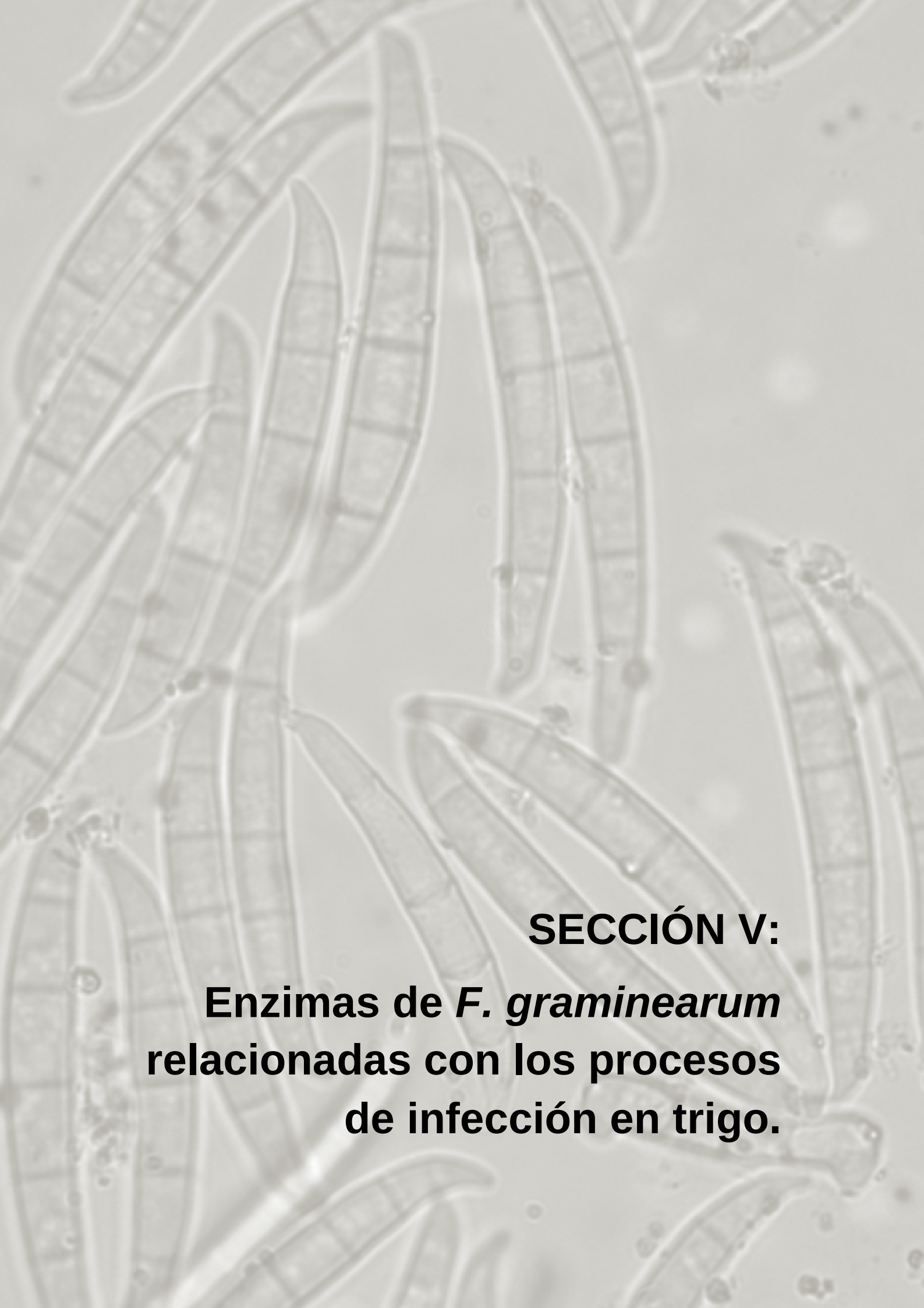

SECCIÓN V:

Enzimas de *F. graminearum* relacionadas con los procesos de infección en trigo.

SECCIÓN V: Enzimas de *F. graminearum* relacionadas con los procesos de infección en trigo.

INTRODUCCIÓN

Pared celular de los vegetales

Durante la asociación inicial con sus hospedadores, los fitopatógenos se encuentran con ceras epicuticulares y la cutícula que cubre la epidermis de la célula huésped. Las ceras epicuticulares son una mezcla compleja relativamente soluble de ácidos grasos de cadena larga, aldehídos, alcanos, alcoholes primarios y secundarios, cetonas y ésteres, mientras que la cutícula es una capa contínua de material lipídico, que consiste en material polimérico insoluble llamado cutina. Esta matriz cuticular también disminuye la vulnerabilidad de las plantas a ataques de patógenos, proporcionando resistencia mecánica y enviando señales celulares para las respuestas de resistencia (Feng *et al.*, 2005).

El primer paso para que el proceso de patogenicidad tenga éxito es la colonización de la planta por parte del patógeno. Para ello los patógenos secretan una batería de enzimas que degradan la pared celular vegetal (CWDE), que es la primera barrera de defensa que tiene la planta.

La pared celular de las plantas es uno de los principales obstáculos que protege a las plantas contra el ataque de patógenos. Desempeña un papel crucial en la difusión apoplástica de agua e iones, y protege el protoplasto interior. La pared celular está formada por la laminilla media compartida por células adyacentes, una pared primaria y una pared secundaria que puede formarse cuando el crecimiento celular se detiene (fig. V.1). La pared celular está constituida principalmente por celulosa, materiales de la matriz y agua. La celulosa es un polímero de cadena lineal de glucosa (β-1,4-glucano). Se unen grupos de 100 a 10.000 moléculas de celulosa covalentemente con enlaces de hidrógeno para formar microfibrillas. Dentro de las microfibrillas, las áreas cristalinas se llaman micelas mientras que el resto de las regiones paracristalinas. La matriz está compuesta por pectina, hemicelulosa y proteínas estructurales. Estos materiales amorfos se distribuyen entre las microfibrillas de celulosa (Carpita and Gibeaut, 1993). La pectina es el componente principal de la laminilla media y también conforma una parte importante de la pared primaria de la célula joven de la planta,

en el que forma un gel amorfo llenando los espacios entre las microfibrillas de celulosa (Alkorta *et al.*, 1998). La pectina es una familia de polisacáridos complejos muy heterogénea, que consiste principalmente de residuos de ácido α-1,4-D-galacturónico que forman cadenas de homogalacturonato. Las cadenas laterales contienen L-ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa (An *et al.*, 2005; Lang and Dornenburg, 2000; Singh *et al.*, 2005). Los grupos carboxilo del ácido galacturónico están parcial o totalmente neutralizados por el sodio, el potasio o iones de amonio. En base al tipo de modificaciones de la cadena principal, las sustancias pécticas se clasifican en protopectina, ácido péctico, ácido pectínico y pectina (Kashyap *et al.*, 2001). Las hemicelulosas son polímeros de diversos grupos de azúcares como la xilosa, glucosa y arabinosa, y es abundante en la pared primaria. El xilano es el componente principal de la hemicelulosa, en particular en la pared primaria de plantas monocotiledóneas, y forma una compleja estructura compuesta de un esqueleto de D-xilosa unidas por enlaces β-1,4- sustituido en menor o mayor medida por varios grupos (acetilo, arabinofuranosilo, galactosilo, glucuronilo) (Hatshc *et al.*, 2006). Las paredes celulares también contienen una variedad de proteínas, tales como glicoproteína y extensina. Las glicoproteínas son un complejo de azúcares y proteínas, las cuales se caracterizan por la abundancia de aminoácidos hidroxiprolina y prolina. La extensina puede unirse covalentemente con otras proteínas y envolver otros componentes de la pared, a su vez es considerada la proteína estructural principal (Kieliszewski and Lamport, 1994; Carpita and Gibeaut, 1993). Además de la celulosa y otros materiales de la matriz, el agua llena aproximadamente el 50% del espacio de las paredes primarias. El contenido de pectinas en las paredes primarias de gramíneas es menor en relación al que presentan las de dicoteledóneas y gimnospermas, además la mayor proporción de sus hemicelulosas son arabinoxilanos (Jarvis *et al.*, 1988).

Diversos trabajos demuestran que *F. graminearum* penetra e invade sus hospedadores con la ayuda de las CWDE secretadas. Luego, se observa crecimiento subcuticular del hongo y el tejido es colonizado intra y intercelularmente (Kang and Buchenauer, 2000a; b; Pritsch *et al.*, 2000; Wanyoike *et al.*, 2002).

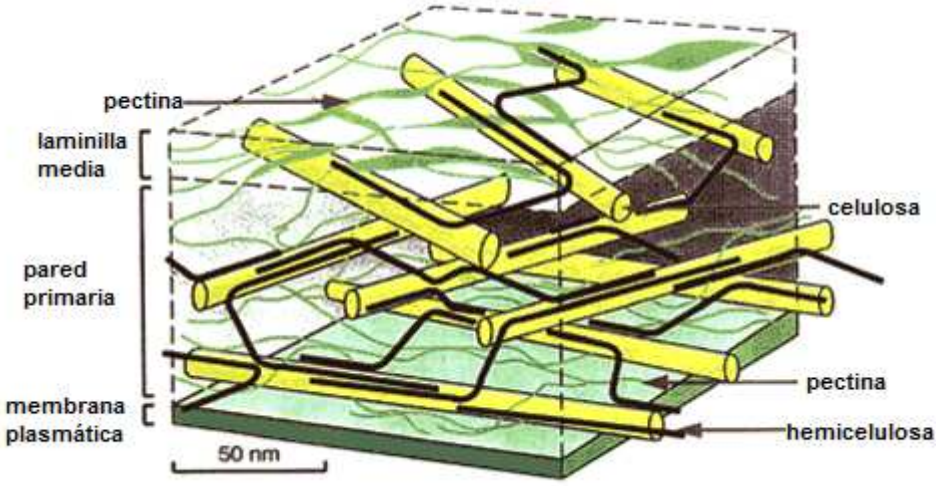

Fig V.1: Esquema de la composición de la pared celular vegetal. (http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm).

Degradación enzimática de la pared celular vegetal y de las sustancias de reserva del grano. Relación con la patogenicidad.

La enfermedad es el resultado de la acción individual o combinada de diferentes mecanismos de patogénesis del hongo, como la producción y liberación de enzimas extracelulares que degradan los principales constituyentes de la pared celular y permiten la colonización de los tejidos, tales como las CWDE, proteasas y lipasas (fig. V.2.1) (Martínez *et al.*, 1991; Alconada, 1993; Alconada and Martínez, 1994; 1996; Kikot *et al.*, 2009). Estas enzimas son también las responsables de los daños ocurridos en los granos de trigo, principalmente por degradar sus sustancias de reserva (fig. V.2.2).

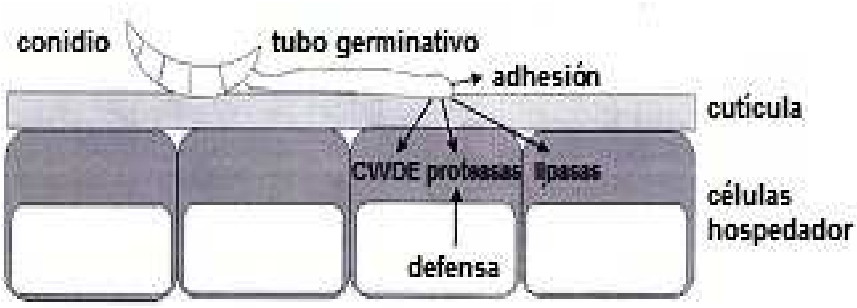

Fig. V.2.1: Esquema de degradación enzimática de la pared celular durante el establecimiento de la infección. En el proceso intervienen proteasas, lipasas y CWDE.

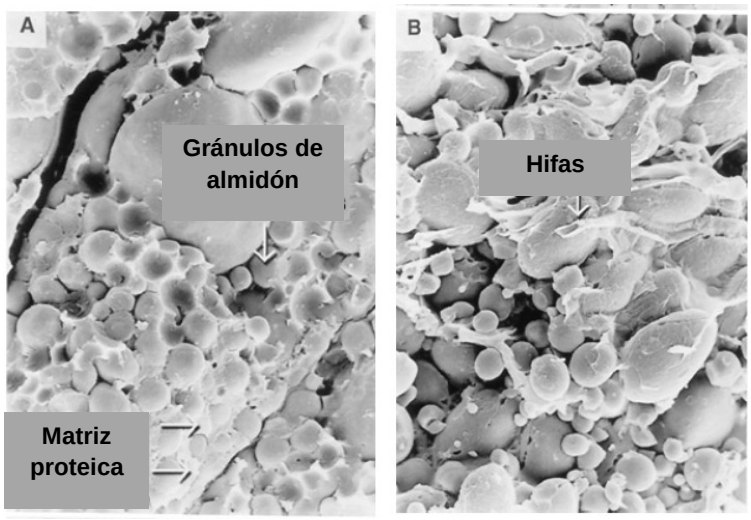

Fig. V.2.2: Fotografías de cortes de granos de trigo observados en SEM (x 1,500). Granos sanos (A). Granos dañados por *Fusarium* spp (B). Nightingale *et al*. (1999).

La mayoría de los hongos producen una amplia variedad de enzimas degradadoras de la pared celular que refleja el grado de complejidad que tiene la estructura de la pared, entre las cuales se encuentran las enzimas pécticas, celulasas, arabinasas, xilanasas y galactanasas (De Lorenzo, 1997). Phalip *et al.* (2005) analizaron el exo-proteoma de *F. graminearum* crecido en pared celular vegetal, e identificaron 24 tipos diferentes de enzimas necesarias para digerir la pared celular completa.

Kang and Buchenauer (2000 a;b), Kang *et al.* (2005) y Wanyoike *et al.* (2002) demostraron mediante las técnicas de etiquetado de inmuno-golg y enzima-gold, que *F. culmorum* y *F. graminearum* producen CWDE como celulasas, xilanasas y pectinasas en las primeras etapas de infección en espigas de trigo, observando alteraciones de los componentes de la pared celular en el tejido infectado. Estos estudios sugieren que las enzimas hidrolíticas producidas por este fitopatógeno, degradan las paredes celulares facilitando la colonización en espigas de trigo.

