Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Detección, cuantificación y caracterización de la actividad proteolítica de los hongos manchadores de la madera

Yagodnik, Claudia

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Yagodnik, Claudia. (1997). Detección, cuantificación y caracterización de la actividad proteolítica de los hongos manchadores de la madera. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2932_Yagodnik.pdf

Cita tipo Chicago:
Yagodnik, Claudia. "Detección, cuantificación y caracterización de la actividad proteolítica de los hongos manchadores de la madera". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2932_Yagodnik.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LOS HONGOS MANCHADORES DE LA MADERA

Lic. Claudia Yagodnik

Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dra. Colette Breuil
Co-Director: Dra. Flavia Forchiassin

Forest Products Biotechnology
Faculty of Forestry
University of British Columbia
Vancouver, BC, Canadá

1997

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DETECTION, CUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLITIC ACTIVITY IN SAPSTAINING FUNGI IN WOOD

Lic.Claudia Yagodnik

Thesis for pursuing a Ph.D. degree in Biological Sciences

Thesis Director: Dr. Colette Breuil
Co-Director: Dr. Flavia Forchiassin

Forest Products Biotechnology
Faculty of Forestry
University of British Columbia
Vancouver, BC, Canada

1997

Para esos locos bajitos **Ezequiel, Nadine y Shawn**

Por que crecimos y creceremos asi de juntos, siempre

Para Javier

... Y en la calle codo a codo, somos mucho más que dos...
Por que sin vos nada de esto seria realidad

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Forest Products Biotechnology, Faculty of Forestry , *University of British Columbia*, compañeros, técnicos y docentes por compartir cada día de los cuatro años que pasamos juntos. A Srabani Banerjee , Biology Department, *University of Ottawa,* por haber logrado aún a la distancia un excelente equipo de trabajo.

Agradezco al Departamento de Ciencias Biologicas y al Departamento de alumnos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, *Universidad de Buenos Aires*, pues pacientemente han procesado los tramites correspondientes.

A Norah White por haberme representado , y coordinado este rompecabeza desde tan lejos. Agradezco infinitamente a Laura Bocanera que leyó muchas veces este manuscrito. A las *cotorras* y muchos otros con los que comparti el camino de mí vida que , pese a la distancia fisica, nos encontró más de una vez muy cerca con el corazón. Amigos así son un privilegio.

A Javier , Ezequiel, Nadine y Shawn, lo mejor que me ha dado la vida, les agradezco la paciencia y el empuje en cada instante de este largo camino. A mis padres y hermanos, por su comprension y ayuda en este emprendimiento.

A la Dra. Flavia Forchiassin por sus direcciones e ideas en transformar este escrito. Y especialmente por haber estado presente en todo momento.

Por ultimo, mi especial y enorme agradecimiento a la Dra. Colette Breuil, por haberme apoyado día a día, a lo largo de todos estos años, haciendo posible este proyecto. Su confianza , su infinita energía y creatividad.
Su cálido vinculo permitió un mutuo crecimiento a nivel profesional y personal.

A todos ustedes, Gracias

Resumen

El manchado de la albura de la madera es un defecto cosmético producido por los hongos manchadores pertenecientes a los Ascomicetes especialmente a los géneros *Ophiostoma y Ceratocystis* o los hongos imperfectos. La coloración se produce por el crecimiento de las hifas del hongo que penetran la albura. El principal interés es entender como el hongo coloniza la madera, para poder sugerir métodos alternativos de protección de la madera y reemplazar el método químico existente como así también, métodos que permitan su detección temprana.

Se describe la caracterización y cuantificación , de endopeptidasas y exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas) obtenidas de diferentes especies de hongos manchadores crecidos en medio líquido y su sustrato natural la madera. Se realizaron estudios del efecto de temperaturas , pH y metales, con el fin de obtener información acerca de óptimas condiciones en las que este aparato enzimático se pone en acción in vitro para luego reproducir los parámetros en la madera infectada *(Pinus contorta var. latifolia)*.

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales y policlonales con el fin de detectar enzimas proteoliticas de *Ophiostoma piceae 387N* in vitro y en la madera. Se describe método de cuantificación del hongo manchador *Ophiostoma piceae 387N*

con el uso de anticuerpos monoclonales. Permitiendo un análisis rápido, sensible y accesible de immunoblotting. Para la detección temprana y cuantificación de los hongos manchadores.

Summary

Sapstain is an economically important cosmetic defect of softwood lumber caused by different fungi. The discoloration of the wood is caused by pigmented fungal hyphae growing in the nutrient rich sapwood. Most of the staining fungi belong to the Ascomycetes, especially to the genera *Ophiostoma* or *Ceratocystis* or the fungi imperfecti. The main interest is to understand wood colonization by staining fungi, in order to suggest alternative approaches to the present chemical wood protection methods and to develop an early detection system.

The study of the proteolytic system in liquid media and in wood of these fungi is presented. Endoproteinases and exopeptidases (aminopeptidases and carboxipeptidases) were obtained from several sapstaining fungi growing in liquid media or in wood. The enzymes were characterized for optimal temperature, pH and inhibitors in liquid media and further on in the natural habitat of this fungi, the sapwood (*Pinus contorta var. latifolia*).

Monoclonal antibodies against semipurified proteinase of *Ophiostoma piceae 387N* and policlonal antibodies against commercial proteinase K were used for detection on Western blots and Immunodots, of the enzymes in liquid media and wood. For early detection a simple and rapid image analysis program is shown.

Dot immunobinding assays (DIA) are widely used, for detection and sometimes quantification of several types of antigen. The system is used in this case to detect at early stages of infection the presence of staining fungi and to quantify it.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

- Staining fungi growing in softwood produce proteinases and aminopeptidases

C. Breuil, C. Yagodnik, and L. Abraham.

Mat & Orga. Volumen 4, pp. 1, 1995

- A simple image analysis program for quantitative dot assays

C. Yagodnik , J. A. Olson, C. Breuil and A. G. Robertson

Biotechnology Techniques. Volume 8 pp. 357. 1994

- A method for detecting carboxypeptidase activity in the sapstaining fungus, *Ophiostoma piceae*, growing in artificial medium or in wood

S. Barnerjee, H. Kaplan, C Yagodnik, C Breuil and D.L. Brown

Biotechnology Techniques. Volume 9 pp. 241. 1995

Indice

1. INTRODUCCIÓN **5**

1.1 Clasificación de las Manchas 6
1.2 Manchado de la Madera 9
1.3 Breve reseña de métodos utilizados para la prevención de 10
1.4 Microorganismos productores de mancha azul y sus hospe 12
1.5 Desarrollo de Manchas 14
1.6 Taxonomía de los hongos ofiostomatoide 15
1.7 Diferencias entre *Ceratocystis* y *Ophiostoma* 16
1.8 Modos de dispersión 16
1.9 Requerimientos para su cre 17
1.10 Nitrógeno en la madera 18
1.11 Proteinasas 19
1.11.1 Inhibidores de proteinasas *22*
1.12 Cuantificación del hongos en la madera. Parámetros hasta e 23

OBJETIVOS **30**

Modalidad de acción de Forest Products Biotechnology *32*

2. MATERIALES Y MÉTODOS **33**

2.1. Cepas Utilizadas 33
2.2. Crecimiento de las difere s especies de hongos 33
2.2.1 Medio líquido *33*
2.2.1.a Determinacion de peso seco 34
2.2.2 Crecimiento en madera *35*
2.2.2.a Determinacion del porcentaje de humedad de la madera 36
2.3 Preparación de la muestra de enzimas 36
2.3.1. Endopeptidasas de las especies crecidas en medio liquido *36*
2.3.2 Preparación de las muestras de aminopeptidasas de hongos crecidos en medio liquido *38*
2.3.3 Carboxipeptidasas *39*
2.4 Determinación de la actividad enzimática 39
2.4.1 Endoproteasas *40*
2.4.2 Aminopeptidasa *40*
2.4.3. Carboxipeptidasas *41*
2.4.3.a Preparación de los sustratos dansylados 41
2.4.3.b Ensayo de carboxipeptidasa 43
2.5 Caracterizacion de enzimas 44
2.5.1 Temperaturas para endopeptidasa *44*
2.5.2 Temperaturas para aminopeptidasas *44*
2.5.3 Efectos del pH en aminopeptidasas *45*
2.5.4 Efectos de cationes bivalentes en aminopeptidasas *45*
2.5.5 Efecto de inhibidores *45*
2.5.5.a Endopeptidasas 45
2.5.5.b Aminopeptidasas 46
2.6 Medición de la biomasa por ergoste 48
2.7 PAGE, IEF y enzimogramas 49
2.8 Inmunoensayos 50
2.8.1 Produccion de anticuerpos *50*
2.8.1.a Anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de Ophiostoma piceae 387N 50
2.8.1.b. Anticuerpos policlonales contra proteinasa K de Tritirachium album 51

Indice cont.

2.8.2 Western blot *52*
2.8.3 Inmunodot *54*
2.9 CUANTIFICACION DE *OPHIOSTOMA PICEAE 387N* 55
2.9. 1 ELISA en columnas *55*
2.9.2 Inmunodot en madera *56*
2.9.2.a Extracción del antígeno (hongo) de la madera 56
2.9.2. b Inmunodot. Materiales 57
2.9.2.c Dot Inmunoblot 58
2.9.3 Desarrollo del software apropiado para analizar la imagen obtenida *60*
2.10 VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS 64
2.11 ENSAYO DE PROTEÍNA POR DOT 66

3. RESULTADOS **68**

3.1 ENDOPROTEASAS EN MEDIO LIQUIDO 68
3.1.1 Actividad proteolítica durante el crecimiento fúngico *68*
3.1.2 Actividades proteolíticas a diferentes temperaturas *74*
3.1.3 Efectos de inhibidores de Endoproteasas *76*
3.1.4 Perfiles de Endoproteasas *79*
3.2 AMINOPEPTIDASAS EN MEDIO LIQUIDO 82
3.2.1 Actividad Aminopeptidasa *82*
3.2.2 Efectos de pH y Temperatura *87*
3.2.3 Efecto de iones bivalentes e inhibidores *90*
3.3 PRODUCCIÓN DE ENDOPROTEINASAS Y AMINOPEPTIDASAS EN HONGOS CRECIDOS EN MADE 93
3.4 CARBOXIPEPTIDASAS DE HONGOS CRECIDOS EN MEDIO LIQUIDO Y EN MADERA 101
3.4.1 Medio Liquido *101*
3.4.2 Madera *103*
3.5 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS 105
3.5.1. Anticuerpos Monoclonales contra la Proteinasa de Ophiostoma piceae 387N *105*
3.5.2 Anticuerpos policlonales contra la Proteinasa K de Tritirachium album *105*
3.6 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR MÉTODOS INMUNOLÓGICOS DE *OPHIOSTOMA PICEAE 387N* E MADERA 109
3.6.1 ELISA en columnas *109*
3.6.2 Cuantificación del hongo por inmunodot en medio líquido y madera *110*
3.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR DOT 117

4. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN **119**

5. BIBLIOGRAFIA **137**

Indice de Figuras

FIGURA 1: ASPECTO DE LA MADERA LUEGO DE 7 DÍAS Y 14 DÍAS DE INFECCIÓN, PARA LOS HONGOS OPHIOSTOMA PICEAE 387N, ALTERNARIA TENUIS, OPHIOSTOMA AINOAE, OPHIOSTOMA PICEAE 387E, OPHIOSTOMA PICEAE 212735 Y EL MOHO VERDE TRICHODERMA HARZIANUM 8

FIGURA 2: A: ESQUEMA DE ANÁLISIS DE LA MEMBRANA SCANNEADA.. 62

B: COMO LA MAQUINA RECONOCE A TRAVÉS DE UN ALGORITMO EL NIVEL DE GRIS MÁS ALTO, ENMASCARANDO E

FIGURA 3: CINÉTICA DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DE O. POPULINUM 671A Y TRICHODERMA HARZIANUM E58 CRECIDOS EN LECHE DESCREMADA Y LECHE DE SOJA. 69

FIGURA 4: ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA MEDIDA A PH 8.0 (O) Y PH 5.0 (●) DEL FILTRADO DEL CULTIVO DE O. PICEAE 212735 CRECIDO EN MEDIO CON LECHE DE SOJA:..... 72

FIGURA5: CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR O. AINOAE 701A CRECIDA EN MEDIO CON LECHE DE SOJA. 73

FIGURA 6: BANDAS PROTEOLÍTICAS DE LAS MUESTRAS DE LOS FILTRADOS DEL CULTIVO DE NUEVE CEPAS DE HONGOS DETECTADAS POR FILM DE RAYOS -X. LOS GRÁFICO MUESTRAN EL REVELADO DE IEF, PAGE NATIVO 81

FIGURA 7: PATRÓN DE CRECIMIENTO DE O. PICEAE 387N (O-O), O. PICEAE 387 E(●-●), O. PICEAE 212735(∇-∇), T. HARZIANUM E58(□-□), Y O. AINOAE 701A(Δ-Δ) EN MEDIO SEMI-SINTÉTICO SUPLEMENTADO CON LECHE DE SOJA, COMO FUENTE DE PROTEÍNA. 85

FIGURA 8: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA, EXPRESADA EN NMOLES DE NITROANILINA HIDROLIZADA / HORA / ML DE CULTIVO, A DIFERENTES TIEMPOS DE CRECIMIENTO, DE O. PICEAE 387N (O-O), O. PICEAE 387 E(●-●), O. PICEAE 212735(∇-∇), O. AINOAE 701A (□-□), Y T. HARZIANUM E58 (Δ-Δ). 86

FIGURA 9: PERFIL DE PH DE LA ACTIVIDAD DE AMINOPEPTIDASA AL DÍA 7 EN, O. PICEAE 387N (O-O), O. PICEAE 387 E(●-●), O. PICEAE 212735 (∇-∇), O. AINOAE 701A (□-□), Y T. HARZIANUM E58 (Δ-Δ) 88

FIGURA 10: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA AL DÍA 7 DE O. PICEAE 387N (O-O), O. PICEAE 387 E(●-●), O. PICEAE 212735 (∇-∇), O. AINOAE 701A (□-□), Y T. HARZIANUM E58 (Δ-Δ) 89

FIGURA 11: ACTIVIDADES DE AMINOPEPTIDASA, ENDOPROTEASA Y CONTENIDOS DE ERGOSTEROL EN LA ALBURA DE PINUS CONTORTA (LODGPOLE PINE) INOCULADA CON OPHIOSTOMA PICEAE 212375 95

FIGURA 12A: ELECTROFORESIS EN PAPEL A PH 2.1 PARA LA DETECCIÓN DE CARBOXIPEPTIDASAS EN OPHIOSTOMA PICEAE CRECIDO EN MEDIO LIQUIDO SUPLEMENTADO CON PROTEÍNAS. A. ACTIVIDAD DE CPA INCUBANDO CON DANSYL-GLY-PHE. 102

FIGURA 12B: ACTIVIDAD DE CPB INCUBANDO CON DANSYL-GLY-ARG 102

FIGURA 13A: ELECTROFORESIS EN PAPEL A PH 2.1 PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD CARBOXIPEPETIDASA EN OPHIOSTOMA PICEAE CRECIENDO EN MADERA. ACTIVIDAD DE CPA INCUBANDO CON DANSYL-GLY-PHE. 104

FIGURA 13B: ACTIVIDAD DE CPB INCUBANDO CON DANSYL-GLY-ARG. 104

FIGURA 14: ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE PROTEASA DE O. PICEAE 387N Y FUE [illegible] SEPARADAS POR SDS-PAGE. 107

FIGURA 15. (A). IMMUNOBLOT CON ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEINASA K DE TRITIRACHIUM ALBUM FRACCION IGG. (B) SIN ANTICUERPO PRIMARIO COMO CONTROL. 108

FIGURA 16: CURVA DE CRECIMIENTO DE OPHIOSTOMA PICEAE 387N. MEDICIÓN DE BIOMASA, ERGOSTEROL Y ANTÍGENO DE PARED CELULAR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES 4G3 111

FIGURA 17: INMUNODOT.PARA CUANTIFICAR O. PICEAE 387N EN MADERA INFECTADA POR DOS SEMANAS.. 113

FIGURA 18: BIOMASA FUNGICA POR DOT PARA TRES DÍAS (□) , UNA SEMANA (O) Y DOS SEMANAS (Δ) DE CRECIMIENTO EN MEDIO LIQUIDO. 115

FIGURA 19. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (BSA) POR INMUNODOT. 118

Indice de Tablas

TABLA 1: DATOS DE PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN DE LA MADERA ASERRADA EN PAÍSES PRODUCTORES 12
TABLA 2: ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS DE DIFERENTES HONGOS MANCHADORES AL DÍA DE MÁXIMO CRECIMIENTO 71
TABLA 3: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS DE NUEVE CEPAS DE HONGOS. 75
TABLA 4: EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASA EN LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS DE NUEVE CEPAS DE HONGOS. 78
TABLA 5: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA, OBSERVADA EN CÉLULAS DE PELLET Y SOBRENADANTE OPHIOSTOMA PICEAE 387N A DIFERENTES DÍAS DE CRECIMIENTO 84
TABLA 6: EFECTO DE VARIOS IONES BIVALENTES EN LA ACTIVIDAD DE ANIMOPEPTIDASA EN DE O. PICE 387N (OPN) O PICEAE 387 E(OPE), O. PICEAE 212735(OP5) O. AINOAE 701A (OA), Y T. HARZIANUM E58 (TH), USANDO L-LEU-PNA COMO SUSTRATO. 91
TABLA 7: INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA O. PICEAE 387N (OPN) O PICEAE 387 E(OPE), O. PICEAE 212735(OP5) O. AINOAE 701A (OA), Y T. HARZIANUM E58 (TH), USANDO L-LEU-PNA COMO SUSTRATO. 92
TABLA 8: ACTIVIDAD DE PROTEASA Y CONTENIDO DE ERGOSTE ; ; ECTADA CON HONGOS CROMOGÉNICOS. 94
TABLA 9: EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASA POR HIDRÓLISIS DE AZOCOLL EN LAS MUE. ' MADERA INFECTADAS CON DIFERENTES HONGOS MANCHADORES. 99
TABLA 10: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN MADERA INFECTADA CON DIFE ; ; HONGOS MANCHADORES. 100
TABLA 11 ELISA EN MADERA EN COLUMNAS. 109
TABLA 12. (A) VALORES DE INTENSIDAD DE PIXEL DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN LOGRADA CON O. PICEAE 387N CRECIDO EN MEDIO LIQUIDO Y (B) LOS VALORES LOGRADOS PARA LAS DIFERENTES EXTRACCIONES CON SDS 1%. 116

1. Introducción

Tradicionalmente, los hongos manchadores observados en la albura han sido categorizados ya sea como hongos manchadores que penetran en las células del parénquima de la madera, o como mohos que causan un cambio de color en forma superficial. En condiciones favorables de humedad y temperatura el hongo coloniza los troncos recién caídos, la madera recién aserrada, chapas y otros productos madereros, no importando si ellos aun no han sido procesados, o si han sufrido algún tipo de transformación (tinción, por ejemplo). Aunque la colonización de este tipo de hongos no tiene efecto significativo en la estructura de la madera o su resistencia (no hay evidencia de disolución de la pared celular, como se observa en la pudrición de la madera), la decoloración es objetable por los compradores arrojando pérdidas económicas significativas para los productos derivados de la industria forestal. La natural belleza de la madera es la mayor razón para su amplio uso en la construcción y mueblería, y muchos usuarios pagan sobreprecios por madera limpia y libre de defectos. Desafortunadamente, un número significativo de sustancias químicas y agentes biológicos, reducen su estética y a veces su estructura. La mayoría de las decoloraciones objetables, primariamente biológicas en su origen aparecen en la albura durante el estacionamiento y almacenaje de la madera. Si bien se presume que esta colonización micótica no tiene efecto significativo en la estructura o en la

resistencia de la madera (Seifert, 1993 y Seifert y Grylls, 1991) nuestro principal interés es entender como estos organismos colonizan la madera y así poder ofrecer a la industria diferentes alternativas frente al sistema químico que en la actualidad se utiliza. Su alta toxicidad para el medio ambiente requiere de una nueva estrategia para su control.

1.1 Clasificación de las Manchas

Las manchas anormales que ocurren en los aserraderos se pueden clasificar del siguiente modo:

1. Manchas causadas por mohos y hongos manchadores

- Manchas superficiales causadas por mohos que se manifiestan físicamente en forma de polvillo de fácil remoción. Puede ser de color negro, verde o amarillento
- Manchas en albura causadas por hongos manchadores que penetran profundamente y que además tienen hifas oscuras. Estas manchas varían en color pero usualmente son gris-azuladas, ocasionalmente negras, verdes, violetas o rosadas y mas raramente marrones.

2. Decoloraciones resultantes de una muerte incipiente por hongos xilofagos (Brown rot y white rot)

Este puede causar un aclaramiento en el color de la madera (white rot), es un tipo de pudrición que aparece en maderas duras en forma de parches o bolsillos. Otras provocan el oscurecimiento de la madera (brown rot) el cual toma la forma de líneas marrones o violáceas que corren paralelas a lo largo de las fibras. Cuando se sospecha la presencia de una muerte incipiente, se debe analizar la firmeza de la madera. Se realiza un test sobre astillas observando si al levantarla con un escalpelo se rompe inmediatamente indicando que la fibra de la madera se ha debilitado por el deterioro.

3. Manchas causadas por contacto de la madera con sustancias químicas

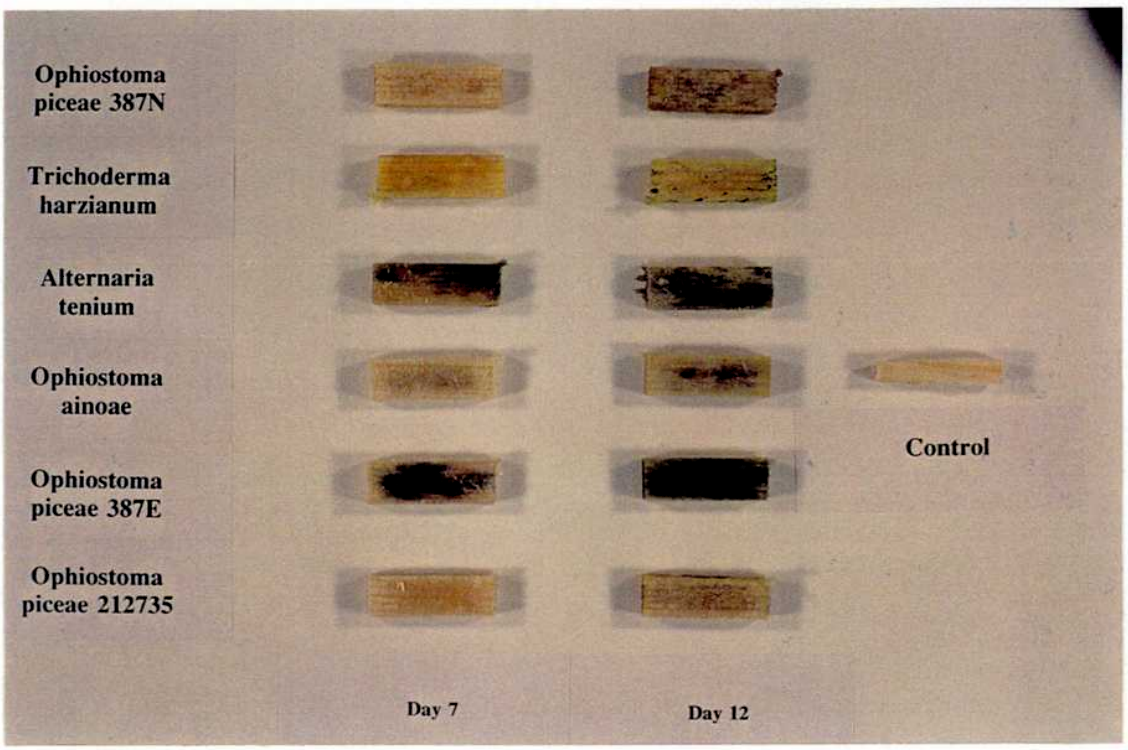
   Un ejemplo de este caso son las manchas de tintura en roble resultante del contacto de la misma con hierro, que reacciona con el tanino de la madera. Las manchas químicas aparecen usualmente como zonas llenas de agua o como manchas que no siguen la dirección de las vetas en la madera.

4. Manchas causadas por cambio en el contenido celular

   Manchas grises en plátanos, manchas internas y otras debido a cambios en el contenido celular o composición de la savia.

5. Coloraciones anormales del duramen de dudoso o desconocido origen

Figura 1: Aspecto de la madera luego de 7 días y 14 días de infección, para los hongos Ophiostoma piceae 387N, Alternaria tenuis, Ophiostoma ainoae, Ophiostoma piceae 387E, Ophiostoma piceae 212735 y el moho verde Trichoderma harzianum



1.2 Manchado de la Madera

El manchado de la madera es un problema generalizado que afecta a la industria de los productos forestales en el mundo entero. En Canadá la industria maderera sufre anualmente grandes pérdidas monetarias debido a la decoloración de la madera. La razón radica en que compradores en el mercado internacional no están interesados en la compra de productos que tengan manchas azul grisáceas. Se pagan altas primas de seguros por la compra de madera limpia y libre de defectos.

Existen entre 150 y 200 especies conocidas en el mundo que producen coloración en la madera. Estos hongos pueden ser penetradores (manchadores) o colonizadores superficiales (moho) (Findlay, 1959). Estos últimos crecen en la superficie y pueden ser cepillados de la madera, mientras que los manchadores azules de la madera penetran profundamente en la madera coloreandola con hifas pigmentadas, oscuras, o por la producción de pigmentos que difunden a través de las paredes celulares. Es este manchado azul producido por hongos, responsable de millones de dólares de reclamos por la calidad del producto que la industria maderera canadiense, y en el futuro aquellos interesados en introducirse en el mercado internacional, sufren anualmente.

1.3 Breve reseña de métodos utilizados para la prevención de la mancha azul

En la década del 60, se manifestó la preocupación por el uso de compuestos con mercurio, que por su alta toxicidad fueron finalmente retirados de los aserraderos y sus industrias derivadas como los molinos de pulpa y papel. Se empezó entonces, a utilizar compuestos como pentaclorofenato de sodio (PENTA) o tetra clorofenato, solo o con bórax para la prevención de las manchas. En años recientes, la presencia de trazas de dioxina en algunos productos pentaclorados, llevó al uso de sustancias químicas alternativas para el embebido o pulverizado de la madera. Los compuestos pentaclorofenados tienen la desventaja de ser altamente tóxicos y de acumularse en tejidos animales, como así también la persistencia de los mismos por periodos prolongados en el medio ambiente. Sin embargo en América del Norte y en muchos países desarrollados, se sigue utilizando pentaclorofenatos (Zabel y Morrell , 1992)

La restricción de los pentaclorofenatos resultó en una evaluación extensiva para identificar posibles alternativas. Compuestos tales como oxido de cobre, tiazoles, metiltiobenzotiazol, bistiocianato de metileno, y algunos compuestos de amonio cuaternario son utilizados solos o en mezclas para combatir especies resistentes. Por otro lado, además del excesivo costo, ninguno demostró ser completamente efectivo como el pentaclorofenol (Seifert y Grylls, 1991; Forintek Canadá Corp.).

Se evaluaron, no sólo los métodos químicos para el control, sino también el uso de microrganismos que por competencia prevengan el crecimiento de hongo. Se ha visto que varios microorganismos inhiben el crecimiento del hongo *in vitro* permitiendo de este modo la protección de la madera bajo condiciones de humedad. Otra alternativa es el estudio de los mecanismos de formación del pigmento, encontrando un método que impida el desarrollo de la mancha, sin afectar el crecimiento del el hongo. Sin embargo, esta alternativa deja abierta la posibilidad que ocurra el decaimiento de la madera. El estudio del metabolismo proteico es la alternativa que se presenta en esta tesis. Alterando este metabolismo se inhibiría el crecimiento del hongo sin dañar el medio ambiente.

La protección de la madera se realiza en la actualidad en países productores de madera aserrada. En Canadá por ejemplo los beneficios del uso de productos para el control de mancha han sido estimados para British Columbia en cerca de los $388 millones por año. No proteger la madera con estos productos además de traer pérdidas por reclamos puede significar la pérdida de ese mercado en particular (Forintek Canadá Corp. , 1991) (Tabla 1).

TABLA 1: DATOS DE PRODUCCIÓN Y PROTE '

Madera aserrada tratada vs. Producción

(millón de m3)	Canadá	Japón	USA	Finlandia	Nueva Zelanda	Chile	Suecia
Madera aserrada tratada.	10	7	4.5	3	2	2	1
Producción de madera aserrada	60	30	90	8	2.5	3	11

1.4 Microorganismos productores de mancha azul y sus hospedadores

La categorización mas reciente de estos organismos que infectan la industria canadiense fue realizada por Keith A. Seifert y Brian T. Grylls en 1991. Ellos realizaron una búsqueda orientada a los organismos presentes en aserraderos y bosques en Canadá ilustrando su distribución y existencia en esos medios (Seifert y Grylls, 1991).

Los hongos aislados fueron agrupados en cuatro categorías llamadas: Ophiostomatales, Mohos Dematiaceos, Mohos Verdes y Levaduras Negras. La clasificación descripta fue realizada en base a similitudes biológicas y a un esquema previo de clasificación realizado por Käarik, 1980 (Seifert y Grylls, 1991). Las ultimas tres categorías incluyen los manchadores superficiales , que por

las razones descriptas anteriormente, no son económicamente tan importantes como los Ophiostomatales cuya colonización y penetración de las hifas con la consecuente pigmentación es mas profunda en la estructura de la madera.

