

SEPTIMBRE 2024 N°18

BOLETÍN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

ISSN: 2618-1932



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA
PODREDUMBRE DE FRUTOS DE *Cucurbita* EN ZAVALLA,
SANTA FE



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA PODREDUMBRE DE FRUTOS DE *Cucurbita* EN ZAVALLA, SANTA FE

Peruzzo A.M.^{1,2}, Martin E.A.^{1,3}, Pioli, R.N.^{1,2,4}
Capítulo Litoral

1.Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR-CONICET, Zavalla, Santa Fe, Argentina). 2.Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR). 3.Cátedra de Mejoramiento Vegetal y Producción de Semillas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR). 4.Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR)

Contacto: peruzzo@iicar-conicet.gob.ar

RESUMEN

El género *Cucurbita* se ubica entre los diez cultivos más importantes de hortalizas en el mundo y, particularmente, la especie *C. moschata* es uno de los vegetales con mayor aceptación. La podredumbre causada por diversas especies de *Fusarium* está descrita como una enfermedad que afecta los frutos en estadios de pre y postcosecha, con la potencialidad de generar micotoxinas. La correcta identificación de estos patógenos fúngicos es un factor clave para la protección del cultivo y el desarrollo de estrategias óptimas en el manejo de enfermedades. El objetivo de este trabajo consistió en identificar por morfología y secuenciación de una fracción del ADN fúngico un set de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos a partir de frutos sintomáticos cultivados en el Módulo Hortícola del Campo Experimental Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Rosario). El relevamiento de frutos enfermos se realizó sobre diversas accesiones de *Cucurbita* implantadas durante los ciclos productivos 2019-20 y 2020-21. Los postulados de Koch fueron aplicados para el aislamiento e identificación de los patógenos asociados a la sintomatología observada. Del total obtenido, se seleccionaron 15 aislamientos del género *Fusarium*, los cuales se identificaron a nivel de especie en base a caracteres macro y micro-morfológicos y secuenciación de la región ITS. La identidad otorgada a cada uno de los aislamientos consistió en *F. oxysporum* (2i, 5i, 6i, 7i, 9i, 14i), *F. verticillioides* (3i, 4i), *F. solani* (8i, 15i), *F. culmorum* (10i, 13i), *F. equiseti* (1i), *F. graminearum* (11i) y *F. polyphialidicum* (12i). La identificación de las principales especies fúngicas que afectan la producción de calabazas es un punto fundamental para determinar una adecuada estrategia de producción de alimentos hortícolas de calidad e inocuidad para sus consumidores. En este sentido, el presente estudio resulta de gran utilidad en la determinación de germoplasma resistente a la podredumbre blanda (*Fusarium* sp.) y su incorporación en los programas de mejoramiento de *C. moschata* tendientes al desarrollo de una agricultura sustentable.

INTRODUCCIÓN

La salud humana se ve favorecida con la implementación de una dieta saludable, la cual depende de la calidad del alimento que se consume. Los vegetales constituyen un

grupo alimenticio que poseen una alta variedad de nutrientes, requiriéndose al menos una ingesta de 200 g de verduras al día (Verschuren, 2012). El género



Cucurbita se ubica entre los diez cultivos más importantes de hortalizas en el mundo y, particularmente la especie *C. moschata* (conocida como calabaza, calabacita, zapallo anquito o coreanito) es uno de los vegetales con mayor aceptación (Della Gaspera, 2013). Por su parte, investigaciones recientes la posicionan como una especie rica en nutrientes, tales como vitaminas, carotenoides, minerales, fibras y compuestos fenólicos. Además, en el fruto se han detectado una serie de compuestos bioactivos anti-obesidad, diabetes y ciertos tipos de cáncer, lo que le otorga un importante valor medicinal (Men et al., 2021).