El grupo de enzimas degradadoras de la pared celular tradicionalmente más estudiado ha sido el de las enzimas pécticas o pectinasas. Si bien en las gramíneas la proporción de pectinas en las paredes celulares es menor en relación a otros grupos taxonómicos, la importancia de estas enzimas es crucial para el establecimiento de la infección.

El grupo de enzimas pécticas incluye a las pectinesterasas, las cuales catalizan la desesterificación de la pectina y las enzimas despolimerizantes, las cuales catalizan el desdoblamiento de uniones glucosídicas α-(1,4) de la cadenas de pectina. Las pectinesterasas pertenecen al grupo de la corboxil ester hidrolasas. Las despolimerazas catalizan la ruptura de las uniones α-(1,4) glucosídicas de los sustratos pécticos, por un mecanismo hidrolítico (enzimas hidrolíticas o D-galacturonasas) o por un mecanismo de ß-eliminación (enzimas transeliminasas o liasas). Estos dos grupos han sido divididos a su vez en cuatro subgrupos, según su preferencia a pectatos (sales de ácidos pécticos) o pectina (sustratos esterificados), y según el patrón de acción terminal (-exo) o al azar (-endo) en la ruptura de los enlaces glucosídicos. De acuerdo a esta clasificación, las enzimas despolimerizantes se dividen en ocho grupos, cuatro corresponden a hidrolasas y cuatro a las liasas o transeliminasas (Rombouts and Pilnik, 1980).

Se ha demostrado que las pectinasas son muy importantes para el establecimiento de la infección de varios hongos fitopatógenos (ten Have *et al.*, 1998; Valette-Collet *et al.*, 2003). Las enzimas pécticas producen modificaciones en la estructura de la pared celular, aumentando la accesibilidad a los otros componentes de la pared celular para la degradación por otras enzimas, la lisis celular y la maceración del tejido (Panda *et al.*, 2004). Las enzimas pécticas (en múltiples formas) son las primeras en ser inducidas cuando los hongos son cultivados en paredes celulares de plantas y las primeras producidas en los tejidos infectados (Martínez *et al.*, 1991; Niture *et al.*, 2006), seguidas de las hemicelulasas y celulasas (De Lorenzo 1997). La aparición secuencial de las CWDE podría tener

su explicación en el hecho de que sólo después de que hayan actuado las enzimas pécticas, la red de celulosa antes rodeada por la pectina pasaría a ser accesible y los inductores de celulasas y hemicelullasas serían liberados (De Lorenzo, 1997).

Además de su importancia en las interacciones entre plantas y patógenos y en procesos biológicos de las plantas, las enzimas pécticas han sido utilizadas por el hombre con diferentes fines industriales. Su primera aplicación comercial data del año 1930 para preparar vinos y zumos de fruta.

Actualmente preparados enzimáticos de pectinasas se utilizan en los procesos de extracción, clarificación y liquefacción de zumos, para mejorar la calidad del producto, así como en la industria textil, y en otras aplicaciones biotecnológicas como la producción de papel, la extracción de aceite y la fermentación de té y café.

Otro grupo de enzimas de relevancia en los procesos de patogenicidad son las enzimas proteolíticas o proteasas. Pekkarinen *et al.* (2002; 2003) han propuesto proteasas de *F. graminearum* y *Botrytis cinerea* como factores de virulencia. Las enzimas proteolíticas o proteasas actúan en una etapa temprana, degradando las proteínas estructurales de las paredes celulares, junto a las carbohidrasas o CWDE de manera de poder invadir al hospedante, luego este tipo de enzimas está involucrado en la degradación de las proteínas de reserva de los granos, alterando los parámetros de calidad de la materia prima (Barneix, 2007). En los granos infectados se produce un incremento de la actividad proteolítica, produciéndose ruptura de cadenas proteicas, lo cual resulta en masas panificables poco cohesivas y muy extensibles, en las cuales se dificulta la retención de gas producido en la etapa fermentativa, lográndose productos de reducido volumen y textura defectuosa (Helwelg, 2003).

Las proteasas son clasificadas en familias según sus similitudes estructurales; sin embargo, resulta también útil clasificarlas de acuerdo a los residuos aminoacídicos del sitio catalítico, de acuerdo a esta clasificación las proteasas se han dividido según su mecanismo de acción en: serin peptidasas, treonin peptidasas, cistein peptidasas, aspartil peptidasas, glutamil peptidasas y metalopeptidasas (MEROPS http:/merops. sanger.ac.uk/).

Otro grupo enzimático que reviste importancia en los procesos de patogenicidad es el de las lipasas, como ha sido demostrado para *Alternaria brassicicola* (Berto *et al.*, 1999), *Botrytis cinerea* (Comménil *et al.*, 1998), y *F. graminearum* (Feng *et al.*, 2005; Jenczmionka and Schafer 2005). Pritsch *et al.*

(2000) observaron el crecimiento subcuticular de *F. graminearum* después de la penetración, donde las lipasas podrían haber participado en cierta medida en la degradación de la cutícula.

Rol de las poligalacturonasas en la patogénesis

Debido a la importancia de las poligalacturonasas (PG) por ser las primeras enzimas en actuar en la degradación de la pared celular vegetal, las cuales a su vez se relacionan con los procesos de comunicación molecular entre el huésped y el patógeno, se han realizado numerosos estudios para determinar con mayor precisión el rol que cumplen estas enzimas en los procesos de virulencia y patogenicidad.

En numerosas investigaciones se ha determinado una relación directa entre las PG y los procesos de patogénesis. Tal es el caso de la endo PG codificada por el gen *Bcpg1* de *B. cinerea* que está involucrada tanto en los procesos de infección secundaria, como en el crecimiento de las lesiones después de la infección (ten Have *et al.*, 1998). También se ha observado en *Claviceps purpurea* que al mutar los dos genes codificadores de endo PG se obtiene una cepa cuya capacidad de producir patogénesis en centeno está significativamente reducida (Oeser *et al.*, 2002). También en bacterias fitopatógenas se han realizado este tipo de estudios obteniendo resultados similares (Annis and Goodwin, 1997), así en *Ralstonia solanacearum* se ha demostrado que tanto la endo PG como la exo PG caracterizadas son factores de virulencia (Huang and Allen, 2000). Sin embargo, en otras investigaciones no se ha determinado una relación directa entre las PG y la patogenicidad. Así, por ejemplo, y mediante el desarrollo de técnicas de producción de mutaciones dirigidas, han aparecido trabajos en donde al inactivar genes concretos de PG encontramos que no juegan un papel determinante en la virulencia. En *F. oxysporum*, se ha demostrado que dos cepas, una mutante para el gen *pg5* codificador de endo PG (Garcia-Maceira *et al.*, 2001) y la otra para el gen *pgx4* codificador de exo PG (Garcia-Maceira *et al.*, 2000), mantenían los mismos niveles de virulencia en plantas susceptibles que cepas salvajes. Es posible que la existencia de otros genes de PG aún no caracterizados en muchos de estos casos confiera a las cepas mutantes actividad PG residual, impidiendo conclusiones determinantes. Aunque, en *Cochliobolus carbonum* la obtención de un cepa con los

genes de endo PG y exo PG mutados sirvió para comprobar que ninguno de los dos eran necesarios para la virulencia (Scott- Craig *et al.*, 1998) a pesar de que la actividad poligalacturonasa de la cepa mutante era menor del 1% de la presente en la salvaje.

La controversia o resultados opuestos en cuanto a la acción de estas enzimas, plantea la importancia de continuar con su estudio. La caracterización de nuevas enzimas puede ser de utilidad para profundizar en el conocimiento de su significado biológico. Por otro lado, la posibilidad de caracterizar de modo individual las propiedades físico-químicas de las PG es de relevancia, siendo su purificación un paso esencial en el análisis.

Un punto importante en el análisis del rol de una actividad enzimática, es la cooperación funcional entre las diversas clases e isoformas de las enzimas, pudiendo la ausencia de una enzima ser reemplazada por otra enzima.

Mesterhazy *et al*. (1999) enuncian que la agresividad de estos patógenos tiene diversos componentes, entre los cuales se encuentra la producción enzimática. Por lo tanto, podría ser utilizado este criterio como estimativo de agresividad en la selección de aislamientos de *F. graminearum* para inocular artificialmente genotipos de trigo y analizar el comportamiento o resistencia a la FET de los mismos.

Resistencia genética al patógeno

El difícil manejo y control de la enfermedad es motivo de búsqueda constante de nuevas fuentes de resistencia genética para ser utilizadas en los programas de mejoramiento. A la fecha no están disponibles cultivares de trigo altamente resistentes a la enfermedad o tolerantes a las micotoxinas (Goswami and Kistler 2004).

Los 5 tipos de resistencia a la enfermedad reconocidos son: resistencia a la infección primaria (Tipo I), resistencia a la propagación de la infección en la planta (tipo II), resistencia basada en la habilidad para degradar micotoxinas (Tipo III), tolerancia a altas concentraciones de micotoxinas (Tipo IV) y resistencia a la infección de los granos (Tipo V) (Stack, 2000). Fundamentalmente se trabaja sobre los tipos de resistencia I y II para la selección de variedades resistentes (Xu *et al.*, 2001). El estudio de resistencia tipo I es importante en el campo del mejoramiento

vegetal, puesto que permite caracterizar el comportamiento de germoplasmas de trigo frente a la FET en condiciones ambientales similares de infección a las que ocurren en la naturaleza.

A partir de un mayor conocimiento de la resistencia genética a la enfermedad, los esfuerzos en mejoramiento se orientaron a la caracterización y utilización de germoplasma resistente de diferentes orígenes. Se identificó resistencia en Praag 8 y Novokrumka 0102 (variedades invernales del este de Europa), Nobeokabozu (cultivar primaveral de origen japonés), Frontana (cultivar de origen brasilero) (Snijders, 1990), Klein Atlas (Tenaglia 2002) y los cultivares primaverales de origen chino Sumai 3, Ning 8343 y Wuhan1 (Snijders, 1990; 2004). La mayoría de estos germoplasmas han sido utilizados como fuentes de resistencia genética en los distintos programas de mejoramiento (Yoshimura *et al*., 2006; Fedak *et al*., 2006). A través de cruzamientos se han creado nuevos genotipos que presentan en su fondo genético características agronómicas deseadas con resistencia a la enfermedad conferida por genes provenientes de progenitores resistentes. En China, se ha trabajado en el desarrollo de genotipos con resistencia a FET y mejoradas condiciones de calidad panadera. Como resultado se han obtenido nuevas líneas derivadas de Sumai 3 denominadas Ning 8623, Ning 8633 y Ning 8675 que poseen moderada resistencia a la enfermedad, calidad mejorada y mayor potencial de rendimiento (Van Ginkel *et al.*, 1996). El cultivar Sumai 3 ha sido ampliamente utilizado como fuente de resistencia a FET en muchos programas de mejoramiento de trigo del mundo incluído los de América Latina (Del Blanco *et al.*, 2003; Díaz 2006). Se determinó que posee genes localizados en los cromosomas 1B, 2A, 5A, 6D y 7D que confieren resistencia de tipo I y II (Yang *et al.*, 2003). En un trabajo anterior Bai *et al.* (2001) observaron sobre Sumai 3 y otros cultivares altamente resistentes, síntomas de infección inicial en espiguillas inoculadas pero con baja o nula dispersión de la enfermedad en la espiga. Kang *et al.* (2007) encontraron coincidencias con trabajos anteriores, asegurando que en el cultivar Sumai 3 la diseminación del patógeno en espiga fue menor, comparado con los cultivares susceptibles empleados.

OBJETIVO

Detectar y caracterizar actividades enzimáticas relacionadas con los procesos de infección y/o pérdida de calidad de los granos en medios de cultivo.

Utilizar el criterio de producción enzimática como estimativo de agresividad de los aislamientos para la identificación de nuevas fuentes de resistencia en trigo a la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Para la detección de actividades enzimáticas se emplearon 9 aislamientos de *F. graminearum* provenientes de diversas localidades de la provincia de Buenos Aires y 2 aislamientos provenientes de Marcos Juárez - Córdoba. Aclaración: los aislamientos monospóricos utilizados en este análisis fueron aportados por distintas entidades nacionales en una etapa inicial del trabajo de tesis, por lo cual este estudio no fue realizado con los aislamientos que se obtuvieran a partir de las muestras de trigo del INTA y SENASA en una etapa posterior de la investigación.

5.2 Actividad enzimática PG

5.2.1 Preparación del inóculo

Se obtuvieron a partir de cortes (0,5 cm de diámetro) de la periferia de colonias de 7 días de crecimiento sobre placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG).

5.2.2 Condiciones de cultivo - Toma de la muestra

Se empleó el medio de cultivo líquido salino Czapek-Dox (Martínez *et al.*, 1991) en el cual se reemplazó parcialmente la fuente de carbono (glucosa) por inductores de las actividades enzimáticas (pectina cítrica y salvado de avena). Para la toma sistemática de muestras se utilizaron Erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 200 ml de medio. Una vez inoculados los Erlenmeyers con tres cortes, se incubaron en agitación (150 rpm) a 28ºC y oscuridad durante 14 días. Muestras de 5 ml fueron tomadas en esterilidad cada 24 horas a partir de Erlenmeyers triplicados. Se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación (8000 rpm, 20 min). Se guardó el sobrenadante a –20ºC hasta su utilización en los ensayos enzimáticos.

5.2.3 Valoración de la actividad enzimática

Se valoró la actividad enzimática PG utilizando como sustrato ácido poligalacturónico (1 mg/ml) en buffer acetato (50 mM, pH: 5). La actividad se determinó midiendo la concentración de azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson (Nelson, 1944). La mezcla de reacción (180 µl de sustrato y 20 µl de muestra) se incubó a 40ºC durante 30 min. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que genera 1 µmol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones establecidas del ensayo. La conversión de absorbancia de las muestras problema en cantidad de sustancias reductoras se realizó haciendo referencia a una curva patrón de ácido galacturónico (de 0,05 hasta 1 µmol).

5.2.4 Caracterización de la actividad PG

5.2.4.1 Variación de la actividad enzimática con la concentración de proteína y con el tiempo de incubación

La variación de la actividad PG con la concentración de proteína se determinó tomando distintas concentraciones de proteína enzimática.

