



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**Caracterización biológica y expresión diferencial de
genes de los distintos estadios reproductivos
de *Thecaphora frezzii***

Bioq. (MSc.) María Soledad Díaz

Tesis

para optar al Grado Académico de

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2024

Caracterización biológica y expresión diferencial de genes de los distintos estadios reproductivos de *Thecaphora frezzii*

Bioq. (MSc.) María Soledad Díaz

Comisión Asesora de Tesis

Director: Dr. Dante Miguel Beltramo

Codirectora: Dra. Cinthia Conforto

Asesora: Dra. Marina Bressano

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Martin G. Theumer

Dr. Francisco De Blas

Dra. Marina Bressano

Presentación formal académica

Abril, 2024

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional

Agradecimientos

En primer lugar, debo agradecer a Dios, fuente de toda inspiración y sabiduría, que obra a través de su inmensidad y nos otorga la fuerza e iluminación para alcanzar nuestras metas.

Quiero agradecer a mi familia, a la que formé con Andrés, mi gran compañero en este viaje, que me regaló mis dos tesoros más amados, Ignacio y Renata, los farolitos de mis ojos. Y a mi familia de origen, mi papá, ejemplo de amor, paciencia y aceptación; a mis hermanos, que acompañan mi camino mientras construyen el suyo; y a mi mamá, que aun en sus momentos más difíciles, me sigue enseñando que de todo se sale y que vale la pena seguir intentando, porque la vida es hermosa. Y a mis papás suplentes, Cristina y Sergio, que me han bancado en tantas, cuidando con todo el amor a sus nietos, apostando a mi desarrollo personal.

A mis amigas, Nadia, Thamy y Sil, las hermanas que me regaló la vida, a Caro, Ceci y Caro B. Con su apoyo e incondicionalidad, este sueño hoy se concreta.

Quiero agradecer al Dr. Beltramo, mi director de tesis, que eligió apostar y animarme para realizar esta carrera. Me llevo de él las mayores enseñanzas, gracias a su confianza y libertad para realizar mi trabajo.

A la Dra. Cinthia Conforto, mi co-directora, que ha realizado aportes muy valiosos para la realización de este trabajo. Y a la Dra. Marina Bressano, integrante de la comisión asesora, por sus contribuciones y por el tiempo dedicado a acompañar este proceso.

A la Dra. Alasino, y a todos los integrantes de la Unidad de Biotecnología de Ceproc, por su experiencia y conocimiento que me compartieron desinteresadamente.

A mi amiga Anita Figueroa, compañera de oficina, de laboratorio y de carrera. Porque hemos compartido mucho más que recetas químicas en nuestras largas jornadas de trabajo.

A Silvia, Gabriela y Karina por su gran trabajo para la identificación de pigmentos.

Al Dr. Soria, por su enorme aporte en el análisis e interpretación de los datos moleculares, y al Mauricio Turco por su contribución desde la química analítica.

Al Ceproc, lugar que me albergó por tantos años y apostó por mi formación, sabiendo que el conocimiento es la puerta para mejorar todos los días.

A Andrés, Nacho y Reni...

RESUMEN

El cultivo del maní (*Arachis hypogaea* L.) en Argentina se enfrenta a numerosas enfermedades fúngicas, siendo el Carbón del maní, causado por el hongo *Thecaphora frezzii*, una de las más devastadoras. A pesar de la importancia económica del cultivo en la provincia de Córdoba, las estrategias de control existentes han demostrado ser ineficaces contra esta enfermedad. Son escasas las investigaciones previas sobre *T. frezzii*, por lo que en esta tesis se propone abordar su estudio desde múltiples perspectivas. Se realizaron ensayos para obtener todas las estructuras de *T. frezzii* in vitro, incluyendo basidiosporas e hifas, a partir de la germinación de teliosporas. Se llevó a cabo una descripción morfológica detallada de las teliosporas, revelando la presencia novedosa de melanina en sus paredes. Además, se establecieron técnicas para evaluar la viabilidad de las teliosporas y se exploró la autofluorescencia como indicador de esta viabilidad. Desde el punto de vista molecular, se investigaron las modificaciones en la expresión génica y la traducción de transcritos a proteínas enzimáticas en diferentes estadios del hongo. Se identificaron proteínas relacionadas con las modificaciones estructurales durante el ciclo de vida del hongo, así como factores de virulencia asociados a la patogenicidad. Se analizaron también las modificaciones bioquímicas presentes en cada etapa de desarrollo, incluyendo los componentes lipídicos y las enzimas involucradas en su síntesis. Se encontraron derivados del ergosterol como principales constituyentes de la membrana. Además, se destacaron los cambios a nivel proteico, con la identificación de bandas proteicas expresadas diferencialmente entre los estadios de desarrollo, y se profundizó en el estudio de la red microtubular, centrándose en los cambios postraduccionales de las tubulinas. Este trabajo proporciona información valiosa para el desarrollo de estrategias de control más efectivas contra *T. frezzii*, una enfermedad que sigue representando un desafío para la agricultura local.

Palabras claves: Carbón del maní, secuenciación de ARNm, composición lipídica, perfil proteico, citoesqueleto.

ABSTRACT

The cultivation of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) in Argentina is challenged by numerous fungal diseases, among which peanut smut, caused by the fungus *Thecaphora frezzii*, stands out as one of the most devastating. Despite the economic significance of peanut farming in the province of Córdoba, existing control methods have proven ineffective against this particular disease. Given the limited prior research on *T. frezzii*, this thesis adopts a multi-faceted approach to its study. Various experiments were conducted to obtain all structures of *T. frezzii* in vitro, including basidiospores and hyphae, through the germination of teliospores. A detailed morphological examination of the teliospores was undertaken, revealing the novel presence of melanin in their walls. Furthermore, techniques were developed to assess the viability of teliospores, with autofluorescence explored as an indicator of viability. From a molecular standpoint, investigations focused on changes in gene expression and the translation of transcripts into enzymatic proteins across different stages of the fungus's life cycle. Proteins related to structural modifications during the life cycle of the fungus were identified, alongside virulence factors associated with its pathogenicity. Biochemical modifications occurring at each developmental stage were also analyzed, including lipid components and the enzymes involved in their synthesis. Ergosterol derivatives were identified as the primary constituents of the membrane. Additionally, attention was given to changes at the protein level, with differential expression of protein bands observed between developmental stages. The study of the microtubular network was also intensified, particularly in relation to post-translational changes of tubulins. This comprehensive work offers valuable insights for the development of more effective control strategies against *T. frezzii*, addressing a significant challenge faced by the local agricultural sector.

Key words: Peanut smut, mRNA sequence, lipid compounds, protein profile, cytoskeleton.