Estos hongos fueron aislados de varias especies de árboles incluyendo los géneros *Abies*, *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*. Esto indica casi todo el espectro de maderas blandas importantes en Canadá. Adicionalmente también se encuentran algunas maderas duras susceptibles al hongo, como por ejemplo aliso, arce, roble y álamo blanco (Käarik, 1974). Esencialmente todas aquellas especies que contengan una alta proporción de células del parenquima y una buena proporción de albura, son susceptibles a este tipo de infección fúngica. Esto en parte se debe al alto contenido de nutrientes que este tejido almacena y a la falta de extractos fenólicos tóxicos, que normalmente se encuentran en el resistente duramen. (Findlay, 1959).

Los "hongos manchadores" incluyen géneros tales como *Ophiostoma*, *Ceratocystis* y *Ceratocystiopsis*. Su ubicación taxonómica no está clara, por tal motivo se los suele llamar "hongos ofiostomatoides", un término taxonómicamente neutro. Las estructuras reproductivas son el peritecio o sinema dependiendo del estadío. Estos contienen ascosporas y conidios respectivamente, los cuales se liberan en un mucilago de consistencia pegajosa y se dispersan de diferentes maneras, por el

aire, películas de agua, o gotas de agua. Estas rutas permiten la entrada del hongo por rupturas en las traqueidas. Los artrópodos son otro vehículo para entrar la impenetrable corteza (Leach, 1940). La madera es infectada antes del secado, durante y el luego del corte, transporte y almacenamiento en aserraderos.

1.5 Desarrollo de Manchas

El ataque a la madera por los hongos productores de manchas se origina por la germinación de esporas en la superficie de la madera recién cortada. Estas esporas se encuentran viajando en el aire o son llevadas por vectores tales como insectos. La contaminación puede también originarse de etiquetas ya teñidas donde ya se encontraban creciendo las hifas. Otra fuente posible de inóculo son las maquinarias del aserradero

En condiciones favorables las esporas germinan dentro de las primeras horas luego de tomar contacto con la madera y penetran la superficie a través de la ruptura de las células. Se cree que el crecimiento se encuentra mecánicamente mediado. La hifa forma un estructura como un "appresorium", que permite que el hongo se ubique de modo adyacente a las células del parénquima creando pequeños orificios en la pared celular. Las hifas rápidamente colonizan las células del parénquima radial o longitudinal, rodeando los canales resináceos por penetración directa. Los hongos manchadores pueden crecer hasta 0.5 mm en el plano tangencial de la

madera, 1 mm radialmente y 5mm longitudinalmente luego de 24 horas, en condiciones ideales. La alta tasa de crecimiento de estos hongos permite una colonización extensiva de la madera recientemente aserrada y realza la importancia del control de manchas en un estadío lo más temprano posible. Frecuentemente, la pigmentación se desarrolla entre 5 y 6 días luego del desarrollo de las hifas dando la apariencia de que las manchas explotaron en la madera como se observa en la Figura 1.

Por otro lado, además de sufrir daño estético, la madera se hace más permeable, a menudo pierde su rigidez y frecuentemente es la puerta de entrada para otros microorganismos capaces de producir decaimiento y pudrición.

1.6 Taxonomía de los hongos ofiostomatoides

Nannfeldt (1932) estableció la familia Ophiostomataceae, tipificada por *Ophiostoma*, en el orden Plectascales para ubicar las formas con ascocarpos con cuellos largos, ascos evanescentes dispuestos irregularmente a través del centrum con ascosporas hialinas unicelulares. El asco decae temprano en el desarrollo, las ascosporas quedan distribuídas a lo largo del cuello y se acumulan en una delgada gota en el extremo del mismo. Melin y Nannfelt (1934) designaron a *Ophiostoma* y *Ceratocystis* como congenericas. Lutrell (1951), sin embargo los separa y ubicó a la familia Ophiostomataceae en un nuevo orden Microascales, dentro de los

Plectomycetes (Upadhyay, 1990). Otros autores, sin embargo, siguen reconociendo el orden Ophiostomatales (Benny y Kimrough, 1980)

1.7 Diferencias entre *Ceratocystis* y *Ophiostoma*

La combinación de caracteres tales como la química de la pared celular, sensibilidad a la cicloheximida y conidiogénesis se utilizan para circunscribir a *Ophiostoma* y *Ceratocystis*. *Ceratocystis* se caracteriza por la presencia de quitina y ramnosa y ausencia de celulosa en la pared celular. Asimismo por la intolerancia de alguna especies a la cicloheximida, y la presencia de anamorfos fialídicos como *Chalara*. *Ophiostoma* a su vez se caracteriza por la presencia de quitina, ramnosa y celulosa en la pared celular y su asociación con anamorfos blásticos como *Sporothrix* y *Graphium* (Samuels, 1990).

1.8 Modos de dispersión

Según D. Malloch y M. Blackwell (1990) muchos hongos utilizan artrópodos para dispersar sus esporas. En muchos casos este tipo de dispersión no está bien documentada. Sin embargo, los Ophiostomatales, es uno de los grupos donde se presenta este tipo de dispersión correlacionado con caracteres morfológicos adaptativos: ascocarpos con cuello largo y esporas en gotas de mucílago que ayudarían a la adhesión al vector de dispersión mencionado. La mayor parte de las

especies de *Ophiostoma* son saprófitas o parásitas débiles pero fuertemente asociadas a coleópteros

1.9 Requerimientos para su crecimiento

La germinación y futura colonización se hace posible cuando se reúnen ciertos requerimientos para el crecimiento de los hongos. Estos incluyen la accesibilidad al agua, que se mide como contenido de humedad del sustrato, nutrientes apropiados, y oxígeno libre a una determinada temperatura. El balance de estos cuatro requerimientos varía dependiendo del organismo y su adaptabilidad a un determinado medio ambiente.

Los requerimientos nutricionales de los hongos manchadores incluye lípidos, carbohidratos solubles (no celulósicos) y proteínas que están accesibles en las células del parénquima de la madera (Zink y Fengel, 1988; Findlay, 1959). Estos se encuentran solo en albura .

El hongo manchador crece rápidamente a temperaturas que oscilan entre 21°C y 27°C. Mientras que el moho puede hacerlo a valores mas altos, alrededor de 43°C. El crecimiento a bajas temperaturas es extremadamente lento. Por lo tanto se concluye que para procesar la madera cortada es mejor hacerlo durante el periodo

invernal, de ese modo, los tablones aserrados tienen la posibilidad de secarse antes que las condiciones para el desarrollo de manchas sean las propicias.

1.10 Nitrógeno en la madera

El nitrógeno en la madera, se encuentra principalmente en forma orgánica (Dill et al., 1984 y Langheinrich y Tischner, 1991) y es almacenado en las células del parenquima como proteínas (Merril y Cowling, 1966, Zimmerman et al. 1977, Ballard et al., 1982 y Wetzel et al, 1989) En 1981 Kulkarni y Nickerson informaron acerca de la incidencia del uso de compuestos nitrogenados ya sean orgánicos o inorgánicos tales como prolina en *Ophiostoma ulmi* que da forma levadura, mientras que con arginina, asparagina, extracto de levadura y amonio da micelio. Sin embargo, para poder usar tales formas de nitrógeno para su crecimiento, es necesaria la presencia de enzimas extracelulares que degraden proteínas específicamente. En trabajos realizados en este laboratorio se determinó que el hongo manchador *Ophiostoma piceae*, como así también especies emparentadas producían proteasas (Abraham et al, 1993).

La madera es una fuente pobre de nitrógeno, conteniendo entre 0.03% y 0.1%, estos valores tan bajos son factores limitantes del crecimiento para los hongos colonizadores de la madera (Merrill y Cowling, 1966; Levi, y Cowling, 1969). En el laboratorio se han encontrado valores similares de nitrógeno presentes en los

troncos cortados y analizados inmediatamente de *Pinus contorta var. latifolia,* (Lodgepole pine*)* (Abraham, y Breuil, 1993). Mas recientemente Gharibian et al, 1996 determinaron la cantidad de nitrogeno en *Populus tremuloides, Pinus contorta var. latifolia, Tsuga heterophylla* y *Pseudotsuga menziesii* encontrando que la madera dura *Populus tremuloides* tenia un 0.08% de nitrógeno mientras que las demás especies de maderas blandas tenían un 0.05%. Esto explica el mayor crecimiento fungico, y por lo tanto producción de proteinasas. La mayor parte del nitrógeno presente se encuentra primariamente en forma orgánica, como proteínas almacenadas en las células del parénquima radial. Se han descripto en algunas especies de madera, cuerpos proteicos análogos a los cuerpos proteicos encontrados en semillas. (Wetzel et al., 1989). Varios investigadores han estudiado y concluido que existe un incremento de sustancias nitrogenadas en la superficie de la madera durante el secado en aserraderos (King et al , 1976; Boutelje, 1990). Theander et al (1993) demostró la correlación entre la cantidad de nitrógeno en la madera y el contenido de azucares con el crecimiento de moho en la superficie de la madera aserrada.

1.11 Proteinasas

Los hongos de diferentes clases taxonómicas producen proteinasas extracelulares e intracelulares que además de tener un importante rol en la nutrición, participan en la degradación de micelio envejecido degradando proteínas fungicas, penetrando el

tejido del huésped durante la infección patogénica de los mismos (North, 1982), y regulando las funciones celulares (tales como activación enzimática, reciclado de proteínas, translocación, esporulación y germinación) (Desphande, 1992). Con el objetivo de entender el complejo proteolítico del hongo *Ophiostoma piceae*, se estudiaron las acciones de endopeptidasas y exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas) de ésta y otras especies emparentadas.

La clasificación de las proteinasas está evolucionando. Anteriormente se clasificaba la proteinasas de acuerdo al rango de pH en el cual eran activas (ácido, neutro o alcalino), o en base a su habilidad de hidrolizar enzimas especificas (queratinasas, elastasas, colagenasas, y otras), o en base a su similitud con enzimas conocidas como pepsina, tripsina y quimiotripsina (North, 1982). En la actualidad la clasificación mas satisfactoria es la propuesta por Hartley (1960). Esta clasificación esta basada en los mecanismos catalíticos de las enzimas y actualmente es la establecida por la Comisión de Clasificación de Enzimas. Los cuatro tipos de proteinasas hoy reconocidas son enzimas de tipo aspartico, serina, cisteina y metalo. Cada una de ella posee una secuencia de aminoácidos especifica que determina en forma particular cada sitio activo.

Todas ellas catalizan la misma reacción pero con diferentes mecanismos. Ellas también pueden diferenciarse de acuerdo a su sensibilidad por algunos inhibidores.

Estos cuatro tipos de proteinasas han sido detectadas en hongos (Hartley, 1960, Barrett, 1977), sin embargo las que predominan son las aspartil proteinasas y las serin proteinasas (North, 1982). Muchas de las proteinasas son activas a pH acídico, estas resultaron ser en su mayoría, por sus propiedades, proteinasas de tipo aspartico. Las mismas presentan un rango de peso molecular entre 30 000 y 45 000 y puntos isoelectricos (pI) por debajo de 5.1. Estas pueden hidrolizar un amplio rango de proteínas nativas pero la mayoría presenta poca actividad frente a sustratos sintéticos. Los hongos productores de proteinasas extracelulares ácidas frecuentemente acidifican el medio en donde se encuentran creciendo, y muchas de ellas son inestables a pH por encima del neutro.

La producción de proteinasas alcalinas se describió en la mayoria de los hongos en los grupos taxonómicos más importantes. Estas fueron caracterizadas en su gran mayoría como proteinasas de tipo serina. Estas últimas generalmente presentan un bajo peso molecular, entre 18 500 y 35 000 y bajos valores de punto isoeléctrico, pI entre 4.4 y 6.2, pero también fueron informados valores altos como pI 8.9 o más (North, 1982).

Según la ubicación del enlace peptídico que hidrolizan las proteasas se clasifican en endo y exopeptidasas. Las carboxipeptidasas son exopeptidasas que contienen un centro activo con zinc y son específicas para algunos residuos carboxi

terminales y tienen actividad a pH neutro. Las aminopeptidasas son exopeptidasas específicas para residuos amino terminales y son de tamaño considerable, alrededor de 250.000. El resto de las proteinasas son pequeñas y monoméricas, con pesos moleculares entre 15.000 y 35.000.

1.11.1 Inhibidores de proteinasas

Se denomina inhibidor a aquel compuesto que produce una disminución en la velocidad de hidrólisis de un sustrato dado (Salvesen y Nagase, 1989). Existen varios inhibidores de los cuatro tipos de enzimas mencionados con anterioridad. Existen inhibidores reversibles, que se comportan de modo competitivo con el sustrato, generando un estado de transición de la enzima con el inhibidor. Los irreversibles, en cambio, se caracterizan por ser parecidos al sitio activo de la enzima, o inhibidores del mecanismo de acción de las mismas. Se han elegido en este trabajo de tesis aquellos inhibidores mas selectivos para cada grupo de proteinasas mencionado. Se esperaría que presentaran reversible o irreversiblemente un Ki 1000 veces menor en la mezcla de incubación. Si bien este valor es ideal y difícil que ocurra en la práctica solo se puede especular que tipo de inhibidor usar con el grado de selectividad requerida (Salvesen y Nagase, 1989).

1.12 Cuantificación del hongos en la madera. Parámetros hasta el momento usados

Detectar el hongo o alguno de sus metabolitos en madera antes de que cualquier tipo de daño pueda visualizarse es una tarea difícil pero importante en el manejo de enfermedades y biodeterioro de la madera. El hongo, se detecta normalmente por examinación microscópica de secciones luego de un teñido histológico o por aislamiento del patógeno en cuestión. Ambos procedimientos son tediosos, consumen considerable cantidad de tiempo, sobre todo si es necesario procesar gran cantidad de muestras, no son suficientemente específicos y puede llevar a resultados que no reflejan la situación ecológica real. Recientemente con el advenimiento de la biología molecular, sondas de ADN, patrones electroforéticos de enzimas e immunodetección se inicia una nueva era en este campo. Los métodos immunológicos son atractivos por ser sensitivos y específicos. Ampliamente usados en medicina por varias décadas, estas técnicas en la actualidad se aplican a la industria forestal y a la patología que pueden presentar los productos madereros (Benhamou et al, 1985; Breuil et al 1988; Dewey et al, 1989; Glancy et al, 1990; Goodell et al, 1988 y Srebotnik et al, 1988). La especificidad de los anticuerpos por sus antígenos hace de ellos excelentes sondas para la detección de microorganismos o alguno de sus metabolitos, los cuales pueden estar presentes en trazas en el medio ambiente natural. Sus aplicaciones siempre estuvieron vinculadas a la investigación y no se manifiesta incoherente su

aplicación como instrumento de diagnóstico.

Uno de los objetivos de este trabajo es detectar, monitorear y cuantificar el crecimiento de masa fúngica usando anticuerpos monoclonales. Existen evidencias de trabajos realizados con anticuerpos policlonales para la estimación de biomasa fúngica en *Thielavia terrestis* (Breuil et al., 1989). Es claro, hoy, que los anticuerpos policlonales tienen características no deseables. Una de ellas es la variabilidad de los anticuerpos de animal en animal como así también, de sangrado a sangrado. Asimismo presentan baja especificidad, generando mediciones poco precisas.

Si bien existen procedimientos confiables para la estimación de biomasa bacteriana, muchos de estos métodos no pueden ser aplicados a organismos filamentosos. Estas opciones son difícilmente aplicables cuando un sustrato insoluble es usado para el crecimiento. Los hongos en raras ocasiones se presentan como un monocultivo, sin embargo, en los medio ambientes naturales, una o más especies de hongos se hallan asociadas con otras clases de microorganismos, por ejemplo en composts o sólidos. Esta es la razón, por la cual, para el estudio y monitoreo del crecimiento fúngico se han utilizado componentes específicos de estos organismos. Con el incremento en el interés en la biotecnología y el uso de procesos utilizando bioconversiones, la medición de la

tasa de crecimiento, rendimiento de la biomasa total fúngica y la cantidad de productos extracelulares en sustratos sólidos, lograron ser medidos con mayor exactitud.

El crecimiento de hongos filamentosos en medio liquido es muy empleado en la actualidad. Varios métodos están a disposición para determinar cuantitativamente el crecimiento fúngico en cultivos estáticos o en agitación constante, como así también el crecimiento en la superficie del agar. Métodos como mediciones húmedas de peso, peso seco, volumen de células empaquetadas, mediciones de proteínas totales, nitrógeno total, consumo de sustrato, producción de CO_2 y consumo de O_2 , son aplicables. Muchos de estos métodos resultan impracticables cuando el hongo esta creciendo en un sustrato sólido. El micelio en este caso se encuentra íntimamente ligado al sustrato donde se desarrolla.

Uno de los componentes más comúnmente medidos en células fúngicas es proteína (Herbert et al., 1971). Sin embargo no hay un método verdaderamente especifico para su análisis. El procedimiento de Biuret ha demostrado ser el menos sujeto a interferencia y el más representativo para evaluar proteínas. La determinación del nitrógeno total es muy útil para conocer el contenido de proteínas en las células. Sin embargo este método puede resultar no muy seguro por la cantidad de compuestos nitrogenados y no proteicos presentes en el medio como ser

aminoácidos, ácidos nucleicos, quitinas, lípidos como así también el nitrógeno presente en el medio de cultivo.

Ergosterol es el esterol predominante de la mayoría de los hongos. No fue encontrado en cantidades significativas en plantas. Su uso para la medición de biomasa fúngica fue por primera vez descripto por Seitz et al. (1977, 1979) cuando se determinó con este parámetro, la extensión de la colonización fúngica en granos de cereal. El ergosterol puede medirse cuantitativamente por cromatografía gaseosa, HPLC, o espectrofotométricamente (UV). Como ocurre con otros productos fúngicos el contenido de ergosterol puede cambiar con el estado fisiológico del hongo y entre especies en forma muy marcada (Seitz et al., 1979). Un complicación posterior puede generarse si el hongo en cuestión produce otros esteroles con propiedades espectrales similares (Matcham et al., 1985).

Otros métodos se encuentran disponibles para la medición de biomasa fúngica. Ensayos de ADN o ARN pueden ser usados luego de un apropiado método de extracción ácida La determinación por el ATP extraíble ha sido usada para determinar biomasa en varios ambientes ecológicamente complejos como sedimentos o suelos. La relación de consumo de sustrato/perdida de peso ha sido utilizado en estudios de biodegradación de materiales sólidos, por ejemplo, madera y textiles. La estimación de quitina es otro método posible ya que este polímero

insoluble se encuentra en la pared de la mayoría de los hongos.

Métodos serológicos, usando ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) se han utilizado con éxito en la detección y cuantificación de virus (Bar-Joseph y Garnsey, 1981), bacterias (Cambra y Lopez, 1978 ; Cother y Vruggink, 1980) y hongos en plantas herbáceas (Casper y Mendgen, 1979; Johnson et al., 1982, Ageulon y Dunez, 1984) , pero en la mayoría de los casos no se reportó la cuantificación de hongo. Breuil y colaboradores (1988), trataron de cuantificar la biomasa fúngica en madera sólida, usando ELISA. La dificultad se presentó en la falta de adhesión a las placas de ELISA del antígeno extraído de la madera por la interferencia que producía el detergente usado en la extracción.

El ensayo de inmunodotting (DIA), ampliamente difundido, ofrece algunas ventajas sobre los demás inmuno ensayos conocidos: son mas sensibles, requieren menos cantidad de muestra y son fáciles de realizar. Permite además que antígenos que se ven imposibilitados de adherirse a las placas de ELISA tengan posibilidad de ser analizados. Se presentan en este trabajo resultados preliminares de intentos de cuantificar el hongo en la madera sin extracción del antígeno, o sea directamente practicar el ELISA en la madera infectada, pero no se obtuvieron resultados reproducibles. Al ser la madera un sustrato orgánico, la posibilidad de generar un sistema de análisis in situ resulta poco probable, pero estos resultados

hicieron pensar en la tecnología que finalmente se desarrolló..

En el DIA (Figura II) los antígenos son inmovilizados en soportes sólidos antes de ser enfrentados a los anticuerpos (Burnette, 1981; Hawkes et al., 1982; Esen et al, 1983; Gershoni y Palade, 1983). La cantidad de antígeno presente pudo ser cuantificada, usando fluorescencia, radiactividad y oro coloidal. El beneficio de este tipo de ensayo es que al unir al anticuerpo especifico enzimas o marcadores radioactivos o luminiscentes, la señal producida por la interacción anticuerpo-antígeno puede ser significativamente amplificada produciendo por lo tanto un ensayo altamente sensitivo.

Si bien, los productos coloreados producidos en un ELISA pueden se medidos por espectrofotometría, los productos del DIA deben ser cuantificados por densitometría. El equipamiento necesario para la densitometría, es costoso y no siempre disponible en el laboratorio, consecuentemente un gran número de investigadores, usan estos ensayos presentando solo datos cualitativos (Moermans et al, 1984; Kazemi y Finkelstein, 1990).

Existen en la actualidad diversas fuentes que mencionan la producción de antígenos fúngicos. El micelio es el antígeno más frecuentemente usado (Clarke et al., 1986 y Fungal Antigens, 1988). El micelio producido en medio liquido es

lavado, homogeneizado y centrifugado, el pellet es utilizado como antígeno de pared (específicamente la pared celular) y el sobrenadante es el antígeno soluble, que incluye proteínas extracelulares, específicamente enzimas y metabolitos excretados que se utilizado como antígenos (Green et al., 1992; Srebotnik et al., 1988). Las esporas también podrían considerarse antigenicas.

El hongo que se ha estudiado *Ophiostoma piceae* fue originalmente aislado de *Pinus banksiana* y ha sido mantenido en la colección de cultivo que tiene el Instituto Forintek Canada Corp. como hongo que habita la madera .

Objetivos

- *Control* del manchado de la madera por disrupción de enzimas, Generar información básica acerca de endopeptidasas y exopeptidasas que el hongo pueda utilizar al establecerse en su hábitat natural. Caracterizar e identificar las enzimas necesarias para el uso del nitrógeno de la madera, proteinasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas

- Detección temprana de la infección del hongo aún cuando la mancha no se ha hecho visible

- Cuantificación del hongo en la madera infectada por un método rápido, reproducible y eficiente.

- Generar anticuerpos policlonales de la proteinasa para su uso en la detección y cunatificación.

Obtener información necesaria para desarrollar métodos aceptables por el medio ambiente para controlar el manchado en los productos de la industria maderera. Obtener métodos cualitativos y cuantitativos para la prevención de la infección en estos productos. El logro de estos objetivos permitirá la reducción del uso de los protectores químicos existentes y desarrollar otros tratamientos específicos.

La cuantificación del hongo en la madera por diversos métodos ha sido ampliamente estudiada, pero al ser la madera un sustrato orgánico tan variable resultaba difícil lograr la precisión de la medición. Fue un objetivo importante

llevar a cabo el desarrollo de alguna tecnología apropiada para tal fin, para su detección lo mas tempranamente posible.

El objetivo de este proyecto es el usar un ensayo inmunológico para detectar y cuantificar el hongo manchador *Ophiostoma piceae 387N* Este método, dot immunoblotting, será usado para verificar y cuantificar la masa del hongo en medio liquido y en su hábitat natural: la madera, utilizando un método de análisis de imágenes.

Teniendo en cuenta lo hasta aquí expuesto, se presenta en este trabajo de tesis el desarrollo de un método de cuantificación del DIA, rápido, simple y económico que permitirá ser ampliamente usado, facilitando el uso de este tipo de ensayo en una amplia gama de aplicaciones.

El trabajo de tesis que aquí se presenta tiene por finalidad focalizar sus resultados en *Ophiostoma piceae 387N*, que es la especie de mayor incidencia en la industria forestal canadiense, sin embargo en varios estadíos de este trabajo se utilizaron cepas emparentadas con menor impacto, para futura referencia.

Modalidad de acción de Forest Products Biotechnology

Proyectos asociados

1. Entender como crece el hongo en la madera y caracterizar sus pigmentos. Aislamiento del gen responsable de la producción de melanina. Este ultimo paso seria utilizado como método alternativo de combate.

2. Caracterizar nitrógeno y lípidos en la madera. Producción de enzimas por el hongo para el metabolismo de los mismos. Estudio de la capacidad antigénica del hongo para la medición de su crecimiento en madera.

3. Estudios a nivel de secuencia de aminoácidos como también de ADN de la proteinasa aislada.

4. Desarrollo de métodos immunológicos para la detección temprana de este hongo. Generación de anticuerpos monoclonales contra las enzimas purificadas del hongo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cepas Utilizadas

Las cepas utilizadas fueron *Ophiostoma piceae 387 N Ophiostoma piceae 387E, 387J, 387N, Ophiostoma ainoae 701A, Ophiostoma piliferum 55H, Ophiostoma populinum, Ceratocystis adiposa 251 B, Alternaria tenuis 2G, Aureobasidium pullulans 132 Q,, Cladosporium cladosporioides 237 D, Trichoderma harzianum E58.* Estas especies fueron obtenidas de la colección de cultivo de Forintek Canadá Corp. . La especie *Ophiostoma piceae 212735* fue obtenida de la colección de cultivos de Agriculture Canadá.

2.2. Crecimiento de las diferentes especies de hongos

2.2.1 Medio líquido

Se utilizó para el crecimiento de las especies arriba mencionadas medio semisintético B (Montenecourt y Eveleigh, 1977) modificado. Para la preparación de 800 ml de este medio se utilizaron: $CaCl_2$. $2H_2O$ 0.4 g, KH_2PO_4 1.0 g, Na_2HPO_4 0.8 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, ftalato potásico 3.0 g, almidón soluble 20 g, solución de micronutrientes (100x) Vogel's (Vogel, 1956), 10 ml. Se le agrega leche de soja como fuente de nitrógeno., se filtra con papel Whatmann y se esteriliza con filtros Corning 0.2 micrones y se fracciona en una proporción de 7:3 leche de soja agua deionizada (Sunrise Markets, Vancouver,B.C. cuya

composicion indica que contiene 3.1% de proteina, 1.4% de materia grasa y 0.9% de carbohidratos) (Abraham et al., 1993). Finalmente al medio B se le agrega la leche de soja esterilizada en una proporcion de 5:1 medio:leche de soja. Por último, se adiciona la solución de vitaminas Vogel's (x1000) 1ml por 800 ml de cultivo.

Los hongos mencionados en 2.1 fueron cultivados en Erlenmeyers de 300ml, conteniendo 60 ml de medio B. Se inoculó micelio previamente crecido en el mismo medio 3-4 días, en cantidad equivalente a 0.6 mg de peso seco . Se incubó a 23 °C con agitación (250 rpm), en oscuridad.

2.2.1.a Determinacion de peso seco

En condiciones de esterilidad se retiran 5 -10 ml de cultivo fúngico. Se toma un disco de filtro de fibra de vidrio (Whatman 934-AH, 4.25 cm) y se coloca en una placa de Petri en microondas, se lo deshidrata por 5 minutos a alta temperatura. Se deja enfriar en un desecador y luego se pesa. Se homogeiniza el cultivo del tubo estéril y se filtra a presión reducida a través del filtro de fibra de vidrio previamente pesado. Se microhornea en alto poder por 5 minutos y se coloca nuevamente en el desecador. Se pesa, se calcula el peso seco del micelio y se lo expresa como mg de micelio seco/ ml de cultivo.

2.2.2 Crecimiento en madera

Piezas de madera cortadas de la zona del cambium de la especie *Pinus contorta var. latifolia*, fueron esterilizadas con rayos gamma a 2.510 x 10^6 rad. y cortadas en bloques de 3x1x0.5 cm para ser luego conservados a -10 °C. Los bloques fueron infectados con 50 µl de micelio homogeneizado de *Ophiostoma piceae 387N, 387E, Ophiostoma ainoae 701A, Alternaria tenuis 2G y Trichoderma harzianum E58* equivalente a 100 µg de peso seco de células determinado como se menciona en 2.2.1.a.. El inóculo fue crecido en medio semisintético B, reemplazando la fuente de nitrógeno orgánica (leche de soja) por nitrógeno inorgánico NH_4NO_3 0.8 gr por litro de cultivo Se incubaron con humedad a saturación colocando papel de filtro embebido en agua en placas de Petri cerradas a 23 °C. Las muestras de madera se cosecharon a los 3, 7, 9, 12 y 15 días de la inoculación Los bloques fueron pulverizados con molinillo (Bel-Art Products, Pequannock, NJ) que posee un sistema de circulacion para nitrógeno líquido, se las pasó luego por tamiz (tamaño de poro: 100 µm) y las muestras se conservaron en frío, habiéndose determinado previamente la estabilidad de las enzimas a bajas temperaturas. Se retiraron muestras para los ensayos con los sustratos correspondientes para la detección de proteasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

Cada uno de estos ensayos se realizó por quintuplicado si no se especifica lo contrario

2.2.2.a Determinacion del porcentaje de humedad de la madera

El contenido de humedad de la madera se determinó gravimetricamente. Se pesó 100 mg de madera molida cuyo peso es el denominado *peso húmedo* y se la colocó en una placa de Petri a 105 °C durante 24h.. Se retiró del horno y se dejó enfriar en desecador. Se pesó nuevamente y al valor dado se lo denominó *peso seco*. Se calculó el porcentaje de humedad contenido en la madera através de la fórmula:

$$\frac{(\text{Peso humedo} - \text{Peso seco})}{\text{Peso seco}} \times 100$$

La madera con la cual se realizaron los estudios tenia un contenido de humedad entre 98% y 100%.