Cucurbita moschata es una planta de hábito anual adaptada a ambientes moderados, especialmente en lo relativo a la humedad, por lo que es un cultivo muy propicio para desarrollar en la región sur de Santa Fe. Sus tallos son herbáceos y angulosos, de comportamiento rastrero con la presencia de zarcillos. Las hojas adquieren forma lobulada, con un pecíolo largo característico. Es una especie diclino-monoica, donde sobre una misma planta se desarrollan primero las flores masculinas y, posteriormente, aparecen las flores femeninas, lo que favorece la alogamia. Esto, en combinación con el tamaño del grano de polen, sumado a que las flores femeninas son receptivas por un periodo de pocas horas en las mañanas, hace que el desarrollo de los frutos dependa de la presencia de polinizadores. Sus frutos son suaves y carnosos, indehiscentes y de tamaño variable (Saboo et al., 2013).

Este cultivo se ve afectado por patógenos bacterianos, fúngicos y virales en diversas etapas de su crecimiento y desarrollo, siendo las interacciones planta-patógeno que ocurren sobre el fruto las que impactan directamente sobre el rendimiento (Astorquiza, 2009; Della Gaspera, 2013; Obregón, 2017). La podredumbre blanda causada por diversas especies de *Fusarium* está descripta como una de las enfermedades fúngicas más relevantes,

debido a que afecta frutos en estadios de pre y postcosecha, progresando durante todo el período de almacenaje. Frecuentemente, el síntoma comienza en el extremo cercano al pedúnculo y/o en la zona de contacto directo con el suelo, provocando lesiones de consistencia semiblanda y de aspecto seco. A medida que el patógeno avanza, se observan patrones circulares característicos de micelio fúngico. Según la especie, los esporodocios se observan sobre el fruto como masas húmedas compactas de colores que van desde el rosa al naranja (Astorquiza, 2009; Della Gaspera, 2013). La transmisión del hongo a las semillas puede darse inclusive sobre frutos asintomáticos, constituyendo una forma de diseminación de la enfermedad a gran escala y la introducción del inóculo en nuevos lotes de producción (Moumni et al., 2020). Por su parte, diversas especies de *Fusarium* son productoras potenciales de micotoxinas por lo que la ingesta directa del alimento contaminado puede derivar en enfermedades humanas de diverso tipo, que van desde disfunción hepática y renal hasta falla multiorgánica (Ekwomadu et al., 2021). Por lo antedicho, la correcta identificación de los patógenos fúngicos que afectan el fruto de *C. moschata* es un factor clave para la protección del cultivo y el posterior desarrollo de estrategias óptimas en el manejo de enfermedades. El objetivo de este trabajo consistió en identificar por morfología y secuenciación de una fracción del ADN fúngico (región ITS), un set de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de frutos sintomáticos de las campañas productivas 2019-20 y 2020-21. De esta manera se espera contar con un grupo de patógenos de gran diversidad y virulencia para posteriores análisis de resistencia de accesiones de *C. moschata* obtenidas en el programa de mejoramiento de la especie, desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

Los patógenos fúngicos aislados para este estudio provienen de diversas accesiones de *Cucurbita* que mostraron sintomatología de podredumbre en el fruto. El material vegetal se encontraba implantado en el lote de Producción Hortícola de la Facultad de Ciencias Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO) y el relevamiento se realizó durante las campañas productivas 2019-20 y 2020-21 durante el estadio de floración hasta la formación del fruto. Para el aislamiento e identificación de los patógenos, porciones de tejido del fruto se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos, y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado acidulado al 2% (APD).

Se seleccionaron 15 aislamientos del género *Fusarium*, los cuales se incubaron a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. Cada aislamiento se identificó a nivel de especie en base a caracteres macro (color de micelio aéreo, color de pigmentos difundidos en el agar, entre otros) y micromorfológicos (presencia/ausencia de macro y microconidios, forma de macroconidios, presencia/ausencia de clamidosporas, entre otros) (Peruzzo et al., 2023), utilizando una clave taxonómica específica para el género (Leslie y Summerell, 2006). La identificación molecular se realizó a partir de micelio de 7 días de desarrollo en placas de Petri con APD e incubado en estufa a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. El ADN de cada



aislamiento se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA (Promega) (Peruzzo et al., 2023). La identificación se realizó mediante PCR siguiendo el protocolo de White et al. (1996), utilizando los cebadores ITS1 e ITS4: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR (5 µL por muestra) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñidos con SybrSafe (Sigma-Aldrich) y se visualizaron utilizando el sistema de análisis de imágenes Gel Doc (Bio-Rad). Posteriormente, 10 µL de cada producto de PCR se purificaron mediante un kit exonucleasa I y fosfatasa alcalina, y se realizó la secuenciación capilar del extremo 5'-3' en el Centro Científico, Tecnológico y Educativo Acuario RíoParaná (Santa Fe, Argentina). Las secuencias obtenidas a partir

de los fragmentos de PCR se sometieron a una herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) individual en GenBank a fin de verificar su identidad (Moumni et al., 2020).