Tabla de Contenidos

CAPÍTULO I.....	18
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
BIBLIOGRAFÍA	31
CAPÍTULO II	36
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GERMINACIÓN DE ESPORAS	36
INTRODUCCIÓN	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
<i>Aislamiento y cultivo de Thecaphora frezzii.....</i>	43
<i>Conservación de Thecaphora frezzii a largo plazo</i>	44
<i>Evaluación de viabilidad de teliosporas de Thecaphora frezzii.....</i>	44
<i>Análisis estructural de teliosporas</i>	45
<i>Análisis de autofluorescencia</i>	46
<i>Análisis de integridad del ADN.....</i>	47
<i>Tinción con calcofluor White y tratamiento con quitinasas.....</i>	48
<i>Análisis de pigmentos</i>	48
<i>Análisis Estadístico</i>	50
RESULTADOS	51
<i>Correlación entre autofluorescencia y viabilidad</i>	56
<i>¿Cuáles son los componentes celulares que causan autofluorescencia?</i>	58
<i>Caracterización de pigmentos</i>	61
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
CAPÍTULO III	77
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS TRES ESTADIOS DE <i>T. FREZZII</i>	77

INTRODUCCIÓN	77
<i>Análisis de transcriptos relacionados a modificaciones estructurales</i>	78
<i>Patogenicidad y expresión génica</i>	81
MATERIALES Y MÉTODOS	84
<i>Aislamiento y cultivo de Thecaphora frezzii</i>	84
<i>Tinción de núcleos de hifas de Thecaphora frezzii</i>	84
<i>Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc</i>	85
<i>Análisis del RNASeq y procesamiento de datos</i>	85
<i>Genes de T. frezzii expresados diferencialmente en el pasaje de teliospora a hifa</i>	86
<i>Expresión génica de T. frezzii asociada a enzimas de las vías metabólicas de melanina</i>	86
<i>Expresión génica de T. frezzii asociada a enzimas de las vías metabólicas de quitina</i>	87
<i>Expresión génica de T. frezzii asociada a enzimas degradadoras de la pared vegetal</i>	89
<i>Identificación de proteínas secretadas por T. frezzii asociadas a potenciales efectores</i> <i>o factores de virulencia</i>	89
<i>Cuantificación de los transcriptos de los genes de interés en cada estadio de T. frezzii</i>	91
<i>Análisis Estadístico</i>	94
RESULTADOS	95
<i>Análisis de transcriptos relacionados a modificaciones estructurales de T. frezzii</i>	96
<i>Análisis de transcriptos de T. frezzii relacionados a patogenicidad y factores de</i> <i>virulencia</i>	109
DISCUSIÓN	118
<i>Análisis de transcriptos relacionados a modificaciones estructurales de T. frezzii</i> ...	118
<i>Análisis de transcriptos relacionados a efectores y factores de virulencia de T. frezzii</i>	125
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFIA	129
CAPÍTULO IV	143
ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE <i>T. FREZZII</i>	143
INTRODUCCIÓN	143
MATERIALES Y MÉTODOS	145
<i>Análisis cromatográficos de los lípidos polares y neutros</i>	146
<i>Ensayo del efecto de AmB sobre hifas de T. frezzii</i>	147

<i>Análisis de ARN</i>	148
<i>Análisis estadístico</i>	149
RESULTADOS	150
<i>Composición de ácidos grasos de lípidos totales en estructuras de T. frezzii</i>	150
<i>Análisis de FAME en lípidos polares y neutros</i>	151
<i>Perfil lipídico en fracción polar analizado por HPLC/CAD</i>	152
<i>Perfil de lípidos insaponificables analizados por CG-FID</i>	153
<i>Identificación de ARNm que codifican para enzimas de las vías metabólicas de lípidos</i>	154
<i>Cuantificación de la expresión de ARNm para enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos</i>	157
DISCUSIÓN	158
<i>Modificación en el perfil de fosfolípidos</i>	160
<i>Análisis de lípidos insaponificables</i>	160
<i>Identificación de transcriptos relacionados a las vías sintéticas lipídicas</i>	161
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFIA	164
CAPÍTULO V	168
ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE T. FREZZII	168
INTRODUCCIÓN	168
MATERIALES Y MÉTODOS	172
<i>Materiales</i>	172
<i>Cultivo de T. frezzii y obtención de proteínas</i>	172
<i>Separación de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	173
<i>Análisis MS/MS</i>	174
<i>Generación de anticuerpos y Western Blot</i>	176
<i>Análisis de modificaciones postraduccionales de tubulinas</i>	177
<i>Inmunodetección de microtúbulos con inmunofluorescencia indirecta</i>	178
<i>Expresión génica asociada a modificaciones proteicas</i>	179
<i>Análisis qPCR de tubulinas de T. frezzii y enzimas modificadoras de tubulina</i>	180
RESULTADOS	182
<i>Análisis de bandas por Western Blot</i>	188
<i>Identificación de isotipos de tubulina</i>	188

<i>Análisis de homología, identidad y niveles de expresión de tubulinas y enzimas modificadoras</i>	192
DISCUSIÓN	195
<i>Diferencias en los perfiles proteicos de las diferentes estructuras</i>	195
<i>Modificaciones postralacionales de tubulina</i>	197
<i>Análisis de proteínas deducidas del RNASeq</i>	202
CONCLUSIONES	204
BIBLIOGRAFÍA	206
CAPÍTULO VI.....	210
CONSIDERACIONES GENERALES	210
Consideraciones finales.....	216
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA REALIZACION DE LA TESIS.....	217
FINANCIAMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS.....	219
ANEXO I	220

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Picos principales del espectro FTIR de melanina DOPA sintética, melanina de teliosporas de <i>T. frezzii</i> y melanina extraída de <i>Boletus griseus</i>	63
Tabla 3.1. Oligonucleótidos empleados en PCR en tiempo real.....	93
Tabla 3.2. Genes involucrados en Metabolismo celular de <i>T. frezzii</i>	99
Tabla 3.3. Genes involucrados en el transporte y comunicación celular de <i>T. frezzii</i>	100
Tabla 3.4. Genes involucrados en las categorías CCDP1, CF2, CRDV3, DIC4, EN5, INNA6, PBF7, SDBCC8 y TPF9 de <i>T. frezzii</i>	102
Tabla 3.5. Genes involucrados en las categorías CCDP1, CF2, CRDV3, DIC4, EN5, INNA6, PBF7, SDBCC8, TPF9, ME10, TCC11.....	103
Tabla 3.6. Análisis de secuencias de proteínas deducidas con actividad enzimática relacionadas a la síntesis de melanina en <i>T. frezzii</i>	105
Tabla 3.7. Análisis de secuencias de proteínas deducidas con actividad enzimática quitin-sintasas (CHS) y quitinasa de <i>T. frezzii</i>	106
Tabla 3.8. Actividad quitinasa de extractos proteicos de hifas, basidiosporas, teliosporas y medio de cultivo de hifas de <i>T. frezzii</i>	109
Tabla 3.9: Nivel de expresión de genes relacionados a enzimas que degradan la pared celular vegetal (PCWDE) en basidiosporas, hifas y teliosporas de <i>T. frezzii</i>	110
Tabla 3.10: Porcentaje de identidad y homología a nivel proteico de las distintas Pep1 de hongos fitopatogénicos (excepto <i>A. flocculosa</i>) respecto a <i>Thecaphora frezzii</i>	115
Tabla 4.1. Oligonucleótidos empleados para PCR en tiempo real.....	150
Tabla 4.2. Perfil de fosfolípidos (fracción polar) de teliosporas, basidiosporas e hifas de <i>T. frezzii</i>	153