2.3 Preparación de la muestra de enzimas

2.3.1. Endoproteasas de las especies crecidas en medio liquido

Los cultivo de las especies mencionadas en 2.1 fueron cosechados en el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, que para cada especie fueron dias diferentes luego de la inoculación: *Ophiostoma piceae 387 N* dia 5, *Ophiostoma piceae 387E* dia 5, *387J* dia 5, *Ophiostoma piceae 212735* dia 5, *Ophiostoma ainoae 701A* dia

6, *Ophiostoma piliferum 55H* dia7, *Ophiostoma populinum* dia 5, *Ceratocystis adiposa 251 B* dia 7, *Alternaria tenuis 2G* dia 5, *Aureobasidium pullulans 132 Q* dia 7, *Cladosporium cladosporioides 237 D* dia 5, *Trichoderma harzianum E58* dia 5. Estos puntos se determinaron de modo preliminar en base a la realización de las curvas de crecimiento de los hongos utilizados en cuanto a biomasa y actividad proteolítica. A 100 ml de los filtrados se le agregó sulfato de amonio hasta el 90% de saturación . El precipitado se recuperó por centrifugación a 18.000 rpm, por 20 minutos a 4 °C y se disolvió en 2 ml de 0,01 M de buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.2. El material insoluble fue removido por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos Luego de desalar la muestra a través de una columna Bio-Rad Econo-Pac 10DG usando como buffer de elección PBS, fue concentrada a 250 µl usando un microconcentrador con un corte de peso molecular de 3.000 (centricón-SR 3, Amicón). La concentración de proteína fue medida usando Bio-Rad dye-binding protein assay kit, utilizando como proteína standard seroalbumina bovina (BSA). La concentración de proteínas de las muestras fue de 1.5 mg/ml con una actividad especifica de 1.500 a 2.500 U, dependiendo de las especies Una unidad de actividad de la proteasa se definió como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de 0.1 A en la absorbancia a 525 nm., bajo las condiciones de ensayo posteriormente detalladas. Las muestras fueron almacenadas a -20°C, habiendo ya establecido la estabilidad de la proteína en esa condición.

2.3.2 Preparación de las muestras de aminopeptidasas de hongos crecidos en medio liquido

Se cultivaron *Ophiostoma piceae 387N, Ophiostoma piceae 387, Ophiostoma ainoae 701 A* y *Trichoderma harzianum E58* en medio semisintetico B en las condiciones mencionadas en 2.2.1 pero como fuente de nitrógeno orgánico se utilizaron dos opciones: 20 g de almidón soluble y 0.2% de BSA o 19 gr de almidón soluble y 140 ml de leche de soja. Resultando una concentracion final de proteina de 0.2% y carbohidratos de 20.3 g/l. Los cultivos fueron cosechados a los 2, 4, 7 y 9 días luego de la inoculación, y centrifugados en Sorvall RG5C a 9000 x g durante 50 minutos. El pellet obtenido fue lavado una vez y resuspendido en agua destilada. Posteriormente homogeneizado con perlas de vidrio y resuspendido con buffer Tris HCL 50 mM, pH 8 (se utilizaron otros buffers cuando se deseaba obtener los diferentes pH para los cuales la enzima presentaba actividad) Para romper las celulas, la suspensión celular fue homogeneizada con perlas de vidrio en un homogeinizador Braun a bajas temperaturas con un flujo constante de CO_2, y luego centrifugada para cosechar la fraccion de pared. La ruptura se monitoreo microscópicamente. El citoplasma residual se lavo con PBS/mertiolate seguido de centrifugacion. Cada segundo lavado las preparaciones fueron sonicadas por 30 segundos en pulsos cortos y pasadas 10 veces a través de una aguja de 23 gauge (Breuil et al, 1992). Se realizaron alrededor de 30 lavados. Se guardaron ambas fracciones para detectar la actividad de la enzima a 4 °C

2.3.3 Carboxipeptidasas

En este caso se trabajó con dos especies *Ophiostoma piceae 387E* y *Ophiostoma piceae 387N*, que fueron obtenidas de Forintek Canadá Corp. El hongo fue cultivado en el medio semisintético B como se menciona en 2.1.1, suplementado con leche de soja. Los hongos crecidos en medio líquido se cosecharon en dos etapas, una luego de cuatro días y otra luego de siete días de crecimiento. Se centrifugaron a 9000 g por 50 min. en Sorvall RC5C. El pellet obtenido, fue lavado una vez y resuspendido en agua destilada y homogeneizado con perlas de vidrio.Posteriormente se lo resuspendió en el buffer de elección para los ensayos con la enzima como se describen en 2.4.3.

Piezas de *Pinus contorta var. latifolia* esterilizadas con rayos gamma (2.2.2) fueron cortadas en bloques de 3x1x0.5 cm. Los bloques fueron infectados con micelio equivalente a 50 µg de las especies *Ophiostoma piceae 387N* y *Ophiostoma piceae 387E*, previamente homogeneizado. La incubación se realizó con humedad a saturación a 23 °C . Las muestras de madera se cosecharon a los siete y nueve días de infección . Los bloques de madera fueron molidos como se realizó para los ensayos enzimáticos mencionados anteriormente con nitrógeno liquido. Las muestras se conservaron en frío a partir de ese momento para los ensayos con los sustratos correspondientes.

2.4 Determinación de la actividad enzimática

2.4.1 Endoproteasas

La actividad de la proteasa fue determinada en 100 mg de madera infectada por diferentes especies de hongos y 100 mg de madera no-infectada pulverizada como se menciono anteriormente usando un ensayo espectrofotométrico con azocoll como sustrato colorimétrico (100-250 mesh, Calbiochem) (Chavira et al., 1984; Abraham et al., 1993). Los ensayos fueron realizados en buffer Tris ClH 0.1 M, pH 8 conteniendo azocoll 4 mg/ml. Los tubos fueron incubados a 37 °C con agitación constante a 320 rpm durante 60 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 100 µl de acido tricloroacético (TCA) 50%, seguido de una centrifugación a 14.000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante (200 µl) se transfirió a una placa de ELISA de 96 viales. La placa fue leída a 525 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Thermomax).

Una unidad de actividad de endopeptidasa se definió como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de absorbancia de 0.1 a 525 nm, bajo las condiciones de ensayo anteriormente especificadas, excepto que se indique lo contrario.

2.4.2 Aminopeptidasa

La actividad de aminopeptidasa fue ensayada por un método colorimétrico usando conjugados de nitroanilina (Masuda, et. al., 1975; Foissy, 1978; Ben-Meir, 1993).

La nitroanilina (NA) liberada, fue determinada por medición de la absorbancia 405 nm (A_{405}) usando un lector de microplaquetas Ceres UV 900 Hdi (Bio-tek Instruments, Inc.) La curva standard fue obtenida utilizando p-nitroanilina. La actividad Aminopeptidasa (AP) fue expresada como nmoles de NA por hora por ml de cultivo. 25 o 50 µl de muestra fueron incubadas por dos horas a temperatura ambiente (22°C) con L-Leu-pNA o L-Pro-pNA a una concentración final de 1 mM en 50 mM Tris-HCl, pH 9, excepto que se indique lo contrario. en un volumen final de ensayo de 500 µl. La reacción se detuvo por la adición de 250µl de 1N ácido acético (Kolehmainen, L. Y Mikola, J. 1971). Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 5 min. y 200 µl del sobrenadante fueron removidos para determinar la (A_{405}) en el lector de microplaquetas.

La concentración de proteínas fue determinada por el ensayo de ácido bicinconínico (Smith, et.al. 1985)

2.4.3. Carboxipeptidasas

2.4.3.a Preparación de los sustratos dansylados

Dansyl-Gly-Phe fue preparado adicionando 67.5 µmoles de cloruro de dansylo (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) disuelto en acetona a 22.5 µmoles (5mg) de Gly-Phe (Sigma) disuelto en 5% de piridina y dejando reaccionar por 1h 30 min. El producto fue purificado por separación de los componentes de la mezcla

de reacción mediante electroforesis en papel durante 40 min., usando papel de cromatografía Whatmann 3MM, a pH 2.1 y un gradiente de voltaje de 60 volts/cm. Las bandas fluorescentes fueron detectadas por luz UV y la banda correspondiente a dansyl-Gly-Phe se cortó y eluyó en buffer ácido acético:ácido fórmico:agua , 4:1:450 a pH 2.1. La solución de dansyl-gly-phe fue liofilizada y resuspendida en 1.5 ml de agua destilada.

El dansyl-gly-arg fue preparado de manera similar usando 54 μmoles de cloruro de dansilo y 18 μmoles (5mg) de formato de gly-arg (Sigma). El producto fue purificado por electroforesis en papel como se describió anteriormente. Luego de la liofilización, el dansyl-gly-arg purificado fue resuspendido en 1.9 ml de agua destilada.

Las concentraciones de dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg fueron determinadas por análisis de aminoácidos luego de una hidrólisis ácida con HCl 6N. A alícuotas de 10 μl de dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg, y 25 nmoles de norleucina se le adicionó un volumen igual de HCl 12N y se dejó hidrolizar. La hidrólisis se llevo a cabo sellando los tubos al vacío y dejando procesar a 105°C durante 20 horas. El hidrolizado fue secado y la cantidad de phe y arg fueron determinadas por análisis de aminoácidos que se llevo a cabo en el analizador, Apellide Biosystem modelo 420. Las concentraciones logradas de dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg fueron de

0.99 mM y 0.11 mM respectivamente.

2.4.3.b Ensayo de carboxipeptidasa

Las actividades de carboxipeptidasa en las muestras fúngicas fueron detectadas por la hidrólisis del dansyl-gly-phe generando dansyl-gly, indicando actividad de la carboxipeptidasa A. De la hidrólisis de dansyl-gly-arg, se genera dansyl-gly indicando actividad de la carboxipeptidasa B. El producto de hidrólisis fue separado del sustrato no-reactivo por electroforesis en papel y detectado por fluorescencia bajo luz UV. Alícuotas de 200 µl de muestras fúngicas crecidas en medio líquido, fueron incubadas por cuatro horas a temperatura ambiente con 5 µl de dansyl-gly-phe o 20 µl de dansyl-gly-arg en un buffer volátil como 0.1 M ácido acético en piridina a pH 6. Se utilizaron como controles positivos 2 unidades de carboxipeptidasa A bovina pancreática (Sigma) o carboxipeptidasa B porcina pancreática (Calbiochem, La Jolla, USA) Ambas fueron incubadas de forma similar con dansyl-gly-phe o dansyl-gly-arg. Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes parcialmente liofilizados para reducir el volumen y luego se sembraron en papel cromatográfico Whatmann 3MM. La electroforesis se llevó a cabo a pH 2.1 y 60 volts/cm. Simultáneamente se sembraron los standares correspondientes (dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg) . La actividad carboxipeptidasa fué ensayada en los sobrenadantes y en el pellet de las suspensiones fúngicas

crecidas en medio líquido.

Las muestras de madera infectadas con el hongo *Ophiostoma piceae 387N*, fueron cosechadas a los siete días y nueve días de infección. Las muestras fueron micro-molidas bajo nitrógeno liquido. 200 mg de cada muestra fueron incubadas en buffer ácido acético en piridina durante 24 horas a temperatura ambiente o 37 °C en presencia de los sustratos dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg. Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron sujetos a electroforesis en papel como se describió en el parrafo anterior.

2.5 Caracterizacion de enzimas

2.5.1 Temperaturas para endopeptidasa

Muestras de proteasa de 8U/100 µl en buffer Tris-HCl, 50 mM y buffer con azocoll fueron equilibradas a varias temperaturas desde 25°C a 49°C en incrementos de 3°C por 30 min. Las muestras y los buffers fueron luego mezclados para llegar a un volumen final de 1 ml conteniendo 4 mg de azocoll, siendo incubados a temperatura de equilibrio a 300 rpm por 60 min. Las reacciones se detuvieron por el agregado de acido tricloroacetico (TCA).

2.5.2 Temperaturas para aminopeptidasas

Se ensayó la actividad de la enzima en un rango de temperatura de 0 a 50 °C en

intervalos de 10 °C. Este ensayo se realizó con muestras obtenidas en el día 7 de crecimiento de los hongos especificados.

2.5.3 Efectos del pH en aminopeptidasas

La influencia del pH en la actividad de aminopeptidasas, fué determinada por el método arriba mencionado a 22° C usando los siguientes buffers: acetato de sodio pH 5, fosfato de potasio pH 6, Tris-HCl pH 7-9 y bicarbonato de sodio pH 10. Todos los buffers fueron usados a la concentración de 50 mM. Un rango amplio de pHs fue trabajado con el buffer Mes/ácido acético/tris pH 5-9.

2.5.4 Efectos de cationes bivalentes en aminopeptidasas

Las muestras fueron preincubadas con varios cationes bivalentes en forma de cloruros, sulfatos, o acetatos por 15 min. y luego se ensayo la actividad aminopeptidasas como se describió anteriormente. La concentración final del ion bivalente durante el ensayo fue de 1 mM .

2.5.5 Efecto de inhibidores

2.5.5.a Endoproteasas

Muestras con 8U/100 µl fueron incubadas con un potencial inhibidor a la concentración indicada en 1ml de buffer de ensayo a temperatura ambiente por 20 min. luego de agregar 4 mg de sustrato el azocoll. Las actividades fueron medidas

como se mencionó anteriormente. Los siguientes inhibidores fueron utilizados:

1,10-fenantrolina (10mM)
fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF, 2mM)
ácido etilendiamintetraacetico (EDTA, 10 mM)
tosillisilclorometilcetona (TLCK 0.1mM)
tosilfenilalanilclorometilcetona (TPCK 0.1 mM)
pepstatina (20uM)
iodoacetamida (IAA 5 mM)
trans-epoxysuccinil-leucilamida-butano (E-64 20 µM)

Para control se utilizaron muestras de proteasas comerciales como:

tripsina, α- y ß- quimiotripsina, proteasa K, termolisina (proteasa tipo X), pepsina, y papaina.

Las unidades de actividad de las proteasas control fue determinada para cada una dentro de las condiciones de ensayo establecidas a pH 8 o pH 5 dependiendo de las propiedades individuales de cada enzima. Todos los inhibidores fueron obtenidos de Sigma con excepcion del EDTA producto de Bio-Rad.

2.5.5.b Aminopeptidasas

Las muestras fueron preincubadas durante 30 minutos con los siguientes inhibidores: actinonina, puromicina, amastatina y bestatina. Posteriormente se ensayó la actividad de la enzima según lo descripto en 2.4.2.

Actinonina, puromicina, amastatina y bestatina son inhibidores de aminopeptidasas, EDTA y fenantrolina son inhibidores de metaloproteasas, y PMSF inhibidor de serin proteasas. Leupeptina inhibe serin proteasas del tipo tripsina y la mayor parte de la cistein proteasas. Soluciones stock de amastatina, bestatina, y fenantroline se prepararon en metanol y actinonina y PMSF en etanol. Los demás inhibidores fueron solubles en agua. Cualquier efecto de los solventes fue corregido solo cuando se calculó el porcentaje de actividad en presencia de inhibidores.

2.6 Medición de la biomasa por ergosterol

Las muestras de madera fueron molidas hasta polvo bajo nitrógeno liquido para luego proceder a las determinaciones de actividad enzimática y biomasa. El crecimiento del hongo fue medido por ergosterol como fue descripto por Gao et al. (1993). Esta metodología permite indicar cuantitatívamente el crecimiento fúngico pues ergosterol es un esterol muy comun en membranas celulares fúngicas y ausente en tejido vegetal. El método consiste en una saponificación simultánea con un proceso de extracción por reflujo constante, conjuntamente con una cuantificación por HPLC. Se toman 1.5 g de madera infectada o no inoculada y se realiza la extracción. Las muestras no saponificadas se someten a reflujo con 60 ml de una mezcla metanol:etanol 5:1 (v:v). Las muestras saponificadas se sometieron a reflujo con el mismo solvente pero adicionando 10% de KOH. Luego de 1 h de reflujo las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se filtraron a través de fibra de vidrio. Los filtrados se extrajeron con 60 ml de eter. Los extractos fueron rotaevaporados a 40 °C hasta sequedad y redisueltos en 1.5 ml de metanol. Las soluciones asi logradas fueron filtradas atraves de filtros Millipore de 0.45 um y almacenados a 4 °C en oscuridad. El ergosterol fue analizado con un sistema de HPLC Waters . la columna utilizada fue una columna reversa Nova-pak C-18 (150 x 3.9 mm) . La fase móvil estaba constituida por metanol y 0.005 N de H_2SO_4 (98:2 v:v) a una velocidad de 2.2 ml/min. La longitud de onda usada fue de

283 nm, El pico de ergosterol se detectó a los 8.3 min..

2.7 PAGE, IEF y enzimogramas

Las muestras de proteasas fueron analizadas usando Phastsystem con geles de poliacrilamida con gradiente de 8-25% y 12.5% PAGE homogéneo e isoelectroenfoque (IEF) (pH 3-9). La corrida en geles nativos permiten separar los componentes de la mezcla en cuestión de acuerdo a su tamaño, carga neta y conformación. Este método ampliamente utilizado permite el uso de las proteínas en estudios posteriores pues no se ve comprometida su actividad. Es decir, se estudia la proteína en su estado nativo en composicion y estructura. Además es utilizado para estimar el peso molecular de las proteínas presentes en la muestra. Los geles son de 0.45 mm de espesor y el sistema buffer de los geles es 0.112 M acetato, 0.112 M Tris, pH 6.5. El buffer utilizado para las corridas contiene 0.88 M L-alanina, 0.25 M Tris, pH 8.8 de Pharmacia LKB Phast y es colocado como una banda junto con el aplicador. La corrida se realizó a 400 Volts con una intensidad de 1 mA al momento de la siembra de la muestra a 2 watts de potencia a 15 °C , y en las mismas condiciones pero a una corriente de 10 mA se realizó la corrida electroforetica. Se sembraron aproximadamente 25 ng de proteína con una actividad de 0.1-0.2 U en cada línea. La separación por isoelectroenfoque (IEF) fue realizada a una corriente constante de 2.0 mA para un total de 431 Vh. El kit para la calibración de pI de 3.5 a 9.3 fue obtenido de Pharmacia. Se corrieron dos

geles simultáneamente, uno de ellos fue teñido con plata como lo indican las recomendaciones de Pharmacia y al otro gel se le practicó un zimograma por contacto. Las bandas proteoliticas se detectaron usando un film de rayos X no procesado (X-Omat RP XRP-1, Kodak, Rochester, NY) e incubando a 37°C (Zhu et al, 1990). La incubación varió de 5 a 60 min., permitiendo así que bandas con menor actividad se hicieran visibles en la película. Sin embargo incubaciones prolongadas resultaron en difusiones engorrosas y de difícil lectura con aquellas de mayor actividad.

Consecuentemente varios films fueron utilizados y procesados. Luego de la incubación, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente (Cheung et al., 1991).

2.8 Inmunoensayos

2.8.1 Produccion de anticuerpos

2.8.1.a Anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de Ophiostoma piceae 387N

Para la realización de los Western blot, se utilizaron anticuerpos monoclonales de la proteinasa purificada de *Ophiostoma piceae 387N* obtenidos por inmunizacion intraesplénica (Spitz et al., 1984). Para la producción de anticuerpos se realizó en forma semi preparativa el último paso de purificación de la proteinasa, la

electroforesis (IEF) en gel de agarosa. Las bandas correspondientes a pI 5.1 y pI 7.4 se cortaron y eluyeron en PBS. Se procedió luego a un centrifugado para quitar el exceso de agarosa. Se ensayó la actividad enzimática como se describió en 2.4.1 recuperandose un 70-80% de la actividad. El sobrenadante se filtró para remover pequeñas particulas de agarosa. Ratones BALB/c fueron inmunizados intraesplenicamente con las enzimas purificadas. Por este procedimiento se introduce en el bazo en forma quirúrgica una porción microscópica de nitrocelulosa (1x1 mm) embebida en las proteinas purificadas conteniendo 25 ng de proteina. Dos semanas despues se repitió el procedimiento y tres dias después se sacrificó el animal retirando el bazo y procesandólo en bolsas Stomacher por 80 a 90 segundos. Se filtraron las celulas del bazo atraves de una malla de nylon (Nitex) de 100 µm de tamaño de poro. Se lavaron con medio DME (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, HyClone Lab.) y se procedió a la fusión con celulas de mieloma Sp2/0 utilizando polietilenglicol 4000 (PEG).Los hibridomas fueron detectados cuatro dias despues de la fusion por ELISA y la clase de anticuerpo producido se determinó por Monoclonal Mouse Immunoglobulin isotyping kit (PharMingen, San Diego, CA).

2.8.1.b. Anticuerpos policlonales contra proteinasa K de *Tritirachium album*

Se prepararon en una etapa posterior anticuerpos policlonales contra la proteinasa K (comercial) para la standarizacion de las mejores condiciones para el western

blotting. Dos conejos hembras blancos New Zealand fueron subcutaneamente immunizados en multiples sitios. Cada conejo recibió 1.3 mg de proteinasa K (Sigma Chemical Co. St Louis , Missouri) disuelta en 0.5 ml de PBS a pH 7.2 mezclado con 0.5 ml adjuvante de Freund completo. Esta immunizacion inicial fue seguida de 5 inoculaciones intramusculares que fueron cada 12-14 dias de la inicial. Estas inoculaciones consistieron en inyecciones de 0.5 ml de 1.3 mg/ml de proteinasa K con adjuvante de Freund incompleto. El suero se purificó aislando las formas IgG del suero utilizando columnas cromatograficas Amicon Protein A, cromatografía de afinidad de membrana (MAC) (Amicon Inc. , Beverly, Mass.). La purificacion fue realizada siguiendo instrucciones del kit utilizado (Amicon Inc.).

2.8.2 Western blot

Para la transferencia se utilizaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las muestras estudiadas para el Western fueron, Proteasa K de *Tritirachium album*, Proteasa de tipo X de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* muestra de proteinasa de *O. piceae 387N* luego de la precipitación con sulfato de amonio del filtrado del cultivo y la muestra de proteasa de *O. piceae 387N* extraída de madera infectada. En esta etapa preliminar se utilizó buffer Tris HCl con Tritón X-100 2% y precipitado luego con sulfato de amonio a 90% de saturación. Por los resultados obtenidos en este estadío y como se comprobó más

adelante cuando se trabajo para la cuantificación de antigeno en madera, Triton X-100 no fue una opción acertada en la extracción del antígeno de la madera.

El buffer usado para la transferencia se compone de 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3. La transferencia se estandarizó en sus parámetros y se realizó durante 40 minutos a 10 volts, 12.5 mA, 0.5 watts, 2.5 v/h. Se realizó immediatamente despues una detección rapida de la transferencia con tinta china o Ponceau S. Una vez confirmada la presencia de las bandas de interés, se trabajó bajo dos sistemas de detección, el indirecto colorimétrico (Fosfatasa alcalina unida a estreptavidina) y el directo quimioluminiscente (Peroxidasa).

Luego de confirmar la presencia de las bandas que interesaban , se bloqueó con 40 ml de 10% leche descremada en PBS por 2 horas a 37° C, se lavó 3 veces con PBS. En caso de usar anticuerpos monoclonales se aplicó el anticuerpo monoclonal primario 1-1H3-A1 (IgM), a una dilución de 1:2000 en 0.1% leche descremada en PBS incubando durante 1.5h a 37°C. Cuando se usaron los policlonales antipK (IgG) se aplico en una proporción 1/500 en 0.1% de leche descremada y se incubó por 1.5 h. Luego de lavar 3 veces con PBS, se aplicó el anticuerpo secundario IgG de carnero anti-ratón biotinilado a una dilución de 1:1000 en 0.1% de leche descremada en PBS por una hora a 37°C en agitación suave. Cuando se hizo la immunofluorescencia de estas membranas se utilizó el anticuerpo secundario: anticuerpo de carnero anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rabano diluido 1/1500 en 0.1% de leche descremada. Utilizando

fosfatasa alcalina se procedio a lavar 3 veces con PBS y 2 veces con TBS y se aplico la estreptavidina unida a la enzima fosfatasa alcalina a la dilución 1:1000 en 0.1% de leche descremada en TBS por una hora a 37°C con agitación constante. Cuando se utilizó el sistema de la enzima peroxidasa se hicieron lavados con PBS y se procedió a la exposicion al sustrato quimioluminiscente de Amersham's enhanced chemiluminescence (ECL) siguiendo instrucciones del manufacturador (Amersham International plc. ,UK) revelando la imagen como una impresion sobre film de rayos X (KodaK). El revelado se realizó, sumergiendo la membrana en el sustrato, preparado del siguiente modo: a 660 µl de NBT (Nitroblue tetrazolium) en DMF (Dimetil formamida) se adicionó 20 µl de buffer de sustrato, seguido de 66 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en DMF. El color violaceo muestra la acción de la enzima. Se estabiliza la imagen y se lava nuevamente con PBS para quitar excesos de sustrato no utilizado.

2.8.3 Inmunodot

Para dot imunoblot se utilizaron membranas de nitrocelulosa de 0.25 µm de tamaño de poro que fue previamente embebida en PBS y luego de quitar exceso de buffer se la ubicó en el aparato de Biodot (Biorad). Las muestras de 20 µl de las muestras de proteinas en PBS fueron sembradas y dejadas secar a temperatura ambiente. Se sembraron las siguientes proteinas, O.piceae 387N purificada por HIC (cromatografia hidrofobica interactiva) (gentileza de Abraham, L.), y

proteinasa del precipitado con sulfato de amonio, proteinasa K de *Tritirachium album* (Sigma P-6556), proteasa tipo X (termolisina) que es una metaloproteina de *Bacillus thermoproteolyticus* (Sigma P-1512), quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma C-1525) y α-amilasa de bacillus amyloliquifaciens (Boehringer y Mannheim, 161764, GmbH, Alemania). Luego al retirar la membrana del aparato Biodot se procedió a los pasos siguientes en bandeja con agitacion suave para la distribución uniforme a temperatura ambiente. La membrana se bloqueo con leche descremada en PBS en una concentración del 5%. La concentración del anticuerpo primario en este caso anticuerpo policlonal contra la proteinasa K (comercial) fue de 1/500. La detección fue directa con peroxidasa de rábano cuya concentración fue de 1/1500, todos los pasos se realizaron en PBS con 0.2% de leche descremada.

2.9 Cuantificación de *Ophiostoma piceae 387N*

2.9. 1 ELISA en columnas

Se utilizaron columnas de propileno para cromatografía desechables de 6.5 ml de capacidad con un disco de fibra de vidrio en su extremo inferior. La madera utilizada tenia un contenido de humedad del 100 % . El volumen de trabajo en cada columna fue de 500 µl. Se colocaron 50 mg de madera infectada molida en las columnas y se la compactó con presión de aire. Las muestras de madera infectada con *Ophiostoma piceae 387N* como se indico en 2.2.2 fueron cosechadas a los tres dias, una semana y dos semanas de incubación. Se

optimizaron las condiciones del ELISA realizando 5 repeticiones en cada estadío de infección. Se bloqueó la membrana con 2% de PBS con leche descremada. Se incubó con agitación a 37 °C por 1.5 hora. Sin proceder al lavado se colocó el anticuerpo primario Mab 4G3(14) (Banerjee et al., 1994) con agitación. Se lavó extensivamente, luego de 2 h de incubacion, con PBS 3 veces. Se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG biotinilado (Southern Biotechnology Associates 0.5 mg/ml) 1:1000 en PBS con agitación. Se repite el lavado con PBS 3 veces y 3 lavados con TBS. Se incubó con estreptavidina unida a la enzima fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates) 1:1000 con agitación por 45 min. Se adiciona el sustrato con su buffer respectivo. Buffer para sustrato: 0.1M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9.5. Sustrato: BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato): una tableta en 0.5 ml dimetil formamida (Sigma), NBT(nitroblue tetrazolium): 1 tableta en 1ml de agua destilada (Sigma). Se tomaron 330 ul de NBT y se mezclaron con 33µl de BCIP en 20 ml de buffer desarrollado anteriormente. Se retiraron alícuotas de 100µl y se leyeron a 405 nm en espectrofotómetro. La lectura se realizó a diferentes tiempos 2, 5, 15 y 30 min.