La linealidad de la actividad PG con el tiempo de incubación, se determinó incubando las reacciones enzimáticas durante distintos tiempos.

En ambos casos la representación gráfica nos da la proporcionalidad entre las dos variables y el límite en algunos casos de esta proporcionalidad. Se valoró la actividad enzimática bajo las condiciones de reacción estandarizadas.

5.2.4.2 pH óptimo y estabilidad al pH

Para determinar el pH óptimo de la actividad PG, se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas en buffer citrato- fosfato- borato 50 mM en un rango de pH entre 2 y 10 unidades con su respectivo sustrato y bajo las condiciones estandarizadas.

Para determinar la estabilidad, el extracto crudo se preincubó en buffer a diferentes pH durante distintos intervalos de tiempo hasta las 2 h. Transcurridos los

tiempos de preincubación, se ensayó la actividad PG según la forma estandarizada.

5.2.4.3 Temperatura óptima y termoestabilidad

Para determinar la temperatura óptima de la actividad PG, se incubaron las reacciones enzimáticas en un rango de temperatura entre 20 y 80°C en buffer acetato al pH óptimo establecido, valorándose la actividad PG bajo las condiciones estandarizadas.

Para determinar la estabilidad, el extracto enzimático se preincubó en buffer acetato al pH óptimo a diferentes temperaturas durante distintos intervalos de tiempo hasta las 2 h. Al cabo de los distintos tiempos, se ensayó la actividad PG según la forma estandarizada.

5.2.4.5 Efecto de iones metálicos y EDTA

Se estudió el efecto de cationes sobre la actividad PG, a una concentración final en el ensayo de 10 mM de la sal correspondiente y del agente quelante EDTA a una concentración final 2 mM. Para estudiar el efecto de los cationes se utilizaron las siguientes sales: Cl_2Hg, SO_2Cu, Cl_2Ca, Cl_2Ba, Cl_2Co, Cl_2Zn, Cl_2Mn, Cl_2Mg y Cl_2Na.

5.2.4.6 Patrón de degradación de sustrato

La actividad PG semipurificada fue incubada a 37℃ con ácido poligalacturónico 0,4% en buffer acetato 50mM y pH 4.0. Se tomaron muestras a diferentes tiempos: 0, 0.5, 1, 3 y 30 h, y se inactivaron por calentamiento a 100℃ durante 5 min. Luego, se midió el poder reductor por el método de Somogyi y Nelson. Se inocularon 2 µl de cada muestra en una placa de silicagel 60 F254 (Merck) junto con 2 µl de los patrones 1000 ppm de ácido galacturónico (AGA), ácido digalacturónico (ADG) y ácido trigalacturónico (ATG). Se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) ascendente empleando un sistema n-butanol: Acido acético: agua (9:4:7 v/v/v). Se reveló pulverizando una solución de ácido fosfomolíbdico al 3% y ácido sulfúrico al 10% en etanol y luego se calentó durante 10 min a 90℃.

5.2.5 Purificación de la actividad enzimática

5.2.5.1 Producción de crudo enzimático

El aislamiento MJ4 fue cultivado en 200 ml de medio de cultivo antes mencionado (5.2.1.2) en Erlemeyers de 1000 ml de capacidad, a 28℃ bajo agitación a 200 rpm. A los dos días de incubación, momento de máxima actividad enzimática PG los cultivos fueron cosechados y filtrados con papel Whatman n°1. El crudo enzimático fue concentrado por liofilización y filtrado a través de membranas de acetato de celulosa (0,45 µm tamaño de poro). Luego, se sometió a una nueva etapa de concentración y desalinización a través de una membrana de 10 kDa de tamaño de poro con una celda de ultrafiltración (Amicon 8050).

5.2.5.2 Técnicas cromatográficas

El crudo enzimático fue sometido a dos pasos de purificación consecutivos. Se empleó un equipo AKTA FPLC-U900 System (Amersham GE) con columnas de exclusión molecular e intercambio iónico.

5.2.5.2.1 Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna de exclusión molecular de Sephacryl S-100 (Pharmacia XK 16/100) como fase estacionaria, con un volumen de columna de 100 ml. La fase móvil utilizada fue buffer acetato 20 mM con 0.15 mM de ClNa a pH 4. La elución se llevó a cabo con el mismo buffer con 4 volúmenes de columna a un flujo de 0,5 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2 ml, en las que se midió actividad PG y proteínas por lectura directa de absorbancia a 280 nm. Las fracciones que mostraron la mayor actividad PG fueron agrupadas y concentradas por ultrafiltración empleando tubos Millipore (Ultracentrifugal filter diveces with low-binding Ultracel®) con membrana de corte de 10000 Da.

5.2.5.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

La muestra obtenida en el paso anterior fue recromatografiada sobre una columna de intercambio iónico Sepharose SP FF (Pharmacia XK 26/20), con un volumen de columna de 28 ml. La fase móvil utilizada fue buffer acetato 20 mM a pH: 4,0, y las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de 0 a 0,4 M de ClNa en 4 volúmenes de columna a un flujo de 2 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml, en las que se midió actividad PG y proteínas por absobancia a 280 nm.

Luego de cada etapa de purificación, las muestras obtenidas por agrupación de las fracciones con actividad enzimática PG, fueron analizadas en términos de actividad enzimática PG, cantidad de proteínas por el método de Bradford (1976) y pureza en SDS-PAGE al 12%.

5.2.6 Técnicas electroforéticas

5.2.6.1 SDS-PAGE

Para verificar el grado de pureza de la PG se realizaron geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La cubeta utilizada fue una Mighty Small II (Hoefer SE260) de acuerdo a Smith (1984). Se usaron marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio Rad) para estimar los pesos de los diferentes componentes. La tinción se realizó con Nitrato de plata (Blum *et al.,* 1987) y/o azul Coomasie Coloidal (Neuhoff *et al*., 1988).

5.2.6.2 Isoelectroenfoque- Zimograma

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en una unidad de electroforesis (LKB Bromma 2117 Multiphor II) a 8℃. El gel se preparó en capa fina de poliacrilamida en un rango de pH de 3 a 10 de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI [Broad pI kit, GE Health Care, Biosciences]. La determinación de los valores de pI

se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los puntos isoeléctricos de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por ellas, tomando como referencia la posición del cátodo.

Luego, se realizaron zimogramas sobre geles de agar al 2%, con ácido poligalacturónico al 0,1% de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Para confirmar cuales fracciones proteicas presentan actividad PG, los geles de IEF sin teñir se pusieron en contacto con un gel y el conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 40ºC durante 10 min. Una vez finalizado el período de incubación, los geles fueron separados y la placa de agar-ácido poligalacturónico fue teñida con rojo de rutenio al 0,05%.

5.2.7 Análisis de huellas peptidicas (Maldi TOF Ms/Ms)

Las bandas de proteínas resueltas en SDS-PAGE seleccionadas se recortaron con bisturí para su procesamiento. Las proteínas fueron tratadas con tripsina *in situ* (Secuenciación de grado Promega) durante la noche a 37℃. Se extrajeron los péptidos generados de los geles utilizando 60% de acetonitrilo en 0,2% de ácido trifluoroacético (TFA), se concentró por secado al vacío y desaló con una columna de fase reversa C18 micro-columnas (Omix consejos Pippete, Varian). Se realizó la elución de los péptidos de la micro-columna directamente sobre la placa de muestra del espectrómetro de masa con 3 μl de la solución matriz (α–ciano-4-ácido hidroxicinámicos en 60% de acetonitrilo acuosa que contiene 0,2% TFA). Los espectros de masas de las mezclas de digestión fueron adquiridos en un instrumento de MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) en modo espejo y se calibraron externamente utilizando una mezcla de péptidos patrón (Applied Biosystems). Se realizaron experimentos de disociación por colisión inducida MS/MS de los péptidos seleccionados. Las proteínas fueron identificadas por la base de datos NCBInr comparando los valores m/z de los péptidos con el programa MASCOT y utilizando los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de la masa monoisotópico, 0,08 Da; fragmento de tolerancia de la masa 0,2 Da; oxidación de metionina como posible modificación y 1 omisión de corte tríptico permitido.

5.3 Actividad enzimática proteolítica

5.3.1 Preparación del inóculo

Se inoculó medio de cultivo líquido completo CM (50 ml de solución stock de sales, 2 ml de solución stock de vitaminas, 1 ml de solución stock de elementos, 2 g de peptona, 1 g extracto de levadura, 1 g de caseína ácida hidrolizada, 10 g de sacarosa por litro de medio) con cortes de agar (0.5 cm de diámetro) de la periferia de colonias de 7 días de crecimiento en placas de Petri con medio de cultivo APG. El precultivo se incubó durante 24 h en un agitador rotatorio a 150 rpm y 28℃ en oscuridad.

5.3.2 Condiciones de cultivo -Toma de la muestra

Se empleó un medio de cultivo líquido inductor de proteasas PI (50 ml de solución stock de sales, 2 ml de solución stock de vitaminas, 1 ml de solución stock de elementos, 1 g de sacarosa y 5 g de gelatina por litro de medio). Para la toma sistemática de muestras se utilizaron Erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 200 ml de medio. Estos fueron inoculados con 20 ml de precultivo y se incubaron en agitación (150 rpm) a 28ºC y oscuridad durante 10 días. Las muestras fueron tomadas cada 24 horas con pipetas estériles de Erlenmeyers por triplicado. Se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación (8000 rpm, 20 min). Se guardó el sobrenadante a –20ºC hasta su utilización en los ensayos enzimáticos.

5.3.3 Valoración de la actividad enzimática

Se valoró la actividad enzimática proteolítica utilizando como sustrato una solución de caseína al 0,5% en buffer Tris-ClH 0,1 M a pH 8. La reacción se preparó agregando 550 ml de sustrato con 50 µl de muestra enzimática. Se incubó a 37ºC durante 30 min. Para detener la reacción se agregó 0,9 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, precipitando la proteína remanente. Luego, la mezcla de reacción fue centrifugada a 4000 g durante 20 min y se midió en el sobrenadante absorbancia a 280 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que genera un incremento de 0,1 unidades de absorbancia a 280 nm por minuto en las condiciones establecidas anteriormente.

5.4 Actividad enzimática lipasa

5.4.1 Preparación del Inóculo

Se obtuvieron a partir de cortes (0,5 cm de diámetro) de la periferia de colonias de 7 días de crecimiento sobre placas de Petri con medio de cultivo APG.

5.4.2 Condiciones de cultivo. Toma de la muestra

Se empleó un medio de cultivo líquido que contenía buffer fosfato 50 mM a pH: 7, 1% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de emulsión de aceite de oliva (10% de aceite de oliva, 1% de tween 80 emulsionado con licuadora por 3 minutos). Para la toma sistemática de muestras se utilizaron Erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 200 ml de medio. Una vez inoculados con tres cortes, se incubaron en agitación (200 rpm) a 28ºC y oscuridad durante 10 días. Se tomaron muestras cada 24 h con pipetas estériles en Erlenmeyers por triplicado. Se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación (8000 rpm, 20 min). Se guardó el sobrenadante a –20ºC hasta su utilización en los ensayos enzimáticos.

5.4.3 Valoración de la actividad enzimática

La actividad lipasa se valoró según dos metodologías:

a - Se valoró utilizando como sustrato aceite de oliva (50 ml de aceite de oliva con 150 ml de solución de polivinilalcohol al 2%). La mezcla de reacción contenía: 5 ml de sustrato, 4 ml de buffer fosfato 50 mM a pH 7, la cual se incubó a 37℃ en agitación (200 rpm) durante 30 min. La reacción se detuvo con 10 ml de solución acetona: etanol (1:1). La actividad enzimática fue determinada por titulación de los ácidos grasos liberados con una solución de NaOH 50 mM hasta pH 9. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que genera 1 µmol de ácido graso por minuto bajo la forma estandarizada.

b- Se valoró utilizando como sustrato p-nitrofenolpalmitato (p-NPP 1 mM en acetona). En la reacción se mezcló 800 µl de buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7, 100 µl de sustrato y 100 µl de muestra. Se incubó durante 30 minutos a 37℃ y se midió absorbancia a 440 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la

cantidad de enzima que genera 1 µmol de p-NPP por minuto en las condiciones establecidas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5 Detección de actividades enzimáticas durante el crecimiento vegetativo de *F. graminearum*

Se analizó la producción de diversas actividades enzimáticas consideradas de importancia tanto en el proceso de colonización de *F. graminearum* en el hospedador, como por su relación con la pérdida de calidad en los granos para su comercialización.

Los aislamientos en estudio fueron caracterizados en cuando a la producción *in vitro* en medios de cultivo líquidos con inductores específicos de las actividades enzimáticas: pectinasa (PG), proteasa y lipasa. Dado que en términos generales, el uso combinado de inductores es adecuado para la producción de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal desde un punto de vista cuali y cuantitativo (Alconada and Martínez, 1994; 1996), los inductores utilizados fueron pectina y salvado de avena, gelatina y aceite de oliva, respectivamente.

La actividad enzimática PG frente a ácido poligalacturónico resultó máxima entre el 2 y 3º día de incubación para los aislamientos en estudio (entre 9 y 175 mU/ml), la actividad disminuyó a partir de ese momento en forma paulatina hasta mantenerse a niveles constantes hasta el final del ciclo estudiado.

El valor máximo de actividad PG fue detectado en el aislamiento denominado MJ4 proveniente de Marcos Juárez (Córdoba), llegando a un máximo de 175 mU/ml al 2º día de incubación. Tres de los aislamientos mostraron muy bajos valores de actividad PG en comparación con los demás aislamientos. Se representa en gráfico de barras en forma comparativa los días de máxima producción (fig. V.2).

La máxima actividad proteasa frente a caseína se observó entre el 2º y 3º día de cultivo para todos los aislamientos en estudio (entre 1 y 10 U/ml). De los 11 aislamientos analizados, comparativamente 8 de ellos produjeron elevada actividad proteasa. De los tres aislamientos con baja actividad proteasa, dos de ellos también mostraron baja actividad PG (aislamientos 2 y 60). Posteriormente, los niveles disminuyeron paulatinamente, manteniéndose luego en el tiempo (fig. V.3). El valor máximo de actividad proteasa fue detectada al igual que para la actividad PG, en el aislamiento Mj4, con una actividad máxima de 10,39 U/ ml al 2º día de incubación.