Tabla 4.3. Comparación de homología de enzimas involucradas en la biosíntesis lipídica en diferentes microorganismos (<i>A. flocculosa</i> PF-1 y <i>U. maydis</i> 521).....	156
Tabla 5.1. Preparación de geles para SDS-PAGE.....	175
Tabla 5.2. Oligonucleótidos para PCR en tiempo real.	182
Tabla 5.3. Curva de calibración con BSA y concentración proteica de cada extracto.....	183
Tabla 5.4. Identificación de bandas 4 y 5 por tecnología Orbitrap	187
Tabla 5.5. Análisis de secuencias de tubulinas y enzimas involucradas en las modificaciones postraduccionales: longitud de AA, porcentaje de homología e identidad comparados con <i>U. maydis</i> , <i>A. flocculosa</i> y <i>T. thlaspeos</i>	194

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S.3.1. Identificación de genes relacionados a los diferentes procesos metabólicos (depositados en banco de datos de GenBank).....	139
Tabla S.3.2. Análisis de PCWDE en <i>T. frezzii</i> (longitud de AA y comparación de identidad entre <i>U. maydis</i> , <i>T. thlaspeos</i> , <i>A. flocculosa</i> y <i>U. hordei</i>)......	143
Tabla S.4.1. Composición porcentual de FAs en las fracciones de lípidos polares (PL) y neutros (NL) en los tres estadios ontogénicos de <i>T. frezzii</i>	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Superficie sembrada por provincia y porcentaje sobre superficie total declarada.....	19
Figura 1.2. Daño provocado por teliosporas de <i>T. frezii</i>	21
Figura 1.3. Descripción del ciclo del carbón del maní.....	22
Figura 2.1. Vías biosintéticas de allomelaninas, feomelaninas y eumelaninas.....	40
Figura 2.2. Estudio de germinación de teliosporas en placas de PDA suplementadas con hormonas vegetales y promotores de la germinación.	51
Figura 2.3. Micromorfología de <i>T. frezii</i> en cultivo en PDA	52
Figura 2.4. Micrografías de teliosporas por SEM.....	54
Figura 2.5. Cortes ultrafinos de esporas sin tratamiento, observadas por TEM	55
Figura 2.6. Ultraestructura de teliosporas.....	56
Figura 2.7. Tratamientos térmicos de esporas en estufa durante 1h a 25-50-100-150-200°C.....	57
Figura 2.8: Intensidad de fluorescencia en teliosporas tratadas durante 0.5, 2 y 4 h con hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno vs. control	59
Figura 2.9. Tratamiento de quitina comercial con agentes químicos	60
Figura 2.10. Teliosporas teñidas con Calcofluor White.....	61
Figura 2.11. Tinción con Calcofluor White de endosporas.....	62
Figura 2.12. Espectro de absorción UV-VIS de melanina DOPA comercial (A) y melanina de teliosporas de <i>T. frezzii</i> (B).....	63

Figura 2.13. Espectro FTIR de melanina DOPA sintética (A) y melanina de teliosporas de <i>T. frezzii</i> (B).....	64
Figura 2.14. Espectro MS – Melanina de <i>T. frezzii</i> muestra en NaOH 0.1M inyección 10uL.	65
Figura 3.1. Germinación de teliosporas en placas de PDA.....	95
Figura 3.2. Categorización funcional de genes expresados diferencialmente entre ambos estadios (% relativos) en cultivos de <i>T. frezzii</i>	97
Figura 3.3. Niveles de expresión de CHSs (A) y CHTs (B) de <i>T. frezzii</i> en cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas)	108
Figura 3.4. Niveles de expresión de genes que codifican para PCWDE, cuantificados por RT-PCR.....	111
Figura 3.5. Alineamientos de secuencias de Pep1 con organismos ortólogos y secuencia completa deducida.....	116
Figura 3.6. Árbol filogenético de Pep1 construido en base a <i>T. frezzii</i> , <i>U. maydis</i> 521, <i>U. hordei</i> , <i>K. brasiliensis</i> , <i>T. thlaspeos</i> y <i>A. flocculosa</i> PFI.....	117
Figura 3.7. Niveles de expresión del ARNm de pep1 en los tres estadios de <i>T. frezzii</i>	118
Figura 4.1. Procesamiento de muestras para separación de lípidos polares, neutros e insaponificables y análisis por técnicas de cromatografía gaseosa (CG) y líquida de alta performance (HPLC) con detector CAD	147
Figura 4.2. Grados de saturación de FAs (A) y largo de cadena (B) en teliosporas, basidiosporas e hifas de <i>T. frezzii</i> analizados por CG.	152
Figura 4.3. Efecto de la concentración y tiempo de tratamiento con AmB en la viabilidad de hifas de <i>T. frezzii</i> (200X).....	155
Figura 4.4. Expresión diferencial de ARNm de Delta 12 desaturasa de ácidos grasos (“Delta (12) fatty acid desaturase” (EC 1.14.19.6)), HMG-Co A reductasa (“HMG-Co A reductase” (EC 1.1.1.34)), PS sintasa (“PS synthase” (EC 2.7.8.8)), PI sintasa (“PI synthase” (EC 2.7.8.11)), PS decarboxilasa (“PS decarboxylase” (EC 4.1.1.65)) y PGP fosfatasa (“PGP phosphatase” (EC 3.1.3.27)) en estructuras de <i>T. frezzii</i>	159

Figura 5.1. Geles de poliacrilamida al 12.5%.....	184
Figura 5.2. Geles de poliacrilamida al 12.5% (izq.) y 17% (der.).....	186
Figura 5.3. Informe de identificación de proteínas de LANAIS-PROEM	187
Figura 5.4. Verificación de ausencia de Acs contra las dos bandas de proteínas de teliosporas en conejos, previo a su inmunización.....	188
Figura 5.5. Análisis de proteínas por Western Blot.	189
Figura 5.6. Comparación entre la secuencia que reconoce el anticuerpo anti- α -tubulina clon DM1A con la secuencia de α -tubulina de <i>T. frezzii</i>	190
Figura 5.7. Reactividad de los Acs de los diferentes isotipos de α -tubulina contra los tres estadios ontogénicos de <i>T. frezzii</i>	191
Figura 5.8. Secuencia de aminoácidos 1 a 55 de α -tubulina en cerebro y <i>T. frezzii</i>	192
Figura 5.9. Immunodetección de α -tubulinas de <i>T. frezzii</i>	192
Figura 5.10. Niveles de expresión relativos de ARNm de tubulinas de <i>T. frezzii</i> de acuerdo a cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas) medido por RT-PCR.....	193
Figura 5.11. Niveles de expresión relativos de ARNm de enzimas modificadoras de tubulinas TTL, CCP1 y HDAC6 de <i>T. frezzii</i> de acuerdo a cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas) medido por RT-PCR.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