2.9.2 Inmunodot en madera

2.9.2.a Extracción del antígeno (hongo) de la madera

Cuatro bloques de madera de *Pinus contorta* infectada y cuatro de madera no infectada con *Ophiostoma piceae 387N* de 3 x 1 x 0.5 cm fueron molidos y

pasados por tamiz de 100 µm de tamaño de malla. Los bloques fueron previamente infectados con 50 µl de micelio homogeneizado. Se pesaron 100 mg de la madera molida (se determino que el contenido de humedad de la madera era del 100%). En un mortero que se ubica en un baño de hielo se coloca 1 ml de 1% SDS y se extrae por 2 minutos la madera infectada y la no infectada. Se recogió la muestra en un microtubo, finalizando el procedimiento con un volumen final de 3 ml. Se realizaron cinco diluciones seriadas de 1:3 del extracto, obteniendo un total de seis muestras

2.9.2. b Inmunodot. Materiales

- Bio-Dot Microfiltration apparatus(Bio-Rad Laboratories)
- Hybond-ECL Nitrocellulose Membrane (Amershan Corporation) poro 0.45 µm
- Buffer inicial: 0.1M buffer fosfato salino PBS , 0.15M NaCl, pH 7.2
- Buffer Bloqueante: 10% de leche descremada en PBS
- Buffer para los anticuerpos: 0.1% de leche descremada en PBS
- Buffer para la enzima: 0.1% de leche descremada en 25 mM buffer tris salino, TBS, pH8.0
- Buffer para sustrato: 0.1M tris buffer, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl2, pH 9.5
- Sustrato: BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato): una tableta en 0.5 ml dimethyl formamide (Sigma)

NBT(nitroblue tetrazolium): 1 tableta en 1ml de H2O dest (Sigma)

- Anticuerpo primario: Mab 4G3(14) contra la pared celular de *Ophiostoma piceae 387N* (Banerjee et al. 1994)
- Anticuerpo secundario: anticuerpo de carnero anti-ratón IgG biotinilado (Southern Biotech)
- Conjugado enzimático: Streptavidina unida a la fosfatasa alcalina 1:1000
- Scanner Hewllet-Packard
- Dot Image Analysis Program, para posterior análisis de los datos obtenidos se utilizó MathCad como software

2.9.2.c Dot Immunoblot

Se prepararon diluciones para la curva de calibración usando *Ophiostoma piceae 387N* crecido en medio líquido. A los tres días, una semana y dos semanas de infección las muestras fueron cosechadas para la determinación de biomasa. El total de biomasa fúngica en cultivo líquido fue medida según 2.2.1.a.. La biomasa fue calculada para cada punto. Se realizaron entonces diluciones de 22.5, 17.5, 12.5, 7.5, y 2.5 µg/ml para obtener una curva standard linear. Cada punto se repitió 16 veces para disminuir la variabilidad del sistema.

En una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro, previamente remojada en buffer fosfato salino (PBS), se sembraron 100 µl del antígeno y sus diluciones en

cada pozo. Ubicándolos del siguiente modo

muestra	dilución (µg/ml)	vial #
Ophiostoma piceae 387N	22.5 17.5 12.5 7.5 2.5 0	A1-H1 A2-H2 A3-H3 A4-H4 A5-H5 A6-H6
Madera no infectada	extracto original	A7-H7
Madera infectada	1:3 1:9 1:27 1:81 1:243	A8-H8 A9-H9 A10-H10 A11-H11 A12-H12

Se dejo drenar y secar a temperatura ambiente 24hs. Posteriormente, se bloqueó con 40 ml de 10% leche descremada en PBS por 2 horas a 37 °C, se lavó 3 veces con PBS, y se aplicó el anticuerpo monoclonal primario MAb4G3(14) (Banerjee et al., 1994), contra un antígeno de la pared celular, a una dilución de 1:5000 en 0.1% leche descremada en PBS incubando durante 1.5h a 37°C. Luego de lavar 3 veces con PBS, se aplicó el anticuerpo secundario IgG de carnero anti-ratón biotinilado a una dilución de 1:1000 en 0.1% de leche descremada en PBS por una hora a 37°C en shaker. Finalmente, se lavó 3 veces con PBS y 2 veces con TBS y se aplicó la estreptavidina unida a la enzima fosfatasa alcalina a la dilución 1:1000

en 0.1% de leche descremada en TBS por una hora a 37°C en shaker. El revelado se realizó, sumergiendo la membrana en el sustrato, preparado del siguiente modo: a 660 µl de NBT se adicionaron 20 µl de buffer de sustrato, seguido de 66 µl de BCIP. El color aparecerá en instantes hasta estabilizar la imagen. Para lograr mayor sensibilidad en la respuesta también se trataron con quimioluminiscencia, en este caso, el ultimo paso, la incubación con el sustrato se modificó usando AMPPD "3,2'-spiroadamantane-4-metoxi-4-3"-fosforiloxi-fenil-1,2-dioxetano(Amersham, UK) en buffer 1M dietanolamina, 0.2% azida sódica y 0.0203 g de $MgCl_2$. la solución se llevó a pH 10 . La membrana fue scaneada y luego analizada usando **Dot software** desarrollado para este propósito. Como control de otros sistemas utilizados se sumergió membrana en aceite mineral como se describe en los procedimientos de Thermomax Plate reader, dejando la membrana transparente y los dots en contraste. Se leyeron los valores de los dots en un amplio rango de absorbancia (280nm -625nm).

2.9.3 Desarrollo del software apropiado para analizar la imagen obtenida

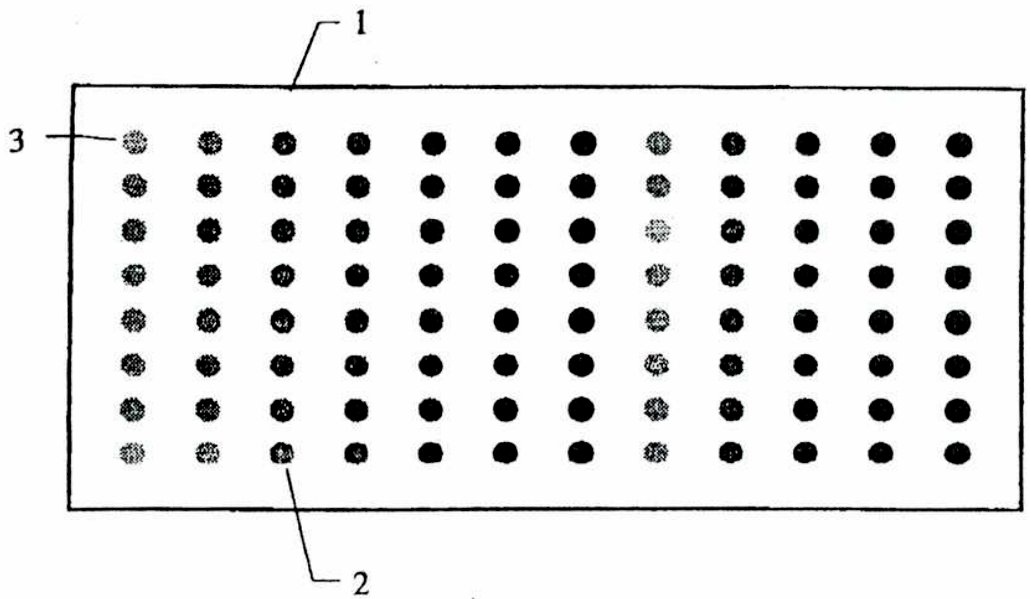
Para analizar la imagen generada por una membrana se trabajó conjuntamente con el Dr. James Olson para diseñar un programa que pudiera lograr traducir los valores colorimétricos logrados en valores numéricos. Se scanneo la membrana lograda luego del immunodot, o determinación colorimétrica de proteínas, esa imagen fue salvada en un archivo en formato binario o ASCII. La imagen

scanneada es leída por el programa diseñado, al cual se lo llamó Dots y corre en Windows. El programa muestra la imagen en el monitor como se muestra en la *Figura* 2A. Desde este punto se procede a:

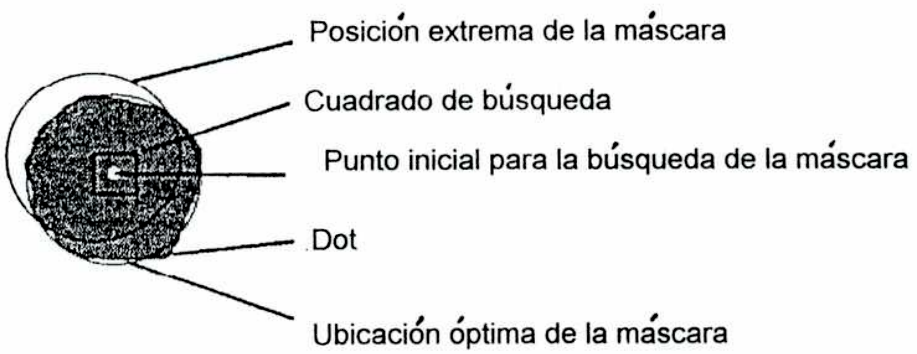
1. Configurar el programa a la imagen
2. Localizar la grilla de dots
3. Análisis automático

Figura 2:A: Esquema de análisis de la membrana scanneada. Dots de 6 mm scaneadas a 300 dpi es 75 pixel de ancho (no se muestran): a. Tres dots son manualmente clickeados en el orden de la figura.En este caso la columna 7 es standard.

a



b



B: Como la máquina reconoce a través de un algoritmo el nivel de gris más alto, enmascarando el dot en superficie máxima

En el primer paso se configuró el programa a la imagen cargada seteando determinados parámetros específicos para esa membrana el radio del dot, el numero de dots por fila y columnas, resolución del scanner (dpi), el rango de búsqueda de dots y por ultimo la magnificación de la imagen en la pantalla. El rango de búsqueda se refiere al ancho y alto de la zona cuadrada sobre la cual el programa hace su búsqueda del dot para la mejor localización de la máscara del dot (Figura 2B). El incremento del rango permite al programa analizar imágenes con dots pobremente definidos, y además alargar el tiempo de análisis.

En el segundo paso, el usuario manualmente localiza aproximadamente la grilla para el programa haciendo un doble-toque cerca del centro de dos dots (la imagen real y la generada por el programa) en una columna dada. Luego se toca algún dot correspondiente a la primera fila superior, otro correspondiente a la ultima fila y finalmente en el primer dot correspondiente a la primera columna de la izquierda (Figura 2A). El tamaño del área de búsqueda fue definido por los parámetros seteados anteriormente. Esto permite minimizar los efectos de imperfecciones en la membrana, variaciones en el background, derramado de los dot, posición del dot y variaciones en el color de dot.

Como el paso de configuración le estableció al programa cuantas filas de dots hay en la imagen, las dos posiciones iniciales de los dots fijan el espaciamiento vertical y horizontal en pixel, y la orientación de la membrana en la imagen. Haciendo un doble-toque en el tercer dot se iniciará automáticamente la búsqueda y análisis del resto de la membrana.

El programa ahora automáticamente pasa por cada dot de izquierda a derecha, y desde la primera fila a la última. Para cada dot el programa hallará la mejor ubicación de la máscara que cubre el dot, y a partir de allí calculará el promedio de nivel de gris para la región circular bajo la máscara. Para flexibilidad y simplicidad, cuando el programa termina de leer todas las columnas y filas, este escribe el promedio de nivel de gris en una lista en un archivo tipo texto. Esta puede ser ubicada en Notepad. La lista luego puede ser analizada y graficada por otro programa con procesador matematico como MathCad u otro similar.

2.10 Visualización de los resultados

En Notepad de Windows se pueden encontrar los valores de lectura del software Dot. Se ordenan según la ubicacion de los dots en el aparato de Bio-Dot.

Se pueden observar los resultados de la siguiente forma como lo demuestra el

ejemplo a continuación.

Datos crudos

205	153	137	145	118	104	104	194	150	160	173	154	201	154	132	141
115	151	141	152	162	159	165	158	247	146	139	155	110	107	97	150
149	186	166	162	246	158	127	130	113	144	89	146	139	149	149	152

En este caso se utilizó una membrana de 4 X 12, esto es, se repitió cada punto cuatro veces. Los datos se ordenaron manualmente separandolos de a 12 por renglones, quedando la disposición de los datos como se muestra a continuación.

Datos ordenados

205	153	137	145	118	104	104	194	150	160	173	154
201	154	132	141	115	151	141	152	162	159	165	158
247	146	139	155	110	107	97	150	149	186	166	162
246	158	127	130	113	144	89	146	139	149	149	152

Haciendo coincidir la grilla anterior con la disposicion inicialmente planteada quedarian ordenados los resultados del siguiente modo:

Datos correspondientes al immunoblot

22.5	**17.5**	**12.5**	**7.5**	**2.5**	**ori**	**NI**	**1:3**	**1:9**	**1:27**	**1:81**	**1: 243**
154	173	160	150	194	104	104	118	145	137	153	205
158	165	159	162	152	141	151	115	141	132	154	201
162	166	186	149	150	97	107	110	155	139	146	247
152	149	149	139	146	89	144	113	130	127	158	246

Las membranas de 8X12 dots fueron scanneadas con scanJet de Hewllet Packard a 256 niveles del gris y 300 dpi de resolución espacial, siendo salvados como TIFF files de imágenes de 1.5 MB cada uno. Las imágenes fueron analizadas por el programa en C Dots, corriendo en Windows. Para corridas más rápidas, se recomienda usar 486DX.

2.11 Ensayo de proteína por DOT

Una solución de seroalbumina bovina (8.0 mg/ml) fue preparada para realizar una serie de diluciones desde 8.0 mg/ml a 0.05 mg/ml en H_2O dest. Un volumen de 2 µl fue sembrado en una hoja de 9x16 cm de papel de cromatografía (Whatman 3MM) que fue ubicado en un Bio-dot apparatus. El papel fue secado a temperatura ambiente por 10 min. y teñido con Coomassie R350 preparado en el momento según instrucción del manufacturador (Phastgel Blue R de Pharmacia) por 5-10 min. Posteriormente, se realizó el desteñido en 30% de metanol: 10% de ácido acético por 1 hora, para visualizar los dots sin interferencia y con intensidad suficiente y sin background. La membrana así desteñida se secó a temperatura ambiente y fue scanneada con un scan Hewllet-Packard ScanJet a 256 niveles de gris a 300 dpi de resolución espacial. Los archivos así obtenidos fueron salvados como TIFF image files de 1.5 mB cada.. El mismo procedimiento se realizó usando determinación de proteína con espectrofotómetro leyendo a 590 nm de

longitud de onda como comparación de sensibilidad. Se tomaron muestras liquidas y se midió la absobancia a 590 nm.

3. Resultados

3.1 Endoproteasas en medio líquido

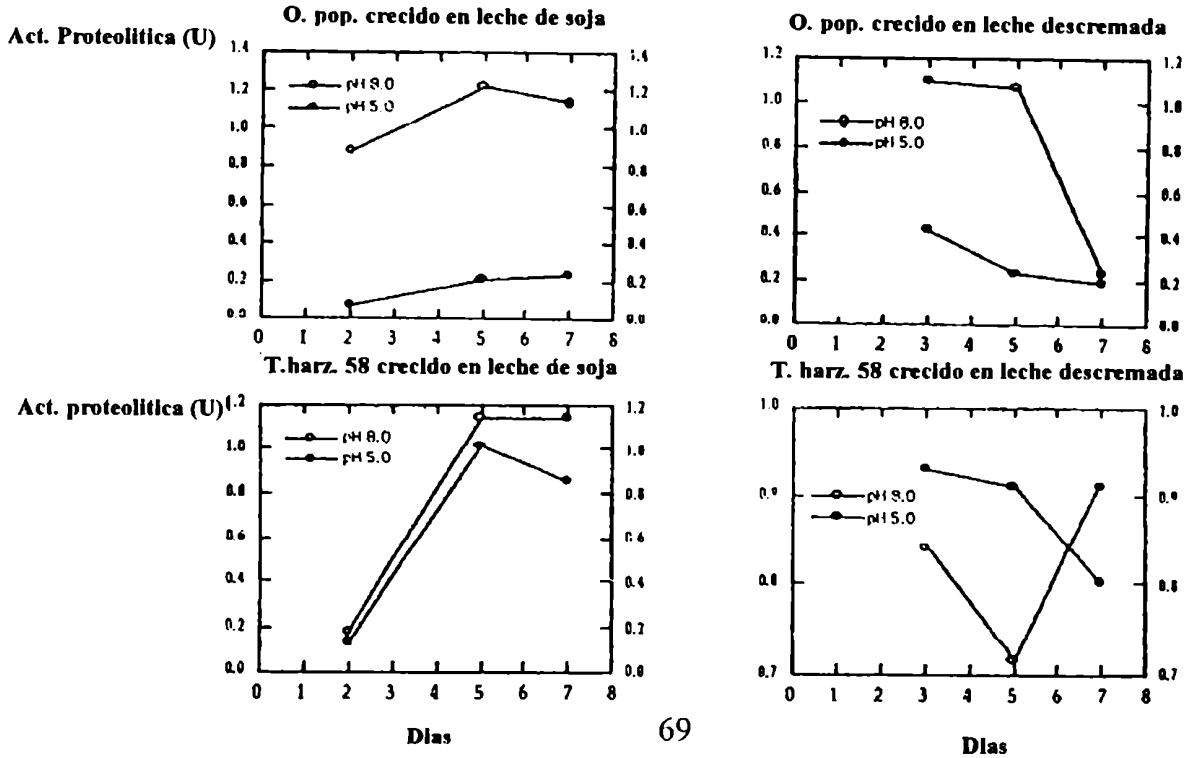
3.1.1 Actividad proteolítica durante el crecimiento fúngico

Dentro de las doce cepas utilizadas para el estudio de proteinasas extracelulares en medio líquido, siete pertenecen al género *Ophiostoma* y también se estudiaron especies de *Alternaria, Aureobasidium, Cladosporium*, que también producen coloración en la madera infectada. La selección fue basada en el informe de Seifert & Gyrlls, donde se informa que miembros de la familia Ophiostomataceae fueron los hongos más frecuentemente aislados de la madera en ambas costas, Este y Oeste de Canadá, como así también otros géneros en menor proporción y que *Ophiostoma .piceae*, fue la especie predominante. El moho verde *Trichoderma harzianum E58* fue también incluído. Los mohos verdes frecuentemente presentes en aserraderos, se bien no son considerados hongos cromogénicos, causan coloración superficial sin alterar la estructura de la madera.

Existe información acerca de la variación en la producción de proteasas varía enormemente entre diferentes cepas de hongos y los medios usados para su crecimiento (Jönsson, y Martin, 1964; 1965; Ebeling, et al., 1974 ; Chrzanowska, et al., 1993). Todas las cepas examinadas produjeron actividades proteolíticas cuando fueron crecidas en medio líquido suplementado con diferentes fuentes de

proteína como leche de soja, leche descremada, BSA. Sin embargo la leche de soja dió los mejores resultados en términos de biomasa y actividad de proteasa en la mayoría de las cepas por la alta cantidad de proteínas presente en esta fuente 3.1% (Abraham et al., datos no publicados) (figura 3). La leche de soja pareciera ser rápidamente utilizada por estos hongos que habitan la madera, pues la mezcla de proteínas de origen vegetal probablemente sea similar a las proteínas presentes en la madera. Cuando la leche de soja fue suplementada como fuente de nitrógeno orgánico, la actividad proteolítica del filtrado se incrementó con el tiempo y llegó a su máximo al principio de la fase estacionaria de crecimiento.

Figura 3: Cinética de las enzimas proteolíticas de O. Populinum 671A y Trichoderma harzianum E58 crecidos en leche descremada y leche de soja. Actividad medida con azocoll a pH 8.0 (O) (Buffer Tris HCl) y a pH 5 (●)(Buffer Acetato de sodio)



En el punto máximo de crecimiento estos hongos demostraron actividades altas a pH 8 y en menor proporción a pH 5, dos *A. tenuis 2G, C. cladosporioides 273D* tuvieron similares actividades a ambos pHs y tres *O. piceae 387E, O. ainoae 701A, , O. piliferum,55H* presentaron mayor actividad a pH 5 . La especie *O. piceae 387N* presentó una actividad levemente mayor a pH 5 (Tabla 1). En pocos casos como *O. piceae 212735*, la mayor actividad fue medida a pH 8 al principio del crecimiento y a bajo pH en estadíos posteriores de crecimiento, o viceversa, (Figura 4). *O. piliferum 55H* fue el único hongo que mostró baja actividad proteolítica a ambos pH. En este caso es probable que las proteasas producidas por este organismo estén pegadas a las paredes celulares o sean incapaces de hidrolizar el colágeno usado para medir la actividad enzimática.

Cuando la actividad proteolítica fue expresada por unidad de biomasa, el valor más alto se obtuvo en la fase exponencial de crecimiento (Figura 3). Luego de este máximo valor la actividad declina durante la fase estacionaria, donde la actividad se mantuvo constante por pocos días. Esto indicaría que las enzimas extracelulares proteolíticas, fueron principalmente sintetizadas y liberadas al medio cuando el hongo estaba en activo crecimiento durante la fase exponencial

TABLA 2: ACTIVIDADE
CRECIMIENTO

Especies	Crecimiento optimo		Actividad proteolitica			
	Dia	Biomasa (mg ml-1)	Filtrado (U ml^{-1})		Masa fungica (U mg^{-1})	
			pH 8.0	pH 5.0	pH 8.0	pH 5.0
O. piceae 387E	5	14.0 ±0.2	30.38 ±0.54	35.12 ±1.60	2.20 ±0.04	2.52 ±0.16
O. piceae 387J	5	12.8 ±0.5	32.74 ±0.8	21.00 ±0.16	2.60 ±0.08	1.64 ±0.04
O. piceae 387N	5	12.1 ±0.1	28.24 ±1.00	33.08 ±1.92	2.36 ±0.08	2.76 ±0.20
O.piceae 212735	5	12.7 ±0.1	30.52 ±2.12	25.2 ±1.32	2.40 ±0.12	2.00 ±0.08
O. populinum 671A	5	13.7 ±0.2	33.44 ±0.72	17.40 ±0.92	2.44 ±0.08	1.28 ±0.04
O. ainoae 701A	6	10.0 ±0.4	16.40 ±1.32	30.28 ±1.00	1.67 ±0.13	3.06 ±0.18
O. piliferum 551I	7	9.9 ±0.2	0.80 ±0.03	1.04 ±0.12	0.08 ±0.00	0.12 ±0.01
C. adiposa 251B	7	7.5 ±0.2	14.00 ±0.56	3.24 ±0.32	1.88 ±0.04	0.44 ±0.04
A. pullulans 132Q	7	14.8 ±0.2	18.88 ±0.92	6.44 ±0.64	1.28 ±0.04	0.44 ±0.04
A. tenius 2G	5	15.8 ±0.5	36.76 ±0.44	35.44 ±2.16	2.36 ±0.12	2.24 ±0.08
C. cladosporioide 273D	5	16.2 ±0.6	39.20 ±0.16	38.96 ±0.56	2.44 ±0.12	2.40 ±0.12
T. harzianum E58	5	10.7 ±0.6	25.68 ±1.80	22.48 ±1.48	2.48 ±0.24	2.04 ±0.08

Figura 4: Actividad proteolítica medida a pH 8.0 (O) y pH 5.0 (●) del filtrado del cultivo de O. piceae 212735 crecido en medio con leche de soja:

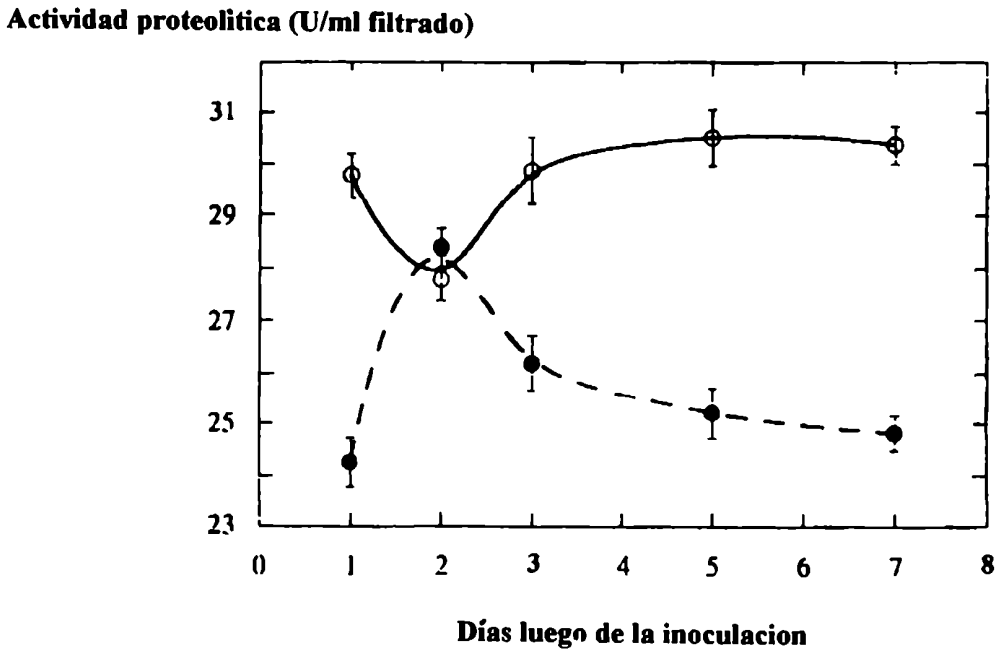
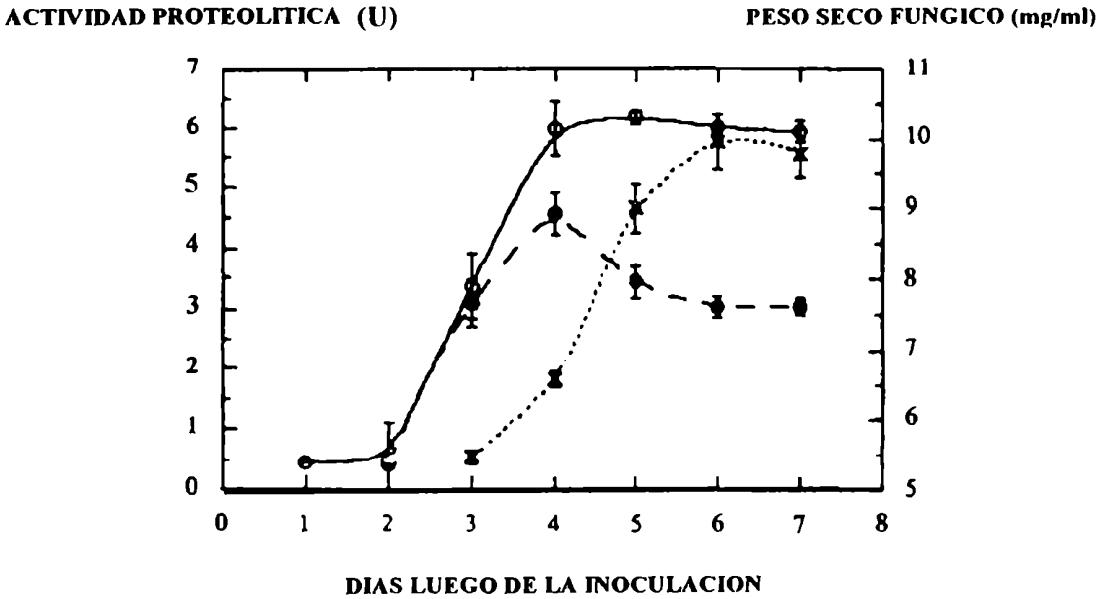


Figura5: Cinética de producción de la proteasa extracelular producida por O. ainoae 701A crecida en medio con leche de soja. (O) actividad del filtrado (U/ml) x5, medido a pH 5.0; (●) actividad por biomasa (u/mg);(x) peso seco del hongo (mg /ml). Cada valor es el promedio de cuatro mediciones.



3.1.2 Actividades proteolíticas a diferentes temperaturas

Usando azocoll se determinó el óptimo de temperatura de la proteasa a pH 8 y pH 5 (Tabla 3). En USA y Europa, la mayoría de los hongos manchadores son mesofílicos, creciendo entre los 23 °C y 37 °C (Seifert y Grylls, 1990), pero la actividad de las enzimas extracelulares tiene una temperatura óptima entre 37°C y 45°C (Saddler et al., 1985). Todos los hongos estudiados demostraron actividad máxima a 37°C o 40°C, con excepción de *C. cladosporioides 2731* cuya actividad máxima fue registrada a 31 °C y a pH 8. A 49 °C , la actividad de proteasa extracelular fue insignificante. Solo muestras de *O.piceae 3871* y *A. tenuis 2G*, retuvieron 19 y 26 % de su actividad máxima, a esta temperatura. Cuando a la proteasa de *C. cladosporioides 2731*, fue ensayada a pH 5 la actividad máxima fue a 37°C, sin embargo el valor de la actividad fue mas bajo que el medido a pH 8 a 31°C. Resultados similares fueron observados con 4 muestras para 37°C y 40°C. Esto puede deberse a la presencia en cada muestra de múltiples proteasas, cada una con un optimo de pH y temperatura diferente.

TABLA 3: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS ACTIVIDADES PROTE 'AS DE NUEVE CEPAS DE

Especies	pH de ensayo	Actividades proteoliticas (Uml ^{1}) a las temperaturas indicadas							
		28	31	34	37	40	43	46	49
O. piceae 387E	8.0	4.54	6.21	7.51	8.63	8.52	5.43	3.07	1.63
	5.0	0.53	1.09	1.66	3.28	3.11	2.07	1.03	0.38
O. piceae 387J	8.0	4.77	5.97	6.98	8.82	6.31	1.34	0.71	0.05
	5.0	0.90	1.32	2.21	3.03	4.12	1.46	0.54	0.03
O. piceae 387N	8.0	2.83	5.33	6.88	7.96	7.68	3.02	0.59	0.04
	5.0	0.79	1.23	1.97	2.98	2.73	1.43	0.32	0.02
O.piceae 212735	8.0	3.87	4.65	5.30	5.89	7.73	2.42	0.50	0.02
	5.0	0.87	1.21	1.61	2.39	1.37	0.91	0.35	0.01
O. populinum 671A	8.0	3.29	4.58	5.74	7.30	7.75	6.43	0.76	0.01
	5.0	1.06	3.45	4.10	4.56	4.58	4.02	0.33	0.00
O. ainoae 701A	8.0	4.13	5.21	7.55	8.95	8.53	3.24	0.85	0.04
	5.0	2.45	3.25	4.93	6.07	7.37	2.79	0.42	0.03
A. tenius 2G	8.0	2.32	3.60	4.23	7.99	8.53	4.41	2.83	2.25
	5.0	0.85	1.01	1.49	1.62	1.97	1.55	0.37	0.12
C. cladosporioide	8.0	7.32	7.84	7.04	6.23	3.52	1.47	0.69	0.01
273D	5.0	1.21	1.87	2.11	4.73	3.74	2.23	0.27	0.00
T. harzianum E58	8.0	2.07	3.02	4.14	8.46	7.89	4.53	2.18	0.05
	5.0	0.81	1.08	2.37	5.95	6.05	2.55	0.39	0.02

**** Las máximas actividades están subrayadas***

3.1.3 Efectos de inhibidores de Endoproteasas

Se determinó la susceptibilidad de las proteasas de las doce cepas de hongos a diferentes inhibidores. Por lo tanto se utilizaron ocho inhibidores con especificidades conocidas para cuatro tipos de proteasas y se analizaron las muestras crudas de proteasas (Tabla 4). Los inhibidores fueron elegidos por inactivar cada uno de los cuatro tipos de proteasas: PMSF para serin proteasas, 1,10-fenantrolina y EDTA para metalo-proteasas, pepstatina A para aspártico-proteasas y E64 e IAA para cistein proteasas Además se utilizaron como controles positivos TLCK inhibidor de tripsina y TPCK inhibidor de quimiotripsina.