La actividad lipasa fue valorada mediante dos técnicas analíticas, por titulación de ácidos grasos liberados y por colorimetría frente al sustrato p-nitrofenolpalmitato, con ninguna de las dos metodologías se obtuvieron resultados reproducibles por lo cual no se incluye su análisis.

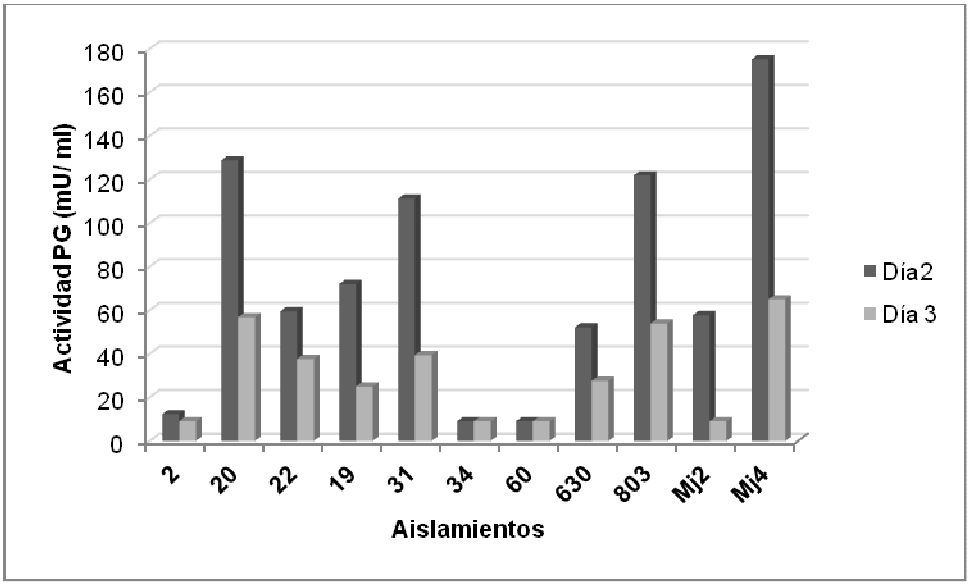

Fig. V.2: Valoración de la actividad enzimática PG utilizando ácido poligalacturónico como sustrato al 2° y 3° día incubación de los cult ivos.

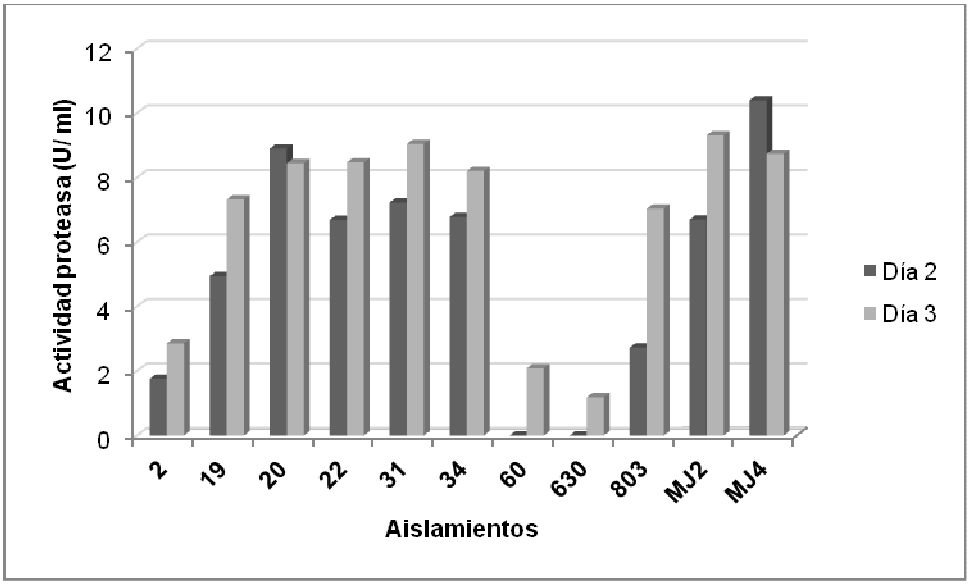

Fig. V.3: Valoración de la actividad enzimática proteasa utilizando caseína como sustrato al 2° y 3° día de incubación de los cultiv os.

A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar con la caracterización y purificación de la actividad PG del aislamiendo denominado MJ4 dada su alta producción. Profundizar en el conocimiento de esta actividad resulta de interés dado su rol decisivo en las etapas tempranas del proceso de infección.

5.6 Actividad PG

5.6.1 Caracterización de la actividad PG en el extracto crudo

Dado que lo más aproximado a lo que ocurre en condiciones naturales son las enzimas presentes en un extracto crudo, se decidió caracterizar a la actividad enzimática en este tipo de extracto. Además, su caracterización permite diseñar un adecuado proceso de purificación al tener conocimiento de sus propiedades bioquímicas.

Para determinar la variación de la actividad PG con respecto a la concentración de proteína, se tomaron distintos volúmenes del extracto crudo y se valoró la actividad enzimática según las condiciones estándar. Se observó linealidad hasta los 4.5 µg de proteína ensayados (fig. V.4). Para determinar la relación existente ente la actividad PG y el tiempo de incubación, las reacciones enzimáticas se incubaron durante distintos tiempos. Se observó linealidad hasta los 40 minutos de incubación (fig. V.5).

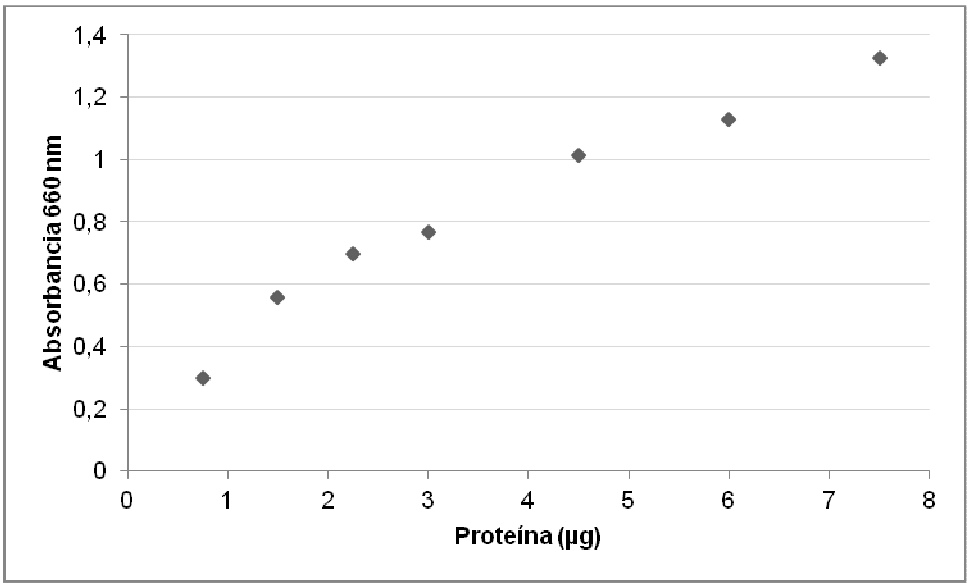

Fig. V.4: Variación de la actividad PG con la concentración de proteína. Se valoró la actividad PG bajo las condiciones estandar utilizando distintas cantidades de proteína a partir del crudo enzimático.

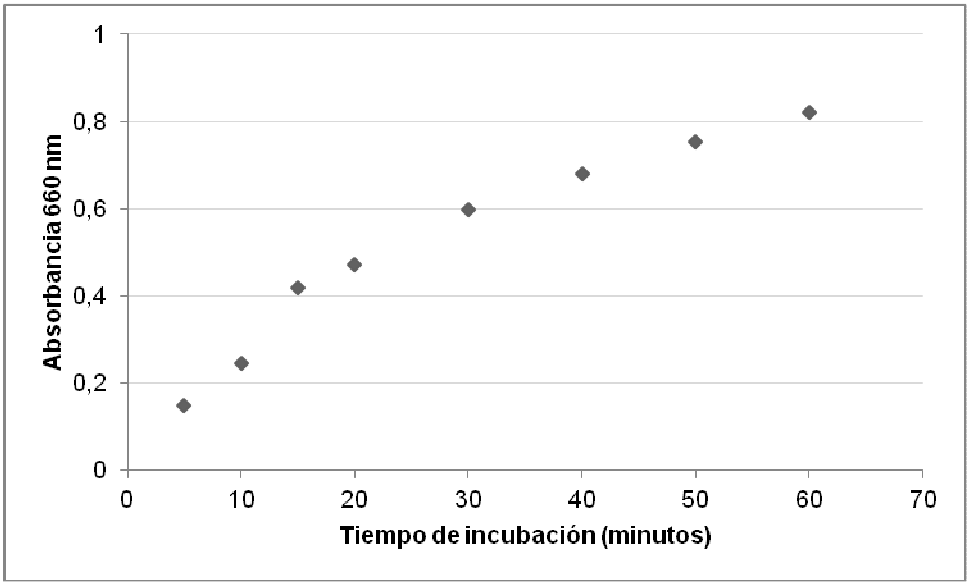

Fig. V.5: Variación de la actividad PG con el tiempo de incubación. Se valoró la actividad PG en el crudo enzimático luego de incubar las reacciones durante los periodos de tiempo indicados.

Para determinar el pH óptimo de reacción del crudo enzimático, se valoró la actividad PG frente al sustrato en buffer en un rango entre 2 y 9 unidades bajo las condiciones estandarizadas. Se obtuvo el máximo de actividad a un pH de 4,5 unidades (fig. V.6). Al pre-incubar al crudo enzimático en buffer en un rango de pH de 3 a 6 unidades durante un período de 2 h, se determinó que la PG mantuvo su

actividad por encima del 50% en un rango de pH entre 3 y 5 unidades durante un período de 1 h (fig. V.7).

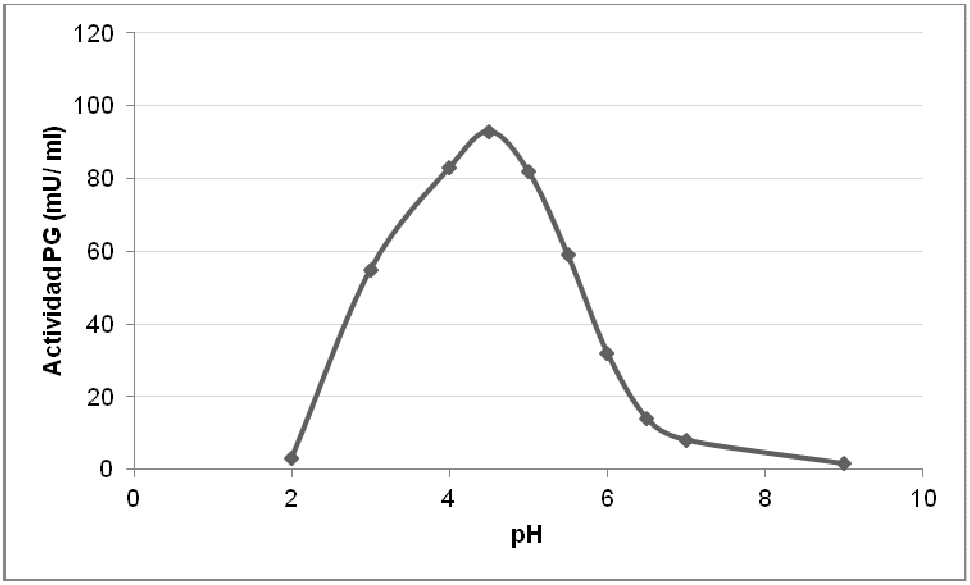

Fig. V.6: pH óptimo de la actividad PG. El efecto del pH sobre la actividad fue determinado incubando alícuotas del crudo enzimático con el sustrato disuelto en buffer citrato fosfato borato ajustado a los valores de pH indicados.

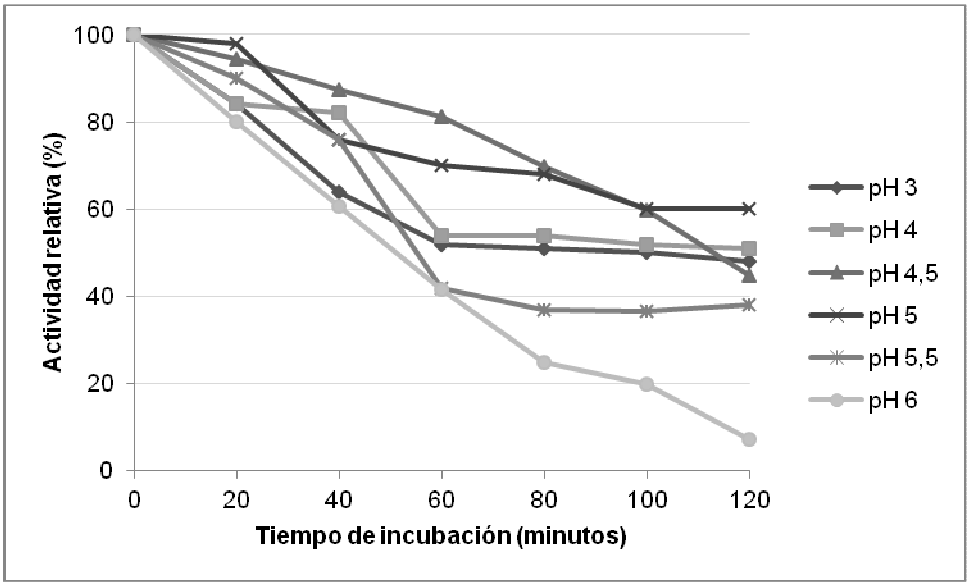

Fig. V.7: Estabilidad al pH de la actividad PG. Se valoró la actividad PG bajo condiciones estándares luego de preincubar el crudo enzimático a los pH indicados durante distintos intervalos de tiempo.

Para determinar la temperatura óptima de la actividad PG se incubaron las reacciones enzimáticas en un rango de temperaturas entre 20 y 80ºC, al pH óptimo establecido. La máxima actividad PG fue a los 50℃ (fig. V.8). Para determinar la termoestabilidad se preincubó el crudo enzimático por un período de 2 h a 30, 40 y 50℃. La actividad se mantuvo estable a los 30℃ ha sta los 90 min. A 40 y 50℃ la actividad PG resultó ser más inestable, manteniendo un 60 y 25% de actividad respectivamente (fig. V.9).

