The background of the slide is a grayscale micrograph showing several elongated, curved plant cells. These cells have a distinct grid-like structure, likely representing cell walls and internal organelles. The cells are arranged in a somewhat overlapping pattern, with some appearing more in focus than others. The overall texture is organic and detailed.

**SECCIÓN IV:**  
**Diversidad fenotípica de  
aislamientos de *F. graminearum*  
aplicando espectroscopía  
infrarroja con transformada  
de Fourier (FT-IR)**

## SECCIÓN IV: Diversidad fenotípica de aislamientos de *F. graminearum* aplicando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

### INTRODUCCIÓN

#### Fundamentos de la espectroscopía infrarroja aplicada al estudio de sistemas biológicos.

Cuando la materia es expuesta a la radiación electromagnética, ésta puede ser absorbida, transmitida, reflejada, dispersada, o bien puede producirse fotoluminiscencia. Este último término es utilizado para designar diferentes efectos como fluorescencia, fosforescencia y dispersión Raman (Fig. IV.1).

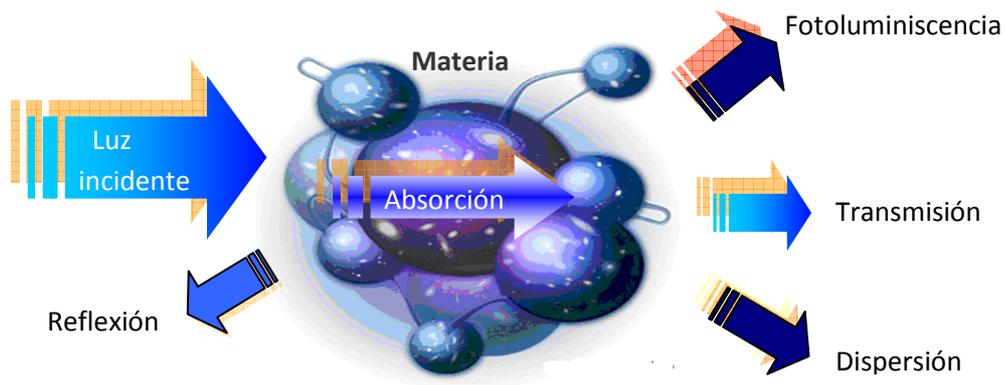
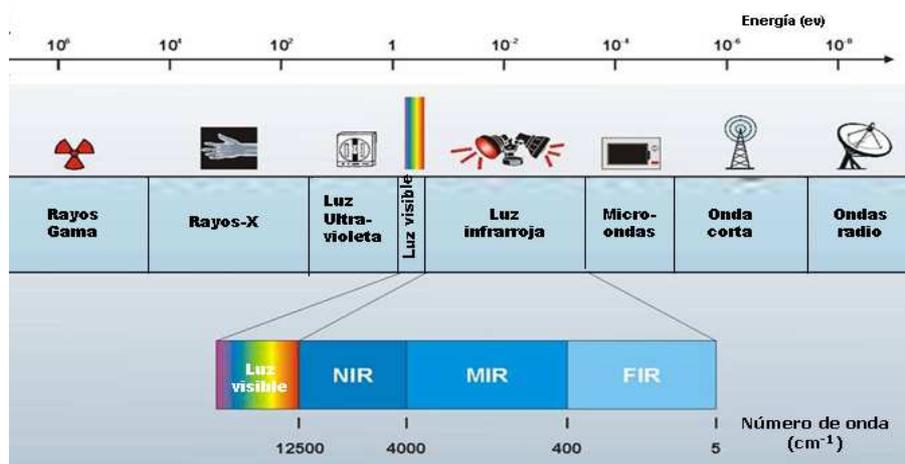


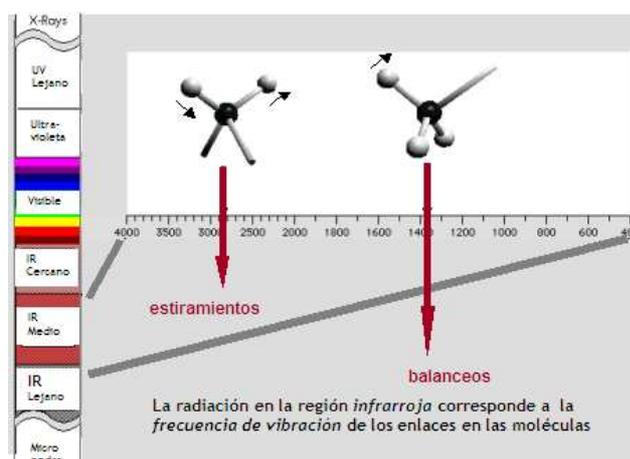
Fig. IV.1. Interacción de la radiación electromagnética con la materia.

Cuando la luz incidente interactúa con la materia y es absorbida surge lo que se conoce como espectroscopía de absorción, que puede ser ultravioleta (UV), visible (V), o espectroscopía de absorción infrarroja (IR), según la energía de la luz incidente. La espectroscopia infrarroja media (MIR) se basa entonces, en la absorción de luz infrarroja ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) por parte de las moléculas (Fig. IV.2). Esta absorción produce la excitación de los estados vibracionales, estiramientos y balanceos y estados rotacionales de algunas moléculas, que poseen una frecuencia de vibración en el rango infrarrojo del espectro electromagnético, como las de vapor de agua.



**Fig. IV.2.** Espectro electromagnético. La región infrarroja está dividida en tres intervalos espectrales: infrarrojo cercano (NIR), mediano (MIR) y lejano (FIR). Las fronteras entre uno y otros son algo arbitrarias, pero están determinadas principalmente por el tipo de tecnología que emplean los detectores y los efectos producidos sobre la materia. La espectroscopía FT-IR emplea la radiación MIR.

Los espectros infrarrojos medios presentarán entonces, bandas debidas a las vibraciones correspondientes a los estiramientos, que ocurren a alta energía y bandas debidas a vibraciones correspondientes al balanceo de los enlaces que ocurren a baja energía (Fig. IV.3).



**Fig. IV.3** Rangos de frecuencias de vibración en la región infrarroja media para los enlaces polares (Tomada de Charles B. Abrams. Perkin Elmer, Argentina, Abrams 1993).

Las absorciones observadas corresponden a los siguientes tipos de estiramiento y balanceo entre los átomos que forman parte de un enlace químico polar.

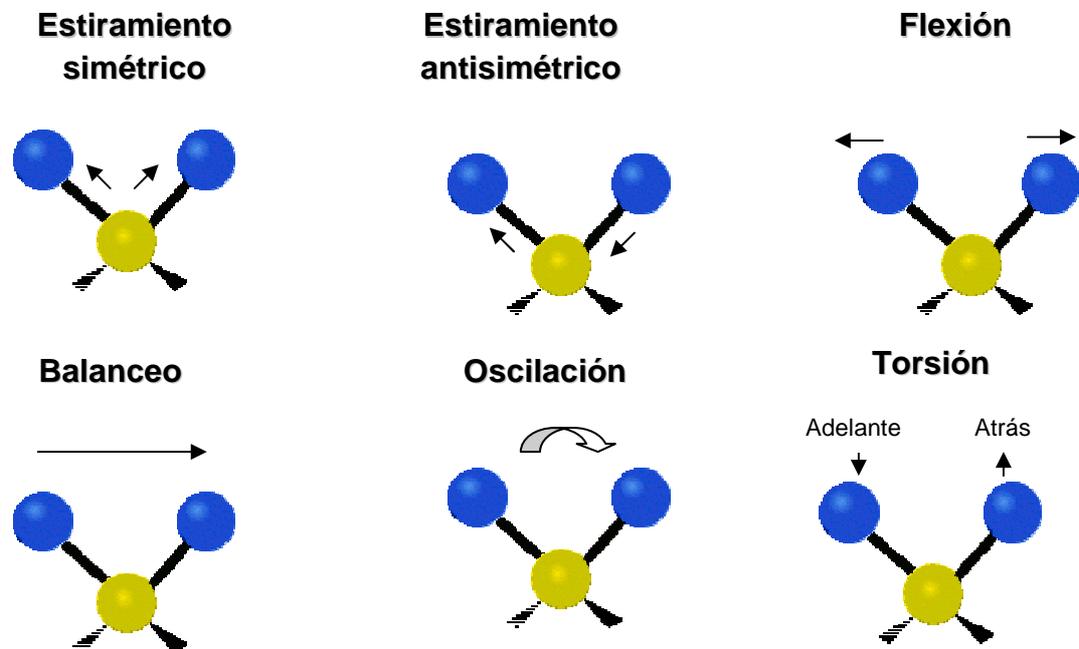


Fig. IV.4. Estiramientos y balanceos producidos por la absorción de luz IR media

### Espectroscopía FT-IR en materiales biológicos complejos

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) aplicada a materiales biológicos proporciona un reflejo de la composición química y estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los materiales biológicos complejos están representados por bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando “huellas digitales” altamente específicas de los mismos (Nichols 1995; Naumann 2000). FT-IR ha sido empleada a nivel mundial en el análisis de fluidos humanos (sangre, suero, orina, líquido sinovial, líquido amniótico, etc.) bacterias, hongos, virus, células individuales, tejidos, secciones de tejidos, etc., lo que ha permitido el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, procesos oncológicos y odontología (Naumann 2000; Naumann 2008). En el caso del estudio de microorganismos los espectros FT-IR revelan una imagen de la composición química de la pared celular,

membranas plasmáticas, citoplasma, biopolímeros y moléculas pequeñas intracelulares. Estos constituyen entonces, una representación del fenotipo, el cual resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación.

Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos complejos se puede hacer una división de los mismos en lo que se denominan ventanas espectrales ( $W_i$ ). La figura VI.5 muestra un espectro típico de una suspensión microbiana deshidratada formando un film sobre una celda de ZnSe en el cual se indican dichas ventanas espectrales y las correspondientes asignaciones a macromoléculas y grupos funcionales más importantes.

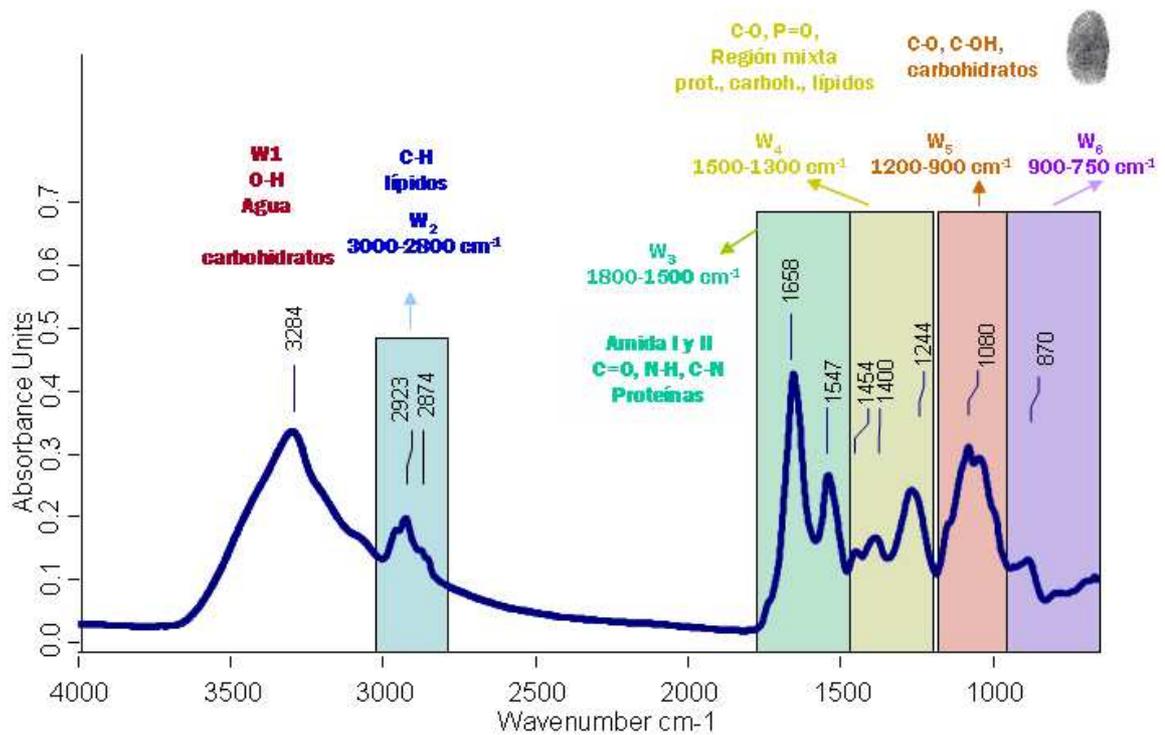


Fig. IV.5. Asignación de los principales grupos funcionales y macromoléculas encontrados en espectros FT-IR de microorganismos. Se indican las seis ventanas espectrales ( $W_1$  a  $W_6$ ) en las que es posible dividir un espectro IR para facilitar su análisis.

A continuación se señalan los grupos funcionales y las principales macromoléculas que es posible identificar en cada una de las ventanas espectrales:

$W_1$ .- Es la región entre 4000 y 3100  $\text{cm}^{-1}$ . Está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al grupo O-H ( $3400 \text{ cm}^{-1}$ ) y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H.

W<sub>2</sub>.- La región 3100 a 2800 cm<sup>-1</sup>, Exhibe las vibraciones correspondientes a los estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>. Aunque dicha región es atribuida por lo general a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas y a fosfolípidos, también se le puede atribuir a vibraciones de cadenas laterales de algunos aminoácidos y carbohidratos (Maquelin 2000; Naumann 2001).

W<sub>3</sub>.- La región entre 1800 y 1500 cm<sup>-1</sup>, es la región denominada Amida I y II. En dicha región se distinguen 3 bandas principales, 1745, 1650 y 1542 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a ésteres, Amida I y Amida II, respectivamente. La banda Amida I (1700-1600 cm<sup>-1</sup>) corresponde al estiramiento del grupo >C=O del enlace peptídico. Esta es la banda más intensa, por lo general, en los espectros de microorganismos (por ser las proteínas un componente importante en la biomasa celular). Además, por ser sensible a los cambios conformacionales del grupo >C=O dentro del enlace peptídico es indicativa de la estructura secundaria de las proteínas en el pool de proteínas totales de los microorganismos. Según la forma que adopte la banda de Amida I, es posible determinar la composición porcentual de proteínas en estructura alfa hélice o hoja beta. En esta ventana se observa la banda correspondiente al estiramiento del grupo >C=O de ésteres (~1740 cm<sup>-1</sup>) presente en lípidos y otras moléculas, y también aunque de mucha menor intensidad, las bandas debidas a los estiramientos de los enlaces >C=O, >C=N, >C=C< presentes en las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos, ADN y ARN.

W<sub>4</sub>.- La región correspondiente al intervalo 1300 y 1500 cm<sup>-1</sup> es la que se denomina región mixta, ya que involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas carbohidratos y ácidos nucleicos. En la región de mayor energía de esta ventana, cercana a 1450-1460 cm<sup>-1</sup> se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. En 1400 cm<sup>-1</sup> es posible observar una banda típica correspondiente al estiramiento simétrico del -COO-. Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm<sup>-1</sup>, se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace >P=O, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres.

W<sub>5</sub>.- La región espectral entre 1200 y 900 cm<sup>-1</sup>, es generalmente dominada por el estiramiento simétrico del grupo PO<sub>2</sub>- correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm<sup>-1</sup>) y fosfolípidos y por una secuencia compleja de picos debidos principalmente a un fuerte acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos (Naumann 2001). Es una región de intensidad significativamente alta en los espectros de hongos (debido a su composición macromolecular), muchas veces más intensa que Amida I.

W<sub>6</sub>.- El intervalo de frecuencias entre 900 y 750 cm<sup>-1</sup>, región de *fingerprint*, exhibe una gran variedad de picos de relativa baja intensidad, pero extremadamente característicos. En esta región resulta muy poco probable poder efectuar una asignación de determinados grupos funcionales a frecuencias de vibración, ya que se encuentran las bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas. Sólo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm<sup>-1</sup> por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del >CH<sub>2</sub> de ácidos grasos.

Debido a la complejidad que surge por la superposición de bandas espectrales provenientes de los distintos componentes celulares mencionados arriba, es necesario aplicar técnicas de aumento de resolución como son la derivada primera o segunda sobre los espectros (se discutirán posteriormente) a fin de lograr una mejor discriminación de los picos que componen las bandas anchas de los espectros de materiales biológicos complejos. Aplicando estas técnicas es posible diferenciar de un espectro con aproximadamente 10–15 bandas anchas como el arriba descrito, un total de 50-70 bandas mas pequeñas que sumadas representan el espectro total.

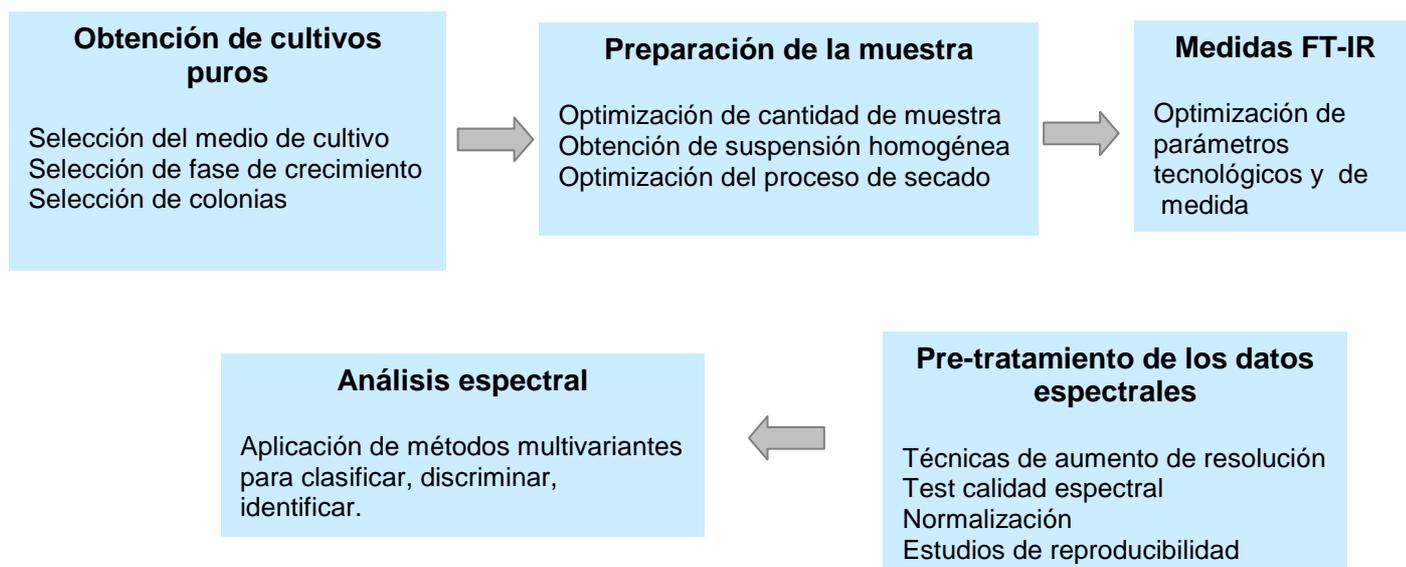
La aplicación de las técnicas de aumento de resolución sobre los espectros FT-IR han permitido además de llevar a cabo una correcta asignación de bandas espectrales a grupos funcionales (Fig. IV.5), conocer la proporción relativa de las principales macromoléculas componentes de los microorganismos o células, y determinar y analizar la presencia de diferentes componentes intracelulares presentes en los mismos (Naumann 2000). Sin embargo, una de las principales aplicaciones del uso de estas técnicas es la discriminación de organismos a nivel de género, especie y cepa.