Los aislamientos 2i, 5i, 6i, 7i, 9i y 14i se identificaron como *F. oxysporum* y presentaron colonias de color blanco al violeta pálido en APD. Los mismos produjeron pigmento violeta y magenta oscuro en APD. En algunos casos se observaron esporodoquios (pionotes) de color naranja o violeta pálido. La observación bajo microscopio óptico mostró macroconidios ligeramente curvados, con células apicales cónicas y basales con forma de pie y principalmente 3 septos. Se registraron además microconidios sin septos con forma oval o elíptica, agrupados en falsas cabezuelas y desarrollados sobre monofiálides cortas. También se observó la presencia de clamidosporas intercalares en las hifas (Fig. 1).



Figura 1. *Fusarium oxysporum*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios. C. Microconidios libres e *in situ*.

Para el caso de los aislamientos 3i y 4i, caracterizados como *F. verticillioides*, el crecimiento en placas de Petri con medio APD presentó colonias inicialmente blancas, que desarrollaron pigmentos violetas con la edad, y pigmentación de coloración magenta oscuro en el agar. Sobre el micelio se observó la presencia de esporodoquios de color marrón claro a naranja, poblado de macroconidios delgados, ligeramente rectos. Las

células apicales de los macroconidios presentaron cierta curvatura, mientras que las células basales tenían forma de pie. La cantidad de septos varió entre 3 y 5. Los microconidios exhibieron una forma oval y sin septos, unidos formando largas cadenas sobre monofiálides, ocasionalmente de a pares presentando una apariencia de "oreja de conejo" (Fig. 2).



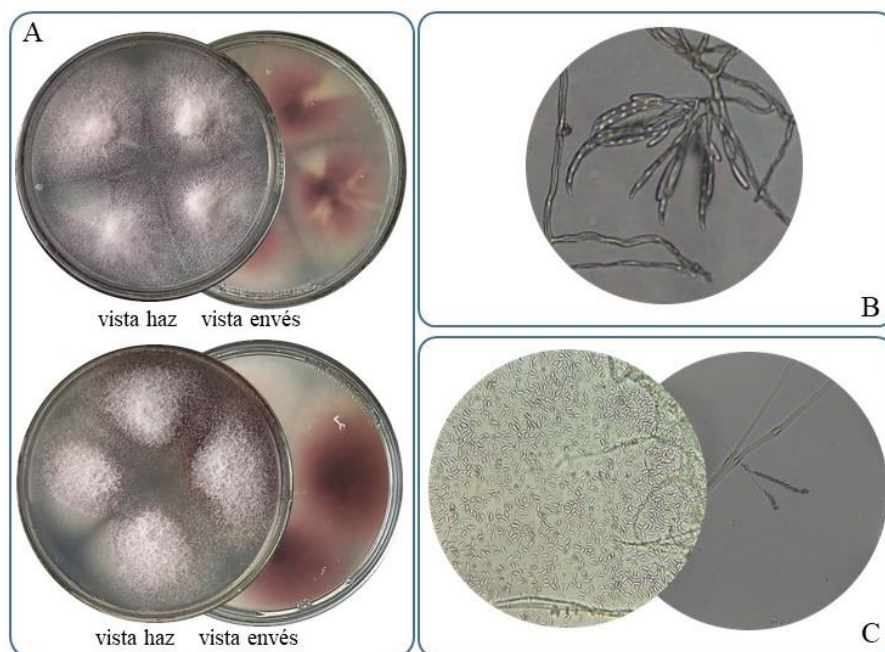


Figura 2. *Fusarium verticillioides*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios. C. Microconidios libres e *in situ*.