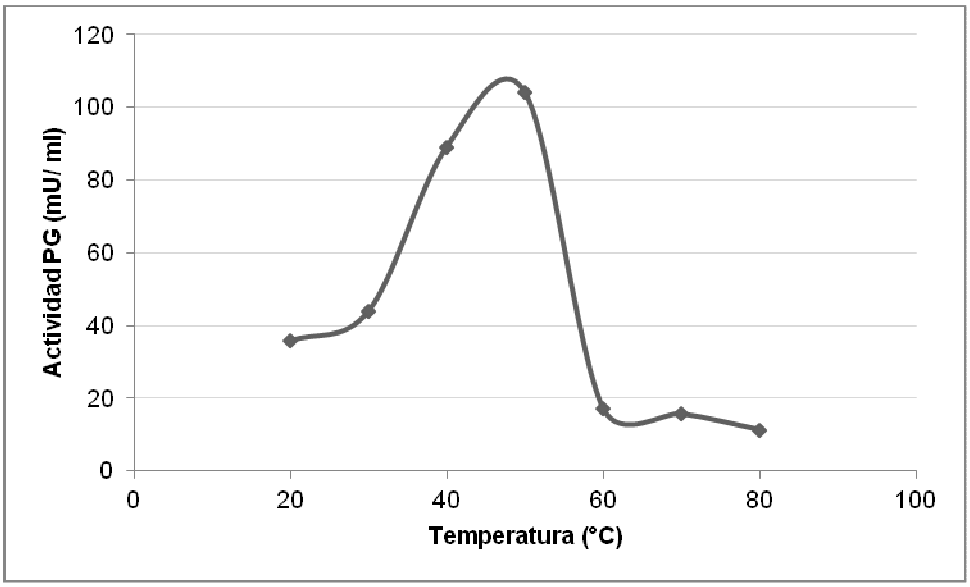

Fig. V.8: Temperatura óptima de la actividad PG. El efecto de la temperatura sobre la actividad en el crudo enzimático fue determinado incubando las reacciones enzimáticas a las temperaturas indicadas.

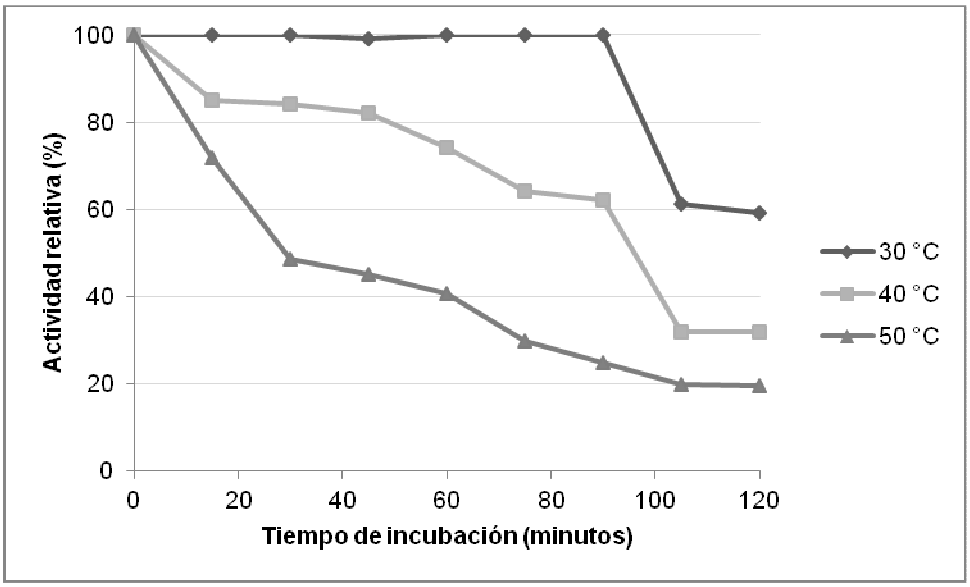

Fig. V.9: Estabilidad a la temperatura de la actividad PG. Se valoró la actividad PG bajo condiciones estándares luego de preincubar el crudo enzimático a las temperaturas indicadas durante distintos intervalos de tiempo.

Al ensayar el efecto de iones metálicos y EDTA sobre la actividad PG, a la concentración utilizada en el ensayo la actividad PG fue inhibida en el siguiente orden ascendente: Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Hg^{2+}. El Na^{2+} no tuvo efecto sobre la actividad. La actividad PG resultó inhibida en un 44% con el agregado de EDTA, lo que indicaría que el EDTA fue capaz de acomplejar metales presentes en el extracto enzimático que modularían dicha actividad (Tabla V.1).

De acuerdo al IEF y el zimograma correspondiente, el crudo contenía varias isoformas de la actividad PG, con valores de pI comprendidos entre 5 y 7.

Tabla V.1: Efectos de iones metálicos y EDTA sobe la actividad PG. Se ensayó la actividad en alícuotas del crudo enzimático con el agregado de las sales de los iones indicados y del agente quelante EDTA a una concentración final en el ensayo de 10 mM y 2 mM respectivamente.

Iones Metálicos	**Actividad relativa %**
Mn^{+2}	46,96
Ba^{+2}	9,83
Zn^{+2}	20,76
Co^{+2}	44,50
Mg^{+2}	94,63
Na^{+2}	101,24
Cu^{+2}	18,39
Ca^{+2}	16,05
Hg^{+2}	5,97
EDTA	56,43

Las respectivas caracterizaciones se realizaron según se especifica en el ítem 5.2.4

5.6.2 Purificación de la enzima PG

La enzima PG fue purificada a partir de cultivos de 2 días de incubación, dado que en ese momento se halló la máxima actividad. El medio de cultivo fue filtrado al vacío con papel Watman nº1, concentrado por liofilización y luego desalado por ultrafiltración con una membrana de corte de 10000 Da. La enzima fue parcialmente purificada en dos pasos cromatográficos. En primer lugar, se utilizó una columna de exclusión molecular Sephacryl S100, equilibrada en buffer acetato 20 mM con ClNa 0,15 mM a pH 4. La elución se llevó a cabo con el mismo buffer con 4 volúmenes de columna a un flujo de 0.5 ml/min. La concentración de proteínas se midió por absorbancia a 280 nm. La actividad enzimática se ensayó en alícuotas de cada fracción. La actividad PG eluyó como un pico de actividad en 0,6 volúmenes de columna (fig. V.10). Las fracciones con actividad se juntaron, desalaron y concentraron por ultrafiltración con una membrana de corte de 10000 Da. Como

segundo paso cromatográfico se utilizó una columna de intercambio iónico Sepharosa SP FF, equilibrada con buffer acetato 20 mM a pH 4. Como se observa en la fig. V.11, la actividad PG se eluyó con un gradiente lineal de ClNa 0-0.4 M a un flujo de 2 ml/ min, obteniéndose un único pico de actividad a una concentración de 0.25 M de ClNa. Las fracciones con actividad se juntaron, desalaron y liofilizaron.

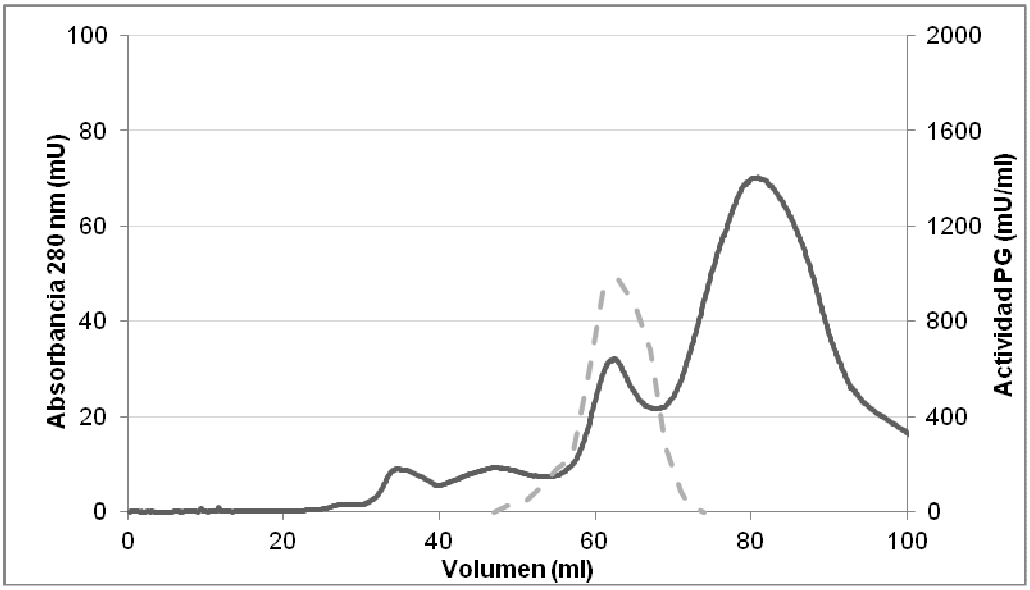

Fig. V.10: Perfil de elución de la actividad PG en cromatografía en una columna de exclusión molecular Sephacryl S100. Se utilizó como fase móvil buffer acetato 20mM con ClNa 0,15 mM a pH 4. La concetración de proteínas se midió por absorbancia a 280 nm (línea contínua). La actividad enzimática se ensayó en alícuotas de cada fracción (línea discontínua).

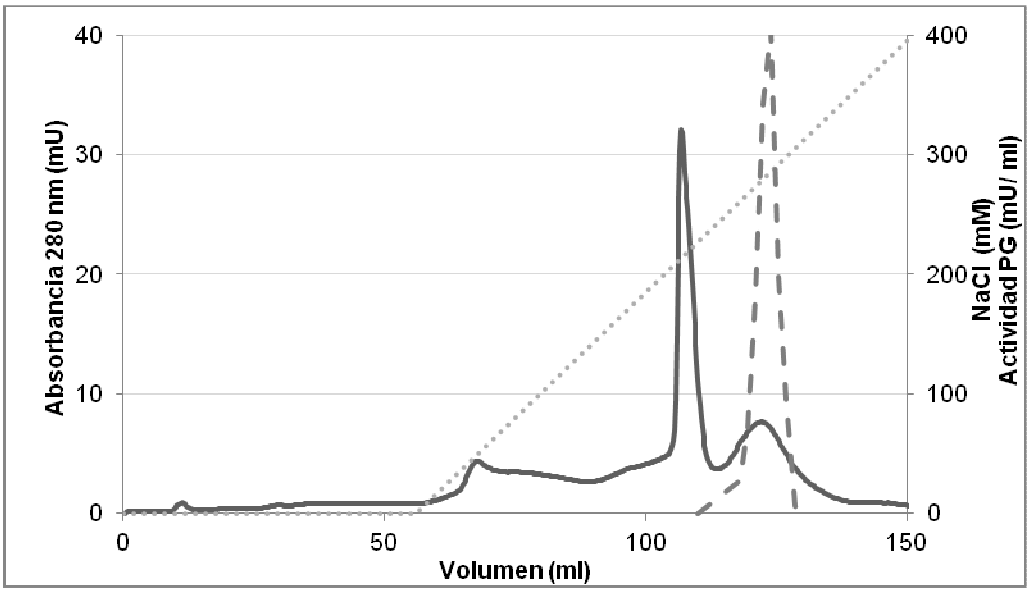

Fig. V.11. Perfil de elución de la actividad PG de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular en una columna de intercambio iónico Sepharose SP FF. La fase móvil utilizada fue buffer acetato 20 mM pH: 4,0 con ClNa 1M. Las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de 0 a 0,4 M de ClNa (linea punteada). La concetración de proteínas se midió por absorbancia a 280 nm (línea contínua). La actividad enzimática se ensayó en alícuotas de cada fracción (línea discontínua).

Luego del esquema de purificación, la enzima fue purificada 375 veces con una actividad específica de 5,41 U/ µg, obteniendo una recuperación del 6,4%. Para verificar el grado de pureza de la enzima, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. En la figura V.12, se observan 2 bandas de proteínas (una de 55 KDa y otra de 40 KDa) las cuales fueron cortadas del gel y analizadas mediante un mapeo péptidico por MALDITOF MS/ MS.

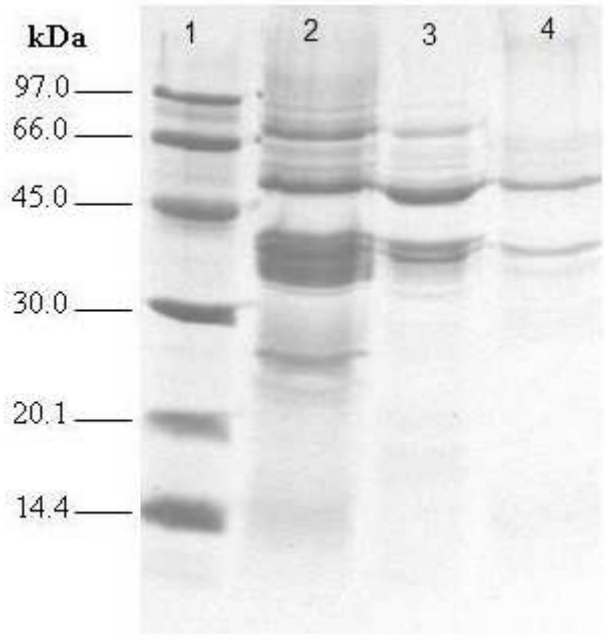

Fig. V.12: SDS-PAGE correspondiente a las distintas etapas de purificación. Calle 1: LMWM. Calle 2: Crudo enzimático. Calle 3: fracciones con actividad PG de la cromatografía de exclusión molecular Sephacryl S100. Calle 4: fracciones con actividad PG de la cromatografía de intercambio iónico Sepharose SP FF.

5.6.3 Análisis de huellas peptidicas (Maldi TOF MS/MS)

Las bandas proteicas seleccionadas se sometieron a una digestión tríptica y fueron analizadas por MALDI TOF MS/MS. Los espectros y los valores de MS/MS obtenidos correspondientes a cada una de las bandas proteicas se muestran en las figuras V.13 y V.14.