## Discriminación microbiana

Tradicionalmente la identificación y caracterización fenotípica microbiana se ha llevado a cabo empleando métodos bioquímicos basados en aspectos morfológicos, reacciones enzimáticas características de crecimiento, composición de pared celular, fisiología y serología. Los principales problemas de estas metodologías es que a la vez que resultan tediosas y que insumen considerable tiempo, pueden dar como resultado una caracterización ambigua o incompleta. Con el reciente desarrollo en instrumentación analítica han surgido a nivel mundial en las últimas décadas tecnologías avanzadas aplicadas a la caracterización fenotípica microbiana, las cuales constituyen metodologías rápidas, involucran una mínima preparación de muestra, permiten un análisis automático de una gran cantidad de muestras, e insumen relativamente bajo costo de reactivos. Entre ellas las de mayor desarrollo han sido la pirólisis-espectrometría de masa, la espectrometría de masas sobre los organismos enteros (MALDI-TOF) y las metodologías basadas en espectroscopía vibracional, tales como FT-IR (Helm and Naumann 1995). y espectroscopía Raman con transformada de Fourier (FT-Raman) (Maquelin *et al.*, 2002). Esta metodología tiene como ventaja el hecho de que no requiere prácticamente procesamiento de la muestra, sólo son necesarias cantidades muy bajas de la población microbiana (10-200 µg), son de relativo bajo costo y al ser una técnica no destructiva de aplicación directa permite obtener resultados rápidamente (Helm *et al.* 1991 (a); Naumann 2000; Naumann *et al.* 1991). FT-IR en particular, es actualmente un método bien establecido para la caracterización e identificación de muestras biológicas e investigar composición celular.

En particular FT-IR es una técnica sumamente sensible, razón por la cual, pequeños cambios en la composición de la muestra, o en la adquisición de los datos, producen un efecto significativo en el espectro resultante. La composición de los microorganismos (proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA), depende de un gran número de variables tales como el sistema de cultivo utilizado, la composición del medio de crecimiento, los tiempos de incubación, el pH, la temperatura, etc. Por lo tanto para la adquisición de espectros infrarrojos es de crítica importancia, realizar un procedimiento de estandarización a fin de obtener reproducibilidad en los resultados. Los estudios de caracterización e identificación de muestras biológicas sólo son absolutamente confiables si la preparación y condiciones de medida son perfectamente ajustadas.

A pesar de no existir una respuesta simple y única para responder a todos los requerimientos de estandarización, la necesidad de lograr repetitividad y reproducibilidad, así como también de compartir resultados entre distintos laboratorios, y construir bases de datos de referencia mundial, ha hecho que se desarrollaran protocolos de estandarización que necesariamente deben ser cumplidos. Al respecto han sido publicados diversos protocolos que incluyen estandarización en las condiciones de cultivo de los microorganismos, en la toma de muestra, así como también en el control de los parámetros de adquisición de los espectros (Helm *et al.*, 1991 (a); Lasch *et al.*, 2002; Maquelin *et al.*, 2002; Naumann *et al.*, 1991, (a) y (b)). Si los organismos que se desean estudiar no tienen aún desarrollado a nivel mundial un protocolo de trabajo, será necesario la optimización y estudio de los diferentes parámetros asociados al cultivo, a la lectura y al análisis de los datos obtenidos siguiendo el siguiente esquema experimental IV.1.



Esquema IV.1. Etapas involucradas en la caracterización de microorganismos por espectroscopía FT-IR.

Una vez establecidas las condiciones y procedimientos de estandarización, se deberán registrar los espectros, realizar sobre ellos un pre-tratamiento (obtención de primeras y segundas derivadas), asegurar su calidad espectral a través del test de calidad espectral (QT), asegurar la reproducibilidad espectral (D) dentro de los espectros de una misma clase de organismos, y seleccionar en base a este pre-tratamiento los espectros que constituirán la base de datos de referencia. Esta librería espectral contendrá los espectros que serán considerados como verdaderos

*fingerprint* de los microorganismos a discriminar y sobre ellos se aplicarán las diferentes técnicas multivariantes.

La disciplina que involucra la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos multivariantes a los espectros vibracionales con la finalidad de extraer la información contenida en los mismos (Schmitt, 2002) se denomina quemometría. La quemometría abarca las operaciones correspondientes al pre-procesamiento espectral (que involucra las pruebas de calidad espectral, normalización, la aplicación de técnicas de aumento de resolución), y al análisis espectral empleando técnicas estadísticas multivariantes basadas en metodologías de reconocimiento de patrones tales como el análisis jerárquico de clusters. La aplicación de estos métodos multivariantes permite, a partir de una “nube de datos” (cientos o miles de espectros o sus derivadas), la caracterización, diferenciación y clasificación de poblaciones microbianas.

Uno de los métodos multivariantes más empleados para la discriminación de organismos a diferentes niveles taxonómicos es el análisis de clusters. Este constituye un método sencillo cuyo objetivo principal es establecer similitudes y disimilitudes entre las poblaciones microbianas analizadas mostrando dichas diferencias mediante un dendrograma. Este dendrograma agrupa en clusters los espectros de mayor similitud o semejanza. El procedimiento para realizar un análisis de cluster es el siguiente:

- 1.- Se buscan las principales diferencias entre los grupos de espectros a analizar. Se trata de encontrar ventanas espectrales (regiones marcadas en amarillo en la Fig. IV. 6) donde las diferencias entre los espectros de una misma clase sean mínimas y las diferencias entre clases sean máximas.

- 2.-Se emplean dichos intervalos para calcular el coeficiente de Pearson, o realizar un estudio de componente principal, para establecer la disimilitud entre los grupos o espectros comparados.

- 3.- Finalmente se construye un dendrograma que muestra dichas diferencias o disimilitudes. Para tal fin se pueden emplear o bien el algoritmo de Ward que representará la disimilitud expresada en “heterogeneidad” o Average Linkage, que muestra la disimilitud como “distancia espectral”. Para llevar a cabo estos análisis se emplean diferentes software. Uno de los más ampliamente usados a nivel mundial es el software Opus de Bruker Optics.

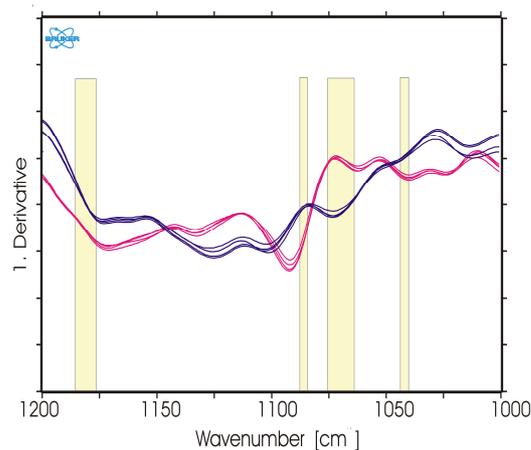


Fig. IV.6. Diferenciación entre dos clases de espectros. Las zonas amarillas son las zonas donde la varianza entre los replicados de cada tipo de muestra (espectros rojos o espectros azules) son mínimas y las diferencias entre las clases (azules de rojas) son máximas.

La identificación rápida y precisa de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* resulta de sumo interés tanto para el control de infecciones, como para el curso de investigaciones epidemiológicas. La caracterización de especies y aislamientos de *Fusarium* spp. ha sido realizada clásicamente sobre la base de sus características morfológicas. Esta técnica en particular resulta tediosa para poblaciones estrechamente relacionadas. Además, la identificación de hongos por observaciones visuales y microscópicas insume generalmente mucho tiempo y experiencia. Alternativamente ha surgido en los últimos 5 años una tendencia a aplicar métodos espectroscópicos como FT-IR para realizar estudios de caracterización e identificación de hongos fitopatógenos de manera sencilla, rápida y a bajo costo. Por ejemplo, Fischer *et al.* (2006) desarrollaron un método sencillo para la preparación de muestras y la identificación de hongos filamentosos por espectroscopía FT-IR. El método se llevó a cabo para diferenciar aislamientos de las especies *Aspergillus* y *Penicillium*. En particular, el grupo de Salman y colaboradores (Israel) y de Nie y colaboradores (China) han realizado investigaciones sobre la aplicación de FT-IR al estudio de la composición química, caracterización e identificación de diferentes géneros y especies de hongos fitopatógenos (Salman *et al.*, 2010; 2012; Nie *et al.*, 2007; a, b). Estos grupos de investigación han aplicado el análisis multivariante en particular a la identificación sistémica de aislamientos de diferentes especies del género *Fusarium*. De modo

que en estos pocos años de investigación en la aplicación de técnicas espectroscópicas y análisis multivariante al estudio de hongos fitopatógenos se logró demostrar el potencial que tienen estas técnicas combinadas para ser empleadas como una herramienta adecuada para la identificación y discriminación de hongos fitopatógenos a nivel de género, especie y cepa. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre la posibilidad de emplear FT-IR para el estudio de la diversidad fenotípica de *F. graminearum*, una especie de suma importancia a nivel local. De poder desarrollarse y estandarizarse una técnica experimental basada en FT-IR que permitiera detectar heterogeneidad en la expresión fenotípica de diferentes aislamientos, obtenidos a campo, de una misma especie, se podrían realizar estudios fenotípicos comparativos, que podrían aplicarse en estudios epidemiológicos y asociarse a la agresividad u origen geográfico de los aislamientos.