Entre todos los inhibidores ensayados, IAA y E64-, dos inhibidores de cistein proteasa, no afectaron a las muestras. PMSF, mostró los efectos más significativos en todas las muestras de proteasa, si bien la inactivación fue menor para *O. populinum 671A y C. cladosporioides 273D*. La mayor parte de la actividad de las enzimas también se vio afectada por el EDTA, con excepción de *A. tenuis 2G* y *T. harzianum*. La actividad de *C. cladosporioides 273D* fue fuertemente inactivada por dos agentes quelantes 1,10-fenantrolina y EDTA. Finalmente ningún inhibidor afectó la actividad de las proteasas de *O. populinum 671A*. Las proteasas de este hongo fueron las únicas sensibles a pepstatina A, un inhibidor altamente selectivo para proteasas aspárticas. La fuerte acción del PMSF y la falta de efecto de E64 o

IAA en las muestras de proteasa, sugirió que la mayoría de las enzimas proteolíticas secretadas por los hongos manchadores estudiados, son del tipo serina. Además, aparentemente la mayor parte de ellas serian metal-dependientes, pues, fueron inactivadas por EDTA, y en algunos casos también por 1,10-fenantrolina. Las muestras estudiadas provinieron de preparados crudos lo que explica la mezcla de bandas por lo tanto podríamos hablar de muestras con metalo- y serin proteasas presentes.

TABLA 4: EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE HONGOS.

Especies	Eficiencia de la inhibición producida por inhibidores de proteinasa específicos							
	1,10-Phe	PMSF	EDTA	TLCK	TPCK	Pepstatin	IAA	E64
O. piceae 387E	-	++++	+++	-	-	-	-	-
O. piceae 387J	-	++++	++	-	-	-	-	-
O. piceae 387N	++	++++	++	-	-	-	-	-
O.piceae 212735	-	++++	+++	-	++	-	-	-
O. populinum 671A	++	++	+	-	-	++	-	-
O. ainoae 701A	-	++++	++	-	-		-	-
A. tenius 2G	+	+++	-	-	-	-	-	-
C. cladosporioide 2731	++++	++		+	+	-	-	-
T. harzianum E58	-	++++		-	-	-	-	-
Tripsina	-	+++		++	-	-	-	-
α- tripsina	-	++++	-	+++	+++	-	-	-
β- tripsina	-	++++	-	+++	+++	-	-	-
Proteinasa K	-	++++	-	-	-	-	-	-
Termolisina	++++	-	-	-	-	-	-	-
Pepsina	-	-	-	-	-	++++	-	-
Papaina	-	-	-	-	-	-	++	+++
								+

La eficiencia de inhibición se calculo del siguiente modo

$$\frac{\text{actividad en ausencia de inhibidor - actividad en presencia de inhibidor}}{\text{actividad en ausencia de inhibidor}} \times 100$$

++++ 80-100%; +++ 60-80%; ++ 40-60%; + 20-40%; - menos de 20% de eficiencia en la inhibición

3.1.4 Perfiles de Endoproteasas

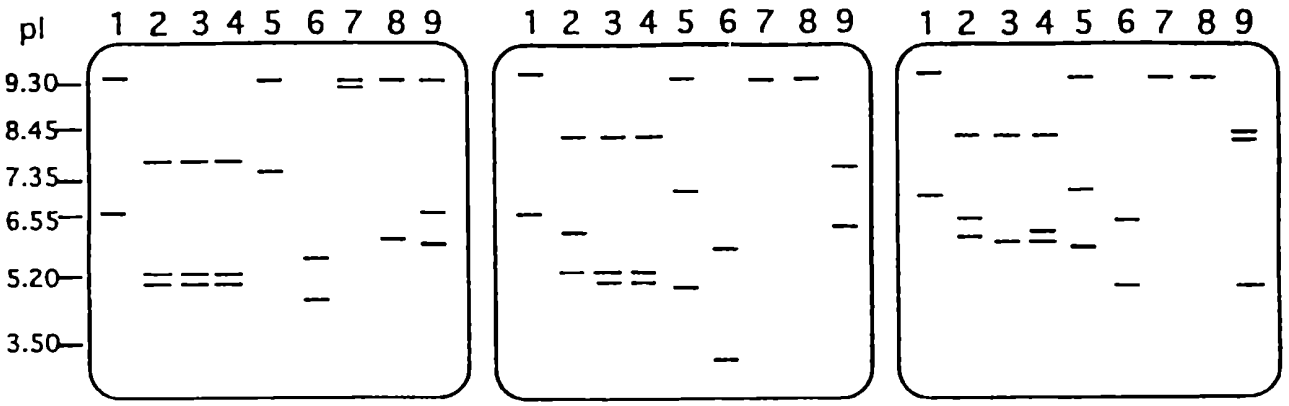
Los resultados de los efectos de los inhibidores mencionados en la sección anterior llevaron a especular con la posibilidad que cada hongo produjera más de un tipo de proteasa. Como así también si los perfiles proteolíticos eran similares o diferentes entre las diferentes especies de hongos manchadores.

Nueve muestras de proteasa preparados de los filtrados de cultivo fúngico fueron aplicadas a geles nativos PAGE e IEF. Luego de la electroforesis las bandas de proteasas fueron detectadas por la superposición de los geles sobre películas de Rayos X cubiertas con colágeno. Con esta técnica, la dilución de la muestra y el tiempo de incubación afectaron la visibilidad de las bandas proteolíticas. Para poder observar bandas menos activas, fue necesario un período más largo de incubación. Sin embargo, períodos largos de incubación resultaron en la difusión de proteínas y manchas no definidas. En la Figura 6, se observan las bandas identificadas de las nueve muestras, usando varias superposiciones con diferentes tiempos de incubación.

Dos o tres bandas fueron observadas en cada revelado de geles nativos PAGE o IEF. Entre las bandas detectadas en la sobreposición de IEF el pI más bajo fue de alrededor de 4.7 (Figura 6A, Línea 6). Existieron varias bandas con valores de pI mayores a 9, correspondientes a las bandas extremas que se observaron en la

superposición de los geles nativos PAGE (Figura 6A, Líneas 1,5,7,8,y 9). Debido a que el pI excedió el valor de pH del sistema buffer para los geles nativos PAGE , las bandas de proteasas corrieron hacia el cátodo. Por lo tanto cada una de esas bandas altas en pI, podrían comprometer más de una enzima, o quizás no aparezcan en el revelado de los geles, simplemente porque ellas migraron hacia el cátodo durante la electroforesis. Este quizá fue el caso de la muestra *de T. harzianum E58* (Figura 6ABC, línea 9). Los dos tipos de geles utilizados para estudiar proteínas nativas PAGE dieron patrones similares para la mayoría de la muestras. Es importante notar que en las superposiciones de IEF las bandas de proteasa fueron las mismas para *O. piceae 387*(J.N., 212735).

Figura 6: Bandas proteolíticas de las muestras de los filtrados del cultivo de nueve cepas de hongos detectadas por film de rayos -X. Los gráfico muestran el revelado de IEF, PAGE nativo y luego de realizar el enfocado isoeléctrico en el sistema Phast de Pharmacia. Líneas: 1. O. piceae 387E; 2. O.piceae 387J; 3. O.piceae 387N; 4. O.piceae 212735; 5. O. populinum 671A; 6. O. ainoae 701A; 7. Alternaria tenuis 2G; 8. C. cladosporioide 273D; 9, T. harzianum E58



A. IEF (pH 3-9) **B. 12.5% PAGE homogeneo nativo** **C. 8-25% PAGE gradiente nativo**

3.2 Aminopeptidasas en medio liquido

3.2.1 Actividad Aminopeptidasa

La actividad aminopeptidasa (AP) en *O.piceae 387N* fue estimada usando los substratos nitroanilina, L-Leu-pNA y L- Pro-pNA. La actividad AP fue detectada en presencia de L-Leu-pNA, pero no con L-Pro-pNA. El hongo produjo AP en medio suplementado con leche de soja o BSA como fuente de proteína. La mayor parte de la actividad fue encontrada en el pellet celular fúngico y solo una pequeña cantidad fue detectada en el sobrenadante (Tabla 5). Cuando la suspensión del pellet celular fue homogeneizada para romper las células y luego centrifugada para separar los componentes intracelulares de las paredes celulares, y así poder ensayar la actividad AP, la actividad se detectó en ambas fracciones la intracelular y la pared celular.

La Figura 7 muestra los patrones de crecimiento (expresado en términos de contenido de proteínas) de *O. piceae 387 N, O. piceae 387 E, O. piceae 212735, O. ainoae 701A y T. harzianum E58*, en medio suplementado con leche de soja. Hubo un incremento agudo del crecimiento en las cinco cepas de hongos, luego de dos días de inoculación. El crecimiento de *O.piceae 387E* y *212735* se incrementó hasta el día 4 para luego permanecer sin variaciones. *T. harzianum* E58 demostró un incremento en el crecimiento hasta el día 4 y luego un suave decrecimiento. El crecimiento de *O. ainoae 701A* se incrementó hasta el día 9 *O. piceae* 387N

exhibió una disminución en el crecimiento, luego del segundo día. El contenido de proteínas de *O. piceae* al día 9 fue mayor que el del día 7 y no fue representativo del grado de crecimiento dada la presencia de proteínas en el medio.. Si bien el contenido de proteínas no es el mejor indicador de la biomasa fúngica, fue usado en este caso para estimar el crecimiento, dado que las mediciones del peso seco no fueron precisas debido a la presencia de material particulado en el medio. En consecuencia, en los ensayos de la enzima, se expresan los valores de la actividad de aminopeptidasas con respecto a masa fúngica presente en 1 ml de cultivo. Las actividades AP de diferentes hongos manchadores, medidas por hidrólisis de L-Leu-pNA y expresadas como nmoles de NA liberados / hora / ml de cultivo, se ilustran en la Figura 8. A los 2 días de crecimiento se registró una actividad AP similar para *O. piceae 387E, O. piceae 387N, O. piceae 212735, y T. harzianum E58* y fue nula para *O. ainoae 701A*. A partir de los 4 días de crecimiento, se registró la actividad más alta para *O. piceae 387E* seguida por *O. ainoae* 701A, mientras que las actividades de *O.piceae 387N, O.piceae 212735 y T. harzianum E58* continuaron bajas.

TABLA 5: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA, OBSERVADA EN CÉLULAS DE PELLET Y SOBRENADANTE DE OPHIOSTOMA PICEAE 387N A DIFERENTES DÍAS DE CRECIMIENTO

Dia	**% de actividadAP en medio suplementado con**			
	BSA		**Leche de soja**	
	P	S	P	S
2	95	5	99	1
7	92	8	99	1
9	91	9	97	3

Figura 7: Patrón de crecimiento de O. piceae 387N (O-O), O. piceae 387 E(●-●), O. piceae 212735(V -V), T. harzianum E58(H-H), y O. ainoae 701A(Δ-Δ) en medio semi-sintético suplementado con leche de soja, como fuente de proteína. El crecimiento fue medido por el incremento de la concentración de proteína en el pellet celular. Para cada cepa los ensayos fueron hechos por triplicado en 3 cultivos separados y los puntos representan el promedio ±sd.

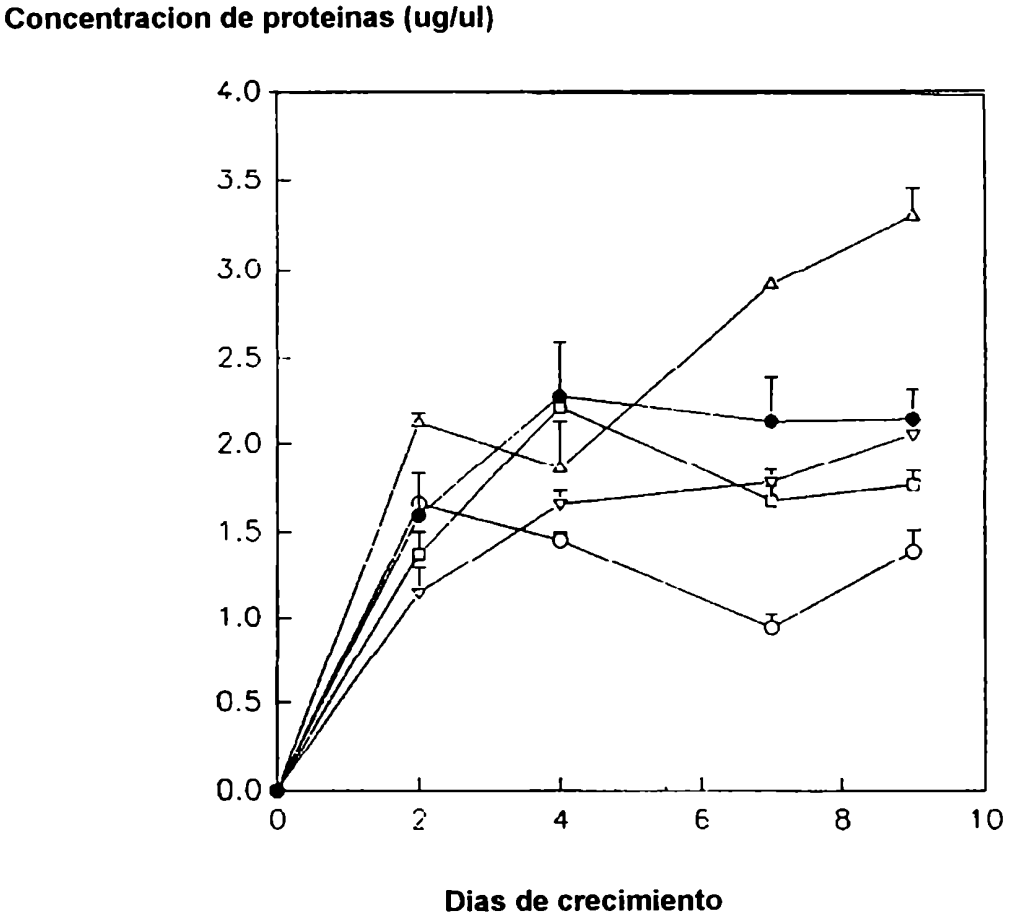
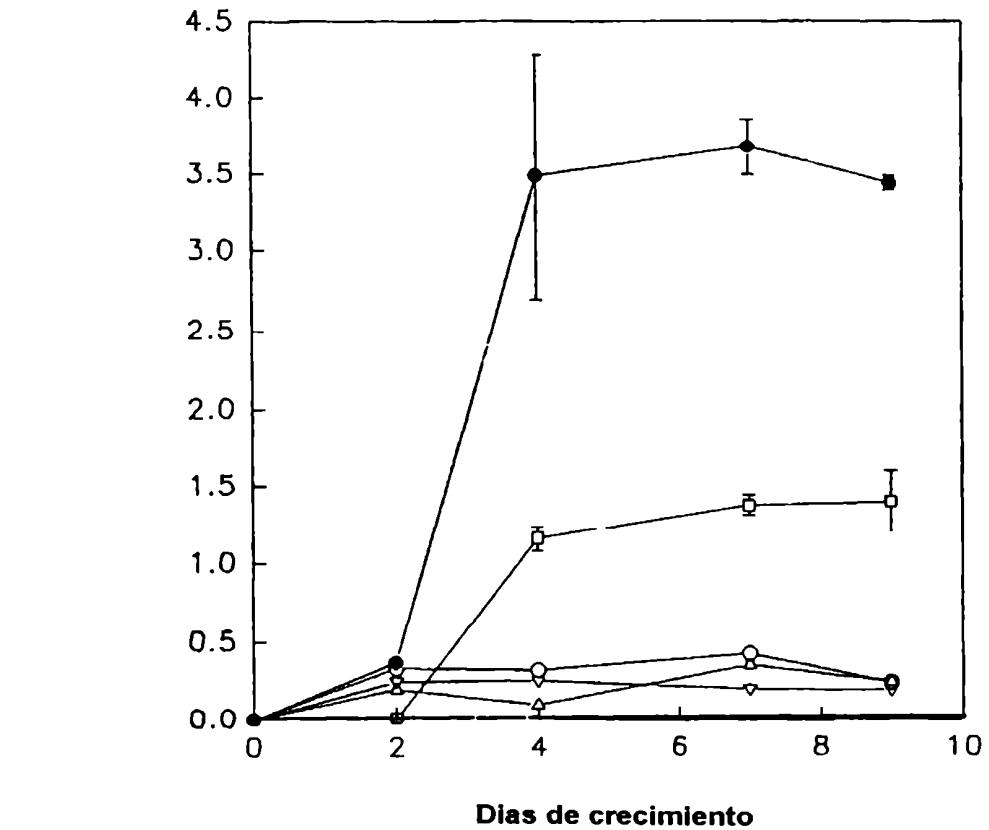


Figura 8: Actividad aminopeptidasa, expresada en nmoles de nitroanilina hidrolizada / hora / ml de cultivo, a diferentes tiempos de crecimiento, de O. piceae 387N (○-○), O. piceae 387 E(●-●), O. piceae 212735(V - V), O. ainoae 701A (□-□), y T. harzianum E58 (Δ-Δ)..Para cada hongo los ensayos fueron hechos por triplicado en 3 cultivos separados y los puntos representan el promedio±sd.



3.2.2 Efectos de pH y Temperatura

La variación de la actividad AP con el pH, siguió patrones similares para todos los días de crecimiento ensayados. Como se observa en la Figura 9, el perfil de pH de la AP producida por tres cepas de *O. piceae, O. ainoae, y T. harzianum* al día 7, muestra una baja actividad a pH 6, que se va incrementando para hacerse óptima en el rango de pH 8 a 9.

La Figura 10, muestra los efectos de la temperatura en la actividad AP en las 5 cepas estudiadas. Se observó un incremento de la actividad con el aumento de la temperatura hasta los 37° C, y un pequeño decaimiento a los 50 ° C.

Figura 9: Perfil de pH de la actividad de aminopeptidasa al día 7 en, O. piceae 387N (○-○), O. piceae 387 E(●-●), O. piceae 212735 (V -V), O. ainoae 701A (□-□), y T. harzianum E58 (Δ-Δ) La actividad fue estimada por la cantidad de NA liberado del L-Leu-pNA. Para cada hongo los ensayos fueron hechos por triplicado en 3 cultivos separados y los puntos representan el promedio ±sd

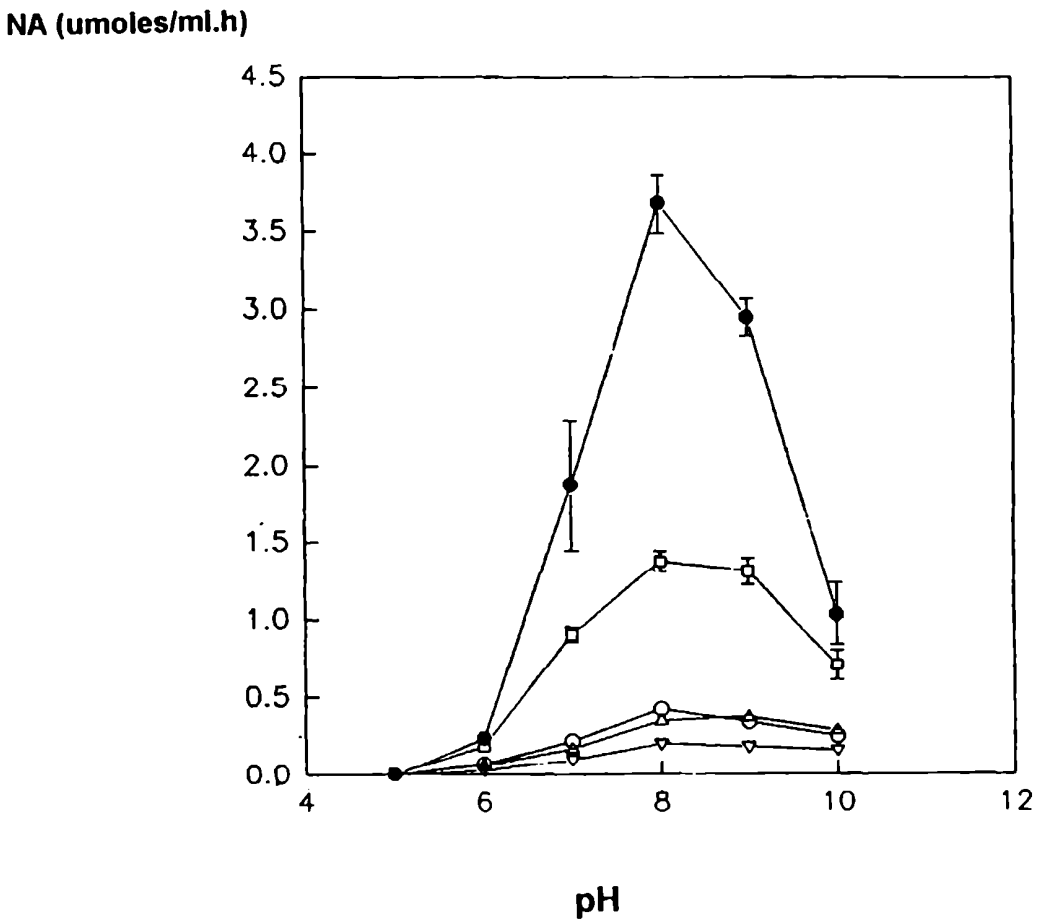
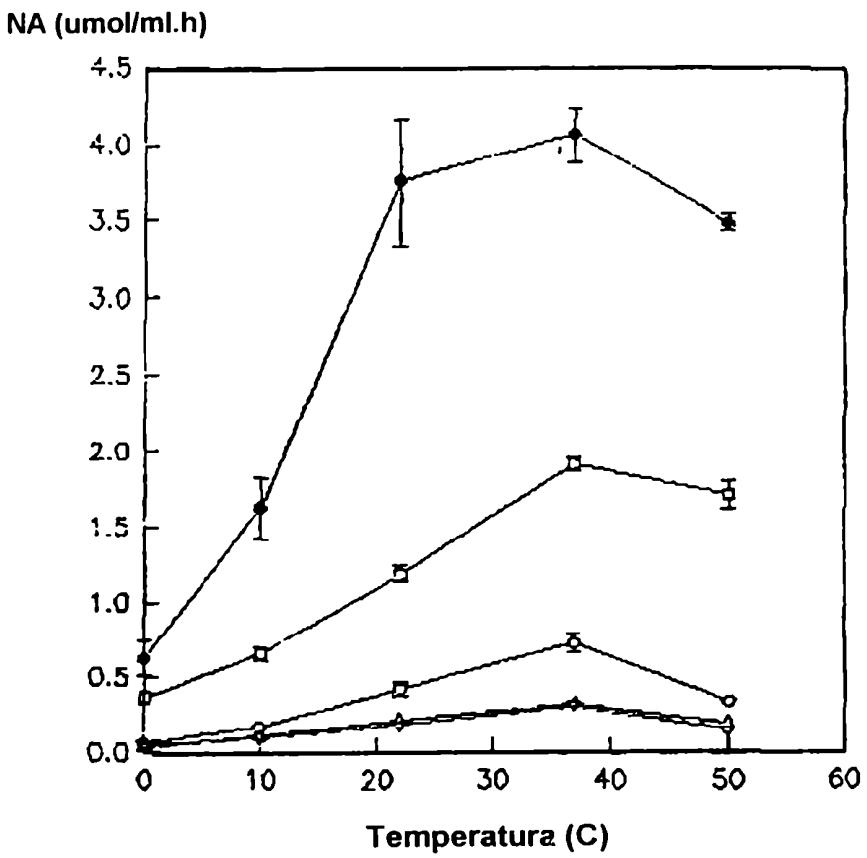


Figura 10: Efecto de la temperatura en la actividad aminopeptidasa al día 7 de O. piceae 387N (O-O), O. piceae 387 E(●-●), O. piceae 212735 (V-V), O. ainoae 701A (□-□), y T. harzianum E58 (Δ-Δ) La actividad fue medida por la hidrólisis del L-Leu-pNA. Para cada hongo los ensayos fueron hechos por triplicado en 3 cultivos diferentes y los puntos representan el promedio ± sd.



3.2.3 Efecto de iones bivalentes e inhibidores

La influencia de los iones bivalentes en la actividad de AP en las 5 cepas de hongos que se estudiaron se presentan en la Tabla 6. La presencia de Co^{2+} en el medio resultó en un incremento pronunciado en la actividad de AP en *O. piceae 387 N, O. piceae 387 E, y T. harzianum E58.* El incremento en la actividad por presencia del Co^{2+} fue menor en *O. piceae 212735* y *O. ainoae 701A*. El Cu^{2+} disminuyó la actividad AP en las 5 cepas de hongos. Ca^{2+}, Mn^{2+}, y Zn^{2+} afectaron poco la actividad AP, disminuyéndola o incrementándola levemente según la especie. El Mg^{2+} aumentó la actividad en todas las especies salvo *O. piceae 387E*, en la cual observó un decaimiento de la actividad con los cuatro últimos iones mencionados.

El efecto de inhibidores en la actividad AP se resume en la Tabla 7. Actinonina y puromicina causaron una reducción de la actividad AP en *O. piceae 387E* y *T. harzianum E58* y no significativa en el resto de las especies estudiadas. .Amastatina, bestatina y EDTA (1 mM) decrecieron la actividad AP las 5 cepas de hongos en diferentes grados. EDTA a mayor concentración (10 mM) no tuvo efectos inhibitorios en *O. piceae 387N* y *O. piceae 212375*. Fenantrolina disminuyó significativamente la actividad AP en todas cepas de hongos. Leupeptina y PMSF tuvieron efectos poco significativos en la actividad AP en

todas las cepas excepto en *O. piceae 387E*, donde se observó un leve decaimiento.

TABLA 6: EFECTO DE VARIOS IONES BIVALENTES EN LA ACTIVIDAD DE ANIMOPEPTIDASA EN DE O. PICEAE 387N (OPN) O PICEAE 387 E(OPE), O. PICEAE 212735(OP5) O. AINOAE 701A (OA), Y T. HARZIANUM E58 (TH), USANDO L-LEU-PNA COMO SUSTRATO. PARA CADA HONGO LOS ENSAYOS FUERON HECHOS POR TRIPLICADO CON 2 CULTIVOS SEPARADOS Y LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ±SD. EN CADA CASO, EL CONTROL QUE NO TENIA IONES BIVALENTES FUE TOMADO COMO E 100%, LOS DEMÁS VALORES FUERON CALCULADOS RESPECTO A ESTE ÚLTIMO.