%: por ciento	X: aumento microscópico
°C: grados centígrados	sp: especie
± : más/menos	spp: especies
µg: microgramos	v/v: porcentaje volumen/volumen
µl: microlitros	p/v: porcentaje peso/volumen
µm: micrómetros	NaClO: Hipoclorito de Sodio
cm: centímetros	mM: milimolar
cm³: centímetros cúbicos	µM: micromolar
gr: gramo	PDA: Potato Dextrosa Agar
mg: miligramos	SDS: Dodecil sulfato de sodio
D.E.: desviación estándar	di: diámetro interno
TOF: Time of flight	DHN: Dihidroxinaftaleno
vs.: versus	DOPA: 3,4-Dihidroxifenilalanina
KDa: kilodalton	UV-VIS: ultravioleta – visible
nm: nanómetro	TEM: Transmission Electron Microscopy
CO₂: Dióxido de Carbono	SEM: Scanning Electron Microscopy
cel: célula	Na₂CO₃: bicarbonato de sodio
M: molar	BSA: Albumina serica bovina
h: hora	rpm: revoluciones por minuto
kV: kilovoltio	MALDI: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
min: minute	CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
seg: Segundo	DAPI: Diamidino-2-fenilindol
HCl: Acido Clorhídrico	NaOH: Hidróxido de Sodio
pb: pares de bases	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
A: Amstrong	qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

H₂: Gas Helio

GC: Gas-chromatography

DMSO: Dimetilsulfóxido

V: Voltios

IgG: Inmunoglobulina G

LMW: marcador de peso molecular “low”

AA: aminoácido

IEF-SDS-PAGE: Isoelectroenfoque– (SDS – poliacrilamida)/ electroforesis

UHPLC-MSMS: Ultra high-performance liquid chromatography – mass/mass

NCBI-NIH: National Center for Biotechnology Information – National Institute of Health

CEQUIBIEM: Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa

LAMARX: Laboratorio de Microscopía Electrónica y Rayos X

FAMAF: Facultad de Matemática, Astronomía y Física

AOAC: Association of Analytical Communities

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del maní (*Arachis hypogaea*) es uno de los cultivos más populares y ampliamente cultivados en todo el mundo. Sus granos son altamente valorados por su sabor, textura y valor nutricional. Además de ser una fuente de alimento y aceite, el maní también tiene aplicaciones industriales y es un cultivo importante para la economía de muchas regiones. Desde una perspectiva nutricional, el maní es declarado como una excelente base de nutrientes esenciales, destacándose por su contenido de proteínas de alta calidad, grasas saludables, fibra, así como vitaminas y minerales fundamentales para el bienestar humano. Su perfil proteico no solo provee una gama completa de aminoácidos esenciales, sino que también ofrece una abundancia de antioxidantes como la vitamina E, el resveratrol y el ácido fólico, los cuales confieren beneficios significativos para la salud.

El maní es un cultivo de importancia económica relevante en muchos países y existe una alta demanda a nivel mundial de este grano y sus productos derivados, como la mantequilla, el aceite de maní y los productos de confitería. Además, la industria genera empleo en las áreas de producción, procesamiento y comercialización, lo que contribuye al desarrollo económico local y regional. El maní es objeto de un comercio internacional significativo. Los países productores, como Estados Unidos, China, India, Nigeria y Argentina, exportan grandes cantidades de maní y productos derivados. Este comercio internacional impulsa la economía global y fomenta la colaboración entre países productores y consumidores. Además, la industria del maní genera oportunidades para la innovación y el desarrollo de nuevos productos, promoviendo la diversificación y el crecimiento económico.

En nuestro país, las primeras referencias del cultivo del maní se remontan a la época colonial, aunque las áreas de siembra eran pequeñas y se daba principalmente en provincias del norte (Fernández y Giayetto, 2006). En Córdoba, los primeros registros de siembra de maní corresponden al siglo XIX. Ya en el siglo XX se produce una gran expansión del cultivo, principalmente a la zona sur-este de la provincia y se pasa de cultivar alrededor de 2.000 has a principios del siglo XX, hasta aproximadamente 300.000 has en la actualidad

(INASE-SISA, 2023). Se declara que las principales variedades de maní sembradas actualmente son Granoleico, MA-757 de Maniagro, con elevado potencial de rendimiento, ASEM 400 INTA Manfredi - Córdoba, con mayor rendimiento, mayor granometría y mejor precocidad que el granoleico, y EC - 214 (AO) de Criadero el Carmen, que es alto oleico, con ciclo muy corto y granos tipo Runner (INASE-SISA, 2023).

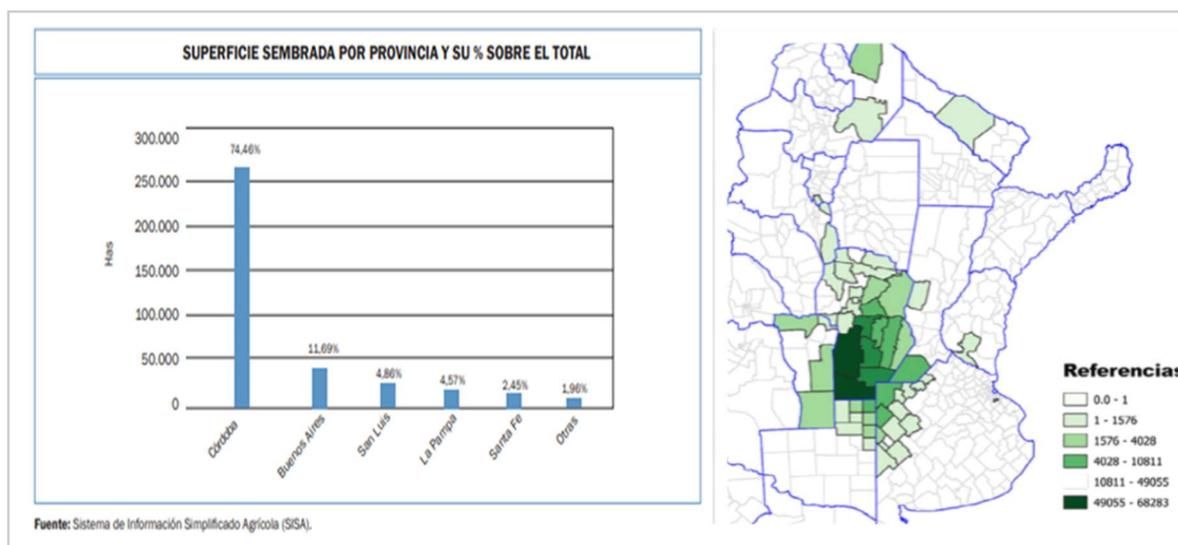


Figura 1.1: Superficie sembrada por provincia y porcentaje sobre superficie total declarada.

En relación al mercado y exportaciones de maní, los principales productores mundiales en volumen son China (40%), India (16%) Nigeria (7%) Estados Unidos (6%) Sudán (3%), Myanmar (3%) y Argentina (3%) (INASE-SISA, 2023); los principales exportadores mundiales en valor se dividen en: Maní crudo con piel y otros maníes crudos: India (31%), Estados Unidos (27%), Argentina (15%), China (6%), Brasil (5%) Myanmar (4%) y Senegal (4%). Preparaciones de maní: Argentina (38%), China (28%), Estados Unidos (11%) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). Entre los países a los que llega el maní y sus derivados producidos en Argentina, se encuentran Países Bajos, Reino Unido, Rusia y Alemania.