## **OBJETIVO**

Analizar la diversidad intraespecífica de aislamientos de *F. graminearum* empleando como herramienta la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) combinada con métodos estadísticos multivariantes.

Comparar la heterogeneidad fenotípica con la diversidad genotípica hallada mediante la aplicación de herramientas moleculares.

Asociar marcadores espectroscópicos a la patogenicidad de los aislamientos locales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Como se indicó previamente, en todo análisis taxonómico basado en el fenotípico microbiano, y en particular empleando FT-IR, es esencial llevar a cabo una estandarización en las condiciones de cultivo (medio de cultivo empleado, pH, temperatura de incubación, etc), preparación de las muestras, parámetros de lectura, etc. Bajo estrictas condiciones de estandarización los espectros obtenidos se asocian a un estado fisiológico del microorganismo, y están constituidos por señales altamente reproducibles.

### **4.1 Material biológico**

En este estudio se emplearon 34 aislamientos de *F. graminearum* (Tabla IV.1). Los aislamientos fueron previamente caracterizados por biología molecular como pertenecientes a diferentes genotipos (ver sección II). Los aislamientos estudiados fueron tomados al azar del total disponible, pero asegurando analizar un número representativo de aislados de cada grupo genético (Tabla IV. 1)

Tabla IV.1. Aislamientos utilizados en el estudio por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Características genotípicas, de patogenicidad y espectroscópicas.

Aislamiento	Localidad	Genotipo (RFLP)	Patogenicidad *		Fenotipo FT-IR
			Buck Halcon	BioINTA 1005	
32A	Oliveros	A			6
32B	Oliveros	A	a, b	a, b	7
32C	Oliveros	A			9
32D	Oliveros	A			10
33A	Oliveros	A			3
33B	Oliveros	A			6
38	Oliveros	A			3
31	Oliveros	B			2
30A	Oliveros	B	d	e	5
30B	Oliveros	B			6
30C	Oliveros	B			2
33C	Oliveros	B			9
44B	Pergamino	B	a, b	a, b	4
66C	Paraná	C	a	b, c	8
66D	Paraná	C			4
67B	Paraná	C			8
67C	Paraná	C	c	d	8
67D	Paraná	C			9
69A	Paraná	C	a	a	8
69B	Paraná	C			6
69C	Paraná	C			6
33	Oliveros	D			4
36A	Oliveros	D			3
36D	Oliveros	D	a, b	a	1
39	Oliveros	D			3
40	Pergamino	D			8
40B	Pergamino	D	b, c	a,b	1
40D	Pergamino	D			1
41	Pergamino	D			8
41A	Pergamino	D			1
41C	Pergamino	D			1
42	Pergamino	D			3
42A	Pergamino	D			3
42B	Pergamino	D			8

\* letras distintas significan diferencias significativas en su agresividad a>b>c>d>e

## 4.2 Cultivos, preparación de las muestras y registro de los espectros

Los aislamientos fueron crecidos sobre agar nutritivo sintético (SNA) durante 10 días. Se cortaron trocitos de 0,5 x 0,5 cm de agar y se emplearon como inóculo de 50 ml de medio líquido caldo papa dextrosa (PDB, Oxoid). Estos cultivos fueron incubados en agitación continua 280 rpm a 30°C, en tre 2 y 7 días. Se tomaron 5 ml de suspensión fúngica. Estas suspensiones fueron centrifugadas por 30 min a 8000 rpm y lavadas 4 veces con agua. El pellet fue suspendido en diferentes volúmenes de agua de manera de contar con diferentes concentraciones celulares que permitieran llevar a cabo la optimización de la cantidad de biomasa a emplear en los estudios FT-IR.

Para algunos de los aislamientos se observó que al cabo de 3 días los cultivos constituían suspensiones heterogéneas, por lo fue necesario llevar a cabo una homogenización antes del estudio espectroscópico. Se ensayaron diferentes alternativas para obtener suspensiones homogéneas. Entre ellas, la aplicación de unos segundos de agitación empleando un vórtex o sonicación en baño de agua (Cleanson, Argentina) empleando diferentes tiempos (10 y 15 min).

Tal como lo indican los protocolos experimentales internacionales empleados en general para cultivos bacterianos o de levaduras, 100 µl de la suspensión homogénea de microorganismos fueron transferidas a celda de ZnSe y secadas en la estufa a 60°C durante 30 min para luego terminar su secado al aire (30 min aproximadamente) hasta obtener un film sobre la celda de ZnSe (Fig. IV.7) (Helm and Naumann 1995; Naumann 2000).

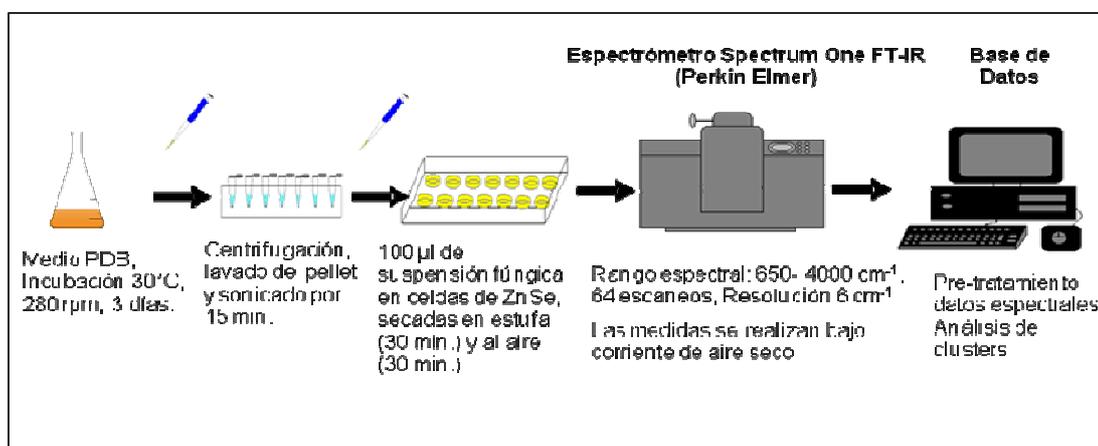


Fig. IV.7. Esquema representando la preparación de las muestras y registro de espectros FT-IR.

Los espectros de absorción de FT-IR fueron adquiridos con un espectrómetro FT-IR Spectrum One (Perkin-Elmer Instruments, EEUU). Se registraron en el rango de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución espectral de 6  $\text{cm}^{-1}$ . Cada espectro resultó el promedio de 64 escaneos. Para evitar interferencias debidas a bandas rotacionales del vapor de agua, las medidas se realizaron bajo corriente de aire seco.

### 4.3 Pre-tratamiento y análisis de los datos

#### 4.3.1 Obtención de derivadas y test de calidad espectral (QT)

Antes de comenzar con el análisis espectral, tal como se indicó en el esquema IV.1, se realizó un pre-procesamiento de datos espectrales. El mismo consistió en el cálculo de la primera y segunda derivada de cada uno de los espectros originales. Estas fueron calculadas usando el algoritmo de Savitzky-Golay con nueve puntos de suavizado (*smoothing*). El cálculo de las derivadas permite incrementar la resolución de las bandas espectrales y al mismo tiempo evitar los problemas debidos a diferencias en la línea de base de los espectros. Sobre los espectros originales y sus derivadas se realizó el test de calidad espectral (QT). Esta fue evaluada a través de la medición o el cálculo de los siguientes parámetros espectrales:

(a) Amplitud de absorbancia de la banda de Amida I. Se calcula la diferencia entre la máxima y mínima absorbancia entre 1800 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  ( $\Delta A$ ): esta amplitud debe tomar un valor comprendido en el rango de 0,345 a 1,355. En este rango se asegura que la señal IR no satura el detector.

(b) Medición del ruido ( $r$ ): Se calcula la diferencia entre el máximo y mínimo valor de la 1<sup>er</sup> derivada de los espectros en la región 2100 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Se elige este intervalo para el cálculo del ruido ya que en él no se registran absorbancias asociadas a componentes celulares o macromoléculas. Dicha diferencia deberá ser  $< 1.5 \times 10^{-4}$ .

(c) Cálculo de la relación señal / ruido

Señal  $S_1$ : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1800  $\text{cm}^{-1}$  y 1600  $\text{cm}^{-1}$  (absorción de proteínas).

Señal  $S_2$ : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $960\text{ cm}^{-1}$  (absorción de carbohidratos)

Se calculó la relación señal / ruido entre los respectivos valores de  $S_1$  y  $S_2$  y el valor del ruido ( $r$ ) obtenido según el punto (b). Estas relaciones deberán ser mayores a 100 y 20 respectivamente.

(d) Medición de la señal del vapor de agua ( $v_a$ )

La contribución del vapor de agua en los espectros se evaluó en el intervalo  $1847\text{-}1837\text{ cm}^{-1}$  de manera de estimar la absorbancia de uno de los picos más característicos de los estados rotacionales del vapor de agua ( $1844\text{ cm}^{-1}$ ). Se utilizó también para el cálculo de la contribución del vapor de agua la derivada de los espectros calculando la amplitud en dicho intervalo donde la diferencia entre el máximo y mínimo debió ser  $< 3 \times 10^{-4}$ . Este valor garantiza que la presencia de las bandas rotacionales del vapor de agua no interferirán en la evaluación de los espectros

(e) Relación señal / vapor de agua ( $S/v_a$ )

Con los valores de señales determinados en el punto (c) y el valor de la señal de vapor de agua del punto (d), se calcularon las relaciones  $S_1/v_a$  y  $S_2/v_a$ . Para asegurar que las señales correspondientes al vapor de agua no van a interferir en los cálculos posteriores éstos no deberán superar el valor de 50 y 10 respectivamente.