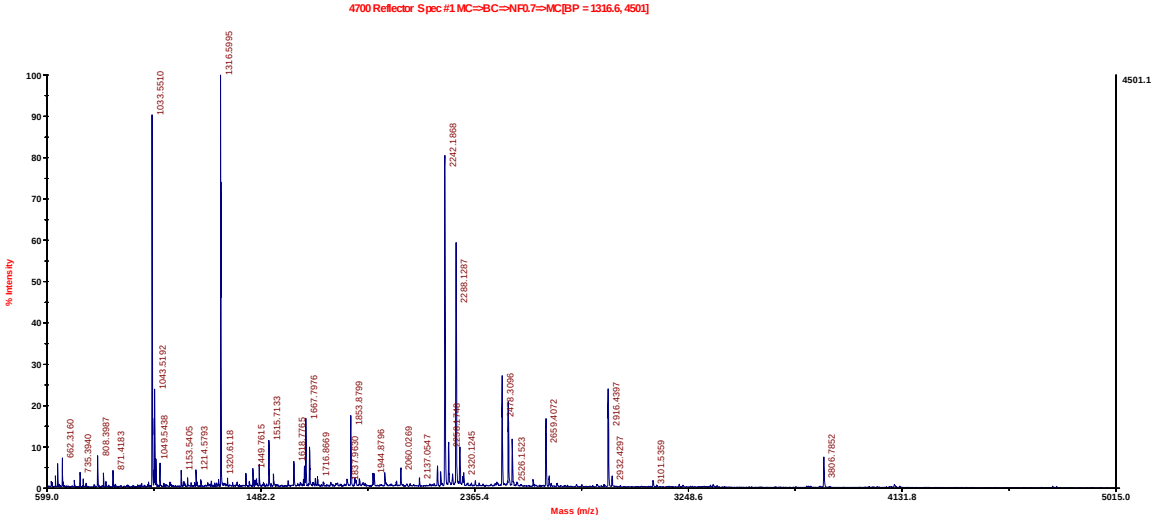

Fig. V.13: Espectro de masa obtenido por MALDI TOF-MS de la proteína de 55 KDa.

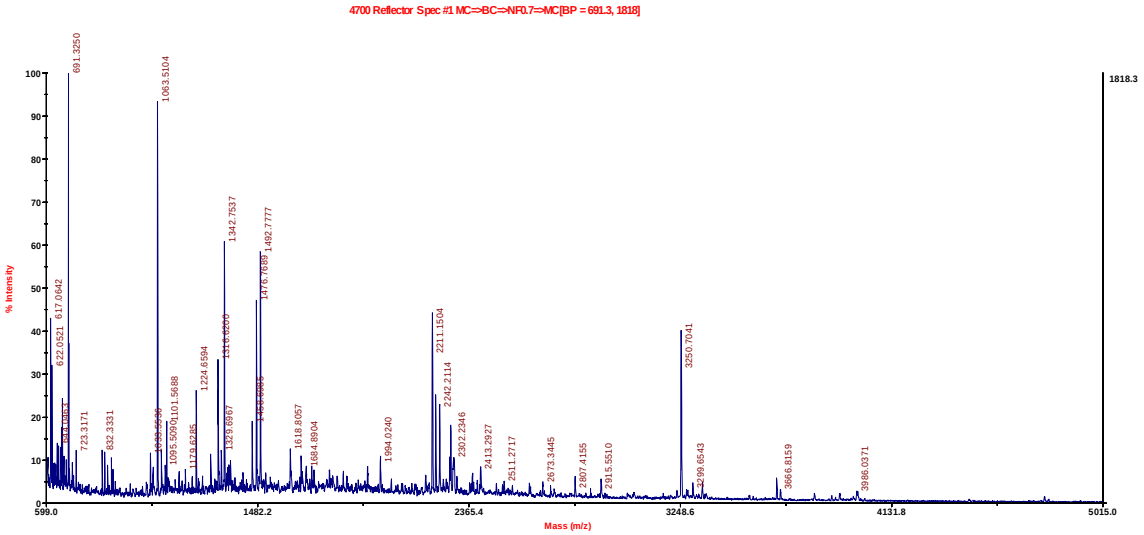

Fig. V.14: Espectro de masa obtenido por MALDI TOF-MS de la proteína de 40 KDa

Con dichos valores de MS (m/z) y MS/ MS (m/z) y empleando la herramienta MASCOT en la base de datos NCBI, la proteína de 55 KDa fue identificada por similitudes estadísticamente significativas con algunos péptidos de una proteína hipotética **FG04527.1** serin carboxi- peptidasa de *F. graminearum* (fig. V.15). La proteína de 40 KDa fue identificada de manera estadísticamente significativa a una proteína hipotética **FG11011.1** endo-poligalacturonasa de *F. graminearum* con la cual comparte la mayor parte de su secuencia (fig. V.16).

Fig. V.15: Secuencia de péptidos alineados con la proteína serin carboxi-peptidasa

1 MKAALLNVLT ALTLAGYSNA TPATTLDKRY SLEDNGIKYK VFEHAATKSQ
51 TKIVSNSGIC ETTPGVNQHS GYFSVGDNMN MWFWFFESRK NAKTAPLALW
101 LNGGPGCSSM IGLFQENGPC TFNKGGSKPT LNPYSWNTFA NMLYVDQPIG
151 TGFSYGTDDA VSTLAAAPR**V WNLLQAFYAQ FPEYENRDFG LFTESYGGHY**
201 **GPEFAYYFEQ QNAAIDAGTI K**GEK**INLVAL GINNGWIDPA NQYR**DYIEYA
251 ANNTYKKLIS STQYSK**YLNT YNQKCVPAFA K**CPGLTGNDA ACGNADDACS
301 QAIERPLENS ADFDVYDIR**A PSNDPFPPST YSTYLQSSSV MK**AIGAQSTY
351 GECPEAAYDK **FINSGDR**GRS FLSTLSKVID SKIQVLIWAG DADWICNWMG
401 NYR**ALNSIAP QSFVSAPLQS FTVDGTKYGE FKTSGNLSWL RVYGAGHEVP**
451 **AYQPQAALAA FVATLSK**KPI SST

Fig. V.16: Secuencia de péptidos alineadas (en rojo) con la proteína endo-poligalactonasa

1 MFSSMILLSG LVASAFAHPT VEPR**ASCTFT DAASAIK**GK**G SCSTIILNNI**
51 **AVPAGTTLDL TKLKDGTHVI FQGK**TTFGYD TWEGPLISFT GNNLLIEGAD
101 GHSIDCQGQR **WWDGK**GSNGG KTKPK**FFSAH SLQNSNIK**NL NVINTPVQAF
151 SINGVTNLGV YNVHMDNSLG DTQGGHNTDA FDVGSSTGVY ISGAVVKNQD
201 DCLAINSGTN ITFTGGNCSG GHGLSIGSVG GRSNNDVKTV R**ILNSSISNS**
251 **DNGVR**IK**TVS GATGSVSDVK YDSITLSNIA K**YGIVIEQDY ENGSPTGTPT
301 AGVPITDVTI NKVTGSVKSS GTDIYILCAS CK**NWTWTNNK** VTGGKTSDKC
351 QGVPSGASC

5.6.4 Caracterización de la actividad PG semipurificada

Para determinar el pH óptimo de reacción, se realizaron las reacciones enzimáticas en un rango de pH entre 3,5 y 5,5 unidades bajo las condiciones estandarizadas. La actividad PG fue máxima a pH 5 (fig. V.17). Para medir su estabilidad, se preincubó la enzima a pH 4 y 5 durante distintos intervalos de tiempo hasta las 2 h. La actividad PG fue estable a pH 5 durante dos horas, manteniéndose la actividad cercana al 100%. Sin embargo, a pH 4 la estabilidad de la actividad PG disminuyó drásticamente alcanzando un valor cercano a cero a las 2 h (fig. V.18).

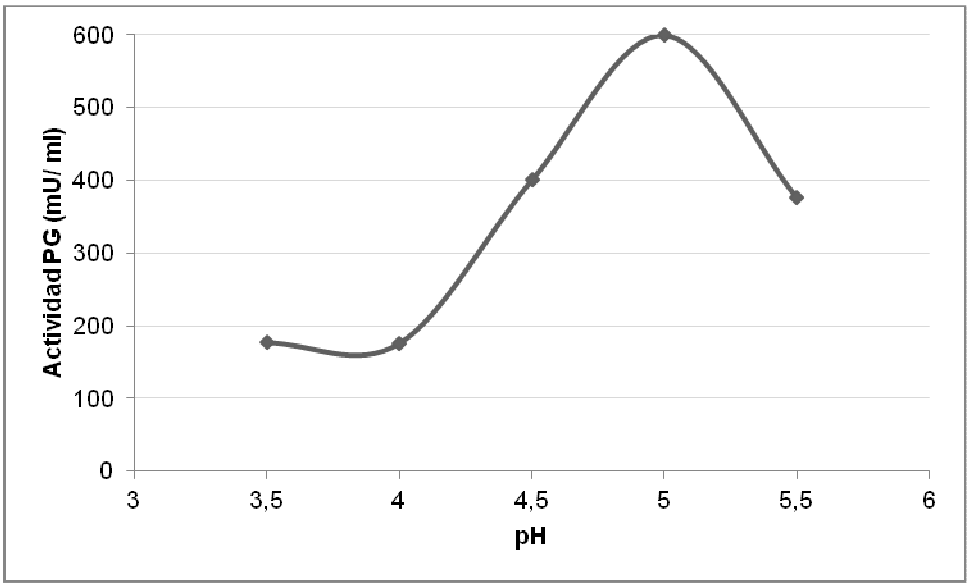

Fig. V.17: pH óptimo de la actividad PG. El efecto del pH sobre la actividad fue determinado incubando alícuotas de la enzima semipurificada con el sustrato disuelto en buffer citrato fosfato borato ajustado a los valores de pH indicados.

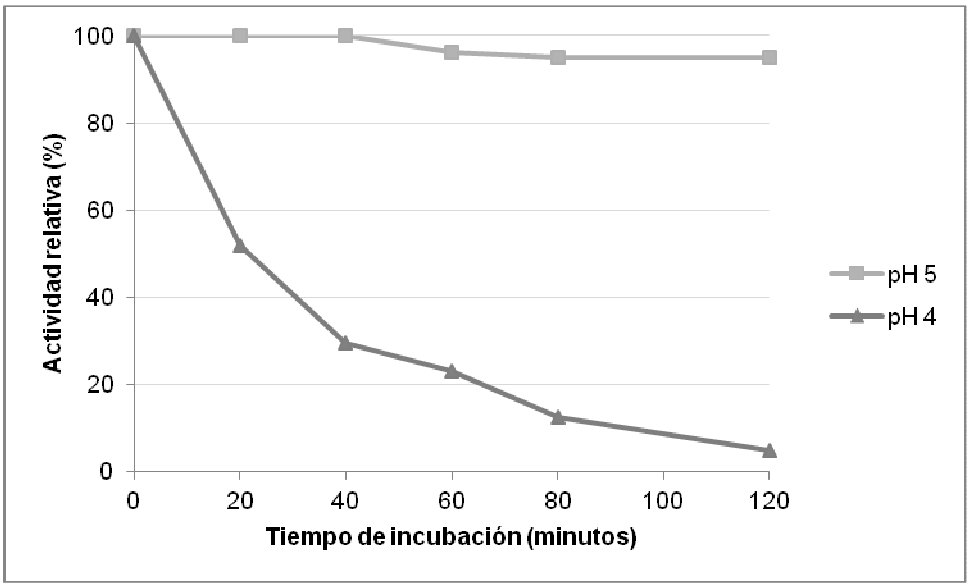

Fig. V.18: Estabilidad al pH de la actividad PG. Se valoró la actividad PG bajo condiciones estándares luego de preincubar la enzima semipurificada a los pH indicados durante distintos intervalos de tiempo.

Para determinar la temperatura óptima, se incubaron las reacciones enzimáticas en un rango de temperatura entre 30 y 50℃. La actividad PG aumentó con la temperatura llegando al máximo a los 40℃, y a partir de ésta comenzó a disminuir (fig. V.19). Para medir su termoestabilidad, la enzima fue preincubada a 30 y 40℃ por distintos intervalos de tiempo hasta las 2 horas. La enzima mantuvo

su actividad durante 2 h a 30℃, mientras que a 40° C resultó más inestable, manteniendo el 55% de su actividad (fig. V.20).

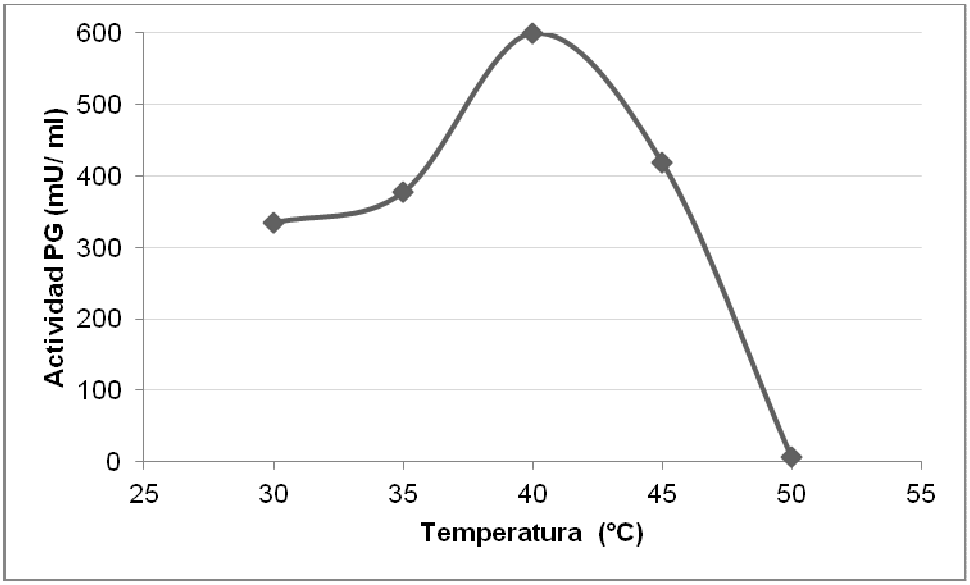

Fig. V.19: Temperatura óptima de la actividad PG. El efecto de la temperatura sobre la actividad fue determinado incubando las reacciones enzimáticas a las temperaturas indicadas.