Metal ion		**% actividad aminopeptidasa**				
		OpN	**Op5**	**OpE**	**Oa**	**Th**
Ninguna		100	100	100	100	100
Ca^{2+}	**1mM**	93.7±2.9	100.0±44	75.7±3.1	.95.7±8.0	112.3±5.7
Co^{2+}	**1mM**	144.7±12.1	112.0±2.7	173.0±5.7	117.0±3.5	196.3±24.3
Cu^{2+}	**1mM**	55.3± 4.6	36.3±2.5	19.3±2.1	62.3±5.0	32.6±2.3
Mg^{2+}	**1mM**	113.7± 2.1	111.0±3.6	64.7±1.5	118.3±4.0	104.6±2.5
Mn^{2+}	**1mM**	89.7± 2.1	98.0±2.0	49.3±2.1	83.7±4.9	11.0±11.4
Zn^{2+}	**1mM**	85.0±1.7	115.0±2.9	40.0±3.5	96.7±7.4	107.0±7.5

TABLA 7: INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA O. PICEAE 387N (OPN) O PICEAE 387 E(OPE), O. PICEAE 212735(OP5) O. AINOAE 701A (OA), Y T. HARZIANUM E58 (TH), USANDO L-LEU-PNA COMO SUSTRATO. PARA CADA HONGO LOS ENSAYOS FUERON HECHOS POR TRIPLICADO EN DOS CULTIVOS SEPARADOS Y LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ±SD. EN CADA CASO EL CONTROL QUE NO TIENE INHIBIDOR FUE TOMADO COMO EL 100% LOS DEMÁS VALORES FUERON CALCULADOS RESPECTO A ESTE ÚLTIMO

Inhibidor	**% actividad aminopeptidasa**					
		OpN	Op5	OpE	Oa	Th
Ninguna		100	100	100	100	100
Actinonina	0.1 mM	98. 0±2.8	97.0±2.8	65.5±4.9	98.5±0.7	71.0±2.8
Amastatina	0.1 mM	87.5±2.1	86.5±0.7	51.0±4.2	53.5±5.0	21.5±2.1
Bestatina	0.1 mM	78.0±4.2	91.5±0.7	59.5±12.0	38.0±5.7	88.0±1.4
Puromicina	0.1 mM	99.5±2.1	97.0±4.2	82.5±0.7	96.0±1.4	60.5±3.5
EDTA	10.0 mM	121.5±19.1	111.5±7.8	18.5±6.3	70.5±17.7	14.0±1.4
	1.0 mM	83.0±8.5	89.0±2.8	19.5±3.5	76.0±14.1	14.5±0.7
Fenantrolina	10.0 mM	15.7±6.5	1.5±0.7	9.0±4.2	5.5±2.1	3.5±0.7
	1.0 mM	42.5±3.5	55.5±2.1	12.5±4.9	24.0±2.8	5.0±0.0
Leupeptina	1.0 mM	99.5±2.1	104.5±3.5	94.0±0.0	95.0±0.0	94.0±2.8
PMSF	1.0 mM	93.5±5.0	100.0±0.0	81.5±2.1	96.5±2.1	92.5±5.0

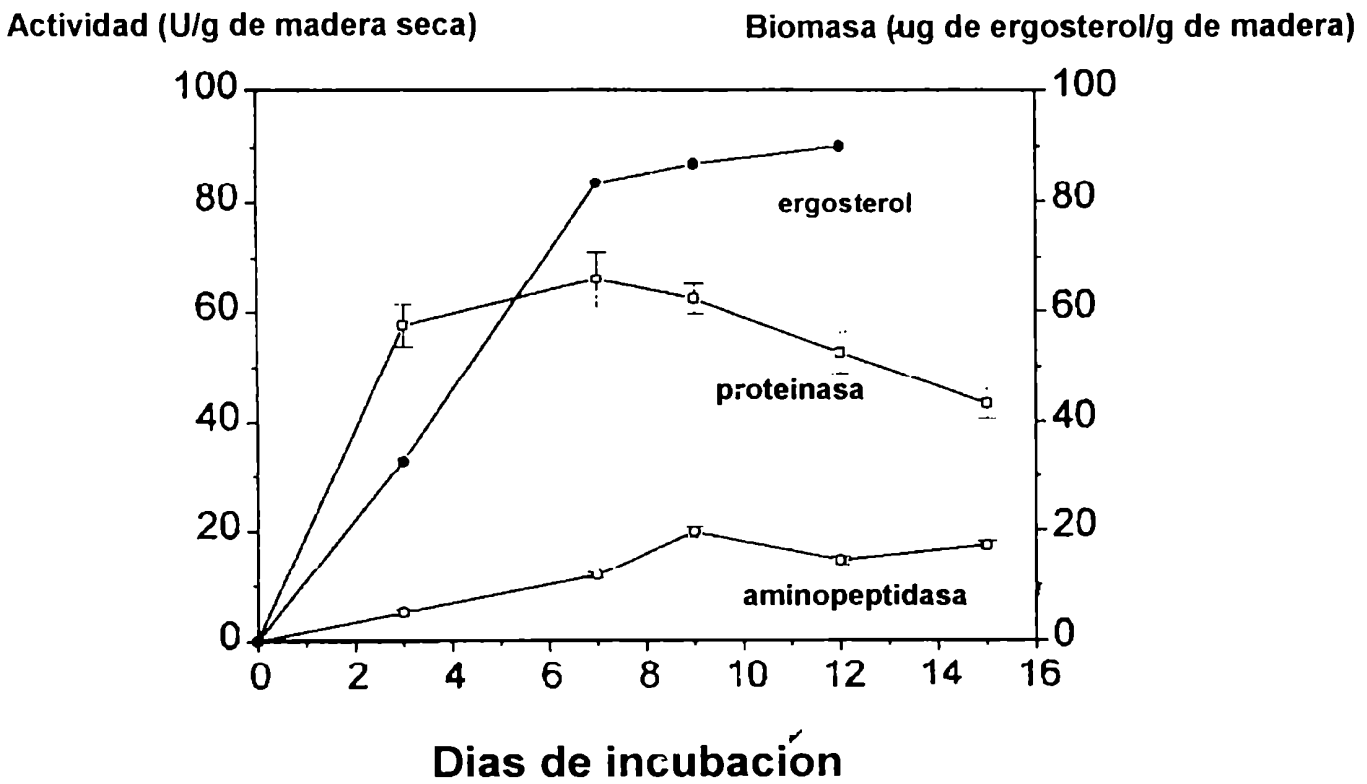
3.3 Producción de endoproteinasas y aminopeptidasas en hongos crecidos en madera

Luego de dos semanas de crecimiento fúngico, todos los bloques de madera mostraron decoloración visual. La biomasa fúngica fue medida a través del contenido de ergosterol en madera no inoculada e infectada. Para la mayoría de la cepas fúngicas el contenido de ergosterol se incrementó durante la primera semana llegado a un valor constante después de 7 a 9 días, indicando que el crecimiento fúngico ha llegado a la fase estacionaria (Figura 11, Tabla 8.)

TABLA 7: INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA O. PICEAE 387N (OPN) O PICEAE 387 E(OPE), O. PICEAE 212735(OP5) O. AINOAE 701A (OA), Y T. HARZIANUM E58 (TH), USANDO L-LEU-PNA COMO SUSTRATO. PARA CADA HONGO LOS ENSAYOS FUERON HECHOS POR TRIPLICADO EN DOS CULTIVOS SEPARADOS Y LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ±SD. EN CADA CASO EL CONTROL QUE NO TIENE INHIBIDOR FUE TOMADO COMO EL 100% LOS DEMÁS VALORES FUERON CALCULADOS RESPECTO A ESTE ÚLTIMO

Inhibidor	**% actividad aminopeptidasa**					
		OpN	Op5	OpE	Oa	Th
Ninguna		100	100	100	100	100
Actinonina	0.1 mM	98. 0±2.8	97.0±2.8	65.5±4.9	98.5±0.7	71.0±2.8
Amastatina	0.1 mM	87.5±2.1	86.5±0.7	51.0±4.2	53.5±5.0	21.5±2.1
Bestatina	0.1 mM	78.0±4.2	91.5±0.7	59.5±12.0	38.0±5.7	88.0±1.4
Puromicina	0.1 mM	99.5±2.1	97.0±4.2	82.5±0.7	96.0±1.4	60.5±3.5
EDTA	10.0 mM	121.5±19.1	111.5±7.8	18.5±6.3	70.5±17.7	14.0±1.4
	1.0 mM	83.0±8.5	89.0±2.8	19.5±3.5	76.0±14.1	14.5±0.7
Fenantrolina	10.0 mM	15.7±6.5	1.5±0.7	9.0±4.2	5.5±2.1	3.5±0.7
	1.0 mM	42.5±3.5	55.5±2.1	12.5±4.9	24.0±2.8	5.0±0.0
Leupeptina	1.0 mM	99.5±2.1	104.5±3.5	94.0±0.0	95.0±0.0	94.0±2.8
PMSF	1.0 mM	93.5±5.0	100.0±0.0	81.5±2.1	96.5±2.1	92.5±5.0

Figura 11: Actividades de aminopeptidasa, endoproteasa y contenidos de ergosterol en la albura de Pinus contorta (lodgpole pine) inoculada con Ophiostoma piceae 212375 con la desviación standard de cuatro repeticiones



Todas la cepas seleccionadas secretaron proteasas extracelulares en medio líquido, con una actividad óptima entre los 37° C y 40° C , y actividad ínfima a los 49°C (sección 3.1.2). Del mismo modo se produce la producción de enzimas proteolíticas durante el crecimiento en su hábitat natural, la madera. En estudios preliminares realizados en este sustrato, se ensayó la actividad de proteasas a pH ácido y alcalino. La mayoría de las cepas mostró actividad comparable a ambos pHs obteniéndose mayor actividad a pH alcalino. En consecuencia la actividad fue medida a pH 8, usando azocoll como sustrato. La actividad de proteasa fue determinada para *O. piceae 212375* a distintos tiempos durante el crecimiento, y se expresó por gramo de madera seca. Se observó un incremento con el tiempo alcanzando su máximo valor a los 7 días, al inicio de la fase estacionaria, como se demostró por el contenido de ergosterol (Figura 11), luego se produce una disminución de la actividad. Una tendencia similar fue observada para todos los hongos crecidos en madera (Tabla 8).

Para corroborar que la proteasa encontrada en medio líquido se corresponde a la secretada por el hongo en su hábitat natural, en otra serie de experimentos se determinó el efecto de diferentes inhibidores de proteasa en la actividad de las enzimas de la madera. Como ya se expuso anteriormente, hemos clasificado las proteasas fúngicas producidas en medio líquido, por determinación de su susceptibilidad a un limitado número de inhibidores. En este trabajo se observa

que los inhibidores de aspártil y cisteín proteasas no han tenido efecto en la actividad (Tabla 9). PMSF inhibió fuertemente la actividad en diferentes muestras, sugiriendo que la mayoría de las proteasas secretadas por el hongo eran del tipo serina. Como todas las proteasas fueron también afectadas por agentes quelantes, EDTA, probablemente sean metal-dependientes. Se observó una tendencia similar con proteasas extraídas de la madera luego de ser colonizadas por el hongo y las producidas en medio líquido.

El primer paso en la hidrólisis de proteínas es llevado a cabo por proteinasas extracelulares. Ellas convierten las proteínas en residuos peptídicos que más adelante serán degradadas por peptidasas en aminoácidos que serán directamente utilizados para el metabolismo. Las aminopeptidasas liberan los residuos amino de los sustratos peptídicos. Usando nitroanilina como sustrato, se determinó la actividad aminopeptidasa de los hongos crecidos en madera. Similarmente a lo hallado para la actividad de proteasa, la actividad aminopeptidasa se incrementó con el tiempo llegando a un máximo entre los días 9 y 12 (Figura 11, Tabla 10). La actividad aminopeptidasa llegó a un máximo durante las fases estacionarias de crecimiento. Contrariamente a la proteasa, se mantuvo relativamente constante o se incrementó durante la fase estacionaria. En los resultados mencionados anteriormente las mismas cepas de hongos crecidos en medio líquido produjeron actividad aminopeptidasa, mayormente asociada con las células (pared celular).

Esta actividad fue inhibida por amastatina, bestatina, y similarmente a la actividad de proteasa, fue también afectada por EDTA.

TABLA 9: EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASA POR HIDRÓLISIS DE AZOCOLL EN LAS MUESTRAS DE MADERA INFECTADAS CON DIFERENTES HONGOS MANCHADORES.

Especies	**Eficiencia de la inhibición con inhibidores de proteinasa**				
	1,10 Phe	**PMSF**	**EDTA**	**Pepstatin**	**E64**
Alternaria tenius 2G	+	++	++	+	+
Ophiostoma piceae 387E		++	++		
Ophiostoma piceae 212375		++	++		
Ophiostoma piceae 387N	+	++	++	+	+
Ophiostoma ainoae 701 A		++	+		
Trichoderma harzianum E58	+	+++	++	+	+

TABLA 10: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN MADERA INFECTADA CON DIFERENTES CEPAS DE HONGOS MANCHADORES. LAS ACTIVIDADES FUERON MEDIDAS EN U/G DE MADERA SECA Y ENSAYADAS A PH8 (PROMEDIO ± SD).

Especies	**Actividad de las aminopeptidasas luego de diferentes días de infección**				
	3	**7**	**9**	**12**	**15**
Alternaria tenuis 2G	7.8 ±1.0	*15.0 ±1.7*	*22.2 ±1.9*	*15.6 ±1.5*	*19.2 ±1.6*
Ophiostoma piceae 387E	*6.2 ±0.3*	*16.8 ±4.2*	*25.6 ±0.9*	*42.4 ±1.3*	*57.2 ±4.5*
Ophiostoma piceae 212375	*5.2 ±1.1*	*11.9 ±1.1*	*19.8 ±1.9*	*14.6 ±1.5*	*17.3 ±1.6*
Ophiostoma piceae 387N	*8.1 ±1.2*	*13.7 ±1.5*	*10.3 ±1.7*	*8.6 ±0.1*	*16.8 ±0.8*
Ophiostoma ainoae 701 A	*4.9 ±0.2*	*7.4 ±1.6*	*14.0 ±1.9*	*16.2 ±1.1*	*13.3 ±1.6*
Trichoderma harzianum E58	*5.9 ±1.1*	*12.7 ±1.1*	*20.5 ±1.9*	*15.3 ±1.5*	*18.0 ±1.6*

3.4 Carboxipeptidasas de hongos crecidos en medio liquido y en madera

3.4.1 Medio Líquido

La actividad de ambas enzimas, CPA y CPB fue observada en los pellets pero no en los sobrenadantes de *Ophiostoma piceae* crecido en medio liquido. No se detectó tampoco ninguna actividad de CPA y CPB en el medio antes de la inoculación.

La Figura 12A representa los productos obtenidos de la incubación de muestras del pellet fúngico con el sustrato dansyl-gly-phe. Las líneas a y b muestran las posiciones del dansyl-gly y dansyl-gly-phe, respectivamente. En la línea c, se puede observar, que cuando la carboxipeptidasa A bovina pancreática fue incubada con dansyl-gly-phe, se generó como producto de la acción de la enzima, dansyl-gly. Las líneas d y e muestran la formación de dansyl-gly en muestras de *Ophiostoma piceae 387E* crecido durante 4 y 7 días, cuando se incubaron con el mismo sustrato. Las líneas f y g corresponden a la formación de dansyl-gly en muestras de *Ophiostoma piceae 387N* crecido durante 4 y 7 días e incubados con dansyl-gly-phe. Por lo tanto podemos concluir que existe actividad de CPA, carboxipeptidasa A en ambas cepas.

Figura 12A: Electroforesis en papel a pH 2.1 para la detección de carboxipeptidasas en Ophiostoma piceae crecido en medio liquido suplementado con proteínas. A. Actividad de CPA incubando con dansyl-gly-phe. a. Standard dansyl-gly, b. Standard dansyl-gly-phe, c. CPA pancreática bovina, d. O. piceae 387E a 4 días de crecimiento, e. O. piceae 387E a 7 días de crecimiento, f.O. piceae 387N a 4 días de crecimiento, g. O. piceae a 7 días de crecimiento.

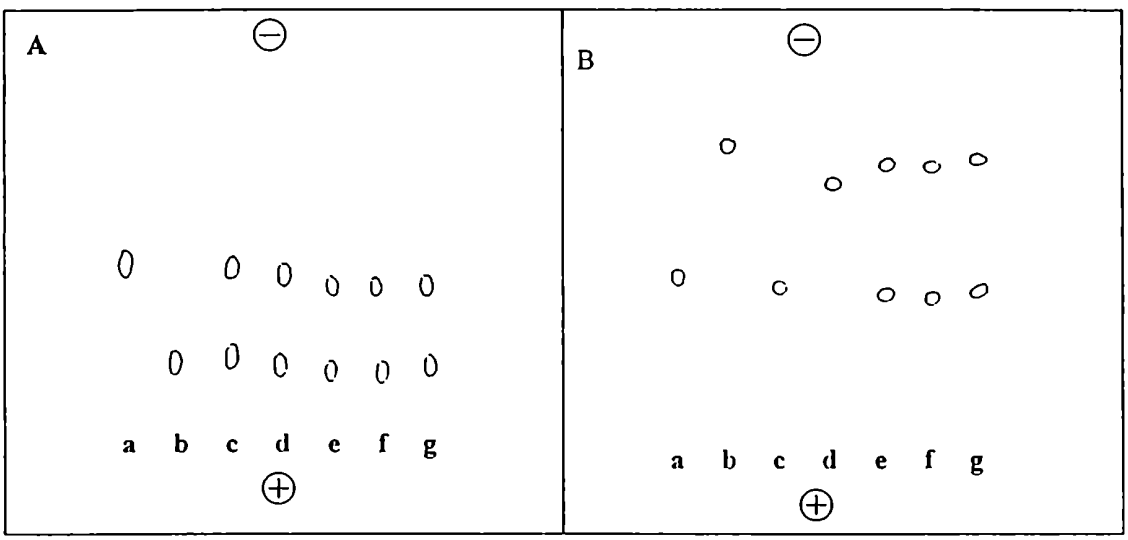


Figura 12B: Actividad de CPB incubando con dansyl-gly-arg a. standard dansyl-gly, b.standard dansyl-gly-arg, c. CPB pancreática porcina, d. O. piceae 387E a 4 días de crecimiento, e. O. piceae 387E a 7 días de crecimiento, f.O. piceae 387N a 4 días de crecimiento, g. O. piceae a 7 días de crecimiento.

La Figura 12B representa los productos obtenidos de la incubación de dansyl-gly-arg con muestras del pellet fúngico realizadas para la detección de actividad de CPB. Las líneas a y b indican la posición de dansyl-gly y dansyl-gly-arg respectivamente. La línea c muestra la formación de dansyl-gly cuando la enzima carboxipeptidasa B porcina pancreática se incubó con dansyl-gly-arg. No se detectó la formación de dansyl-gly en Ophiostoma piceae 387E a los 4 días de crecimiento (línea d) indicando la falta de actividad de la enzima CPB. La línea e sin embargo muestra actividad de la enzima a los 7 días de crecimiento. La líneas f y g las cuales corresponden a muestras de Ophiostoma piceae 387N, muestra formación de dansyl-gly, para 4 y 7 días de crecimiento indicando que ambas cepas contienen la enzima CPB.

3.4.2 Madera

No se observó la formación de dansyl-gly cuando madera no infectada fue incubada por 24h a 37 °C con los sustratos dansyl-gly-phe (Figura 13A línea d) y dansyl-gly-arg (Figura 13B línea d). Sin embargo, la madera infectada con *Ophiostoma piceae 387N* bajo las mismas condiciones dió manchas fluorescentes correspondiente a dansyl-gly (Figura 13A y 13B, líneas e y f). este resultado demuestra que el hongo produce CPA y CPB cuando crece en madera.

Figura 13A: Electroforesis en papel a pH 2.1 para la detección de actividad carboxipepetidasa en Ophiostoma piceae creciendo en madera.. A Actividad de CPA incubando con dansyl-gly-phe. a. Standard dansyl-gly, b. Standard dansyl-gly-phe, c. CPA pancreática bovina, d. madera no infectada, e. O. piceae 387N a 7 días de crecimiento, f.O. piceae 387N a 9 días de crecimiento.

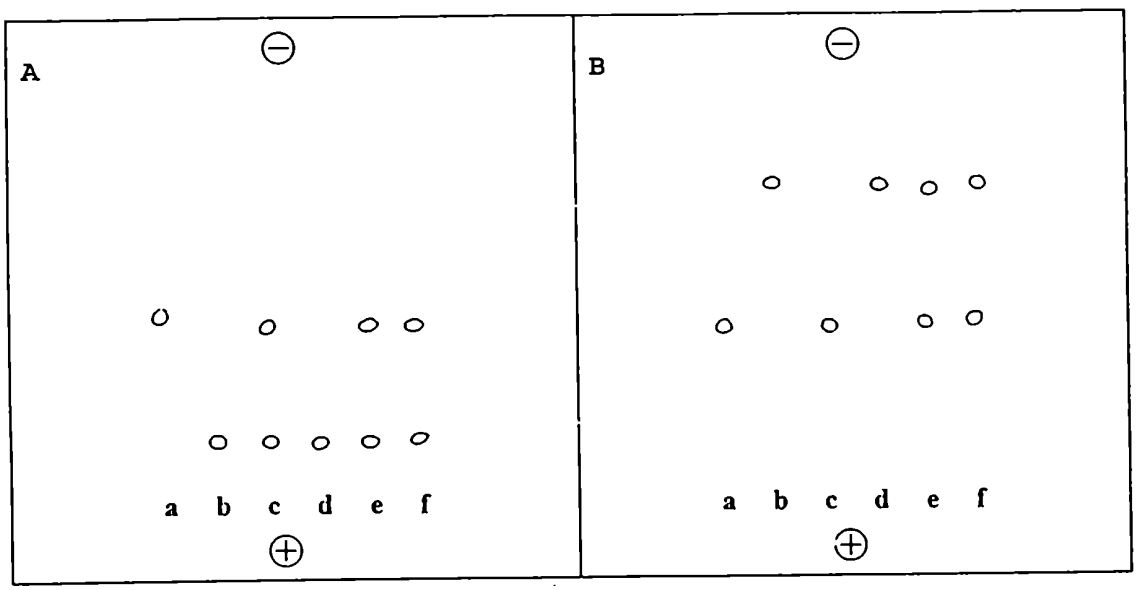


Figura 13B: Actividad de CPB incubando con dansyl-gly-arg a. standard dansyl-gly, b.standard dansyl-gly-arg, c. CPB pancreática porcina, d. madera no infectada, e. O. piceae 387N a 7 días de crecimiento, f. O. piceae 387N a 9 días de crecimiento.

3.5 Producción de Anticuerpos

3.5.1. Anticuerpos Monoclonales contra la Proteinasa de *Ophiostoma piceae 387N*

Treinta y seis hibridomas secretaron anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de *O. Piceae 387N.* La línea celular designada I-H13-A1 produjo anticuerpo de tipo IgM en contra de la banda de la endoproteasa de pI 5.1 que se purifico del IEF preparativo. El anticuerpo reconoció la proteasa del medio líquido y de la madera y se observó una reacción cruzada con algunas proteasas comerciales como se muestra en el Western blotting de la Figura 14.

3.5.2 Anticuerpos policlonales contra la Proteinasa K de *Tritirachium album*

Dada la baja especificidad del anticuerpo monoclonal logrado y por estudios bibliograficos realizados se decidió trabajar con anticuerpos policlonales contra la proteinasa K comercial (serin proteasa). Esta proteasa pertenece al grupo de las serin proteasas del tipo subtilisina II al igual que nuestra proteinasa (Abraham et al., 1996). Estas enzimas tienen la característica de autólisis en determinadas condiciones que aun hoy se siguen estudiando. Por trabajos preliminares realizados en nuestro laboratorio, la proteinasa de *Ophiostoma piceae 387N* presenta cierta homología con la proteinasa K comercial en la zona amino terminal y se comporta en forma mas estable. En la figura 15 se observan los resultados del

immunoblot realizado con estos anticuerpos. Estos últimos reconocieron la proteinasa purificada de *O.piceae 387N* en forma más especifica .

Figura 14: Análisis por Western blot de proteasa de O. piceae 387N y fuentes comerciales separadas por SDS-PAGE.

Líneas:

1. *Standard de peso molecular anhidrasa carbónica, 32.5 kDa*
2. *Proteinasa K de Tritirachium album,*
3. *Proteasa Tipo X de Bacillus thermoproteolyticus rokko,*
4. *Muestra preparada por precipitación del filtrado del cultivo*
5. *Muestra preparada a partir de la madera infectada*
   - A. *Gel tenido con plata*
   - B. *PVDF detectado con Mab 1-1H3-A1 contra la proteinasa del hongo O. Piceae 387N semipurificada.. Detectada colorimétricamente con BCIP/NBT.*

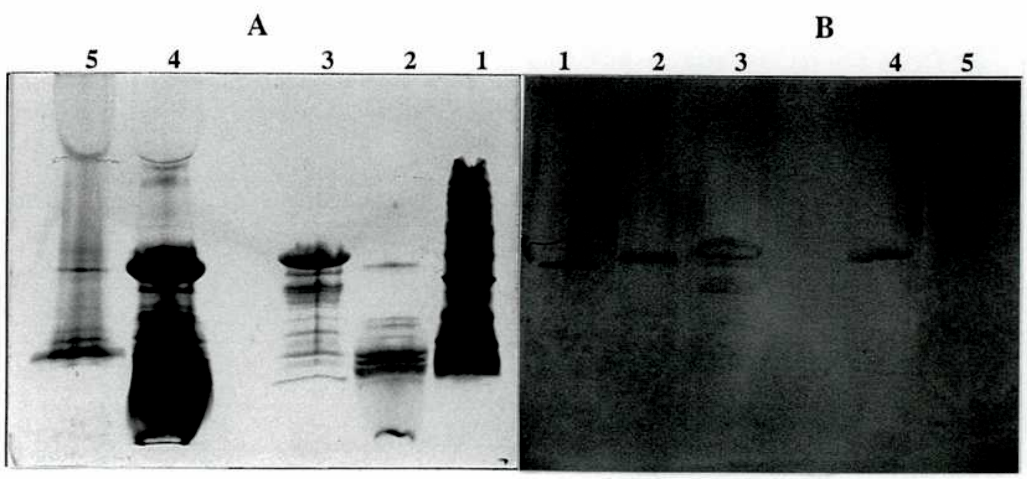
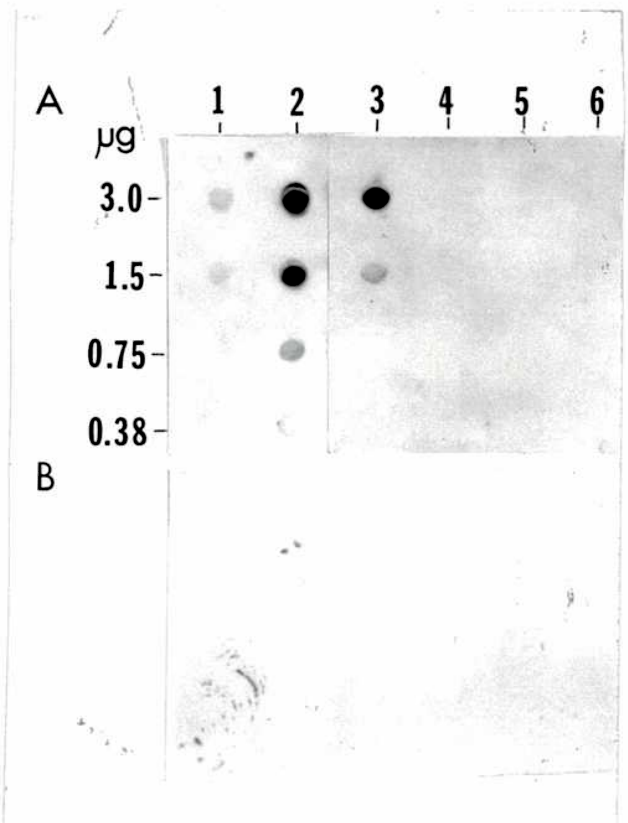


Figura 15. Immunoblot con anticuerpos policlonales contra la proteinasa K de Tritirachium album fraccion IgG. (A). Sin anticuerpo primario (B) como control. La cantidad de proteina se indica en el margen izquierdo con excepcion a la proteinasa K, esta ultima se sembró 10X menos de los valores dados. Líneas 1. Proteinasa de O. Piceae 387N purificada por HIC 2. Proteinasa de O. Piceae 387N semipurificada 3. Proteinasa K de control 4 Proteasa tipo X (termolisina) de Bacillus thermoproteolitycus 5. Quitinasa de Streptomyces griseus y 6. α- amilasa de Bacillus amyloliquifaciens



3.6 Detección y cuantificación por métodos immunológicos de *Ophiostoma piceae 387N* en madera

3.6.1 ELISA en columnas

Se estandarizaron las condiciones del ELISA usando estreptavidina unida a fosfatasa alcalina como sistema enzimático por su capacidad amplificadora y los tiempos de incubación respectivos, como así también los buffers involucrados. Como primera aproximación se utilizó este sistema para la detección de la infección en estadíos tardíos. Los resultados en la siguiente tabla fueron obtenidos a partir de madera altamente infectada (2 semanas).

TABLA 11. ELISA EN MADERA EN COLUMNAS.

