

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.¹, Alasino, R.V.^{1,2}, Beltramo, D.M.^{1,2}. ¹CEPROCOR, ²CONICET. soledaddiaz81@gmail.com

Introducción

El presente estudio se enfoca en el análisis del perfil lipídico en cada etapa del desarrollo del hongo fitopatógeno *Teichophora frezii* (Basidiomycota), agente causal del carbon del maní. Se enfocó en el análisis de la composición de fosfolípidos (PL), esteroides y ácidos grasos (AG) con el fin de reconocer las vías metabólicas involucradas en la síntesis de lípidos y su relación con la viabilidad celular¹. En relación a los AG, se estudiaron las diferencias en el grado de saturación de los mismos y el largo de las cadenas lipídicas.

Materiales y métodos

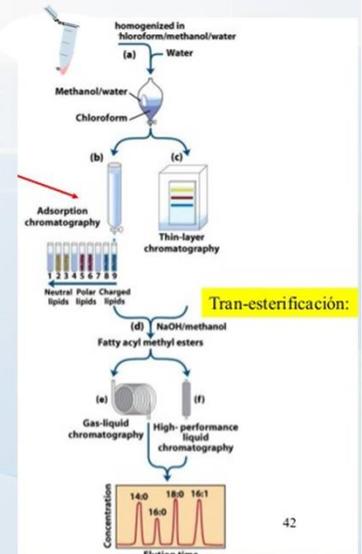
Como materiales de partida se tomaron teliosporas de cajas de maní enfermas de la campaña 2016/2017 del campo experimenta de INTA Gral. Cabrera. Las mismas se desinfectaron con NaClO 5% 10 min y se germinaron en medio PDA. El micelio obtenido fue repicado posteriormente en PDA, se cosecho suficiente cantidad de hifas para la realización de los ensayos, se lavaron y se freezaron para su posterior análisis. Para la obtención de basidiosporas, se dejaron placas con hifas en PDA hasta agotamiento del medio y formación de basidiosporas.

Análisis de lípidos

- ✓ Extracción de lípidos de hifas, basidiosporas y teliosporas por el método de Folch².
- ✓ Ácidos grasos: Análisis de largo de cadena y saturaciones por CG/FID, comparación con estándar de ácidos grasos
- ✓ Fosfolípidos y lípidos neutros: Análisis por HPLC/PDA; comparación con estándares fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (DSPG) y liso-fosfatidilcolina (LPC).
- ✓ Estimación de composición relativa en cada estadio.

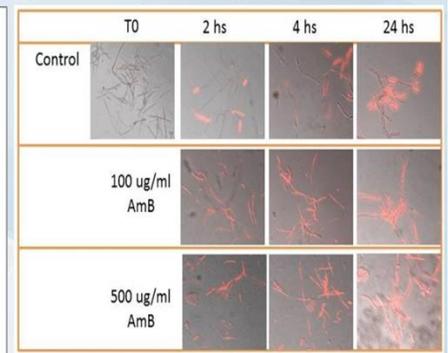
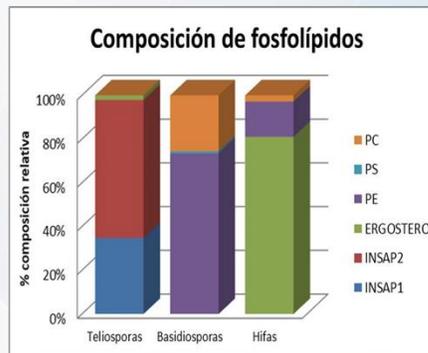
Sensibilidad a AmB

- ✓ Ensayo AmB a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (100 y 500 ug/ml en DMSO durante 2, 4 y 24 hs).
- ✓ Monitoreo de viabilidad con IP



Resultados

En teliosporas se observó la presencia de tres tipos de lípidos insaponificables (lípidos neutros) de diferente composición química. En basidiosporas se encontraron tres tipos de PL, entre ellos PE, PC y PS, aunque no se observaron lípidos insaponificables. En hifas se encontró PE y PC, aunque no se encontró PS. Se encontró un alto % de 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 ambas concentraciones de AmB, la viabilidad de las hifas disminuyó en un 60% y 90% respectivamente en relación al control. 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 palmítico (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 linoleico (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.

Conclusiones

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. Además ayuda a interpretar los procesos de síntesis y funciones de los PL, esteroides y AG y a identificar compuestos con potencial actividad antifúngica.

Bibliografía:

1. Chayakulkeeree M., Rude T.H., Toffaletti D.L., Perfect J.R. 2007. Fatty Acid Synthesis Is Essential for Survival of *Cryptococcus neoformans* and a Potential Fungicidal Target. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 51 (10): 3537–3545.
2. Folch, G., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, vol. 226 (1) pp. 497–509.