El examen microscópico de los aislamientos 8i y 15i, identificados como *F. solani*, mostraron fiálides largas, microconidios ovalados unicelulares y bicelulares y

macroconidios cilíndricos ligeramente curvados, de 3 a 5 septos. En el cultivo en APD estos hongos produjeron micelio de color blanco a crema (Fig. 3).

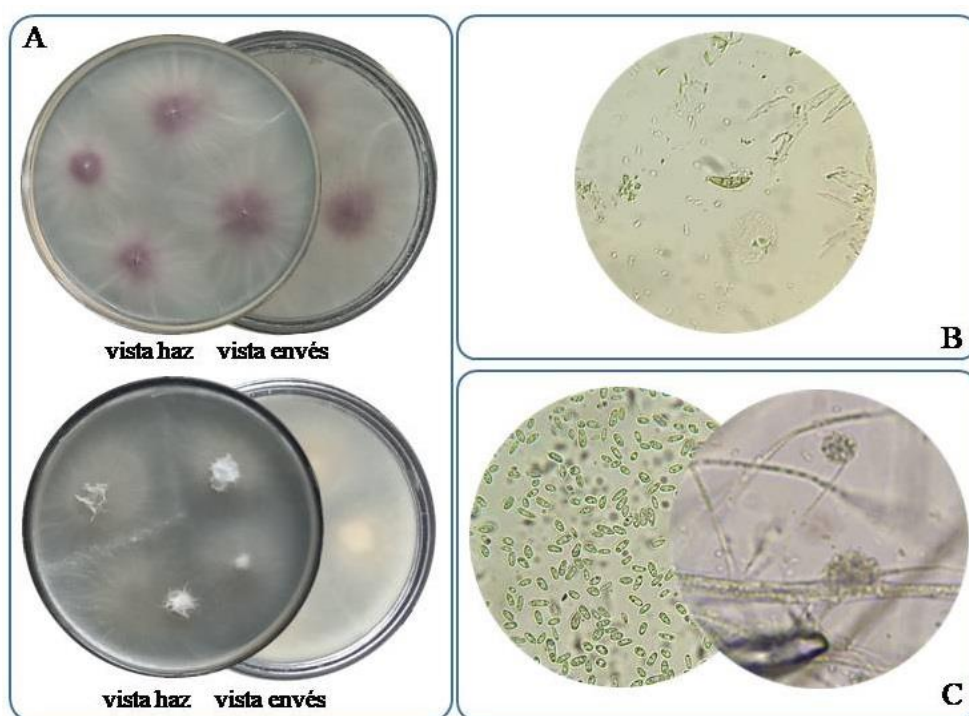


Figura 3. *Fusarium solani*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios. C. Microconidios libres e *in situ*.

La especie *F. culmorum* fue otorgada para los aislamientos 10i y 13i, quienes presentaron colonias de color naranja pálido inicialmente al crecer en APD y se tomaron marrón claras con la edad. Se observaron, en algunos casos, gran cantidad de esporodocios color

naranja en su superficie. Por su parte, formaron pigmentos rojos en el APD. Al observar las estructuras microscópicas se encontraron únicamente clamidosporas sobre las hifas y macroconidios de 3 y 4 septos, robustos, con una célula apical redondeada y



roma y una célula basal sin forma de pie (Fig. 4).