Enfermedades del cultivo – Carbón del maní

Los patógenos fúngicos representan un desafío significativo en la producción agrícola, afectándola de manera directa, a través de la disminución en los rindes, o indirectamente, por los costos de producción derivados del uso de agroquímicos fungicidas (Frantzeskakis *et al.*, 2017).

El cultivo de maní, al igual que otros cultivos de producción extensiva, se ve afectado por numerosos problemas sanitarios. En el caso del área manisera argentina, se han registrado pérdidas significativas debido a patógenos presentes en el suelo (March *et al.*, 2005; Oddino, 2011). Históricamente, las enfermedades fúngicas de suelo que han tenido mayor impacto en nuestra región son el tizón del maní (causado por *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*), el marchitamiento (cuyo agente causal es *Sclerotium rolfsii*), la podredumbre parda de la raíz (asociada a *Fusarium solani*) y el carbón del maní (causado por *Thecaphora frezzii*) (Paredes *et al.*, 2022). *T. frezzii* pertenece a la división Basidiomycota, clase Ustilaginomycetes, subclase Ustilaginomycetidae y se ubica sistemáticamente en el Orden Ustilaginales (Astiz Gassó y Marinelli, 2013). En nuestro país, ha incrementado su prevalencia e intensidad de manera sostenida durante la última década. Los primeros registros de la enfermedad en Argentina son de 1994/1995, en regiones del centro-norte de la provincia de Córdoba (Marinelli *et al.*, 1995) y se torna comercialmente relevante en la campaña 2001/2002, por su importante crecimiento exponencial (Arias *et al.*, 2021). Cazón *et al.* (2018) describen un pico de prevalencia que alcanza el 100% durante la campaña 2015/2016.

T. frezzii es un organismo biotrófico que infecta y coloniza el ginóforo, el cual, tras ser fecundado, inicia su elongación hacia el suelo, siendo comúnmente denominado "clavo". La infección ocurre cuando el clavo penetra en el suelo y estimula la germinación de las teliosporas de *T. frezzii* que se encuentran presentes en él, dando inicio al proceso de infección (Astiz Gassó y Wojszko, 2016; Marinelli *et al.*, 2006.). Esta infección generalmente causa alteraciones en el crecimiento de la vaina (hipertrofia) y resulta en la colonización y transformación parcial o total de la semilla en desarrollo en una masa carbonosa de esporas (Marinelli *et al.*, 2006; Acuña *et al.*, 2012). Al generar como síntoma una transformación de los granos dentro de las vainas, el carbón afecta directamente al

órgano de cosecha y, por lo tanto, el rendimiento del cultivo. De esta manera se observa una estrecha relación entre la incidencia de la enfermedad y las pérdidas ocasionadas.

Los síntomas causados, aunque pueden diferir entre especies, tienen en común el depósito de una masa de teliosporas. En algunos hospederos, los síntomas se restringen a los órganos florales (*Thecaphora capensis*, Roets *et al.*, 2008), en otros puede causar la ruptura de las hojas (*T. schwarzmaniana*, Vasighzadeh *et al.*, 2014) y en otros puede afectar a los frutos, tanto aquellos que se desarrollan en la parte aérea (*Ustilago maydis*, Kahmann *et al.*, 2000) o bajo la tierra (*T. solani*, Andrade *et al.*, 2004; *T. frezzii*, Conforto *et al.*, 2013).

Descripción del ciclo del Carbón del maní

Zuo *et al.* (2019) en su compendio sobre carbonos, describe a las teliosporas como estructuras de resistencia que le permiten al hongo permanecer en el suelo por años. Cuando encuentran condiciones adecuadas, germinan formando un promicelio haploide que no es patógeno, hasta que encuentra otra célula haploide compatible. Como se ha descrito para *U. maydis* y *T. thlaspeos*, solo una vez conformado el micelio dicariótico, se establece el estadio infeccioso (Banuett, 2010; Brefort *et al.*, 2009; Frantzeskakis *et al.*, 2017).

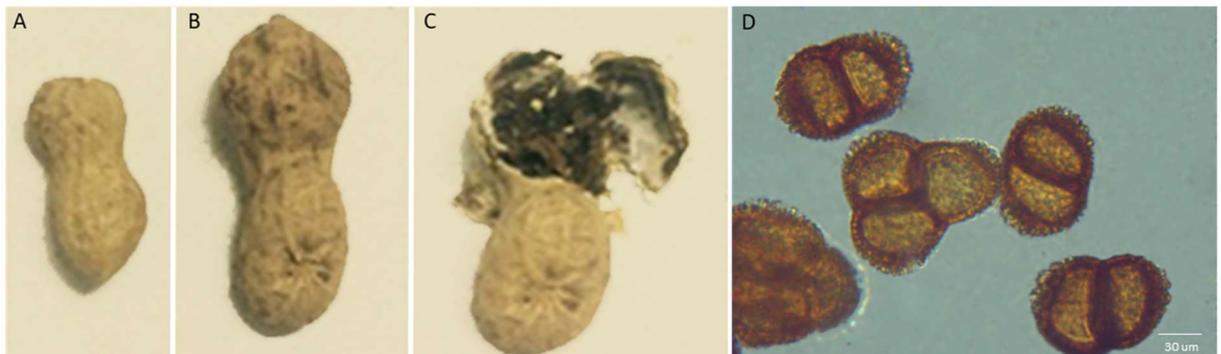
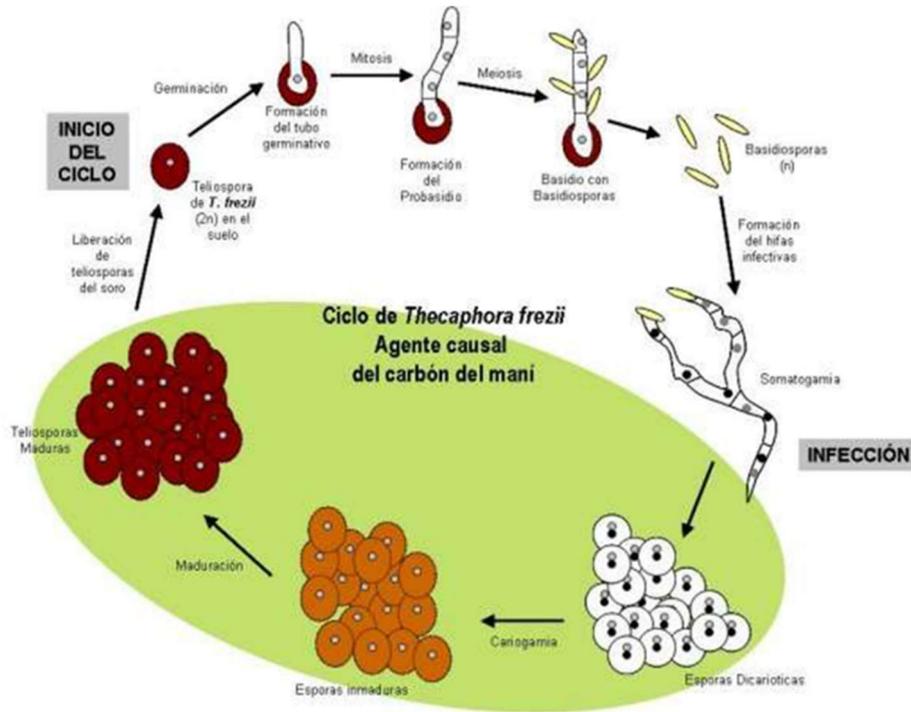


Figura 1.2: Daño provocado por teliosporas de *T. frezzii*: A- caja de maní madura, tamaño promedio; B- caja de maní hipertrófica demostrando signos de la enfermedad del carbón; C- Caja de maní infectada de carbón, donde los soros carbonosos destruyen los granos del interior. D- Teliosporas de *T. frezzii* en microscopia de campo claro (1000X).