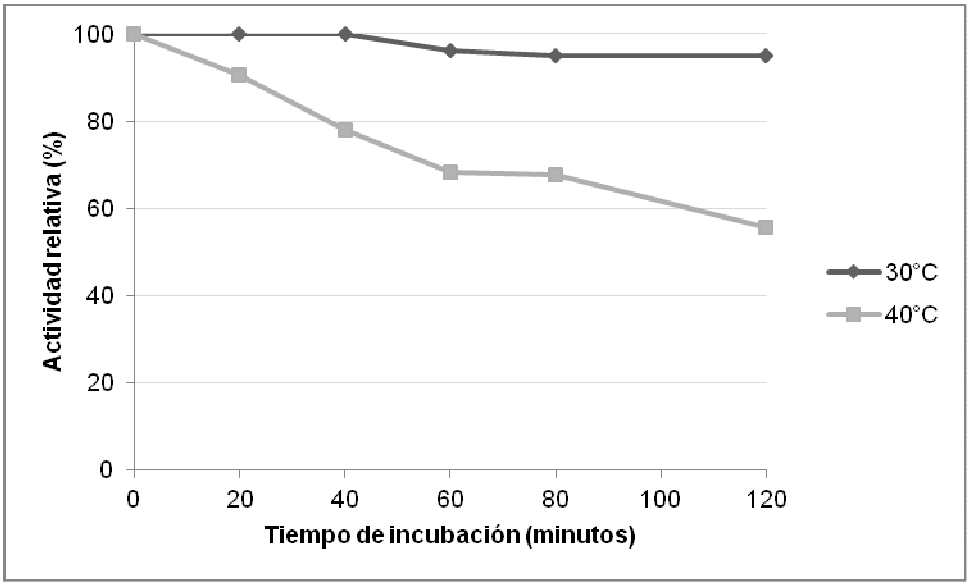

Fig. V.20: Estabilidad a la temperatura de la actividad PG. Se valoró la actividad PG bajo condiciones estándares luego de preincubar el crudo enzimático a las temperaturas indicadas durante distintos intervalos de tiempo.

Para determinar el modo de acción de la PG semipurificada (endo o exo) se preincubó con sustrato ácido poligalacturónico durante distintos intervalos de tiempo. Alícuotas de la reacción fueron corridas en una TLC junto con patrones de ácido mono-, di- y tri- galacturónico. Como puede observarse en la figura V.21, de acuerdo al patrón de fragmentación del sustrato, la actividad resultó ser una endo-poligalacturonasa.

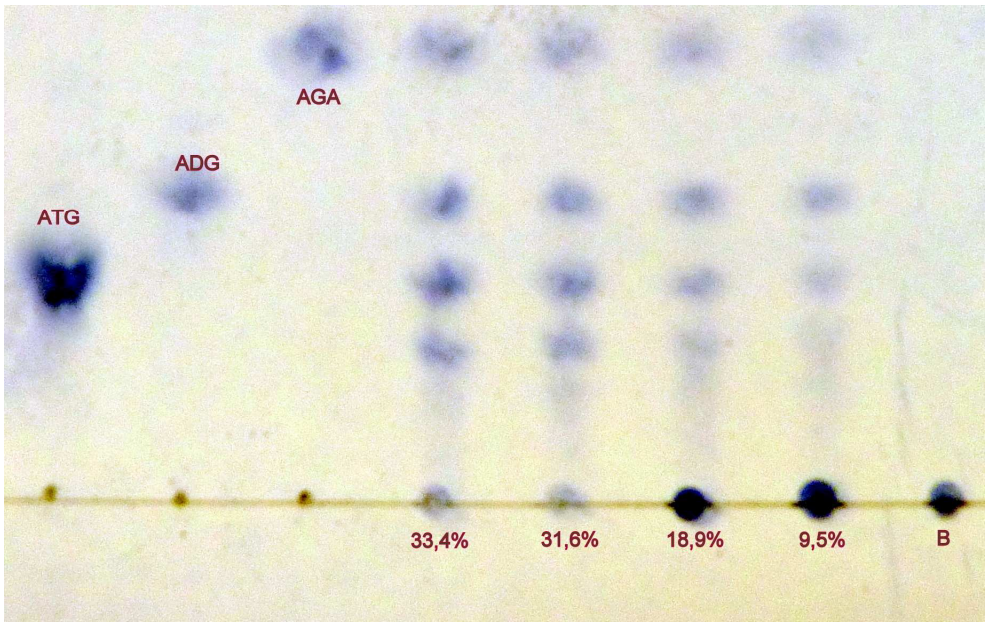

Fig. V.21: Patrón de fragmentación de la actividad endo-poligalacturonasa purificada. TLC de los productos resultantes de la actividad sobre ácido poligalacturónico a los 0 y 30 minutos, 1, 3 y 30 h. Patrones utilizados: ácido trigalacturónico, ácido digalacturónico y ácido galacturónico.

Las características bioquímicas de la actividad PG purificada (pH y temperatura óptima, estabilidades) son similares a otras enzimas fúngicas utilizadas en procesos biotecnológicos (Teramoto *et al.*, 1994; Zhang and Yang 2001). Se observa que el pH óptimo de 5 unidades de la PG semipurificada se sitúa dentro del rango normal descripto para otras PG purificadas, (Riou *et al.*, 1992; Thakur *et al*, 2010; Quiroga *et al.*, 2009). La curva de actividad frente al pH resultó ser angosta, ya que a pH 4,5 y 5,5 la actividad relativa disminuyó alrededor del 60%. La PG resultó ser estable a pH 5 durante 2 h. Con respecto a la temperatura, las

características observadas en la PG se ajustan a las de otras PG purificadas en otros organismos (Riou *et al.*, 1992, Thakur *et al.*, 2001).

En las bases de datos existentes fueron ingresados dos genes correspondientes a PG del genoma de *F. graminearum* (código: fg11011y fg03194). Con los valores de MS (m/ z) y MS / MS (m/ z) y el uso de la herramienta mascot en la base de datos NCBI, la proteína de 40 kDa fue identificada como la PG FG11011. Sin embargo, Tomasini *et al* (2009) identificaron una proteína, la cual llamaron PG1, como el producto del gen fg11011. PG1, la cual fue activa en un rango de pH de 4,0-7,0, con un pH óptimo entre 5,0 y 7,0 unidades. Los primeros estudios de PG se realizaron en cultivos *in vitro* y el uso de técnicas como el isoelectroenfoque (IEF) permitió poner de manifiesto la presencia de una gran cantidad de isoformas en los cultivos, y que el patrón de expresión de estas enzimas varía en función de diferentes condiciones, dependiendo del aislamiento, así como, de las condiciones del cultivo (Guevara *et al.*, 1997; Caprari*, et al.*, 1993). Las isoformas pueden diferir tanto en su estabilidad, actividad, pH óptimo o la preferencia de sustrato y el tipo de oligosacáridos liberados. Así mismo, se ha observado que existen modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, que contribuyen a producir nuevas isoformas. La redundancia en función de estas enzimas implicadas en el proceso de colonización podría conferir al patógeno una mayor flexibilidad a la hora de adaptarse a nuevas condiciones u hospedadores.

En la presente investigación la endo PG fue co-purificada junto con una serin carboxipeptidasa, según el mapeo peptídico por MALDI TOF Ms/ Ms. Estas proteasas pertenecen a un grupo proteico ampliamente distribuido en los hongos, así como en las plantas superiores y animales, y son particularmente abundantes en los hongos filamentosos (Degan *et al*., 1992; Blinkowsky *et al*., 1999). Las proteasas alcalinas han sido asociadas con las infecciones de fusariosis en cebada y trigo, lo que implica que las proteinasas de *Fusarium* spp, junto con otras enzimas hidrolíticas y toxinas, están fuertemente involucradas en el proceso de colonización de los granos (Ninghtingale *et al*., 1999; Schwarz *et al*., 2002; Pekkarinen *et al.,* 2007). Estas enzimas están relacionadas con la pérdida de proteínas de almacenamiento de granos produciendo cambios cualitativos y cuantitativos en las proteínas del grano, lo que altera el funcionamiento del mismo (Pekkarinen *et al*., 2000; 2003). En el presente estudio, todos los aislamientos de *F. graminearum* analizados presentaron actividad proteasa, con variaciones en su producción, bajo

las condiciones de análisis. Este tipo de enzimas y su rol en la patogenicidad serán estudiadas en investigaciones futuras.

Distintos estudios indican que la secreción de enzimas *in vitro* es un buen indicador del tipo de enzimas que un agente patógeno podría producir en relación con la enfermedad (Martínez *et al.*, 1991). Aunque la función biológica de las PG en relación a la interacción planta-patógeno, es objeto de controversia, se considera un parámetro importante en estas interacciones (Martínez *et al.,* 1991). En *F. oxysporum* y *F. solani*, se encontró una estrecha correlación entre la producción de PG y el grado de daño observado (Lang and Dornenburg, 2000). En *Claviceps purpurea*, la sustitución de dos genes estrechamente vinculados a la actividad PG condujo a una fuerte reducción de la patogenicidad en el centeno, pero la interrupción de otros genes implicados en otros CWDE (celulosa, xilanasa) no tuvo ningún efecto sobre la virulencia de forma significativa (Oeser *et al.,* 2002).

La caracterización de las PG reviste interés dado que puede ayudar a interpretar su rol en el proceso de la patogénesis y desarrollo de síntomas, así como, también en el campo aplicado de la industria alimenticia. Debido al hecho de que la aplicación de sistemas enzimáticos que contienen actividades pectinasa, celulasa y hemicelulasa es esencial para la conversión de la biomasa, los aislamientos en estudio constituyen una fuente provisional para este propósito. Las enzimas pécticas se encuentran entre las más utilizadas comercialmente, con diferentes fines biotecnológicos (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001). Cabe señalar que las PG de hongos se utilizan principalmente en la clarificación de jugos (Lang and Dornenburg, 2000).

La producción *in vitro* de las enzimas de los aislamientos de *F. graminearum* y su perfil diferencial podría estar relacionado con diferencias en la agresividad de los aislamientos, debido a la importancia de estas enzimas en las primeras etapas de la colonización, como se mencionó anteriormente. El estudio de la producción enzimática en los aislamientos nos permitió utilizar este criterio como estimativo de agresividad y seleccionar un aislamiento de *F. graminearum* para infectar distintos genotipos de trigo a campo y evaluar el comportamiento o resistencia a la enfermedad de los mismos a partir del análisis de variables patométricas y de componentes de rendimiento.

5.7 Análisis de resistencia en trigo a la FET, utilizando un aislamiento de *F. graminearum* seleccionado por su elevada producción enzimática como estimativo de agresividad

En el año 2010 se condujeron ensayos de evaluación a campo de resistencia de tipo I a la FET en diversos genotipos de trigo (cultivares y líneas) nacionales e internacionales mediante inoculación artificial con el aislamiento MJ4, bajo condiciones de control parcial de humedad y temperatura. Las pruebas fueron realizadas en el INTA-Marcos Juárez por el Ing. Agr. Enrique Alberione como parte de un trabajo en colaboración con nosotros (Kikot *et al.*, 2011).

A continuación se discute los puntos más relevantes de ese trabajo:

El material utilizado en los ensayos de patogenicidad consistió de cultivares de trigo nacionales (76 entradas), cultivares internacionales (12 Th SCAB) (42 entradas), líneas regionales del programa de mejoramiento de trigo (92 entradas) y los cultivares testigos Sumai 3, Buck Halcón (TS), ProINTA Oasis (TS), ProINTA Granar (TMR) y YMI 6-26B (TR). Los cultivares son genotipos de trigo que se comercializan, y las líneas son genotipos de trigo aún bajo análisis para ser introducidas en el mercado.

El diseño experimental respondió a un experimento de bloques completos aleatorios con dos repeticiones. La siembra de los ensayos se realizó el día 30 de julio. Se sembró en hills plots (5 a 10 semillas) por surco con disposición en tresbolillo. La inoculacón se realizó en la etapa de espigazón con una suspensión de 10^5 conidios/ ml, perteneciente al aislamiento MJ4.

Se cortaron y guardaron en sobres para la posterior observación y evaluación de la infección la totalidad de las espigas de cada hills en cada uno de los 3 ensayos.

La evaluación de la resistencia consistió en la ponderación de la enfermedad a través de las variables patométricas y variables de componente de rendimiento. Las variables analizadas fueron: incidencia (nº de espigas enfermas / total de espigas evaluadas x 100) sobre un número total de 20 espigas observadas por hills y severidad (nº de espiguillas enfermas / total de espiguillas en cada espiga x 100) y proporción de granos enfermos sobre 6 espigas enfermas evaluadas por hills. Se trillaron y se obtuvo de cada una de ellas la totalidad de los granos. Se observaron

y separaron granos sanos de enfermos, se contaron y pesaron. Con los datos de conteo y pesado de la totalidad de los granos del grupo de espigas evaluadas se obtuvo un valor promedio de la variable peso de mil granos (PMG). Se integraron los valores de % de incidencia y los valores promedios de porcentaje de severidad y porcentaje de granos enfermos y con estos se calculó el índice de incidencia, severidad y daño del grano (ISK) de la siguiente manera:

Indice ISK = (% de Incidencia x 0,3) + (% de severidad x 0,3) + (granos enfermos x 0,4)

En el ensayo de líneas regionales se calculó el índice de *Fusarium* a partir de la estimación de las variables incidencia y severidad.

Indice de Fusarium (IF) = % Incidencia x % severidad / 100

Las variables se analizaron mediante Anova (software estadístico InfoStat versión 2008).

5.7.1 Evaluación de la resistencia en los cultivares argentinos e internacionales.

En el ensayo de cultivares argentinos se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las variables, excepto en incidencia. Sin embargo, en el ensayo de variedades internacionales (12 Th SCAB) sólo se encontraron diferencias significativas en la variable PMG (Tabla V.2).

Tabla V.2: Análisis estadístico de los ensayos de cultivares nacionales e internacional.