Tabla IV.2. Test de Calidad espectral (QT)

Parámetro	Región ( $\text{cm}^{-1}$ )			
	1800- 1600	1200- 960	2100-2000	1847- 1837
$\Delta A$ mínima	0,345			
$\Delta A$ máxima	1,245			
Ruido			0,00015	
Señal <sub>1</sub> / Ruido	10	20		
Señal <sub>2</sub> / Ruido	50	10		
Vapor de agua				0,0003
Señal/ Vapor de agua	50	10		

El QT, así como las derivadas, se llevaron a cabo empleado el software Opus (version 4.2; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania). Al aplicar el test de calidad sobre un espectro el mismo puede dar como resultado sólo dos valores posibles: QT=1, si el espectro cumple con el 100 % de los parámetros evaluados, o QT=0, si al menos uno de los parámetros no resulta en el rango esperado (Tabla IV.2). Sólo los espectros cuyo QT=1 con todos los parámetros del test de calidad aceptados serán considerados aptos para ser incluidos en la base de datos espectrales de referencia.

La librería o base de datos espectrales se construyó con no menos de 3 espectros, obtenidos de no menos de 3 cultivos independientes, y sus correspondientes derivadas segundas para cada aislado. El hecho de incluir microorganismos obtenidos de cultivos independientes asegura considerar las posibles fuentes de variación debidas al crecimiento de los microorganismos, así como también las ocasionadas por el procedimiento de muestreo (Bruker, Manual)

#### **4.3.2. Normalización vectorial**

Si bien como norma primordial de trabajo se establece que todos los espectros a comparar deben provenir de la misma cantidad de biomasa celular, la normalización es siempre necesaria para compensar posibles errores. Sin embargo es posible llevar a cabo diferentes tipos de normalización según la aplicación. De todas ellas, en este trabajo se realizó la normalización vectorial en todo el rango espectral ( $3800 - 750 \text{ cm}^{-1}$ ) empleando la función correspondiente en el software Opus 4.0.

#### **4.3.3. Reproducibilidad**

Una vez optimizados todos los parámetros descritos en cuanto a la toma de muestra y las medidas de los espectros, de manera que los mismos superen el QT, antes de emplearlos en cualquier análisis de caracterización y/o identificación, se analizó la reproducibilidad obtenida para los espectros registrados de cada uno de los aislamientos analizados. A fin de cuantificar o parametrizar la reproducibilidad se calculó la varianza espectral entre replicados obtenidos de un mismo cultivo y de

cultivos independientes. En este trabajo se utilizó el cálculo de la distancia espectral (D), como parámetro para describir el nivel de reproducibilidad (Helm *et al.*, 1991; Naumann *et al.*, 1991), el cual proporciona la varianza normal del sistema en estudio.

Para darle valores cuantitativos a los límites de reproducibilidad, se utilizó un parámetro objetivo que describe y compara las medidas, denominado coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{y_1y_2}$ ). Este constituye la correlación entre pares de espectros y se calcula a través de la ecuación:

$$r_{y_1y_2} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{1i}y_{2i} - n\overline{y_1}\overline{y_2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n y_{1i}^2 - n\overline{y_1}^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_{2i}^2 - n\overline{y_2}^2}}$$

Donde  $y_{1i}$  y  $y_{2i}$  son los valores de las absorbancias individuales de dos espectros a ser comparados; n representa el número de puntos en la región donde se realiza el cálculo y  $y_1$  e  $y_2$  representan el valor de la media aritmética entre  $y_1$  y  $y_2$ .

Este coeficiente de correlación se calcula para cada uno de los pares de espectros utilizando la segunda derivada en la región 1200– 900  $\text{cm}^{-1}$ , obteniéndose una matriz de coeficientes de correlación. Con esta matriz se construye un dendrograma aplicando el algoritmo Av. Linkage. Los valores de fusión obtenidos para el dendrograma generado correspondieron a las distancias espectrales (D). Empleando la distancia espectral media y calculando la varianza espectral se define el nivel de reproducibilidad espectral (RL). Así, los niveles de reproducibilidad entre los replicados de cada aislamiento fueron calculados como la distancia promedio  $D \pm 2 DS$  de la distancia espectral, la cual constituye una medida de disimilitud (Helm *et al.*, 1991; Rebuffo *et al.*, 2006). El software OPUS (version 4.0; Bruker Optics GmbH) fue usado para calcular los valores D promedio, las desviaciones estándar y la varianza para los diferentes rangos espectrales.

#### **4.3.4. Quemometría. Aplicación de métodos estadísticos multivariantes. Análisis de clusters (CA) y construcción de dendrogramas**

Dentro de los métodos multivariantes empleados en estudios de discriminación como el Análisis de Componente Principal (PCA), Análisis Discriminante Lineal (LDA), entre otros, en este trabajo se aplicó el análisis de cluster (AC). Para ello se empleó el software Opus, versión 4.0. Se utilizó el coeficiente de Pearson para establecer las disimilitudes entre los grupos en diferentes ventanas espectrales. Para la construcción del dendrograma se ensayaron diferentes ventanas espectrales y se eligió la combinación de ventanas que arrojan la máxima discriminación entre aislamientos y la mínima entre replicados de un mismo aislamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien en los últimos años se han realizado algunos trabajos de caracterización de hongos fitopatógenos en el campo de la espectroscopia, es muy poco lo que se ha realizado con organismos del género *Fusarium* spp. y en particular con aislamientos de la especie *F. graminearum*. De modo que se debió realizar en una primera etapa de nuestra investigación, una estandarización y puesta a punto de la estrategia a emplear que permita la discriminación de nuestra colección de aislados en diferentes fenotipos (medio de cultivo empleado, tiempo de cultivo, cantidad de muestra a analizar, condiciones de lectura, estudios de reproducibilidad o varianza entre replicados de un mismo aislamiento).

### 4.4 Estandarización de la metodología

#### 4.4.1 Selección de la metodología

Los trabajos previos realizados para la caracterización e identificación de hongos fitopatógenos se ha llevado a cabo o bien por reflexión total atenuada (ATR-FT-IR) (Salman *et al.*, 2010; 2011; 2012) o a través de la tecnología del micelio seco mezclado con KBr y formulado en pastillas que luego se miden por Transmisión/Absorción (Nie *et al.*, 2007 a; b). Trabajos bibliográficos reportan la discriminación a nivel de género de hongos fitopatógenos. En este trabajo se propone el empleo de la técnica de film seco. Esta es una metodología muy sencilla, ampliamente empleada para la identificación de bacterias y levaduras (Fischer *et al.*, 2006, Naumann 2000). La misma consiste en preparar una suspensión celular de concentración adecuada que es depositada sobre una celda de ZnSe, se seca, y el film formado sobre la celda se mide en un espectrómetro convencional por transmisión.

#### 4.4.2. Medio de cultivo

Uno de los parámetros más difíciles de optimizar en el empleo de la tecnología FT-IR es el medio de cultivo a emplear para la preparación de las muestras. Los estudios de discriminación de hongos filamentosos deben realizarse

o bien empleando micelio, o bien esporas, pero no con mezclas de ambos tipos celulares. En la presente investigación, se ensayaron distintos medios y condiciones de cultivo para obtener una suspensión de micelio: 1) se ensayó la recolección de micelio desde una placa con agar papa glucosado y resuspenderla en agua estéril (Erukhimovitch *et al.* 2005), 2) se probó el empleo de cultivos en medio líquido papa glucosado elaborado en nuestro laboratorio incubado a 30°C, bajo agitación continua durante distintos períodos de tiempo (2 a 7 días). Estos cultivos generaban suspensiones de micelio turbias debido a los restos de medio de cultivo que no podían ser separados del micelio, que interferían luego en la lectura de los espectros. Por lo que se ensayó una tercer opción, 3) que fue la adoptada finalmente, consistiendo en el empleo de cultivos líquidos en medio papa glucosado comercial (Oxoid) incubado por 3 días a 30°C, bajo agitación continua. En esas condiciones de cultivo las suspensiones celulares eran límpidas y estaban constituidas en un 100 % por micelio.

#### **4.4.3 Preparación de una suspensión homogénea y secado de las muestras**

Para los aislamientos de *F. graminearum* analizados, se observó que debido a las características de la muestra no era posible aplicar directamente la suspensión sobre la celda de ZnSe, debido a que la suspensión fúngica en muchos casos constituían sistemas heterogéneos. Al secar este tipo de suspensión sobre la celda de ZnSe, el film formado no quedaba homogéneo sino con partículas en las cuales la luz IR refleja y el espectro obtenido resultaba totalmente distorsionado. Para evitar la formación de films heterogéneos se ensayó una agitación en vortex y una sonicación en baño de agua por diferentes tiempos (10, 15 min). Finalmente, se decidió sonicar empleando baño de agua las muestras durante 15 min.

Luego de diversos tratamientos, también se comprobó que los mejores films sobre las celdas de ZnSe se obtienen cuando las muestras se secaban por 30 min en estufa y luego 30 min al aire, tal como se indica en materiales y métodos.

De modo que teniendo en cuenta nuestros resultados y los trabajos reportados previamente, se procedió al análisis de todos los aislamientos indicados en la Tabla IV.1 empleando el procedimiento indicado en la Figura IV.7.