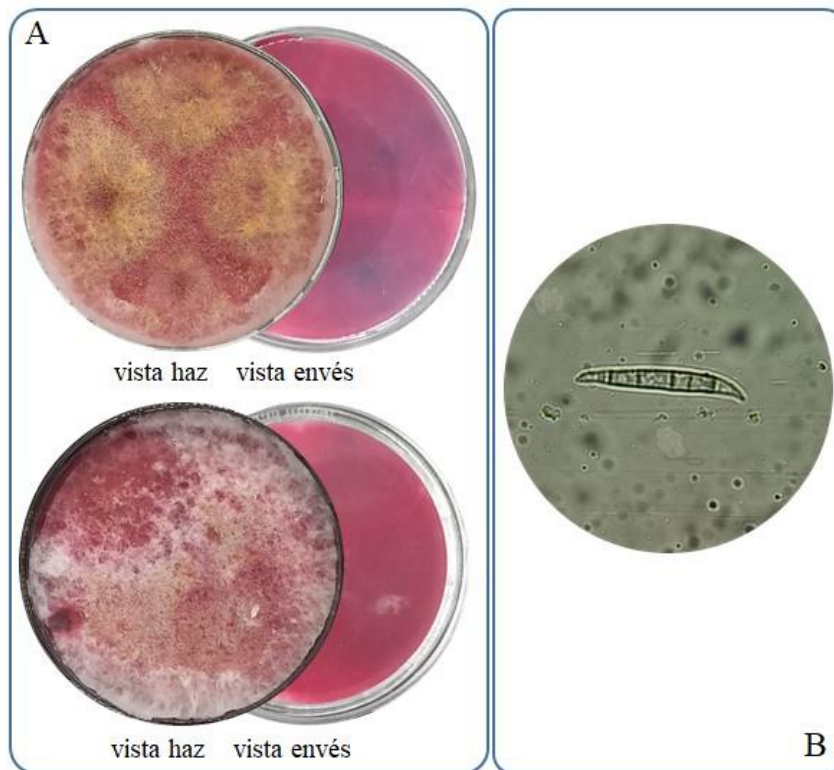


Figura 4. *Fusarium culmorum*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios.

El aislamiento 1i (Fig. 5), caracterizado como *F. equiseti*, presentó únicamente macroconidios en esporodocios de color naranja, con estructuras reproductivas con una importante curvatura y esbeltas, de 5 a 7 septos. Las células apicales presentaron forma

de látigo, mientras que las basales presentaron forma de pie de carácter prominente. Este aislamiento mostró una colonia de color blanco, que se tornó amarillo-marrón con la edad. También se detectó la presencia de paredes gruesas y verrugosas en las hifas.

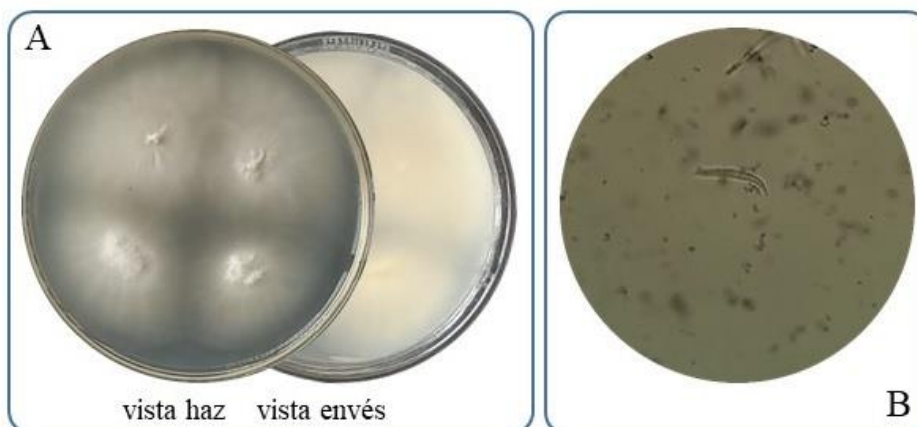


Figura 5. *Fusarium equiseti*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios.

El aislamiento 11i fue caracterizado como *F. graminearum*, el cual presentó una colonia de color rojo carmín y amarillo, con formación de pigmento rojo en el agar. Únicamente se observaron macroconidios esbeltos,

moderadamente curvos y con 5 a 6 septos. Las células apicales se registraron cónicas, con una forma similar a un hocico, mientras que las células basales presentaron forma de pie (Fig. 6).