El trabajo de Cazón (2015) detalla que, una vez que las teliosporas de *T. frezzii* quedan liberadas en el suelo, su germinación se desencadena mediante la presencia del clavo. Cuando este penetra en el suelo donde residen las teliosporas, se produce una infección y

colonización localizada en el tejido vegetal. El proceso de germinación comprende la formación de un probasidio y basidiosporas haploides. Estas basidiosporas haploides, al encontrarse con basidiosporas que poseen un "mating type" opuesto, se conjugan, dando origen a un micelio dicariótico e infeccioso que penetra en el clavo. Con el desarrollo del fruto, se origina la masa carbonosa de teliosporas (Figura 1.3).



Luis Ignacio Cazón. INTA – IPAVE. 2015

Figura 1.3: Descripción del ciclo del carbón del maní.

Manejo actual de la enfermedad

Se han recomendado varias tácticas para el manejo del carbón del maní, como la rotación de cultivos, el uso de fungicidas en el suelo y la selección de campos con baja densidad de teliosporas de *T. frezzii* (Cazón, 2015). Lo que se recomienda es que estas estrategias no se empleen aisladas, sino como parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad, sobre todo al trabajar con cultivares más susceptibles, como lo son las variedades sembradas en nuestra provincia (Arias *et al.*, 2021). Una de las alternativas más

novedosas se basa en desarrollar variedades resistentes mediante la transferencia de genes de especies silvestres y variedades locales. Actualmente se continúa trabajando en esta alternativa y se han encontrado resultados promisorios en relación al factor de resistencia heredada, aunque se espera mejorar las características agronómicas (Bressano *et al.*, 2019). Otra práctica que podría ser usada es la realización de una labranza profunda (Cazón, 2015). Según lo estudiado por Spinazzé y Marraro Acuña (2010), la aplicación de prácticas que entierren las teliosporas a más de 15 cm de profundidad, disminuye las probabilidades de ocurrencia de la enfermedad, ya que el fruto se desarrolla entre los 5 y 7 cm en el suelo. Otra alternativa es el uso de fungicidas comerciales, entre ellos, carboxamidas, estrobilurinas y triazoles, aunque algunos autores señalan que su eficacia es limitada, alcanzándose un tope de 50-60% de control (Conforto *et al.*, 2013; Astiz Gassó y Wojszko, 2016; Paredes *et al.*, 2022) además de ponderar el riesgo de desarrollar una resistencia por parte del patógeno a los agroquímicos.

Dada la limitada eficacia de las actuales alternativas de manejo de la enfermedad, se considera imperativo continuar investigando las estrategias de infección del hongo y su ciclo de vida. Esto facilitará la comprensión del patosistema, para el cual la información disponible es escasa.

Estudio de T. frezzii in vitro

Una de las técnicas utilizadas para evaluar el comportamiento de los hongos es el cultivo *in vitro*, que ofrece la ventaja de permitir su estudio sin depender de la presencia de la planta hospedera. Este enfoque acelera el proceso de análisis al eliminar la necesidad de esperar a que el hongo infecte y colonice a la planta y permite obtener resultados más rápidamente. Sin embargo, como se ha descrito para *U. maydis* (Kahmann *et al.*, 2000), la germinación de las esporas genera una estructura haploide, los esporidios, que pueden ser propagados en condiciones artificiales en medios de cultivo. Si bien en estos casos la enfermedad no puede ser reproducida exactamente como ocurre en presencia de la planta, permite examinar las características y comportamiento fúngico de manera independiente, lo que facilita su estudio y comprensión en un tiempo más acotado. Astiz Gassó y Marinelli (2013) describen que, en estudios realizados sobre esporas de carbón del maní de la campaña 2010/2011, se logró inducir su germinación y obtener cultivos axénicos *in vitro*; para ello se

utilizaron diversos medios de cultivo elaborados con extractos de órganos de la planta de maní. Sin embargo, este protocolo de germinación no fue publicado. Numerosos grupos de investigación continuaron estudiando la manera de lograr una germinación completa, mediante suplementos a los medios de cultivo o variaciones en las condiciones de incubación, sin lograr establecer un protocolo público que demuestre las condiciones adecuadas para que germinen todas las esporas. Entre las variables ensayadas para la germinación de esporas de otros hongos, se encuentran aquellas tendientes a romper su dormición, ingreso de agua, movilización de sustancias de almacenamiento para dar inicio a la germinación (Dijksterhuis *et al.*, 2007). Sephton-Clark y Voelz, (2018) señalan en su trabajo de germinación, la importancia de la pared de esporas, las cuales les confieren resistencia a factores ambientales adversos. Estos autores señalan que la estructura se mantiene relativamente conservada entre diferentes especies fúngicas, las cuales están básicamente compuestas por polisacáridos, lípidos y proteínas. Entre las moléculas más comunes se encuentran los β -glucanos, quitinas, glucosa, mananos, entre otras. Cabe destacar que existe escasa información sobre la estructura y composición de las paredes y el contenido interior de las esporas de *T. frezzii*.

Entre los hongos cuyas esporas se encuentran pigmentadas, se encuentra el *Mucor rouxii*, para el que se ha mencionado la presencia de alrededor del 42.6% de glucosa, 16.1% de proteínas, 10.3% de melanina, 9.8% de lípidos, 9.5% de quitosan, 2.1% de quitina, además de fosfato, manosa y ácido glucurónico (Nuero García, 1995). Se ha descrito la presencia de melanina en la pared de numerosos hongos que forman esporas. La melanina es básicamente un polímero que está formado por residuos del aminoácido tirosina. Sin embargo, en la actualidad se conocen diferentes tipos de melanina compuesta por distintos monómeros. La melanina compone los sitios hidrofóbicos observados en las capas más externas de *Aspergillus fumigatus*, lo cual es considerado un factor de patogenicidad, además de darle mayor estructura a las esporas (Bayry *et al.*, 2014; Pihet *et al.*, 2009). Estos autores señalan que aquellas estructuras que carecen de melanina muestran menor electronegatividad, hidrofobicidad y cambio en la estructura de la pared de los conidios. En otros hongos de la división de Basidiomycota, los genes relacionados a la melanización son considerados un factor de virulencia, porque contribuye a la diseminación del hongo (Eisenman y Casadevall, 2012). Estos autores señalan que en las cepas más agresivas de *Cryptococcus gattii*, los genes relacionados a la síntesis de melanina están sobreexpresados,

con la consecuente acumulación de melanina. Además, han observado que los cúmulos de melanina se encuentran anclados de manera sólida a la pared de los hongos, por lo que se sugirió que la quitina juega un rol fundamental en dicho anclaje, a través de “cross-linking” entre ambas moléculas. Se ha encontrado que las moléculas de quitina, que son polímeros de N-acetilglucosamina, se sintetiza por la expresión de quitin-sintasas (CHS) y utiliza la UDP-N-acetilglucosamina como sustrato para la elongación de la cadena. En numerosos hongos se ha descrito la presencia de múltiples genes CHS con diferentes roles en el crecimiento fúngico (Gow *et al.*, 2017).