#### 4.5 Análisis de la composición química

La Figura IV.10 muestra espectros provenientes de 3 aislamientos de *F. graminearum*, cultivados bajo las condiciones estandarizadas indicadas previamente. En la figura se señalan los principales picos asociados a los grupos funcionales y macromoléculas mencionadas anteriormente (fig. IV.5). Estos espectros presentan el aspecto típico observado en los espectros FT-IR de hongos filamentosos y en particular muestran gran similitud a los reportados por otros organismos del género *Fusarium* previamente reportados (Nie *et al.*, 2007; Salman *et al.*, 2012). Los mismos muestran una banda dominante en la región de carbohidratos (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) con una importante contribución de los picos en 1076  $\text{cm}^{-1}$  y 1150  $\text{cm}^{-1}$  debido al estiramiento C-O de la quitina (Nie 2007; Salman 2012) y 1028 y 1151  $\text{cm}^{-1}$  asignadas al estiramiento C-O del glucógeno (Naumann 2000). Pueden observarse también las típicas bandas de Amida, Amida I 1640  $\text{cm}^{-1}$  y Amida II 1546  $\text{cm}^{-1}$ , con relativa baja intensidad, tal como fue reportado para organismos pertenecientes a la especie *Fusarium* (Nie *et al.*, 2007; Salman *et al.*, 2011). Sin embargo, uno de los aspectos más interesantes para resaltar en los espectros analizados constituye las bandas asignadas a la presencia de lípidos. Estas son: la región  $W_2$  (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ) asignada a estiramientos antisimétricos y simétricos del C-H (específicamente 2853 y 2922  $\text{cm}^{-1}$ ) y un banda intensa a 1742  $\text{cm}^{-1}$  debido a la absorción de grupos  $>\text{C}=\text{O}$  presentes en ésteres de fosfolípidos (Naumann 2000). En concordancia con resultados recientemente publicados (Salman *et al.*, 2011) la gran mayoría de los espectros de los aislados locales de *Fusarium* presentan un aumento relativo en la intensidad de las bandas asociadas a lípidos (1742  $\text{cm}^{-1}$ ), respecto a las bandas de Amida I y II. Estas características espectrales son las descritas como distintiva para el género *Fusarium* en comparación a otros géneros como *Rhizoctonia*, *Colletotrichum* y *Verticillium* con mayor predominio de Amida I y II frente a la de  $>\text{C}=\text{O}$  en ésteres.

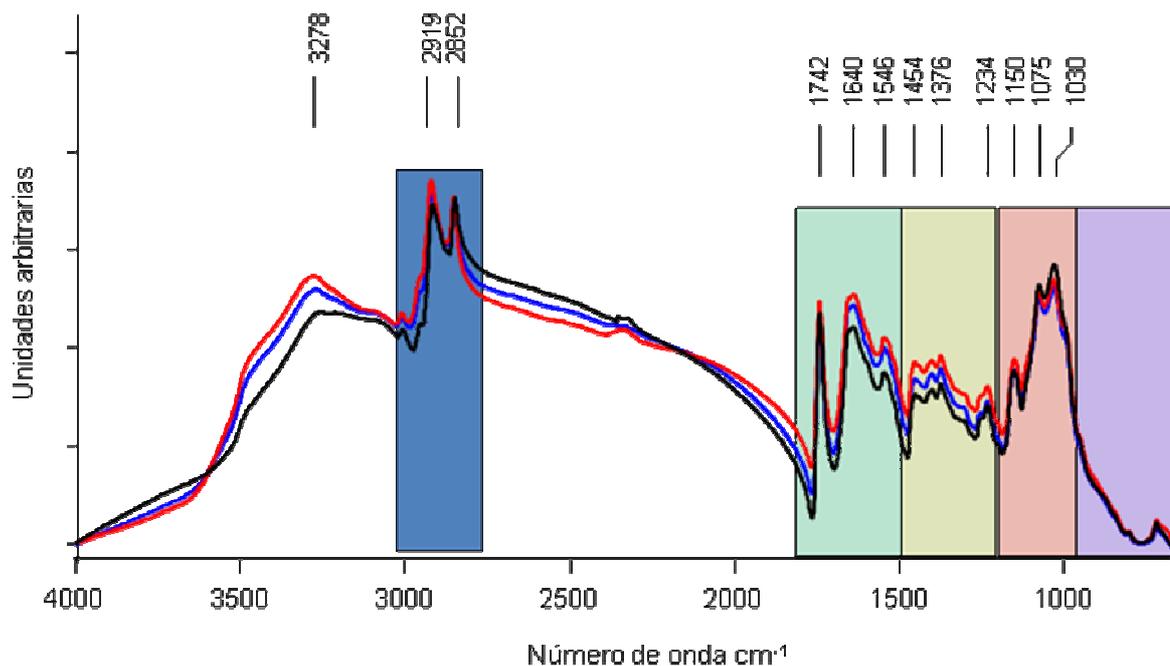


Fig. IV.10 Espectros FTI-IR de 3 aislamientos de *Fusarium graminearum* locales. Las regiones indicadas en colores corresponden a las ventanas espectrales W<sub>2</sub> a W<sub>6</sub> indicadas en métodos.

La superposición de los espectros de los aislamientos estudiados presentó gran similitud (fig. IV.10) en la mayoría de las regiones espectrales. La forma de las bandas asociadas a lípidos, proteínas y carbohidratos fue similar, debido a la alta similitud intrínseca que existe entre los aislamientos de la misma especie. Sin embargo, se pudieron observar algunas diferencias en las intensidades principalmente de las bandas en las regiones de lípidos y proteínas. Sólo a modo de ejemplo, la Figura IV.11 muestra los espectros IR correspondientes a dos aislamientos con diferentes propiedades patogénicas, el 66C con elevada agresividad y el 30 A con baja agresividad (ver Tabla IV.1). Si bien la intensidad de los grupos >C=O de ésteres mostró ser semejante, los espectros del aislamiento más agresivo (66C), mostró en la ventana representada por las bandas asignada a los lípidos (3000-2800 cm<sup>-1</sup>) un aumento significativo de los picos asociados al estiramiento simétrico y antisimétrico de C-H en CH<sub>2</sub>, lo que podría indicar un contenido relativo alto de lípidos de cadena larga. Asimismo el aislamiento menos agresivo (30A) muestra un aumento relativo del contenido proteico (Amidas I y II).

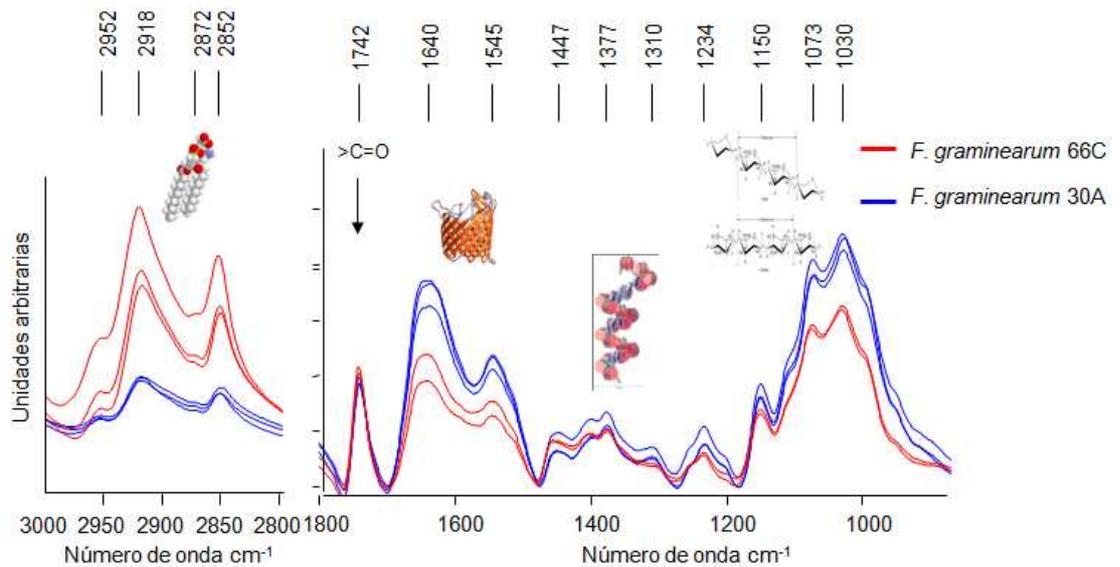


Fig. IV.11. Diferencia en la composición macromolecular de aislamientos con diferentes propiedades patogénicas. En aislamiento de menor agresividad 30A (azul) muestra mayor contenido relativo en proteínas y menor en lípidos que el de mayor agresividad 66C (rojo)

Estas diferencias encontradas en los componentes estructurales como lípidos y proteínas, sí bien son evidentes en varios de los aislamientos estudiados, sus orígenes son aún desconocidos y resulta muy difícil explicar con exactitud las diferencias espectrales observadas. Un comportamiento similar fue reportado para cepas de *F. oxysporum* en un estudio realizado con 5 aislamientos, donde se reportaron diferencias en las intensidades relativas de las bandas presentes en la región 1750-1250  $\text{cm}^{-1}$  (Salman *et al.*, 2011). Si bien sería necesario realizar estudios más detallados y extensos que permitan caracterizar y asociar la composición química de los aislamientos con su diferente patogenicidad, es importante notar el potencial de la técnica espectroscópica para la detección fiable de estos marcadores espectrales (alto contenido en lípidos, proteínas, etc). De poder confirmarse la existencia de una asociación entre los marcadores espectroscópicos y la patogenicidad de los aislamientos, esta técnica podría ser un instrumento para la rápida detección de cepas patógenas.