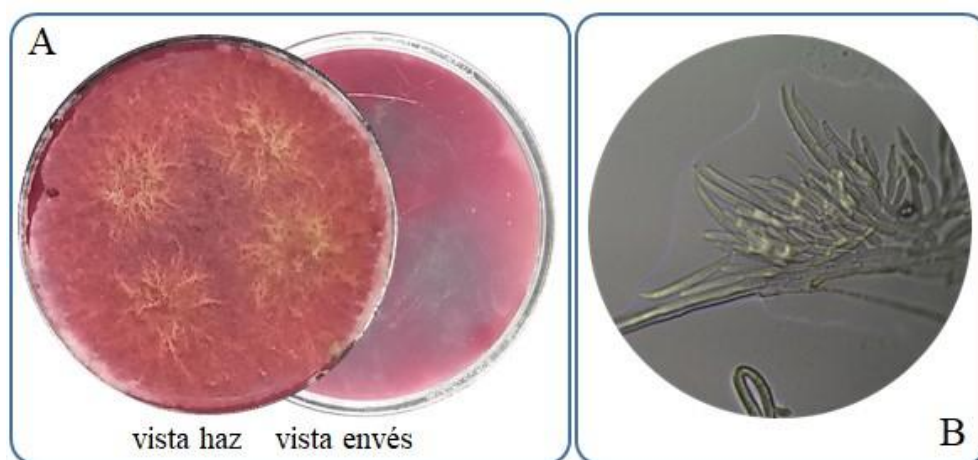


Figura 6. *Fusarium graminearum*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios.

Por último, el aislamiento 12i se identificó como *F. polyphialidicum*, al observar esporodoquios blanquecinos con macroconidios robustos, con células apicales curvadas y basales con forma de pie. Los mismos presentaron de 3 a 7 septos. Los microconidios observados fueron fusiformes y no septados, formados principalmente sobre monofiálides y ubicados de a pares

o en falsas cabezuelas. Se observaron, además, clamidosporas terminales e intercalares de manera esporádica en las hifas. En lo que respecta al micelio, este aislamiento presentó una colonia de color blanco a naranja pálido, que produjo pigmento de color amarillo en APD (Fig. 7).

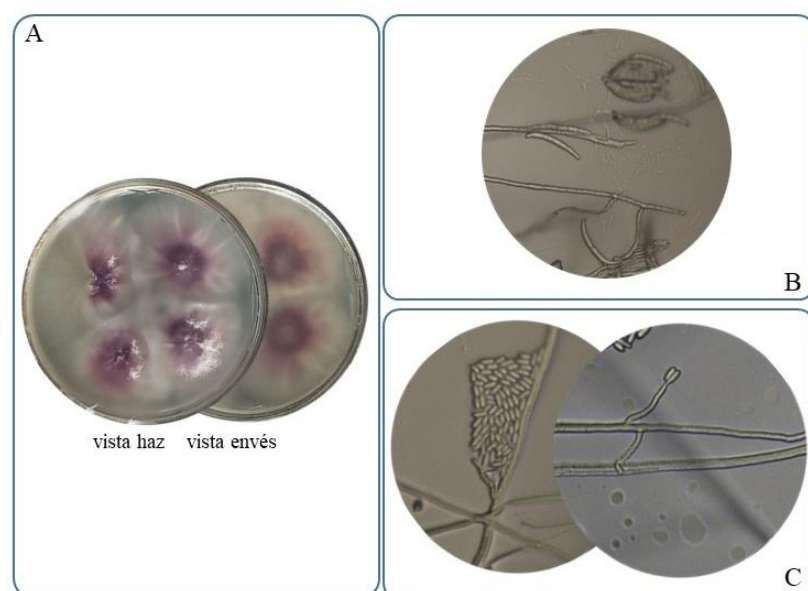


Figura 7. *Fusarium polyphialidicum*. A. Colonias desarrolladas en placas de Petri con medio APD, vista haz y envés. B. Macroconidios. C. Microconidios libres e *in situ*.

La Tabla 1 muestra la identidad otorgada a cada uno de los 15 aislamientos, tanto por caracteres morfológicos como moleculares. El 40% de los aislamientos se identificaron como *F. oxysporum*, el 13,3% como *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. culmorum* respectivamente, y el 6,7% como *F. equiseti*, *F. graminearum* y *F. polyphialidicum* respectivamente. En el caso del aislamiento identificado morfológicamente como *F. polyphialidicum*, la caracterización molecular mostró además un alto porcentaje de similitud con *F.*

subglutinans, especie que produce pigmentos violáceos cuando se la cultiva en PDA y macroconidios más pequeños y angostos que los producidos por *F. polyphialidicum*.