Variables	**Cultivares nacionales**	**C. internacionales**
	p-valor	p-valor
Incidencia	0,1878	0,1718
Severidad	0,0002	0,5884
Granos enfermos	<0,0001	0,2420
Indice ISK	0,0003	0,1580
PMG	<0,0001	0,0170
Probabilidad	*p<= 0,05*	

Se encontró una correlación positiva entre las variables incidencia y severidad y el porcentaje de granos enfermos. Por el contrario, la correlación entre las variables de porcentaje de granos infectados y ISK con respecto al peso de mil granos (PMG) fue negativa. La manifestación de los síntomas tuvo una alta asociación con el nivel de infección de los granos. Al mismo tiempo, el PMG fue afectado negativamente como consecuencia de un aumento en la incidencia y severidad y por lo tanto, el aumento de la infección de los granos. La variable PMG fue afectada negativamente por el índice de ISK. El PMG fue más afectado en aquellos cultivares que mostraron una mayor susceptibilidad a la enfermedad.

Con los valores de severidad obtenidos en los cultivares argentinos, se construyó un histograma de frecuencias de FET. Los cultivares que se comportaron como resistentes (estadísticamente no diferentes a la del control resistente Sumai 3 y YMI 6-26B) fueron los siguientes: Cronox, LE 2357, Proteo Klein, Huanchen Buck, BioINTA 2005, Buck Puelche, Castor Klein, Buck AGP Fast, Arex y Klein Nutria, BioINTA 1005 Klein. Carpincho Klein Rayo, Buck Chacarero, Klein Zorro, Atlax, Buck 75 Aniversario, Buck Meteoro BioINTA 1002, Klein Tigre, ACA 906, Buck 55 CL. Todos ellos tuvieron niveles de severidad inferior al 20%. Por el contrario, fueron susceptibles (índice de severidad por encima del 50%) Baguette 11 y Baguette P 18 (fig. V.22).

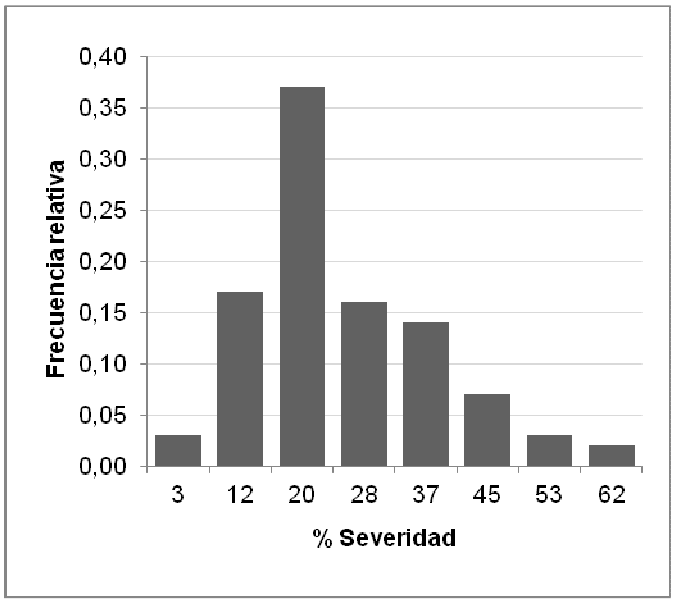

Fig. V.22: Frecuencias relativas de severidad de FET en cultivares comerciales

La tabla V.3 muestra el comportamiento hacia la enfermedad a través del análisis de las variables severidad, granos infectados e incidencia en el grupo de cultivares que mostraron niveles de severidad inferior al 15%. Los 11 cultivares incluidos en este grupo y el control Sumai 3 mostraron valores más bajos en las variables analizadas que los promedios observados en el grupo más afectado de los cultivares, considerados muy sensibles. Los promedios en el gráfico corresponden a los cinco cultivos más afectados por la enfermedad en términos de severidad: Baguette P 11 (61,9%), Baguette 18 (53,6%), B. Mangrullo (48,5%), Klein Guerrero (44,1%) y BioINTA 3000 (42,5%).

Tabla V.3: Comportamiento de cultivares resistentes argentinos versus cultivares susceptibles argentinos hacia la FET.

Cultivares resistentes	**% Severidad**	**% Incidencia**	**% Granos dañados**
BioINTA 1005	15,0	42,5	21,34
Cronox	14,6	27,5	17,92
LE 2357	14,4	40,0	21,65
K. Proteo	14,1	22,5	15,49
B. Huanchen	12,7	15,0	12,63
BioINTA 2005	12,4	25,9	25,94
Sumai 3	12,3	30,0	16,76
B. Puelche	11,9	20,1	20,1
K. Castor	11,5	25,0	14,44
B. AGP Fast	11,2	32,5	14,94
Arex	10,2	15,0	12,23
K. Nutria	0,0	0,0	0
Promedios			
Cultivares resistentes	**11,7**	**24,7**	**16,12**
Cultivares susceptibles	**50,1**	**81,3**	**60,2**

Es de destacar, que algunos de los cultivares resistentes (Klein Nutria, Arex, Buck Huanchan, Klein Proteo) mostraron valores bajos en las tres variables analizadas, mientras que BioINTA 2005, LE 2357, Buck AGP Fast y el control Sumai 3 obtuvieron niveles iguales o superiores al 30% de incidencia.

La tabla V.4 muestra el comportamiento hacia la FET de acuerdo a las variables incidencia, severidad y daños de los granos de grupos de cultivares resistentes y susceptibles argentinos frente a un grupo de variedades internacionales. Los cultivares argentinos con resistencia o buen comportamiento frente a la enfermedad mostraron para las tres variables analizadas valores promedios que fueron inferiores a los promedios en el grupo de variedades internacionales. Este grupo estaba compuesto por algunos cultivares caracterizados como resistentes, como por ejemplo: Nobeoka Bouzu Komugi, Catbird, Sumai 3, Frontana y cultivares argentinos caracterizados como moderadamente resistentes: ProINTA Granar and Klein Don Enrique. Cultivares derivados de los padres resistentes formaban parte de un grupo internacional de germoplasma:VSol/NobeokaBozu//Pel731,NinG8745/3/2*Chumi18//Jup,Yangmai5*2/Cettia,Wuh1/Vee#5/3/Chum18//Jup, Mayoor//Tksn1081/AE.Squarrosa entre otros. En este grupo de cultivares la única diferencia significativa se encontró en el PMG. Un grupo de líneas y cultivares Russell-Dr, Ning8745/3/2*Chumi18//Jup/B. Ning8745/3/2*Chum18//Jup/, Pro INTA Granar, Mayoor//Tksn1081/AE.Squarrosa NL90.13.3.10, Berkut/Ning Mai 9558, Klein Don Enrique, Catbird, Sha3/Cbrd/10/Attila*2/9/KT/Bage//FN/U/3/Bza/ presentaron un promedio de 23,3 gramos frente a otro grupo con un valor de 8,5 gramos, incluido en este último el control Sumai 3.

Tabla V.4: Comportamiento de cultivares argentinos resistentes y susceptibles versus cultivares internacionales hacia la FET.

Promedios	**% Severidad**	**% Incidencia**	**% Granos Dañados**
Cultivares argentinos susceptibles	50,1	81,3	60,2
Cultivares argentinos resistentes	11,7	24,7	16,12
Cultivares internacionales	17,2	34,72	18,39

5.7.2 Evaluación de resistencia en las líneas avanzadas de ensayos regionales del programa de mejoramiento INTA.

El comportamiento frente a la FET de las líneas de trigo de ensayos regionales del programa de mejoramiento, fue evaluado de acuerdo al valor del índice de *Fusarium* (IF) obtenido a partir de las variables porcentaje de incidencia y severidad. De acuerdo con el índice calculado, se observó mayor infección en las líneas de crecimiento de ciclo largo que en las líneas de crecimiento de ciclo corto (tabla V.5).

Tabla V.5: Comportamiento de las líneas de trigo avanzadas de los ensayos regionales del programa de mejoramiento del INTA.

Lineas	% Incidencia	% Severidad	IF
Ciclo de crecimiento largo			
T 00216	12,5	16,1	2,0
J 10004	30,4	12,5	3,8
JN 08005	32,0	12,3	3,9
JN 10005	39,1	11,1	4,4
V 00928	42,1	13,4	5,6
T 00212	44,0	22,3	9,8
P 05375	37,5	27,0	10,1
Ciclo de crecimiento intermedio			
B 20108	11,4	9,2	1,0
T 00219	4,8	34,5	1,6
W 07007	14,3	16,0	2,3
T 00221	13,3	18,1	2,4
J 10010	19,4	15,4	3,0
J 10008	17,6	17,6	3,1
T 00220	25,0	13,7	3,4
Ciclo de crecimiento corto			
JN 10019	0	0	0
T 00225	3,6	5,9	0,2
J 10015	7,7	8,7	0,7
T 00223	7,7	9,8	0,8
T 00224	2,9	27,8	0,8
T 00222	9,4	9,2	0,9
P 04842	9,4	10,9	1,0

IF: Indice Fusarium (% Incidencia x % Severidad /100).

Los resultados obtenidos sugieren que el aislamiento de *F. graminearum* utilizado como inóculo resultó ser altamente infectivo, permitiendo evaluar la enfermedad en un gran número de variedades de trigo. La elección de un aislamiento con elevada producción enzimática como indicativo de agresividad, se basó en que la actividad PG cumple un rol decisivo en el proceso de infección, dado que serían las principales enzimas responsables del debilitamiento de las paredes celulares al verse modificada la pectina, lo cual permitiría la penetración del micelio de los hongos, y por lo tanto el éxito de la infección (ten Have *et al.*, 2002; Mesterhazy *et al*., 1999) y en que las actividades proteasas son las principales actividades enzimáticas relacionadas con la pérdida de calidad de los granos (Barneix, 2007).

Se considera que la inoculación artificial en este tipo de pruebas asegura el contacto entre el patógeno y el huésped, permitiendo el éxito de la infección y el posterior avance de la enfermedad, frente a las condiciones ambientales proporcionadas. La evaluación de la resistencia tipo I a la FET es importante desde el punto de vista del mejoramiento, ya que permite caracterizar el comportamiento de los genotipos de trigo contra la enfermedad bajo condiciones similares a las que sucede en la naturaleza. Por lo tanto, este tipo de estudios hace posible la identificación de nuevas fuentes de resistencia (Gilbert and Woods, 2006).

CONCLUSIONES

Los aislamientos analizados de *F. graminearum* produjeron en medios de cultivo bajo condiciones adecuadas las actividades enzimáticas poligalacturonasa y proteasa, las cuales están relacionadas con los procesos de colonización del trigo y pérdida de calidad del grano. Debe considerarse en este punto que la habilidad patogénica de los hongos está relacionada en parte con su poder de secretar enzimas extracelulares.

Las características bioquímicas de la actividad PG son similares a las de otras enzimas fúngicas estudiadas. La actividad enzimática PG en el extracto crudo demostró ser relativamente sensible a la presencia de EDTA y ciertos cationes metálicos, y estable ante otros; demostrando en línea general su resistencia a ser inhibidos por la presencia de ciertas sales en la planta (o medio ambiente).

Se logró una semipurificación de la actividad PG, la cual co-purificó junto a una actividad proteasa, de acuerdo al análisis peptídio realizado. La actividad PG pudo ser identificada como una endo-poligalacturonasa, la cual es una enzima relevante por su mecanismo de acción en la degradación o despolimerización de la pectina. La proteasa fue identificada como una serin carboxi-peptidasa. Las proteasas son enzimas relevantes no sólo por cooperar junto a las hidrolasas en la degradación de la pared celular, sino por estar directamente relacionadas con la pérdida de calidad de los granos.

Si bien, existió cierta similitud en algunos valores observados en las caracterizaciones de la enzima en estado semipurificado con respecto al extracto crudo, otros valores difirieron. Este comportamiento podría ser un indicio de la presencia de isoformas.

El zimograma realizado demostró la presencia de isoformas PG. La presencia de múltiples formas o isoenzimas observadas en este trabajo corroboran su habilidad patogénica, ya que ellas si bien son muy similares, presentan características diferentes que le permiten adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales, confiriéndole así cierta flexibilidad a los potenciales patógenos. De este modo, puede interpretarse como una herramienta para enfrentar la diversidad que se presenta en los sustratos naturales y posiblemente, le confiere el elevado poder fitopatógeno a *F. graminearum* en un amplio y variado rango de climas y hospedadores. Sin embargo, debe considerarse que el balance entre las isoformas depende en ciertos casos de las condiciones de cultivo.

El análisis en cuanto a la producción enzimática nos permitió seleccionar un aislamiento potencialmente agresivo para evaluar de manera fiable el comportamiento ante la infección de diversos germoplasmas de trigo, e identificar nuevas fuentes de resistencia.

Si bien, se le adscribe a las enzimas extracelulares un rol relevante como componente de la agresividad de los hongos patógenos, no se registran antecedentes en cuanto a la selección de aislamientos basada en este criterio para análisis de resistencia. Por lo tanto, consideramos que este aporte es complementario a otros enfoques, en los cuales la selección de aislamientos de *F. graminearum* para evaluar resistencia se basa en la producción de micotoxinas, principalmente DON, parámetro no siempre correlacionado con los daños observados en el trigo.

El inóculo empleado en la evaluación del tipo de resistencia tipo I a la FET demostró ser altamente infectivo y permitió evaluar por primera vez la enfermedad en un amplio rango de germoplasma de trigo nacional e internacional, identificando nuevas fuentes de resistencia.

La caracterización y evaluación de los cultivares de trigo internacionales preseleccionados por su resistencia, fue llevada a cabo con el fin de verificar su comportamiento bajo las condiciones climáticas argentinas. Las variables analizadas corroboraron su buen comportamiento frente a la FET.

La evaluación frente a la FET de cultivares argentinos, nos permitió detectar nuevas fuentes de resistencia o con buen comportamiento frente a la enfermedad. Si bien, este material es considerado resistente a ciertas enfermedades de detección fácil y rápida, no había sido aún evaluada su resistencia a la FET.

De acuerdo al índice de *Fusarium* calculado en las líneas avanzadas o genéticamente estabilizadas de los ensayos regionales del programa de mejoramiento del INTA de trigo, este material mostró buen comportamiento o resistencia a la enfermedad. Si en estudios futuros se les adscribiera a estas líneas buena calidad, rendimiento y aspecto sanitario, ellas podrían ser liberadas como nuevas variedades al mercado y a su vez ser utilizadas como progenitores de nuevas líneas a analizar.