#### 4.6 Discriminación fenotípica intraespecífica

Como fue mencionado anteriormente, para llevar a cabo un estudio de diferenciación o discriminación a nivel de género, especie o cepa es necesario primeramente evaluar la reproducibilidad o varianza entre los espectros replicados obtenidos para cada uno de los aislamientos a estudiar. A modo de ejemplo la Figura IV.12 muestra la derivada segunda de los espectros replicados obtenidos de tres aislamientos de *F. graminearum* en la ventana espectral 1200-750  $\text{cm}^{-1}$ . El nivel de reproducibilidad (RL) entre los replicados de cada aislamiento se calculó como la distancia espectral media (D)  $\pm$  2 desviaciones estándar (Helm *et al.*, 1991, Rebuffo, 2006). Este valor representa una medida de la disimilitud entre los replicados para un mismo aislamiento. El valor de varianza o nivel de reproducibilidad más elevado obtenido entre replicados en todos los aislamientos estudiados fue  $\text{RL} = 25,2 \pm 11,85$  correspondiente el aislado 67B (Tabla IV.3). Teniendo en cuenta esta reproducibilidad o varianza máxima encontrada, dos espectros de *F. graminearum* fueron considerados como indistinguibles (pertenecientes al mismo fenotipo) por espectroscopia FT-IR cuando el nivel de reproducibilidad en la ventana 1250-900  $\text{cm}^{-1}$  calculado para ellos fue menor que 38.

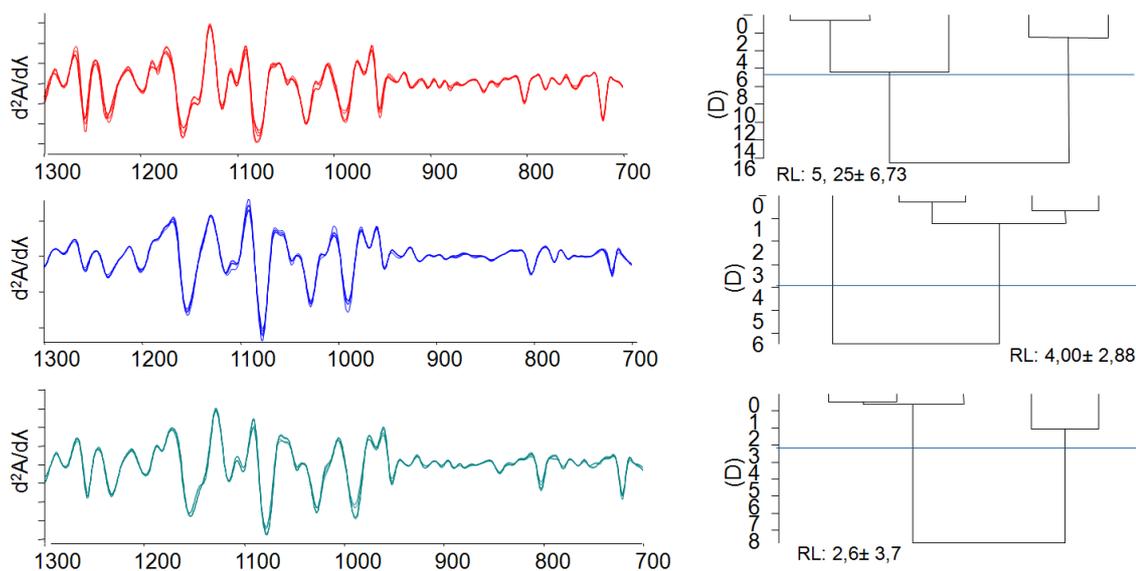


Fig. IV.12. Disimilitud entre espectros replicados. Nivel de reproducibilidad (RL = D media  $\pm$  2 desv. estándar) obtenido para 3 aislamientos de *F. graminearum*. La disimilitud entre los replicados de cada aislado fue calculada empleando el coeficiente de Pearson en la derivada segunda de los espectros replicados en el rango espectral 1250-900  $\text{cm}^{-1}$ . La D media corresponde al valor de fusión medio obtenido en el dendrograma construido mediante la aplicación del algoritmo "Average Linkage" (software OPUS, Bruker Optics).

**Tabla IV.3** Niveles de reproducibilidad calculados como valores de D en el rango espectral 1250-900  $\text{cm}^{-1}$

Nombre del aislamiento	Número de replicados	D máxima (obtenida del dendrograma)	Nivel de reproducibilidad D media $\pm$ 2 desv. estándar
39	5	16	9,75 $\pm$ 6, 1
36	4	30	22,3 $\pm$ 13,8
41	5	18	12,1 $\pm$ 8,5
69	8	30	17,6 $\pm$ 13,1
67B	4	12	25,2 $\pm$ 11,8

En las secciones anteriores se estudió la diversidad de los aislamientos de *F. graminearum* a través de diferentes métodos genotípicos (sección II) y en relación a la patogenicidad (sección III). Con el fin de obtener una mayor comprensión de la diversidad bioquímica de este grupo de aislamientos locales se analizó la variabilidad fenotípica a través de sus espectros FT-IR. La Figura IV.13 muestra 4 replicados de espectros FT-IR de 3 aislamientos de *F. graminearum* (40D, 33 y 39). Si bien como se indicó previamente los espectros tienen aspectos similares, al aplicar una técnica de aumento de resolución como la derivada segunda y una normalización vectorial en todo el rango espectral se observan diferencias significativas en los patrones obtenidos (Fig. IV.13 a y b). Como era de esperar, la Figura IV.13 b muestra a través de las derivadas segundas correspondientes a los replicados de un mismo aislamiento una alta reproducibilidad (variación muy pequeña entre replicados), mientras que se observaron diferencias claramente significativas en las características generales de las derivadas segundas entre los aislamientos en el rango espectral correspondiente a  $W_4$  y  $W_5$  (Fig. IV.13 b).

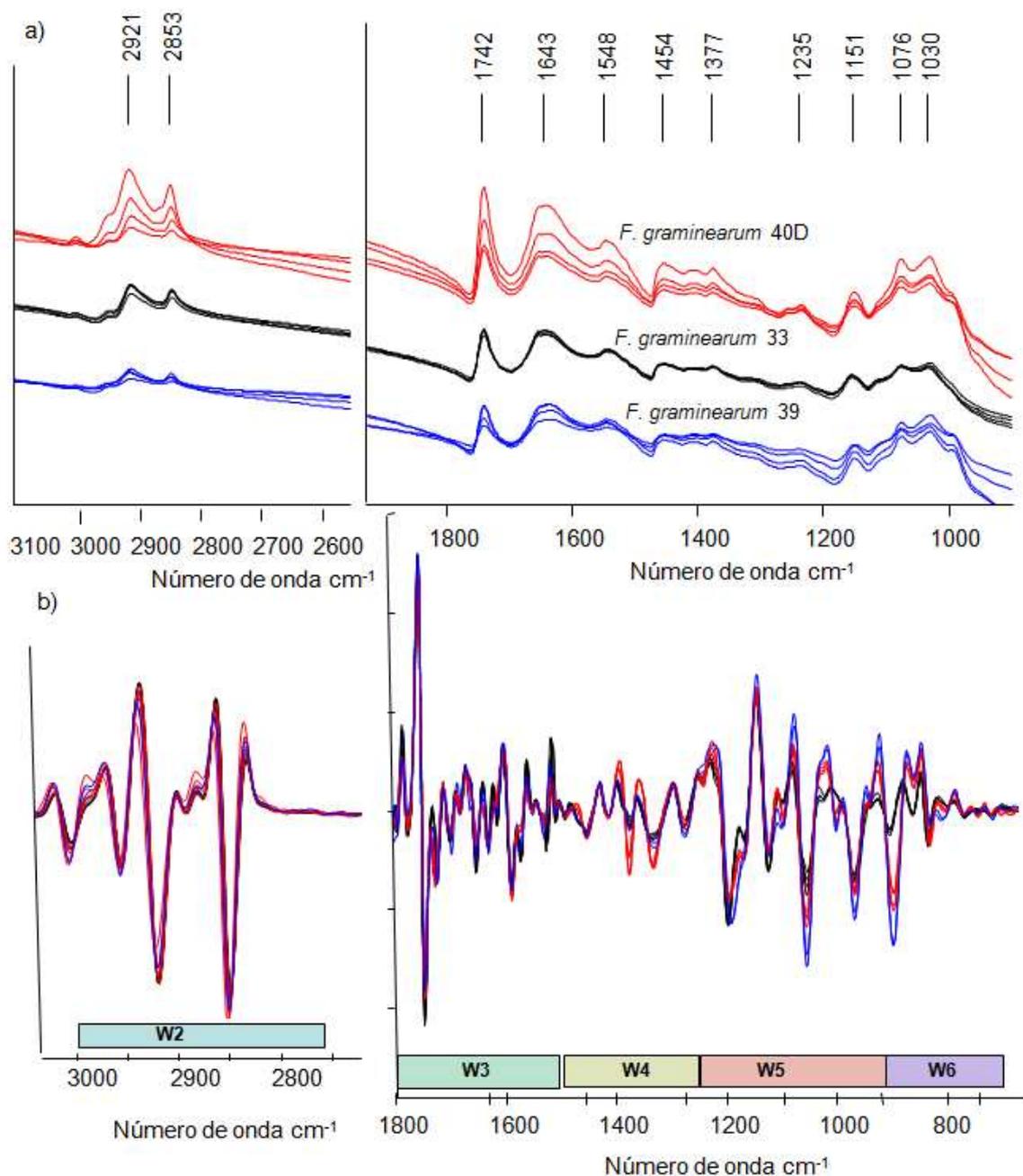


Figura IV.13 Diversidad fenotípica evaluada por FT-IR. Espectros FT-IR de 3 aislamientos locales de *F. graminearum* (4 replicados de cada uno de ellos) (a) y sus correspondientes derivadas segundas (b). Se indican las ventanas espectrales  $W_2$  a  $W_6$  que corresponden a las regiones descritas en materiales y métodos.