	Control (madera no infectada)	**Madera infectada (14 dias)**
Set I	0.419 ± 0.12	1.000 ± 0.15
Set II	0.425 ± 0.09	1.178 ± 0.18
Set III	0.413 ± 0.09	1.197 ± 0.11

Cada set fueron 12 columnas, se leyeron los resultados a 405 nm.. Las desviaciones estándar están basadas en 12 repeticiones en cada set. La madera tenía un contenido de humedad del 95%

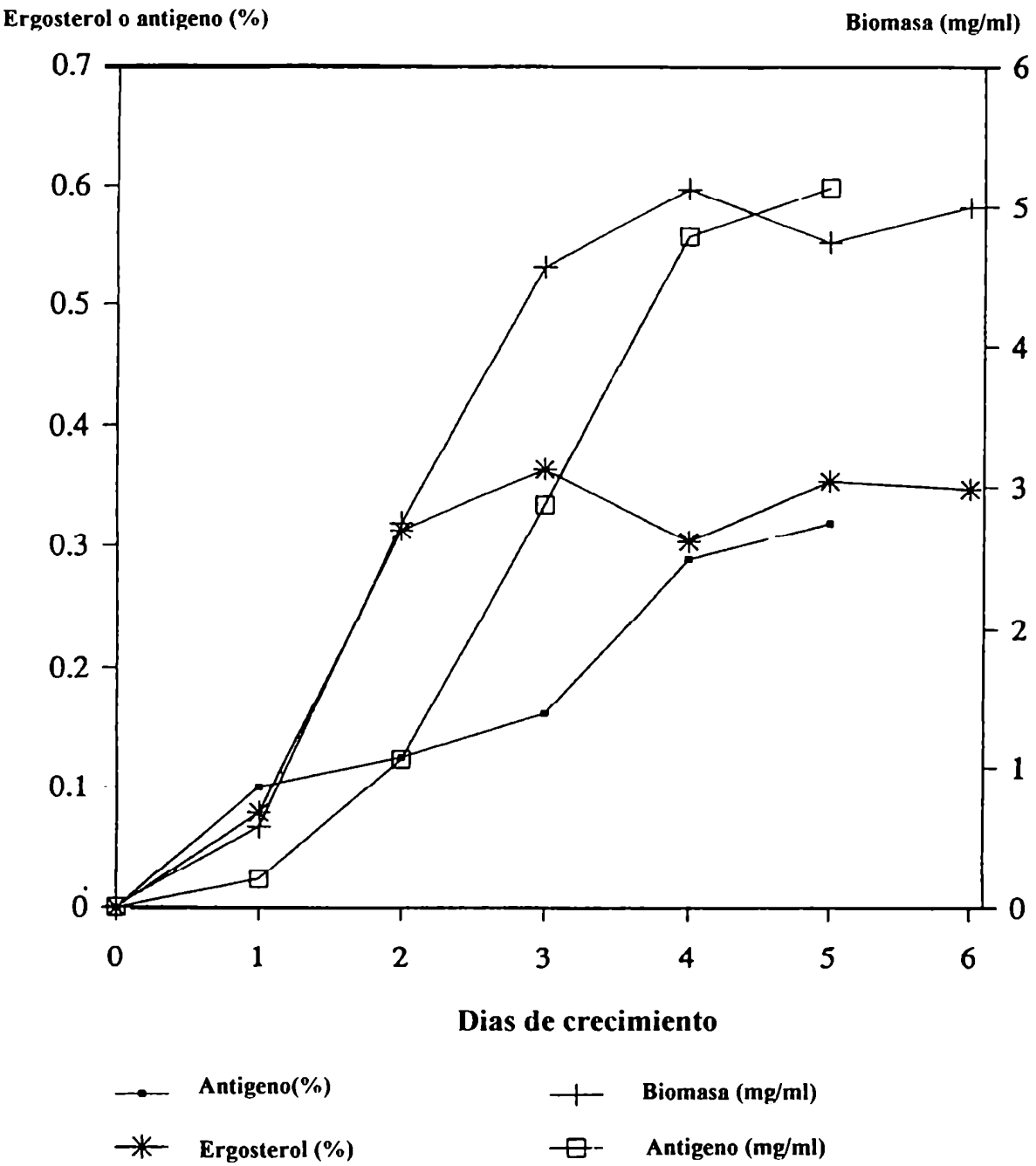
Si bien la lectura de madera infectada fue alta comparada con la no infectada, cuando se realizaron los mismos estudios pero en estadíos tempranos los resultados fueron erráticos. Lo mismo ocurrió cuando se trabajó con menores

cantidades de madera. Por lo tanto se decidió trabajar sobre otro tipo de metodología con resultados reproducibles.

3.6.2 Cuantificación del hongo por immunodot en medio líquido y madera

Se establecieron las condiciones óptimas para la detección del antígeno de pared de *Ophiostoma piceae* 387 N para medio líquido. Se elaboraron curvas de crecimiento utilizando el antígeno como parámetro de medición del crecimiento fúngico y se lo comparó con ergosterol y mediciones de peso seco (Figura 16). Si bien en la etapa exponencial todos los parámetros se comportaron en forma similar en la fase estacionaria el antígeno siguió creciendo cuando los demás parámetros se estabilizaban.

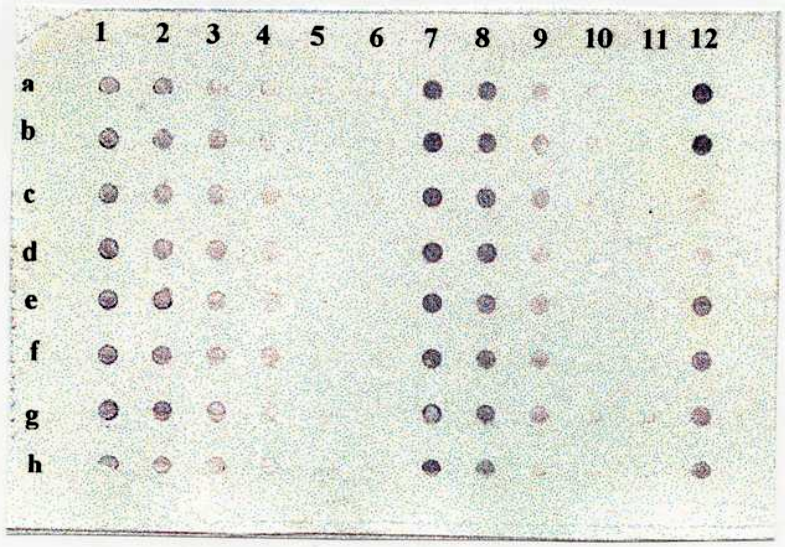
Figura 16: Curva de crecimiento de Ophiostoma piceae 387N. Medición de biomasa, ergosterol y antígeno de pared celular con anticuerpos monoclonales 4G3



En madera se trabajó para establecer las condiciones optimas y adecuadas para la extracción del antígeno. Se indicó el detergente adecuado para la extracción y posterior immunoensayo, el tipo de membrana Hybond-ECL, las condiciones de bloqueo de los espacios no involucrados en la reacción para la obtención del menor background y alta sensibilidad. Se estudió además el efecto del SDS a diferentes concentraciones sobre la unión del antígeno extraído y la membrana de nitrocelulosa. Se observó que a bajas y a altas concentraciones el SDS inhibe la unión del antígeno a la membrana. Pero sorpresivamente el SDS al 1% tiene un efecto positivo en la unión y la incrementa.

La curva estándar correlacionando el peso seco del hongo con la immunoreactividad fue generada con la cosecha del micelio a diferentes días de crecimiento: tres días, 1 semana y dos semanas (Figura 17)

Figura 17: Inmunodot para la cuantificación de O.piceae 387N en medio liquido y madera. Membrana de nitrocelulosa 0.45 µm de tamaño de poro. Las primeras 5 columnas corresponden a diluciones del micelio fúngico: 22.5; 17.5; 12.5; 7.5; 2.5 mg/ml, Columnas 1 a 5 respectivamente. Columna 6: muestra no- diluida. Columna 7: extracto de antígeno de la madera original. Diluciones del extracto 1:3; 1:9; 1:27; 1:81: columnas 8 a 11. Columna 1:2. Madera infectada por dos semanas



En la Tabla 12 se representan los valores obtenidos de intensidad de pixel para tres días y dos semanas de infección en madera de *O. piceae 387N.*

Para las tres muestras la immunoreactividad se incrementó con la cantidad de micelio aplicada por dot, y fue lineal en el rango de 5 a 45 ng de peso seco del hongo por dot. Sin embargo la immunoreactividad fue más alta para el micelio cosechado luego de tres días de crecimiento, mientras el hongo se encontraba creciendo activamente, comparado con los estadíos de crecimiento a la semana o dos semanas, cuando el hongo había alcanzado la fase estacionaria (figura 16).

Figura 18: Biomasa fungica por dot para tres días (□) , una semana (O) y dos semanas (Δ) de crecimiento en medio liquido. Las desviaciones estándar representadas están basadas en 8 dots .

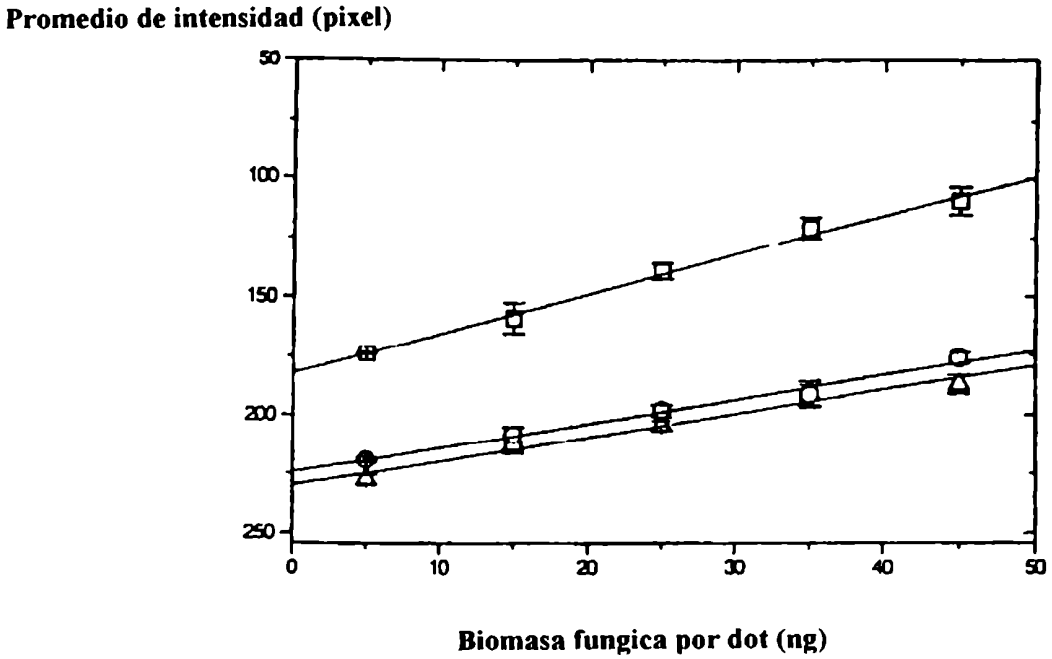


TABLA 12. (A) VALORES DE INTENSIDAD DE PIXEL DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN LOGRADA CON O. PICEAE 387N CRECIDO EN MEDIO LIQUIDO Y (B) LOS VALORES LOGRADOS PARA LAS DIFERENTES EXTRACCIONES CON SDS 1%. CADA UNA VA ACOMPAÑADA DE SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR. CADA PUNTO FUE REPETIDO 6 VECES.

A.

Tiempo de infección (días)	**Intensidad de pixel a diferentes diluciones de *O.piceae 387N* crecido en medio liquido**					
	22.5	**17.5**	**12.5**	**7.5**	**2.5**	**SDS 1%**
3	113.8±8.7	126.5±9.2	141 ±3.7	161.3±6.7	175.8±3.6	182.3±2.3
14	176.3±2.3	191.8±4.3	198.2±2.6	208.2±3.2	219.2±1.1	222.8±4.9

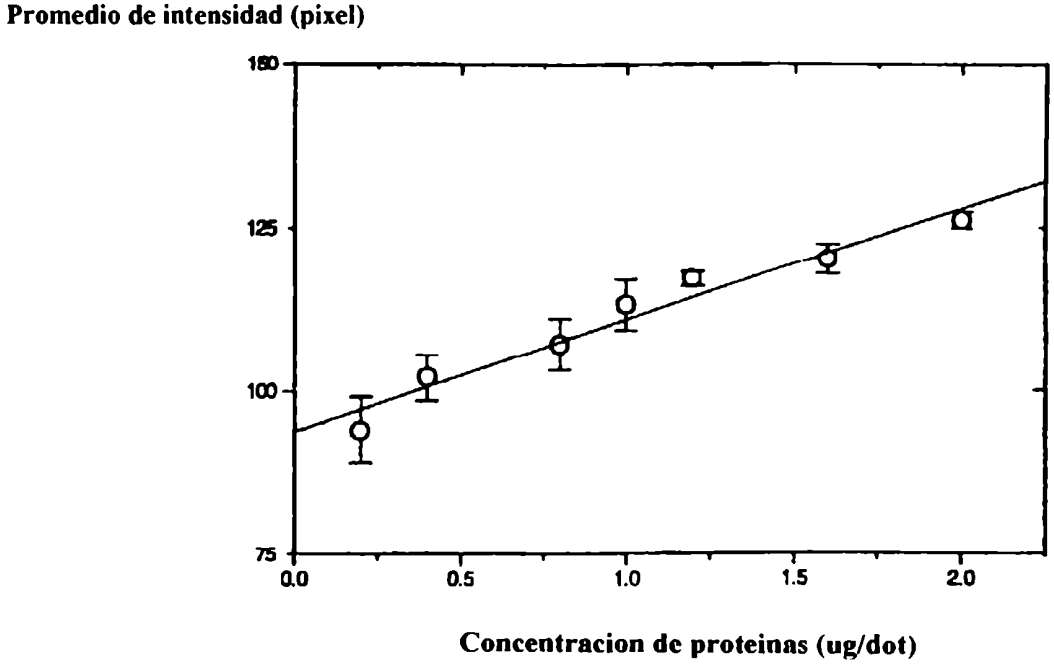
B.

Tiempo de infección (días)	**Intensidad de pixel a diferentes diluciones de las extracciones en *Pinus contorta* infectada con *O.piceae 387N***					
	1/3	**1/9**	**1/27**	**1/81**	**1/243**	**SDS 1%**
3	126.3±5.9	140.8±8.5	141 ±2.7	175.3±4.6	178.5±3.2	182.3±2.3
14	161.8±10	176.2±2.2	192.3±1.9	198.8±1.9	214.2±0.9	222.8±4.9

3.7 Cuantificación de proteínas por DOT

Con el objetivo de probar la efectividad del programa propuesto, se realizó una determinación de proteínas, siguiendo el método de Ghosh (Ghosh et al, 1988). La sensibilidad de la tinción fue determinada por DOT de diluciones seriadas de seroalbumina bovina (figura 19). Luego de realizar el análisis de los datos se puede concluir que el análisis de imágenes resultó ser equivalente en cuanto al rango de sensibilidad a los métodos convencionales, como densitometria y ELISA. En el método de Ghosh la cantidad de proteínas de los dot fue determinada por análisis densitométrico, luego medida espectrofotométricamente (ELISA). Los límites de sensibilidad en la densitometria cuantitativa fue de 100 ng por dot para resultados lineales y de 100-200 ng por dot para el ELISA, obteniéndose en nuestro caso un rango de sensibilidad de 200 ng a 4 µg por dot. Si bien el rango de sensibilidad resultó ser similar, las rapidez , facilidad y bajo costo justifican su uso.

Figura 19. Determinación de proteína (BSA). Para dar una inclinación positiva se invierten los valores restándolos a 255. 0 representa el negro y 255 el blanco. Se representan también las desviaciones standard de ocho puntos para cada valor.



4. Conclusiones y Discusión

El nitrógeno es uno de los factores limitantes para el crecimiento de los hongos, cromogénicos creciendo en madera. Bajo cantidades de nitrógeno extremadamente bajas, las proteinasas podrían actuar en el reciclado interno de proteínas en el hongo, en vez de la ruptura de proteínas exógenas. Lilly et al. (1991) sugirieron que bajo condiciones limitantes de nutrientes, los hongos no necesariamente esporularian , sino que, quizás usarían su energía para el crecimiento de las hifas y la llegada a nutrientes frescos. La ruptura autolítica de proteínas en micelio viejo puede ser la mayor fuente de nitrógeno translocable (Fenn y Kirk, 1981). Por lo tanto la función de las proteinasas producidas por los hongos cromogénicos creciendo en madera, tiene dos facetas, primeramente la ruptura de proteínas presentes en la madera en unidades asimilables, y segundo el reciclado de proteínas fúngicas cuando la fuente externa está agotada.

Estudios realizados por Sauter et al. (1989) y Langheinrich y Tischner (1991), confirmaron trabajos previos que determinaban la presencia de proteínas en diferentes partes de los árboles, almacenadas como cuerpos proteicos y constituirían la fuente más importante de nitrógeno en madera. El nitrógeno organico en la madera se encuentra en diversas formas y se almacena en el parénquima radial como proteinas (Merril y Cowling, 1966; Zimmerman y Brown,

1977 y Wetzel et al., 1989). En el estudio de la actividad extracelular proteolitica de las doce especies de hongos utilizadas en los estudios en medio liquido, todas ellas mostraron actividad proteolítica cuando fueron cultivadas con diferentes fuentes de proteínas tales como leche de soja, leche descremada y seroalbumina bovina, sin embargo la leche de soja dio los mejores resultados. Cuando se utilizaron nitrógeno inorgánico y aminoácidos como fuente de nitrógeno, no se detectó actividad proteolítica durante el activo crecimiento de *O. piceae* 387N, y solo trazas fueron detectadas luego de que todo el nitrógeno fue consumido y se produjo la detención del crecimiento (Abraham et al, 1993).

Dentro de las doce especies estudiadas *O. piliferum 55H* demostró la actividad más baja a alto y bajo pH. Es posible que las proteinasas producidas por este organismo se encuentren unidas a la célula o sean incapaces de hidrolizar el colágeno utilizado para medir la actividad de la enzima. Cuando la actividad proteolítica se expresó por unidad de biomasa el valor más alto se obtuvo durante la fase exponencial de crecimiento. Luego de ese valor máximo la actividad declina hasta que el crecimiento fungico alcanza la fase estacionaria donde la actividad permanece constante por algunos dias. Este patrón se observó en las demás especies estudiadas, indicando que las enzimas proteolíticas se producen en la etapa de activo crecimiento del hongo en la fase exponencial. Por las bandas obtenidas en las placas radiográficas con colágeno cada especie demostró catalizar

la degradación del colágeno de las placas por más de una enzima. Se observaron al menos dos o tres bandas en cada caso. Se puede pensar entonces en enzimas con diferentes roles, algunas procesadoras y otras reguladoras (Gottesman y Maurizi, 1992). Por el estudio con inhibidores de diferentes tipos de proteinasas se concluyó que la mayoría de las enzimas proteoliticas secretadas por los hongos estudiados son del tipo serina. Ademas demostraron ser metal-dependientes pues en la mayoría de las especies se vieron inactivadas por EDTA y en *C. cladosporioides 273 D,* también por fenantrolina. Esto sugiere que en las muestras de proteinasas estudiadas esté presente más de un tipo de enzima.

Se ha demostrado que el nivel de ergosterol por biomasa fúngica en medio líquido no es constante durante el crecimiento de los mismos. El contenido de ergosterol en el micelio de *O. piceae* en la fase estacionaria fue el doble del valor obtenido en la mitad de la fase exponencial de crecimiento (Gao et al., 1993). Los resultados obtenidos demostraron que las proteasas fueron sintetizadas mientras el hongo crecía activamente en madera. Consecuentemente sería más preciso expresar la actividad de proteasa por unidad de madera seca, y correlacionar dicha actividad con el crecimiento del hongo a través del ergosterol, que más que una medida del crecimiento en madera seria un indicador de fases de crecimiento o para seguir el crecimiento cuando se moniterean diferentes eventos bioquimicos.

La actividad de proteasa más alta en madera se registró para el moho verde *Trichoderma harzianum*, coincidiendo con los resultados obtenidos cuando la especie fue cultivada en medio líquido. Otras especias de *Trichoderma*, así como también una gran cantidad de otras especies fúngicas, han demostrado secretar proteasas en medio líquido (Chrzanowska et al., 1993; Kanonmani y Joseph, 1993). Cuando el nitrógeno inorgánico y aminoácidos fueron usados como fuente de nitrógeno, no se detectó actividad proteolítica durante el activo crecimiento de *O. piceae 387N*, y solo cantidades mínimas fueron detectadas luego de la suspensión del crecimiento cuando todo el nitrógeno habia sido consumido (Abraham et al., 1993).

Aunque el nivel de la actividad proteolítica varió entre los distintos organismos, el máximo de actividad proteasa fue registrado cuando el hongo estaba en activo crecimiento, sugiriendo que las enzimas juegan un papel importante en la nutrición. La actividad aminopeptidasa fue medida a través de las diferentes etapas del crecimiento fúngico, con un máximo de actividad en la etapa estacionaria de crecimiento. Es probable que estas enzimas estén involucradas en las fases terminales de digestión peptídica. Asi como también que exista más de un tipo de enzima involucrada y algunas de ellas jueguen diferentes papeles. Ya que el nivel de nitrógeno en madera es bastante bajo, algunas de estas enzimas probablemente participen en proveer aminoácidos y energía durante el período de inanición, a

través del un reciclado. Todos los hongos cromogénicos crecidos en medio líquido suplementado con proteínas, produjeron y liberaron enzimas proteolíticas dentro de los filtrados de cultivo. Aun así el nivel de actividad varió entre los diferentes organismos, la actividad fue primariamente registrada durante la fase exponencial de crecimiento fúngico, sugiriendo que las enzimas puedan tener un juego importante dentro de la nutrición. Dado que en cada hongo se observó por lo menos dos a tres bandas correspondientes a actividad de proteasa, es posible especular que algunas de las enzimas tengan diferentes roles, por ejemplo proteínas de procesamiento, o reguladoras.

Dentro de las proteasas estudiadas las aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de residuos de aminoácidos desde el amino terminal de la proteína produciendo sustratos peptídicos. Estas están relacionadas con una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. La degradación de péptidos con propósitos nutricionales es una de las tantas funciones que se le adjudican a las aminopeptidasas (Taylor, 1993). La actividad aminopeptidasa fue identificada en diferentes hongos por ejemplo en diferentes especies de *Aspergillus* (Tsuru, 1988; Nakadai, 1972) hongos anaeróbicos del rumen (Michel et al., 1993) *Trichoderma koningii* (Tsuru, 1988) y levadura (Masuda, 1975; Tisljar, 1993) entre otros. Las aminopeptidasas en levaduras parecen facilitar la toma de aminoácidos por hidrólisis de péptidos antes de la absorción. St. Leger et. al. (1993) informó acerca

de la participación de aminopeptidasas para la provisión de nutrientes en el hongo entomopatogénico *Metarhizium anisopliae.*

Las aminopeptidasas producidas por los hongos cromogénicos (*Ophiostoma ainoae* y tres cepas de *Ophiostoma piceae* en este trabajo, y el moho de superficie (*Trichoderma harzianum*) crecidos en medio líquido, han sido identificadas y caracterizadas.

En *O. piceae 387 N* la mayor parte de la actividad AP se observó en el pellet celular y una pequeña cantidad fue detectada en el sobrenadante del cultivo. Cuando las células de pellet fueron lisadas y la fracción intracelular separada de la pared, la actividad AP se observó en ambas fracciones, sugiriendo que estas enzimas se encuentran dentro de las células y también asociadas a la pared celular.

En *O. piceae 387 N*, la actividad AP fue detectada con el L-Leu-pNA y no con L-Pro-pNA indicando la presencia de actividad aminopeptidasa del tipo leucina y ausencia de aminopeptidasa tipo prolina En este trabajo también se informa la detección de aminopeptidasa del tipo leucina en *O. piceae 387 E, O. piceae 212735, O. ainoae 701 A,* y *T. harzianum E58.*

La actividad AP en las 5 cepas de hongos, fue deprimida por amastatina y bestatina, ambas conocidas por inhibir aminopeptidasas del tipo leucina

(Umezawa, et al 1976; Aoyagi, et al , 1978; Muller, et al 1991). Puromicina y actinonina inhibieron hasta cierto punto la actividad AP en *O. piceae 387E y T. harzianum E58*. Aminopeptidasas aisladas de cerebro de raton (Gillespie et al., 1992), *Escherichia coli* (Yoshimoto et al., 1988) y el ascomicete *Saccobolus platensis* (Fernandez Murray, 1994) han sido inhibidas por puromicina. Aminopeptidasas sensibles a actinonina han sido encontradas en membranas de riñón de porcinos (Gillespie, et. al. 1992; Tieku, 1992). Estas enzimas demostraron poca o ninguna actividad serin-proteasa, que fue evidente por la falta de inhibición de la actividad con PMSF. Contrariamente, la mayor parte de las proteasas secretadas por este hongo, son significativamente inhibidas por PSMF.

Las AP producidas por las 5 cepas de hongos requieren metales iónicos para su actividad, lo que fué demostrado por la observación de la reducción de la actividad en presencia de quelantes como el EDTA y fenantrolina. La supresión de la actividad por estos últimos ha sido observada en otros hongos (Masuda et. al. 1975; Michele et. al. 1993). Como se observó en la sección relacionada con los resultados de los inhibidores de proteinasas en medio liquido el EDTA inhibio la actividad de proteinasa extracelular en *O. piceae 387E*, *O. piceae 212735*, *O. ainoae 701 A*, y ambos EDTA y fenantrolina inhibieron actividad extracelular en *O. piceae 387N*. Por lo tanto podríamos decir que el amplio espectro de proteinasas que estos hongos producen, ya sea las asociadas a la células o las

segregadas, son metal dependientes. Los diferentes iones bivalentes afectaron la actividad de la enzima en diferentes proporción. En las cinco especies de hongos se observó que la adición de Co^{2+} aumentó la actividad AP mientras que la presencia de Cu^{2+} causó una disminución en la actividad. La estimulación de AP por el Co^{2+} y la supresión de su actividad por Cu^{2+} han sido mencionadas en *Streptomyces lividans* (Aphale, 1993).

El pH óptimo de las aminopeptidasas producidas por las 5 cepas de hongos se encontró en el rango básico. Se ha reportado que muchas de las aminopeptidasas de mamíferos y de bacterias tienen actividad óptima a pH básico (Tsuru, 1988).

El estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad AP en las 5 cepas de hongos demostró actividad óptima a 37°C. Una temperatura similar se observó para proteasas producidas por estos hongos en forma extracelular.

Es posible que las aminopeptidasas junto con los proteasas sean responsables de la propagación, crecimiento y desarrollo de los hongos cromogénicos. Por lo tanto la regulación o inactivación de estas enzimas pueden ofrecer nuevos métodos de control.

Las carboxipeptidasas por otro lado son exopeptidasas que hidrolizan uniones peptídicas desde el carboxilo terminal de polipéptidos y proteínas. Requiere de un

carboxilo terminal libre para ser activa y poder actuar (McDonald y Barrett, 1980 y Sarath et al., 1989). La liberación de aminoácidos por acción de esta enzima se pueden detectar por una reacción colorimétrica, con ninhidrina (Sarath et al., 1989). Este método resulta inapropiado para el uso con las muestras fúngicas por el alto background resultante de la reacción de la ninhidrina con otras proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en las muestras. Los ensayos de carboxipeptidasas se puede realizar utilizando péptidos marcados radioactivamente (Skidgel et al., 1981), si bien este es un método extremadamente sensible, requiere especial manejo de la radioactividad y de los procedimientos para el desecho del material radiactivo. También se han descripto ensayos empleando sustratos fluorescentes (Fricker et al., 1990). Sin embargo se requiere enzima altamente purificada para detectar actividad.

Se prepararon los sustratos fluorescentes, dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg con el objetivo de desarrollar un método capaz de detectar actividad de carboxipeptidasa A y B en las muestras fúngicas, sin un paso previo de purificación de la enzima. Carboxipeptidasa A generará dansyl-gly a partir de dansyl-gly-phe y carboxipeptidasa B generará dansyl-gly a partir de dansyl-gly-arg. El producto obtenido, dansyl-gly, se separa inmediatamente por electroforesis en papel a alto voltaje y se detecta luego su fluorescencia. Esta estrategia provee un procedimiento de detección altamente sensitivo para la actividad de

carboxipepetidasa A y B en mezclas complejas, conteniendo alta cantidad de material ninhydrina positivo y otros contaminantes. Si bien, podría usarse cromatografía en capa delgada (Winter, 1986), para separar e identificar los productos fluorescentes, la presencia en las muestras de grandes cantidades de material fúngico puede causar una sobrecarga en el cromatograma, interfiriendo con la correcta separación de las partes. Sin embargo, estos materiales no interfieren con el procedimiento electroforético, el cual puede tolerar un nivel más alto de contaminantes antes de que se vea comprometida y afectada la calidad de la separación.

La enzima carboxipeptidasa A exhibe su actividad máxima con sustratos cuyo C-terminal es un residuo aromático, mientras que la enzima carboxipeptidasa B es específica para sustratos con C-terminal en un aminoácido básico. (MacDonald y Barrett, 1980). Se prepararon los sustratos dansylados, dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg para detectar la actividad de estas enzimas CPA y CPB, respectivamente, en los hongos crecidos en medio líquido suplementado con proteínas y en bloques de madera

Se ha demostrado que la electroforesis en papel puede separar claramente sustrato de producto, o sea dansyl-gly-phe y dansyl-gly-arg de dansyl-gly generado por la acción de las enzima, en un método que resultó altamente sensible. Se puede

utilizar con alto nivel de confiabilidad con muestras crudas fúngicas, y aún así visualizar la actividad de CPA y CPB. Este procedimiento puede ser rápidamente adaptado para la detección de la actividad de CP en cualquier fuente que se desee. En el caso de ser necesaria una comparación cuantitativa entre las muestras fúngicas, esta se puede llevar a cabo simplemente eluyendo el dansyl-gly de los cromatogramas y cuantificar la intensidad de la fluorescencia obtenida.

Otros de los objetivos de este trabajo, fue demostrar, usando anticuerpos monoclonales, que el organismo estudiado produce las mismas enzimas proteolíticas en medio artificial con fuente de nitrógeno orgánico, y en madera. El anticuerpo monoclonal-1H3-A1, producido en contra de la enzima reconoció una banda simple en los blots de *O. piceae 387N*, ya sea en extractos de medio líquido o de madera. El anticuerpo pudo discriminar entre diferentes proteasas producidas comercialmente. Sin embargo, el anticuerpo no fue específico para nuestra proteasa fúngica, y mostró reactividad cruzada con otras serinproteasa comerciales tales como la proteinasa K de *Tritirachium album* . La reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal puede ser valiosa para monitorear proteasas similares producidas por otros hongos cromogénicos.

El anticuerpo poliK IgG pareciera reaccionar más fuertemente con la proteinasa K que con la proteinasa de *O.piceae 387N*. Esto se observó en resultados preliminares en ELISA. Con el anticuerpo diluído 1/5000 se obtuvo una densidad óptica (DO) de 1.2 con 1 μg de proteinasa K. Bajo las mismas condiciones el punto inferior de deteccion fue para una dilucion del anticuerpo policlonal de 1/250000 generando una DO de 0.1 para la proteinasa de *O. piceae 387N*. Esto probablemente es debido a la gran inestabilidad de esta enzima, que a 37 °C y a altos pH se autoliza (Abraham y Breuil, 1995) y estas son las condiciones del

ELISA utilizado. Otras proteinasas sin embargo son estables con el calor como el caso de la proteinasa K (Betzel et al.,1990).