Un fenómeno que ha sido poco investigado en relación a la composición de las paredes fúngicas es la autofluorescencia que presentan ciertos hongos, la cual se ha empleado principalmente en estudios de tejidos o en análisis de detección de hongos en ambientes naturales. Si bien la causa de la fluorescencia aún no se ha dilucidado completamente, en muchos casos es atribuida a compuestos endógenos como aminoácidos aromáticos o quitina (Breyer *et al.*, 2021). Recientemente, se han realizado estudios estimando la biomasa fúngica a través de la cuantificación de la autofluorescencia del ergosterol (Mansoldo *et al.*, 2020). Otros trabajos describen a la melanina como posible fuente de autofluorescencia, por contener en su composición química, enlaces que permiten la movilidad de electrones, pudiendo ser excitados a determinadas longitudes de onda. Por esta razón, no es menor el abordaje de las posibles causas de autofluorescencia, sobre todo porque podría ser una herramienta para la detección y estudio de la viabilidad de las estructuras fúngicas. Además, estos componentes podrían estudiarse como posibles elicitores, que permiten el reconocimiento de la planta hospedera y la consecuente activación de los mecanismos de defensa vegetal (Agustinho y Nosanchuk, 2017).

Análisis del genoma y modificaciones en la expresión génica

Los avances en la tecnología de secuenciación están revolucionando tanto la micología como la patología vegetal, convirtiéndolas en disciplinas científicas fundamentadas en el análisis genómico. En los últimos diez años, la tecnología de secuenciación ha sido un avance notable en el estudio de los carbores, ya que permite analizar las características genómicas claves de los patógenos de las plantas (Frantzeskakis *et al.*, 2017). Los primeros estudios de genomas de carbores son relativamente recientes, a

partir de la secuenciación del genoma de *U. maydis* (Kämper *et al.*, 2006). Luego se describieron las secuencias genómicas de carbones como *Sporisorium reilianum* (Schirawski *et al.*, 2010) y *Ustilago hordei* (Laurie *et al.*, 2008) que revelaron nuevas características de las especies, como regiones conservadas que codifican para proteínas efectoras y potenciales factores de virulencia (Ali *et al.*, 2014). Se ha dedicado atención a las diferentes familias genómicas presentes en los patógenos, así como la abundancia de enzimas activas de carbohidratos (CAZymes), las cuales desempeñan un papel crucial en la degradación y metabolismo de los carbohidratos. La investigación en este campo puede proporcionar información valiosa sobre la capacidad de los hongos para infectar y colonizar los tejidos vegetales, como señalan Zhao *et al.* (2014). Por ejemplo, el análisis del genoma de *Anthracoystis flocculosa* (= *Pseudozyma flocculosa*) mostró un incremento en la identificación de genes que codifican para quitinasas, pertenecientes a la familia de las CAZymes (GH18) que explicaría el rol que desempeña como agente de biocontrol (Lefebvre *et al.*, 2013)

Se conoce que estas enzimas que degradan las paredes celulares, cutinas y pectinas, son codificadas por múltiples familias de genes, por lo que también son considerados factores de virulencia, lo que se aborda actualmente para explicar el grado de severidad en múltiples patógenos (Agrios, 2005). Además, las enzimas que degradan la pared celular a través de su acción a menudo liberan oligosacáridos y proteínas de la pared celular que pueden provocar o suprimir las respuestas de defensa de la planta huésped. Otro aspecto destacado en el estudio de los genomas fúngicos es el papel de los ARN de longitud corta, los cuales desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica y en la interacción entre el hongo y su hospedador (Weiberg *et al.*, 2013) Su investigación intensiva ha revelado características previamente desconocidas de los genomas fúngicos y ha proporcionado información nueva sobre la biología y patogenicidad de los hongos.

Síntesis de lípidos y vías metabólicas involucradas

Algunos autores han mencionado la fuerte dependencia que existe entre la biosíntesis lipídica y los procesos relacionados al metabolismo, crecimiento y viabilidad de los hongos. La importancia de los lípidos en las funciones esenciales de los hongos, especialmente en la morfogénesis, es reconocida por su participación en varios procesos celulares, ya que sirven

como componentes cruciales para la estructura y el almacenamiento celular, lo que permite la adaptación en condiciones adversas y actúan como compuestos reguladores (Mysyakina y Feofilova, 2011).

La estructura química y las propiedades físicas de los lípidos fúngicos son extremadamente diversas, así como las funciones que desempeñan en las células. Contrario a lo que se cree, los lípidos constituyen mucho más que la membrana plasmática, la cual representa una barrera celular para el intercambio con el medio. Los lípidos sirven como anclaje para proteínas involucradas en la producción de energía, señales de traducción, transporte, replicación del ADN, secreción, etc. La bicapa lipídica de la membrana celular contiene fosfolípidos (PLs), glicolípidos y esteroides, responsables de la fluidez, la estabilidad y la permeabilidad de la misma. En relación al interior citosólico, se ha descrito la presencia de lípidos en esporas de numerosas especies fúngicas, principalmente almacenados como sustancias de reserva, como forma de adaptación a las condiciones ambientales y mantenimiento de los niveles de metabolismo adecuados. Se ha propuesto, por ejemplo, para *U. maydis*, que la proteína SSP1 se almacena en las esporas y sería la responsable de la movilización de los lípidos de reserva en esporas germinativas.

Otros lípidos implicados en la morfogénesis y dimorfismos de algunos hongos carbonosos son los esteroides, entre ellos el ergosterol, que contribuyen al mantenimiento de la estructura y normal funcionamiento de las membranas (Vanden Bossche, 1990). Es discutido el rol de los complejos esteroides-glicolípidos, o dominios ricos en esteroides, en las estructuras de membranas, que podrían participar en procesos de transporte y expresión de factores de virulencia, como se observó para algunos hongos dimórficos, como *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. nidulans*, y *S. pombe* (Mysyakina y Feofilova, 2011) Existen numerosos fungicidas que actúan sobre la biosíntesis de ergosterol; en general, fungicidas sistémicos que atraviesan la cutícula foliar y resultan altamente efectivos en aplicaciones curativas luego de iniciada la infección (Agrios, 2005). En el año 2018, se introdujo al mercado un fungicida sistémico con propiedades tanto curativas como preventivas. Esta solución consiste en una combinación de dos moléculas de triazoles, triadimenol (30%) y miclobutanil (20%), ambas con una acción probada sobre la biosíntesis de ergosterol. Estas moléculas actúan al inhibir la enzima 14- α -demetilasa, esencial para la conversión de lanosterol en ergosterol, un proceso crucial en el desarrollo fúngico. A pesar de estas propiedades, se ha observado que la efectividad de este fungicida puede ser errática,

mostrando una notable variabilidad en su desempeño en diferentes situaciones o condiciones.

