

MODIFICACIONES EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS ONTOGÉNICOS DEL HONGO FILAMENTOSO *Thecaphora frezii*

Díaz M.S.¹, Figueroa A.C.¹, Turco M.², Alasino V.R.¹, Beltramo D.M.¹ –
1-Unidad de Biotecnología; 2-Unidad de Separaciones analíticas CEPROCOR
soledaddiaz81@gmail.com

Introducción

El cultivo de maní es afectado por numerosas enfermedades fúngicas, entre ellas el carbón del maní causada por *Thecaphora frezii* (Basidiomycota). Debido a las pérdidas económicas que ocasiona en el cultivo, se ha avanzado en la descripción de los estadios ontogénicos del hongo; sin embargo, los aspectos bioquímicos de cada estadio, la participación en las diferentes funciones metabólicas y su relación con los factores de virulencia aún no han sido abordados en profundidad. El presente estudio se enfoca en el análisis del perfil lipídico en cada etapa del desarrollo del hongo, enfocado principalmente al análisis de la composición de fosfolípidos (PL), esteroides y ácidos grasos (AG). En este último punto, se estudiaron las diferencias en el grado de saturación de los mismos y el largo de las cadenas lipídicas.

Materiales y Métodos

Para la obtención de teliosporas, las mismas fueron tomadas directamente desde cajas de maní con signos de enfermedad, las cuales fueron adecuadamente desinfectadas. Las hifas y basidiosporas se obtuvieron a partir de cultivos *in vitro* en medio PDA. De estos tres estadios, se realizó la extracción lipídica siguiendo la técnica de Folch (1957). La determinación de PL y esteroides fue realizada por la técnica de HPLC, empleando los estándares correspondientes para su identificación. Además, para corroborar la acción de anfotericina B (AmB) sobre los esteroides de las hifas, estas fueron tratadas con concentraciones crecientes del antifúngico (100 y 500 µg/ml en DMSO) a diferentes tiempos de exposición (2, 4 y 24 hs). La acción de AmB se corroboró mediante tinción fluorescente con Ioduro de Propidio (IP), el cual tiñe células muertas de color rojo. Los AG fueron analizados mediante CG, comparando con un mix de estándares de AG.

Resultados

En relación a los PL, se determinó una marcada variación entre las estructuras analizadas. En teliosporas no se detectó ningún PL, sin embargo, se observó la presencia de tres tipos de lípidos insaponificables (lípidos neutros) de diferente composición química. En las basidiosporas se encontraron tres tipos de PL, entre ellos fosfatidiletanolamina (73%), fosfatidilcolina (26%) y fosfatidilserina (1%) aunque no se observaron lípidos insaponificables. Una composición similar se encontró en hifas con un 16% fosfatidiletanolamina y 3% fosfatidilcolina, aunque no se encontró fosfatidilserina. Se encontró un solo tipo de lípido insaponificable (81%) caracterizado como ergosterol. Este resultado se corroboró con el ensayo de actividad antifúngica de AmB, la cual ejerce su acción uniéndose al ergosterol de membrana y creando poros que causan la muerte celular. En este ensayo se observó mediante tinción con IP que a las 2 hs de exposición a AmB 100 µg/ml y 500 µg/ml, la viabilidad de las hifas disminuyó en un 60% y 90% respectivamente en relación al control (sin AmB). Luego de 4 hs de incubación no se observaron células viables en los tratamientos con AmB.

Respecto a los AG, también se encontraron diferencias en la composición de cada estructura. En las teliosporas los componentes principales fueron los AG monoinsaturados (56%) entre ellos podemos mencionar al ácido oleico *cis* y *trans* (18:1), ácido palmitoleico (16:1) y ácido gadoleico (20:1). Los ácidos grasos saturados y poliinsaturados se encontraron en cantidades iguales (22%). La relación entre AG saturados e insaturados se revierte en basidiosporas e hifas, en las cuales se observó una proporción de AG saturados de 53% y 51% respectivamente. En las basidiosporas se encontró un 17% de monoinsaturados y 30% de poliinsaturados. En las hifas esta cantidad fue de 24% de monoinsaturados y 25% de poliinsaturados. En relación a los poliinsaturados, se encontró al ácido linoleico como el principal componente, con un 22% en teliosporas, 30% en basidiosporas y 25% en hifas. Es importante destacar la presencia de ácido eicosadienoico (20:2) en hifas, el cual no fue detectado en ninguna otra estructura.

Respecto al largo de cadena, los AG de cadena larga ($\geq 18C$) prevalecieron en todas las estructuras analizadas, aunque su % fue marcadamente mayor en teliosporas (88%) respecto a basidiosporas (65%) e hifas (63%). En las primeras, el principal componente fue el ácido oleico, mientras que en basidiosporas se encontró ácido esteárico (21%), ácido oleico (14%) y ácido linoléico (29%). La composición de AG de cadena larga en hifas fue similar a la de basidiosporas con un 20% de ácido esteárico, 18% de ácido oleico y 25% de ácido linoleico.

Conclusión

Se observaron cambios en la composición lipídica de la membrana de *T. frezii* en cada estadio ontogénico. Este es el primer reporte donde se describe la variación en la composición lipídica en las diferentes estructuras, lo que representa un avance para analizar la relación entre composición y patogenicidad. Esto ayuda a interpretar los procesos de síntesis y funciones de los PL, esteroides y AG y a identificar compuestos con potencial actividad antifúngica.