Algunas de las especies fúngicas identificadas en el presente trabajo han sido detectadas previamente en interacción con *C. moschata*, tanto en fruto como en semillas. En el caso de frutos se han identificado las especies *F. oxysporum* (Gbemenou et al., 2022), *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, y *F. solani*



(Della Gaspera, 2013). En semillas de *C. moschata*, Moumni et al. (2020) también detectaron *F. solani*, entre otros géneros fúngicos.

La identificación de las especies fúngicas asociadas a las variedades de calabaza producidas en el Módulo Hortícola de la FCA-UNR, Zavalla, sur de Santa Fe, permitirá determinar una adecuada estrategia de manejo del cultivo, de manera tal de asistir a la producción de

alimentos hortícolas de adecuada calidad e inocuos para sus consumidores. En este sentido, el presente estudio resulta de gran utilidad en la determinación de germoplasma resistente a la podredumbre blanda (*Fusarium* sp.) y su incorporación en los programas de mejoramiento de *C. moschata* tendientes al desarrollo de una agricultura sustentable.

Tabla 1. Identidad de los aislamientos en estudio en función de la caracterización morfológica y la validación molecular por secuenciación de la región ITS.

Aislamiento	Identificación por morfolología	Validación molecular (% similitud, max. score)
1i	<i>F. equiseti</i>	98.54
2i	<i>F. oxysporum</i>	99.80
3i	<i>F. verticillioides</i>	100
4i	<i>F. verticillioides</i>	99.81
5i	<i>F. oxysporum</i>	100
6i	<i>F. oxysporum</i>	100
7i	<i>F. oxysporum</i>	100
8i	<i>F. solani</i>	100
9i	<i>F. oxysporum</i>	100
10i	<i>F. culmorum</i>	99.80
11i	<i>F. graminearum</i>	100
12i	<i>F. polyphialidicum</i>	99.62
13i	<i>F. culmorum</i>	100
14i	<i>F. oxysporum</i>	99.32
15i	<i>F. solani</i>	99.42

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astorquizaga, R.E. 2009. Plagas animales y enfermedades del zapallo y otras especies del género *Cucurbita*. Agricultura 16: 65-68.

Della Gaspera, P. 2013. Manual del cultivo del zapallo anquito (*Cucurbita moschata* Duch.). Buenos Aires. Ediciones INTA. 344 p.

Ekwoyadu, T.I.; Akinola, S.A.; Mwanza, M. 2021. *Fusarium* mycotoxins, their metabolites (free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts. International Journal of Environmental Research and Public Health 18(22): 11741.

Gbemenou, U.H.; Ezin, V.; Ahanchede, A. 2022. Current state of knowledge on the potential and production of *Cucurbita moschata* (pumpkin) in Africa: A review. African Journal of Plant Science, 16(1): 8-21.

Leslie, J.F.; Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa. Blackwell Publishing. 388 p.

Men, X.; Choi, S.I.; Han, X.; Kwon, H.Y.; Jang, G.W.; Choi, Y.E.; Park, S.M.; Lee, O.H. 2021. Physicochemical, nutritional and functional properties of *Cucurbita moschata*. Food Science and Biotechnology 30: 171-183.

Moumni, M.; Allagui, M.B.; Mancini, V.; Murolo, S.; Tarchoun, N.; Romanazzi, G. 2020. Morphological and molecular identification of seedborne fungi in squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). Plant Disease 104(5): 1335-1350.

Obregón, V. 2017. Guía para la identificación de las enfermedades de las cucurbitáceas. 1° Ed. Bella Vista. Ediciones INTA. 35 p.

Peruzzo, A.M.; Pioli, R.N.; Martínez, L.P.; Hernández, F.E.; Cairo, C.A. 2023. Biological relationships among *Fusarium graminearum* s.l. isolates from diverse hosts and environments of Argentina. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 39(2): 217-227.

Saboo, S.S.; Thorat, P.K.; Tapadiya, G.G.; Khadabadi, S.S. 2013. Ancient and recent medicinal uses of cucurbitaceae family. International Journal of Therapeutic Applications 9: 11-19.

Verschuren, W.M.M. 2012. Diet and Cardiovascular Disease. Current Cardiology Reports 14: 701-708.