A la misma dilución el anticuerpo poliK IgG pudo detectar menores cantidades para proteinasa K que para *O. piceae387N* . Además se observa que formas de la proteinasa semipurificada son detectadas facilmente, no asi las purificadas por HIC (Cromatografía Hidrofobica Interactiva) facilitadas por L. Abraham. Este resultado puede deberse a la pobre union de la enzima a la membrana de nitrocelulosa. Sin embargo la señal fue mayor para la proteinasa K que para la proteinasa de *O. piceae 387N.*

Se concluye por lo tanto que los anticuerpos producidos contra la proteinasa K reconocieron la proteinasa de *O. piceae 387N* y por lo tanto se los puede utilizar para immunolocalización y cuantificación. Si bien la respuesta fue más fuerte para la proteinasa K que para su proteína homóloga la proteinasa de *O. piceae387N* , este hecho confirma la similaridad de las dos proteinas. Esta reactividad cruzada ilustra los beneficios que aún tienen los anticuerpos policlonales. Generando anticuerpos policlonales contra la proteinasa K una enzima obtenida comercialmente se pudo detectar e immulocalizar la proteinasa de *O. piceae* 387N una enzima difícil de purificar en grandes cantidades para las immunizaciones. Además la proteinasa de *O. piceae 387N* es pequeña y proclive a autólisis a pH y

temperaturas óptimas. Para la obtención de anticuerpos específicos habría que proteger la enzima, o en su defecto estudiar en forma más detallada el mecanismo que lleva a esa autólisis y su regulación.

Abraham y Breuil en 1996 pudieron lograr una purificación más precisa de la proteinasa extracelular de *O. piceae 387N* trabajando luego de la precipitación con sulfato de amonio al 90% con una cromatografía hidrofóbica interactiva. A la fracción correspondiente a la proteinasa se la trató con PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) para prevenir la autólisis. De este modo se pudieron lograr anticuerpos policlonales contra la proteinasa más estables y específicos que determinaron reconocimiento de la enzima, aún desnaturalizada en SDS-PAGE, y en madera (Gharibian et al., 1996). Se pudieron estudiar además las proteinasas en diferentes especies de arboles como *Populus tremuloides, Pinus contorta var. latifolia, Tsuga heterophylla* y *Pseudotsuga menziesii* infectadas con *O. piceae 387N* por immunomarcado y observación a microscopio electrónico (Gharibian et al., 1996). La obtención de estos anticuerpos permitirían hacer uso de la técnica lograda para immunodot para la cuantificación de la enzima en campo.

En la ultima sección de este trabajo de tesis se investigó un método rápido y seguro para la cuantificación del hongo en la madera para ser usado en campo. El ELISA es un método efectivo de cuantificación de la colonización fúngica en

madera, como así también la detección temprana aún cuando la infección no se ha hecho visible, obteniéndose buena correlación entre el ELISA y observaciones a microscopio (Breuil et al., 1987). Sin embargo para la cuantificación es necesaria la extracción del antígeno de la madera, que se realizó con detergentes tales como SDS y Tritón X100 (Breuil et al, 1990). La dificultad se presentaba en la unión del antígeno a las placas de poliestireno utilizadas para el ELISA por la interferencia del detergente, que dificultaba la fijación del antígeno a las placas. Se investigó entonces la posibilidad de usar el ELISA pero utilizando como soporte sólido la madera. Los resultados no resultaron reproducibles dada la interferencia del soporte elegido generando un background muy alto, cuando se midió la densidad optica a 490 nm dió alrededor de 0.4 y la lectura en madera altamente infectada fue de 1.00. Se optimizó la técnica trabajando con más tiempo de bloqueo con leche descremada en PBS, sin embargo el valor de DO de la madera no dismunuyó. Cuando se realizaron ensayos para detectar unión no específica del anticuerpo primario (contra la pared del *O. piceae 387N*). Los valoresn de DO para madera no infectada fueron más altos aún. No se descarta la posibilidad de optimizar esta técnica en el futuro para hacerla accesible para trabajar en campo utilizando bloqueantes más adecuados para sustratos orgánicos. Esta técnica podría ser usada para la detección de la infección pero no aún para la cuantificación

Por lo tanto se investigó la posibilidad de usar DIA (Immunoensayo por dot) para

la cuantificación de *O. piceae 387N*. Este ensayo presenta la facilidad de poder seleccionar matrices adecuadas para la unión del antígeno extraído, que tienen la ventaja de tener alta capacidad de unión para proteínas, comparado con las placas de poliestireno de ELISA (Bjerrum,y Heegaard, 1988). Las membranas de nylon tambien fueron utilizadas para este tipo de ensayo, pero el mayor problema asociado a estas membranas es el incremento de unión inespecifica resultando en altos backgrounds (Gershoni et al, 1990) como se observó en el western de la figura .

El efecto del detergente cuando se trabaja con membranas de nitrocelulosa es un punto importante a estudiar. Ha sido documentado que diferentes detergentes producen efectos que interfieren en la detección immunológica de antígenos proteicos (Spinola y Cannon, 1985; Hoffman y Jump, 1986). Por ejemplo el Tween 20 al 0.05% disocia las proteínas unidas a membranas (Hoffman y Jump, 1986). El Tritón X100 no condujo a extracciones limpias (datos preliminares y Breuil et al., 1990) por lo tanto se trabajó con SDS, que fue el detergente elegido para la extracción de *O. piceae 387N*. Se puedo observar que a bajas concentraciones de detergente (>0.2%) se tiende a mejorar la unión a la membrana de nitrocelulosa (Brown et al, 1991). Concentraciones mayores no lo mejoran ni lo inhiben en una concentracion del 1%, pero al producir diluciones sucesivas del extracto, el efecto del SDS resultó cooperativo en la unión a la

membrana a una concentración final de 0.06%.

En trabajos preliminares (Breuil et al., 1988) los niveles de antígeno detectados por ELISA fueron de 0.5 µg/ml en medio líquido y 1 mg en madera, como los valores mas bajos de detección (Breuil et al., 1990), y en el DIA fue de 5 ng de peso seco de hongo/dot (2 µl) y para madera en el orden de los µg utilizando un programa diseñado para la cuantificación.

Este método permitiría medir pequeñas cantidades de proteínas, antígenos y anticuerpos, como así también para el screening de grandes cantidades de muestras (hibridomas) para la caracterización de anticuerpos. Este programa permite trabajar sobre membranas con imperfecciones y bordes irregulares. Los test iniciales en seroalbumina bovina dieron resultados lineares en un rango de 200 ng/dot hasta 4 µg/dot, resultados comparables a los de densitometría y espectrofotometría usado por Gosh et al. , 1988. Este tipo de trabajo sin embargo permitiría transferir estos files con membranas escaneadas entre diferentes laboratorios.

El programa dots descripto en este trabajo de tesis permite hacer posible ensayos con immunodot cuantitativo en forma económica y rápida. Aquellos familiarizados con lenguaje C de computación pueden rápidamente entenderlo, modificarlo y

extenderlo, por ejemplo al uso de dots rectangulares. Este método permite medir menores cantidades de biomasa fúngica que el ELISA, peso seco u otro método bioquímico, como determinación de proteína, quitina o ergosterol. Similarmente como ocurre con proteína, quitina o ergosterol la cantidad de antígeno no fue constante, siendo más alta en la fase de activo crecimiento que en la fase estacionaria, en la cual se llego a un valor constante. Como los demás parámetros, los antígenos fúngicos solo pueden ser usados como índices de biomasa fúngica. Por otro lado presentan la ventaja de no requerir la utilización de solventes y extracciones alcalinas como ocurre con el ergosterol.

5. Bibliografia

A

Abraham, L. D. and Breuil, C. 1996 *Enz. and Microb. Technol.* 18: 133-140

Abraham, L. D. and Breuil, C. 1993: Organic Nitrogen In Wood: Growth Substrates For a Sapstain Fungus. Internat. Res. Group On Wood Pres., Doc. IRG/WP 93 - 10019.

Abraham, L. D., Roth, A., Saddler, J. N., and Breuil, C. 1993 *Can J Bot.* 71 1224-1230

Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. *J. Antibiotics.* 1978, 6, 636-638.

Aphale, J.S. and Strohl, W.R. 1993. J. *Gen. Microbial.*, 1326 139, 417-424.

Augelon, M. and Dunez, J. 1984. *Ann. Appl. Biol.* 105: 463-469

Auld, D.S., Latt, S.A. and Vallee, B.L.1972 *Biochemistry.* 11, 4994-4999.

B

Bajorath, J. , Saenger, W. and Pal, G.P. 1988 *Biochem. Biophy. Acta* 954:176-182

Ballard, R.G., Walsh,M.A. and Cole, W.E. 1982. *Can. J. Bot.* 60: 2334-2341

Banerjee, S., Little, J., Chan, M., Luck B. T., Breuil, C. and Brown, D. L. 1994 *Can. J. Microbial.* 1993, 40, 35-44

Bar-Joseph, M., and Garnsey, S.M.. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): principles and applications for diagnosis of plant viruses. In plant diseases and vectors. *Academic Press Inc.*, New York.pp. 35-58

Barrett, A.J. 1977. *Proteases in mammalian cells and tissues*. North-Holland, Amsterdam

Barthomeuf, C., Pourrat, H., and Pourrat, A. 1989. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1333-1336

Behrendt, C.J., Blanchette, R.A., and Farrell, R.L. 1995. *Phytopathology* 85:92-97

Ben-Meir, D., Spungin, A., Ashkenazi, R. and Blumberg, S.. 1993. *Eur. J. Biochem.*, 212, 107-112

Behamou, N., Ouellette, G.B., Lafontaine, J.G. y Joly, J.R. 1985 *Can.J. Bot.* 63: 1177-1184

Benko, R. 1987. Antagonistic Effect Of Some Mycorrhiza Fungi As Biological Control Of Blue Stain. *The International Research Group On Wood Preservation.* Document No. IRG/WP/1314

Benny, G. L. And Kimbrough, J. W. 1980 *Mycotaxon* 12: 1-90

Benyon, R. .J. And Salvesen, G. Commercially available proteases inhibitors. In *Proteolytic Enzimes.* (Bentyon, R.J. and Bond, J.S., eds.). IRL Press, Oxford pp 241-249

Bond, J. S. 1989. *Commercilly available proteases.* In *Proteolytic Enzimes.* (Bentyon, R.J. and Bond, J.S., eds.). IRL Press, Oxford, pp 57-79

Boutelje, J. B. 1990. *Wood Sci. Technol.* 24: 191 - 200.

Breddam, K. 1986. Serine Carboxypeptidases. A Review. *Carlsberg Res.* Commun 51: 83128

Breuil, C., Wojtczak, G., Kushner, D.J. and Saddler, J.N.. 1989 *Biotechnology Techniques* 3 :247-252.

Breuil, C., Luck, B.T., Rossignol, L., Little, J., Echeverri, C.J., Banerjee, S. and Brown, D.L. 1992. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 2311-2319

Breuil, C., Rossignol, L., and Saddler, J.N. 1990. *Biotechnol. Tech.* 4:263-268

Breuil, C., Seifert, K.A., Yamada, J., Rossignol, L., and Saddler, J.N.. 1988. *Can. J. For. Res.* 18:374-377

Burnette, W N. 1981. *Anal. Biochem.* 112, 195-203

Butler, J.E.1994. *Immunochemistry of solid-phase Immunoassay.* CRC Press, Boca Raton

Byrne, T., and Smith, R.S. 1987. Protection Of Lumber In Canada: Current Practices, Future Trends. International Union Of Forest Research Organizations. Paper Prepared For The *Annual Meeting, Honey Harbour, Ontario, Canada.* Pp 1-15

C

Cambra, M. and Lopez, M.M.. 1978. Proc. 4th Int. Symp. Plant Pathol. Bacteriol. (Angers, France). Pp. 327-331

Carlile, M.J., and Watkinson, S.C. 1994. *The Fungi.* Academic Press, London

Casper, R. and Mendgen, K. 1979. *Phytopathol.* 94: 89-91

Chavira, R., Burnett, T.J., and Hageman, J.H. 1984. *Anal. Biochem.* 136:446-450

Cheung, A.L., Ying, P., and Fischetti, V.A. 1991. *Anal. Biochem.* 193 :20-23

Chrzanowska, J., Kolaczkowsku, M. and Polanowski, A. 1993. *Enzyme Microbial Technol.* 15: 140 - 143.

Clarke, H.J., MacNicoll, A.D. and Norman, J.A. 1986 *Int. Biod. Supp.* 22:123-130

Clark,J.E. and Setliff, E. C. 1985. Special publication SP 20R, Forintek Canada Corp.

Clubbe, C.P. 1980. The Colonization and Succession of Fungi in Wood. *The International Research Group On Wood Preservation*. Documnent No. IRG/WP/1107

COFI, 1994. British Columbia Forest Industry Fact Book Council Of Forest Industries, Vancouver, B.C.

Comstock, J. C.. 1992 *Plant Disease* 76, 1033-1035

Condra, J.H., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., Titus, D., Yang, T., Teppler, H., Squires, K.E., Deutsch, P.J., and Emini, E.A. 1995. *Nature* 374:569-571

Cother, E.J. and Vruggink, H. 1980. *Potato Res.* 23: 133-135

Cueva, R., Garcia-Alvarez, N. and Suarez-Rendueles, P. 1989. *FEBS Lett.*, 259, 125-129.

D

De Hoog, G.S., and Scheffer, R.J. 1984. *Ceratocystis* Versus *Ophiostoma*: A Reappraisal. *Mycologia* 76:292-299

De Martino, G. 1989. Purification of proteolytic enzymes. in: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. Beynon, R.J. and Bond, J.S., (Eds.). IRL Press, Oxford, Pp. 15-23

Degan, F.D., Ribadeau-Dumas, B. and Breddam, K. 1992. *Appl. Environ. Microbial.* 58, 2144-2152.

Delmar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W., and Geokas, M.C. 1979. *Anal. Biochem.* 99:316-320

Deshpande, M.V. 1992. *World J Microbiol. Biotechnol.* 8:242-250

Dewey, F. M., Munday, C.J.and Brasier, C.M.. 1989 *Plant Pathol.* 38:9-20

Dill, I., Salnikow, J. and Kracpelin, G. 1984. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1259-1261.

Disanto, M. E., Li, Q. and Logan, D. A. 1992. *J. Bacterial.* 174, 447-455.

Dowding, P. 1970. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:399-412

Dunn, B.M. 1989. *Deterrnination of Protease Mechanism. in: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.* Beynon, R.J. and Bond, J.S. (Eds.). IRL Press, Oxford, Pp. 57-81

E

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Hetz, H., Orth, H.D. and Lang, H. 1974. *Eur.J.Biochem.*, 47, 91-97

El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M., Leathers, T.D. and Gupta, S.C. 1993. *Mycopathologia*

Ellis,K.J. and Morrison, J.F. 1982. *Methods In Enzymology* (Purich, D.L., Ed.). Academic Press, Inc. , Vol. 87, Pp. 405-426.

Esen, A, Conroy, J.M, and Wang, S Z. (1983). *Anal. Biochem.* 132, 462-467

F

Fengel, D., and Wegener, W. 1989. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* Walter de Gruyter, Berlin

Fenn, P. and Kirk, T. K 1981. *Arch. Microbiol.* 130: 59 - 65

Ferreira, M.U., Stolf, A.M., Ferreira, C.S., Katzin, A..M., Ramos,A.M., Kimura, E., Di Santi, S.M. and Camargo, L.M.1991. Memorias Do Instituto Osvaldo Cruz ; 86(4):467-8

Fernandez Murray, J.P. 1994. Aislamiento y caracterización de una aminopeptidasa en el ascomicete Saccobolus platensis. Efecto

de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática. Tesis Doctoral. FCEN. UBA.]

Fersht, A. 1985. *Enzyme structure and mechanism.* W.H. Freeman and Company, New York

Findlay, W.P.K 1959. Sapstain of timber. *For. Abstr.* 20:1-14

Foissy, H.1978. *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 207-210

Fricker, L. D., Das, B. and Angeletti, R.H. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 2476-2482.

Fungal Antigens. 1988. Ed. By E. Drouhet, G.T. Cole, L. De Repentigny, J.P. Latge and B. Dupont. Plenum Press. New York and London :

G

Gao, Y. Chen, T., and Breuil C. 1993. *Biotech. Techniques* 7, 621-626

Gao, Y., Breuil, C. and Chen, T. 1994. *Material U. Orgarisrnen* 28: 105 - 118.

Geisow, M.J. 1991. *Trends Biotechnol.* 9:149-150

Gershoni, J.M, and Palade, G.E. 1983. *Anal. Biochem.* 131, 1-15

Gharibian, S., Hoffert, C. Abraham, L.D. and Breuil, C. 1996. *New Phytol.* 133, 673-679

Ghosh, S., Gepstein, S., Heikkila, J J. and Dumbroff, E. B. 1988 *Anal. Biochem.* 169, 227-233

Gillespie, T.J., Konings, P.N.M., Merrill, B.J. and Davis, T.P. 1992. *Life Sciences*, 51, 2097-2106

Glancy,H. , J.W. Palfreyman, Button, D., Bruce, A. and King, B. 1990. *J. Inst. Wood Sci.* 12: 59-64

Goodell, B.S. Jellison, J. and Holsi, J.P. 1988 *Forest Prod. J.* 38:59-62

Gottesman, S. And Maurizi, M.R. 1992. *Microbiol. Rev.* 56, 592-621

Gray, W. R. 1972 *Methods Enzymol.* 25, 121-138.

Green III, F., Clausen, C.A., Larsen, M.J., and Highley, T.L. 1992. Can. J. Microbiol. 38:898-904

Harlow E and Lane D, Eds. 1988 Antibodies, A Laboratory Manual, 726 pp

Harris, E.L.V. 1989. Initial Planning. In: Protein Purification Methods: A Practical Approach. Harris, E.L.V., and Angal, S. (Eds.). IRL Press, Oxford, pp. 1-66

Hartley, B.S. 1960. *Ann. Rev. Biochem.* 29:45-72

Hawkes R., Niday, E, and Gordon, J 1982. *Anal. Biochem.* 119, 142-147

Heinicke E., Kumar U. and Muñoz D.G. 1992. *J. Immuno. Methods.* 152, 227-236

Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E. 1971. *Chemical analysis of microbial cells* In: *Methods in Microbiology.* Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds.) Academic press, London vol.5B: 244-249

Hoffman, W.L. and Jump, A.A. 1986 *J. of Immuno. Methods* 94: 191-196

Hoffert, C. 1995. Immunolocalization Of A Proteinase Produced By The Sap-Staining Fungus, *Ophiostoma Piceae.* M.Sc. Thesis. University Of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada

J

Johnson, M.C., Pirone, T.P., Siegel, M.R. and Varney, D.R. 1982 *Phytopathol.* 72, 647-650

Jönson, A.G. and Martin, S.M.. 1964. *Agric. Biol. Chem.*, 28, 734-739

Jönson, A.G. and Martin, S.M. 1965 *Agric. Biol. Chem.*, 29, 787-791

I - K

Ichishima, E., Kumagai, H. and Tomoda, K. 1980 *Curr. Microbial* 3, 333-337.

Käärik, A. 1974. Sapwood Staining Fungi. *The International Research Group On Wood Preservation.* Document No. IRG/WP/125

Kazemi, M and Finkelstein, R.A 1990. *J. of Immunol. Methods* 128, 143-146

Kendall, C., Ionescu-Matiu, I. and Dreesman, G.R. 1983. *J. Immunol. Methods* 56:329-339

King, B,. Oxley, T. A. and Long, K D. 1976. *Material u. Organism* 3: 263 - 276.

Kobayashi, R. and Tashima, Y. 1989. *Anal. Biochem.* 183, 9-12

Kolehmainen, L. and Mikola, J. *Arch. Biochem. Biophys.* 1971, 145, 633-642

Kulkarni, R.K. and Nickerson, K.W. 1981 *Exp. Mycol.* 5:148-154

L

Langheinrich, U. and Tischner, R. 1991 *Plant Physiol.* 97, 1017-1025.

Leach, J.G. 1940. *Insect transmission of plant diseases.* Mc Graw-Hill, New York, pp 615

Levi, M. L. and Cowling, E. B. 1969. *Phytopathol.* 59:460 -468.

Levin, A.E and Branton, D 1986. *J Cell Biol.* 103, 518a (Abstract).

Li, K.W., Geraerts, W.P M, Van Elk, R. and Joosse J 1989. *Anal. Biochem.* 182, 44-47.

Lilly, W. W., Higgins, S. M. and Wallweber, G. J. 1990. Mycologia 82:505-508.

Lilly, W. W., Wallweber, G. J. and Higgins, S. M. 1991. *Current Microbiol.* 23:27-32.

Lopez-LLorca, L.V. 1990 *Can. J. Microbiol.* 36:530-537

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

M

Malloch, D. and Blackwell, M. 1990. *Dispersal Biology of the Ophiostomatoid Fungi. Taxonomy and Biology of Ophiostomatales.* An International Symposium, West Germany

Manonmani, H. K and Joseph, R. 1993. *Enzyme Microbial Technol.* 15: 624 - 628.

Masuda, T., Hayashi, R. and Hata, T. 1975. *Agric. Biochem. Chem.* 39:499 - 505.

Matcham, S.E.,Jordan, B.R. and Wood, D.A. 1985 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21. 108.-112

McDonald, J. K. and Barrett, A. J. 1980. *Mammalian Proteases* Vol. 2, London: Academic Press.

Merrill, W. and Cowling, E. B. 1966. *Phytopathol.* 56: 1083 - 1090.

Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F. and Gouet P. 1993. *FEMS Microbiol. Lett.*, 110, 5-9

Mitchell, L.A. 1988. *Plant Disease* 72, 664-667

Mlcales, J. A. 1992. *Mycologia* 84:815-822.

Moeremans, M., Daneels G, van Dijck, A Langanger, G. and De Mey J 1984. *J. Immunol. Methods* 74, 353-360

Morihara, K., and Tsuzuki, H. 1969. *Arch. Biochem. Biophys.* 129:620-634

Müller,A., Benoist, P., Diem, H.G. and Schwencke, J. 1991. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2787-2796.

Murray, P.F., Samela, A. and Passeron, S. *Experimental Mycology.* 1992, 16, 279-290

N - R

Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. 1972. *Agr. Biol. Chem.*, 37, 757-765.

Neurath, H. 1984 Evolution Of Proteolytic Enzymes. *Science* 224:350-357

North, M.J. 1982 Comparative biochemistry of proteinase of eucaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.* 46: 308-340

Rayner, A.D.M., and Boddy, L. 1988. Fungal Decomposition Of Wood: Its Biology And Ecology. John Wiley And Sons, Chichester, U.K.

Reich, E. , Rofkin, D.B. and Shaw, E. (Eds.) *Proteases and Biological control Aspects.* 1975. Cold Spring Harbour Laboratory, New York

Ride, J P and Drysdale, R.B. 1972. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 7-15.

Root, D D, and Reisler, E..1989. *Analyt. Biochem.* 181, 250-253

S

Saddler, J.N., Hogan, C.M. and Louis-Seize, G. 1985 *Appl. Microb. Biotech.* 22, 139-145

Salvesen, G. and Nagase, H. 1989. *Inhibition of Proteolytic Enzymes*. In: *Proteolytic Enzymes*, Benyon R. J. and Bond, J. S.Eds. pp. 83-102, Oxford: IRL Press.

Samuels, G.J. 1990 The case for distinguishing *Ceratocystis* and *Ophiostoma. Taxonomy and Biology of Ophiostomatales*. An International Symposium, West Germany

Sarath, G., De La Motte, R. S. and Wagner, F. W. 1989. Protease Assay Methods. In: *Proteolytic Enzymes*, Benyon R. J. and Bond, J. S.Eds. pp. 25- 55, Oxford: IRL Press.

Sauter, J. J. and Van Cleve, B. 1990. *Wood. Planta* 183:92-100.

Sauter, J. J., Van Cleve, B. and Wellenkamp, S. 1989. *Holzforschung* 43:1-6.

Scheffer, T.C. 1973. Microbiological Degradation. In: Wood Deterioration And Its Prevention By Preservative Treatments. Vol 1. Degradation And Protection Of Wood. Nicholas, D.D. (Ed.). Syracuse University Press, Syracuse, pp. 31-106

Segers, R., Butt, T. M., Kerry, B. R. and Peberdy, J. F. 1994 *Microbiol.* 140, 27152723.

Seifert, K.A. and Grylls, B. T. 1991. A Survey of the Sapstaining Fungi of Canada. Unpublished Report. Available From Forintek Canada Corp., Ste. Foy, Quebec

Seifert, K.A. Sapstain of Commercial Lumber by Species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. in *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. Edited By M.J.Wingfield, K.A.Seifert and J.F.Webber. Minneapolis: American Phytopathological Society. 1993, Pp. 141-152.

Seitz, L. M., Mohr, H.E. Burroughs, R. and Sauer, D.B. 1977 *Cereal Chem.* 54, 1203-1207

Seitz, L. M., Sauer, D.B., Burroughs, R. , Mohr, M.E. and Hubbard, J.D. 1979 *Phytopathol* 69, 1202-1203

Skidgel, R. A., Wickstrom, E., Kumamoto, K. and Erdos, E. G. 1981 *Anal. Biochem.* 118, 113- 119.

Smith, R.S. 1991 *Lumber protection today* In *: lumber protection in the 90's.* Proceedings of a meeting held at Forintek Canada Corp., Vancouver pp 3-13

Smith, C.E., Musich, P.R., and Johnson, D.A. 1989. *Anal. Biochem.*; 177(1): 212-219

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.. 1985 *Anal. Biochem.*, 150, 76-85

Spitz, M., Spitz, L., Thorpe, R. and Eugui, E.. 1984. *Journal of Immunological Methods* 70: 39-43

Srebotnik, E., K. Messner, R. Foisner and Petterson B.. 1988 *Current Microbiol.* 16: 221-227

St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1993 *J. Gen. Microbial.* 139, 237-243.

Stott, D.I. 1989. *Journal of Immunological Methods* 119(2):153-187

Subrarnanian, C.V. *Hyphomycetes on wood and bark. In: Hyphomycetes: Taxonomy and Biology.* 1983. Academic Press, New York. pp. 148-169

T Tan, L. and Breuil, C.1986 . A Technical Assessment of Cellulase Production and the Enzymatic Hydrolysis of Wood Residues. Available from Forintek Canada Corporation Eastern

Laboratory, 800 Montreal Road, Ottawa, Canada. Contract No. 53-66-713.

Taylor, A 1993b. *Trends Biochem. Sci.* 18:162-172.

Taylor, A.1993a . FASEB J., 7, 290-298.

Theander, O., Bjurman, J. and Boutelje, J. B. 1993. *Wood Sci. Technol.* 27:381-389.

Tieku, S. and Hopper, N.. 1992. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 1725--1730

Tisljar, U. and Wolf, D.H. *FEBS Lett.* 1993, 322, 191-196

Towbin, H.and Gordon, J.. 1984. J. *Immunol. Methods* 72, 313-340

Tsuru, D. In Metalloproteins: Chemical Properties and Biological Effects (Otsuka, S. and Yamanaka, T., Eds.). Kodansha Ltd., Tokyo, 1988, Pp. 343-355

U - V

Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, M., Hamada, M. and Takeuchi, T.. 1976. *J. Antibiotics.*, 1, 97-99

Upadhyay, H.P. 1990 *What are Ophiostomatales? Taxonomy and Biology of Ophiostomatales.* An International Symposium, West Germany

Venables,C.E. and Watkinson,S.C. 1989. *J. Gen. Microbial.*, 135, 1369-1374

Vera, J. C. and Rivas, C. 1988 . *Anal. Biochem.* 173, 399-404

Vogel, H.J. A.. 1956. *Microb. Genet. Bull.*, 13, 42-43

W - Z

Wagih, E. E. and Fletcher, J.. 1993 *Can. J. Microbiol.* Vol. 39, 1993

Wetzel, S., Dealers, C. and Greenswood, J. S. 1989. *Canad. J. Bot.* 67:3439-3445.

Winter, G. 1986. Manual Sequencing By The Dansyl-Edman Reaction. In: *Practical Protein Chemistry*, Darbe, A. Ed. pp. 367-374, Chichester: John Wiley And Sons Ltd.

Yoshimoto, T., Tamesa, Y., Gushi, K., Murayama, N. and Tsuru, D. 1988. *Agri. Biol. Chem.*, 52, 217-225

Zabel, R.A. , and Morrell, J.J. 1992. *Wood: Microbiology: decay and its prevention.* Academic Press, San Diego, pp 326-343

Zawoznik, S. 1984. *Tesis para optar el titulo de Ingeniera Agronoma.* Tratamientos antimohos en madera aserrada de Pinos. Prevención de la mancha azul y otros tipo de manchado.Universidad de Buenos Aires

Zimmerman, M. H. and Brown, C.L. (eds.) 1977 *Tress: Structure and Function.* Springer-Verlag, New York

Zink, P. and Fengel, D. 1988. *Holzforschung* 42: 217-220

Zhu, H., Gus, D. and Dancik, B.P. 1990. *Appl. Environ. Microbial.*, 56, 837-843