El análisis llevado a cabo, nos indicó que la aplicación de esta técnica de aumento de resolución representa una herramienta capaz de detectar diferencias significativas en la expresión fenotípica de los diferentes aislamientos estudiados a

través de la comparación de los patrones (*patterns*) obtenidos. A fin de visualizar dichas diferencias espectrales y determinar la heterogeneidad de la población local de *F. graminearum* a través de un dendrograma, se realizó un análisis multivariante empleando las derivadas normalizadas de los espectros correspondientes a los aislamientos indicados en la Tabla IV.1. Para llevar a cabo este estudio debieron seleccionarse las ventanas espectrales que mostraran las mayores diferencias entre espectros de diferentes aislamientos. Según la Figura IV.13 éstas serían las regiones  $W_4$  (región mixta) y  $W_5$  (región asignada a carbohidratos). Además, los estudios de composición química mostraron diferencias en la intensidad relativa de las bandas correspondientes a proteínas respecto a las asignadas a los estiramientos C-H y C=O asociadas a fosfolípidos (ventana  $W_2$ ,  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  y  $1742\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) entre diferentes aislamientos. Teniendo en cuenta estos resultados, se construyó un dendrograma realizando el análisis multivariante en las ventanas  $1250-750\text{ cm}^{-1}$ ,  $3000-2800$  y  $1800-1700\text{ cm}^{-1}$  mostrado en la Figura IV.14. Teniendo en cuenta la varianza obtenida para los replicados se trazó una línea dando un valor de corte a la discriminación entre aislamientos a un nivel de fusión de 200 (Heterogeneidad = 200) (Fig. IV.14). De modo que los espectros agrupados con un valor de heterogeneidad menor al valor de corte fueron asignados al mismo fenotipo espectral. Este valor de corte permitió establecer 10 fenotipos espectrales. Así, la población de *F. graminearum* estudiada, con una relativa baja diversidad genotípica obtenida por PCR-RFLP (sólo 4 grupos genéticos se obtuvieron por PCR-RFLP, A-D) mostró una significativa diversidad fenotípica

Desde el punto de vista de la expresión fenotípica, representada por los *fingerprinting* espectrales, los aislamientos estudiados se agruparon en dos grandes clustres A y B (indicados en celeste y naranja en la Fig IV 14), cada uno de los cuales contenía 5 tipos espectrales diferentes (1-5, cluster A y 6-10, cluster B). Es interesante notar que el grupo A incluyó los aislamientos de menor agresividad (ambas pertenecientes al mismo cluster genético PCR-RFLP, B), el 30A en el cluster 5 y el 67 C en el cluster 1, mientras que el otro cluster mayoritario (B) incluyó en el subgrupo 7, los aislamientos caracterizadas como de mayor agresividad, 69A y 66C (ambas pertenecientes al mismo cluster genético PCR-RFLP, C).

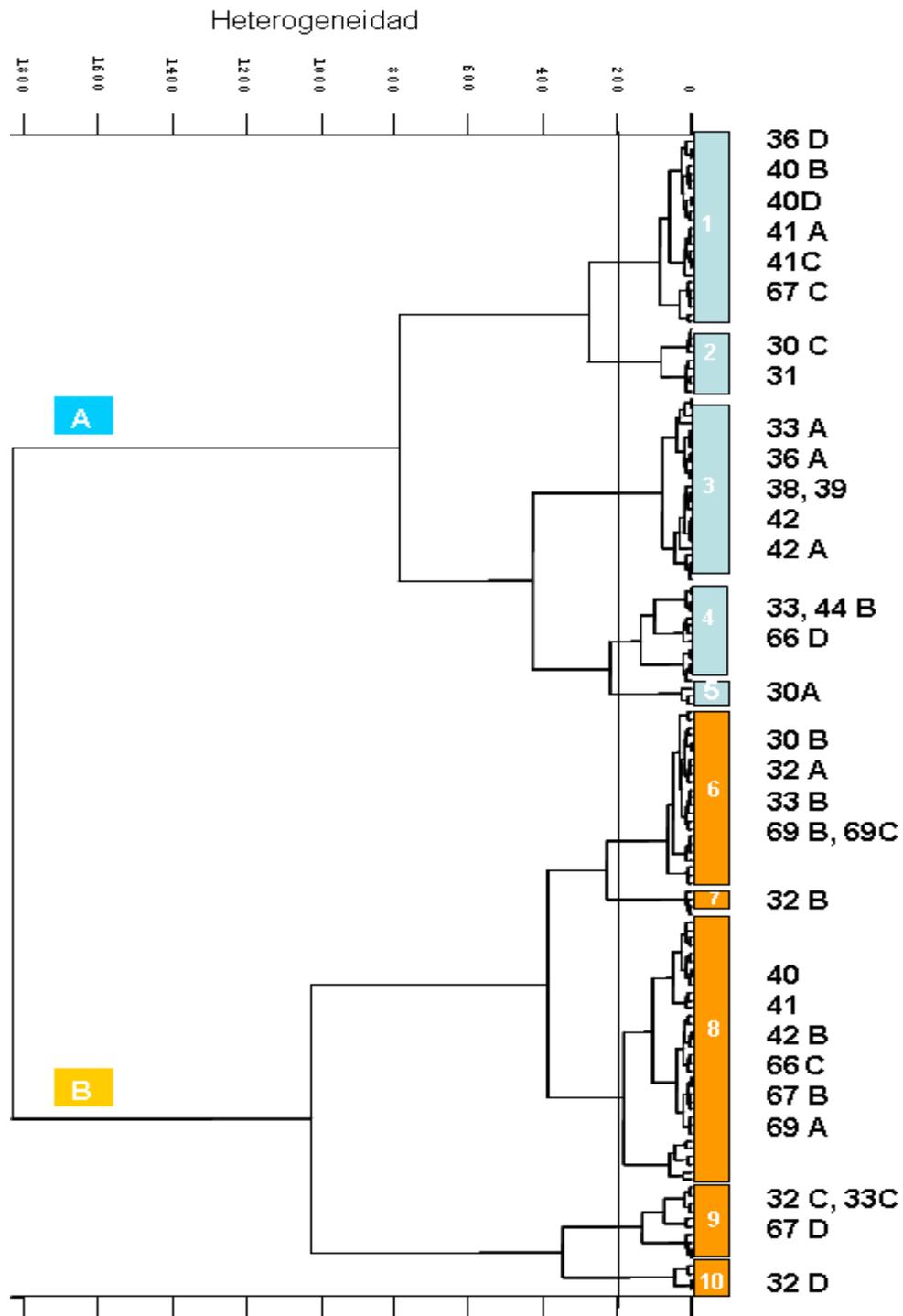


Fig. n° IV.14. Dendrograma basado en FT-IR obtenido por análisis de cluster de 34 aislamientos de *F. graminearum*. El dendrograma fue construido usando las regiones 1250-750 cm<sup>-1</sup>, 3000-2800 cm<sup>-1</sup> y 1800-1700 cm<sup>-1</sup>. Las distancias espectrales fueron calculadas empleando el coeficiente de Pearson y representadas mediante el algoritmo de Ward. La línea representa el valor de corte que discrimina los distintos fenotipos espectrales. Los aislamientos agrupados a una distancia espectral menor que el valor de corte (heterogeneidad = 200) son asignado al mismo fenotipo FTIR.

Los resultados obtenidos (fig. IV.11, IV.13 y IV.14) revelan que la espectroscopía IR tiene un gran potencial para estudiar la diversidad de la expresión fenotípica en la población de *F. graminearum* local. A través de la aplicación de métodos fisiológicos clásicos es muy difícil distinguir con precisión entre aislamientos altamente relacionados. Sin embargo, FT-IR resultó sensible tanto a la variación en la composición macromolecular de los aislamientos como a su expresión fenotípica general observada a través del *fingerprinting* IR. Los resultados mostraron asimismo la gran contribución que esta técnica representa como herramienta importante en la correlación entre patogenicidad y composición química, así como en estudios de distribución poblacional y epidemiología.

## CONCLUSIONES

La mayoría de los trabajos realizados en el campo de la espectroscopía con organismos del género *Fusarium* se llevaron a cabo empleando la tecnología de reflectancia total atenuada (FT-IR/ATR). En el presente trabajo se desarrolló una metodología basada en espectroscopía de Transmisión (AT/FT-IR) que permite realizar análisis fenotípicos de aislamientos de *F. graminearum* con gran reproducibilidad. La estrategia desarrollada involucró la puesta a punto del medio de cultivo a emplear, el tiempo de incubación, la toma de muestra y el registro de los espectros. La sencillez de la estrategia propuesta, la ausencia de sustancias químicas, la fiabilidad, y los cortos tiempos de medición, en comparación con otros métodos disponibles demuestran la gran necesidad de continuar con los estudios sobre la aplicación de FT-IR en combinación con análisis multivariante a estudios de composición química y discriminación de hongos fitopatógenos.

FT-IR demostró ser sensible a la composición química de los organismos analizados. Esta metodología podría entonces, representar una importante herramienta que permita estudiar la asociación entre patogenicidad y composición macromolecular. En particular se abre un importante interrogante sobre la real asociación del contenido relativo de lípidos en aislamientos de mayor agresividad que podría ser estudiado.