Otro grupo enzimático relevante en las vías metabólicas de los lípidos son las enzimas dioxigenasas (DOX), las cuales han sido identificadas en numerosos hongos patógenos con la capacidad de oxidar ácidos grasos insaturados (Oliw, 2021). En el caso del hongo carbonoso *Rhizoctonia solani*, se han descrito tres homólogos de la familia de las DOX, incluyendo dos pertenecientes a la familia de las linoleato diol sintasas (LDS). Aunque estos homólogos no son tan cercanos filogenéticamente a la enzima predominante en *U. maydis*, existe una proteína relacionada llamada "Proteína específica de esporas 1" (SSP1 por sus siglas en inglés "Spore Specific Protein 1"). Esta enzima se encuentra principalmente en los cuerpos lipídicos de las esporas de *U. maydis* y se cree que está involucrada en la oxidación de ácidos grasos esterificados, con la subsiguiente acción de lipasas específicas (Huber *et al.*, 2002).

Modificaciones en el perfil proteico

Durante el ciclo de vida de los hongos se producen numerosas modificaciones en la expresión génica que se traducen, por ejemplo, en proteínas que desempeñan diversos roles durante el crecimiento fúngico. Los análisis proteómicos que se realizaron en *U. maydis*, enfocados principalmente a la transición y crecimiento de este patógeno, demostraron la sobreexpresión de aproximadamente 13 proteínas durante la transición dimórfica de este hongo (Böhmer *et al.*, 2007). Además, observaron un incremento de dos proteínas puntuales (glutaminasa A (UM06158) e hidrolasa (UM03083)), asociadas a la isoforma filamentosa, que coinciden con un aumento a nivel transcricional luego de la transición dimórfica, cuando fueron medidos por ensayos de "microarrays". Numerosas proteínas participan en la interacción entre el hongo y su huésped, y comprender su función puede ser crucial para desarrollar estrategias de control efectivas (Guyon *et al.*, 2014; Pellegrin *et al.*, 2015; Alfaro *et al.*, 2016). Dentro del grupo de proteínas involucradas en la degradación de las paredes celulares, se encuentran aquellas que actúan sobre polisacáridos, hormonas, o enzimas como amilasas o lipasas; si bien todas ellas pueden considerarse necesarias, no siempre resultan esenciales para la inducción y desarrollo de la enfermedad y por ello ser tratadas como potenciales factores de virulencia (Agrios, 2005).

Un grupo proteico de interés a analizar son aquellas proteínas que participan en la constitución y modificación del citoesqueleto celular. Los microtúbulos son esenciales en numerosos procesos, ensamble de husos para división celular, segregación de cromosomas, movimiento de organelas, transporte de otras proteínas y mantenimiento de la polarización para el crecimiento de las células (Westermann y Weber, 2003). En los hongos filamentosos, desempeñan una importante función en el alargamiento de las hifas, migración del núcleo, transporte de organelas, proteínas y ARN, y se consideran partícipes en el desarrollo de las estructuras de patogénesis (Shiel, 2014). La composición de los microtúbulos se asocia a heterodímeros de α/β tubulina, aunque también se ha descrito la presencia de γ -tubulina en algunos hongos como *Aspergillus nidulans* (Xiang y Plamann, 2003).

A pesar de que la enfermedad ha adquirido una creciente relevancia en el sector manisero argentino en los últimos años, el conocimiento acerca del patosistema sigue siendo limitado. Actualmente, se están llevando a cabo diversas investigaciones para abordar esta carencia, aunque aún no se han logrado cubrir todos los aspectos relacionados con la biología del patógeno. Estos aspectos son fundamentales para el desarrollo de estrategias de manejo eficientes. Dada la importancia significativa que tiene el cultivo de maní para la provincia de Córdoba y el notable aumento en la intensidad de la enfermedad del carbón, resulta crucial generar información que permita la creación de herramientas de control efectivas. Esto, a su vez, facilitaría el desarrollo de diversas estrategias de manejo que servirían como base para reducir la intensidad de la enfermedad en el cultivo.

HIPÓTESIS

Los estadios de teliospora, basidiospora e hifa de *Thecaphora frezzii* exhiben una expresión génica diferencial, lo que conlleva variaciones significativas en su contenido proteico y lipídico. La caracterización bioquímica detallada de cada uno de estos estadios contribuye de manera crucial al avance en el conocimiento de este hongo fitopatógeno. Además, esta información bioquímica proporciona una base sólida para el desarrollo de estrategias de manejo más efectivas frente a *T. frezzii*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión diferencial de genes en los estadios de teliosporas, basidiosporas e hifas de *T. frezzii* y evaluar variaciones en su composición lipídica y proteica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un medio de cultivo óptimo para la germinación, así como establecer las condiciones ideales de crecimiento y métodos eficientes de conservación a largo plazo para cada estadio de *Thecaphora frezzii*. Además, caracterizar la morfoestructura de las esporas del patógeno con el fin de obtener una comprensión exhaustiva de sus características biológicas.
2. Identificar diferencias en la expresión génica a lo largo de los diversos estadios del ciclo biológico de *T. frezzii*, centrándose especialmente en la transición de la forma de resistencia a la forma infectiva.
3. Investigar la composición de fosfolípidos y ácidos grasos en las membranas celulares de los distintos estadios de *T. frezzii*, analizando las diferencias entre cada estructura.
4. Analizar el contenido y comparar el perfil proteico del citoesqueleto celular, con especial énfasis en la red microtubular. Explorar la expresión de diversas isoformas postraslacionales de tubulina en los estadios celulares de teliosporas, basidiosporas e hifas de *T. frezzii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña M., Wiemer A. P. y Cosa Y. 2012. Carbón del maní bajo la lupa, anatomía de la infección. XXVII Jornada Nacional del Maní. General Cabrera, Argentina.
- Agrios G. 2005. *Plant Pathology 5th ed.* Elsevier Academic Press, London, UK. 922p.
- Agustinho D. P. & Nosanchuk J. D. 2017. Functions of Fungal Melanins. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.12091-6>.
- Alfaro M., Castanera R., Lavín J. L., Grigoriev I. V., Oguiza J. A., Ramírez L. & Pisabarro A. G. 2016. Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environmental Microbiology*, 18 (12), 4710–4726. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13360>.
- Ali S., Leconte M., Rahman H., Saqib M. S., Gladieux P., Enjalbert J. & de Vallavieille-Pope C. 2014. A high virulence and pathotype diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici at its centre of diversity, the Himalayan region of Pakistan. *European Journal of Plant Pathology*, 140 (2), 275–290. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0461-2>.
- Andrade O., Muñoz G., Galdames R., Durán P., & Honorato R. 2004. Characterization, *in vitro* culture, and molecular analysis of *Thecaphora solani*, the causal agent of potato smut. *Etiology*, 9 (8).
- Arias S.L., Mary V.S., Velez P.A., Rodriguez M.G., Otaiza-González S.N. & Theumer M.G. 2021. Where Does the Peanut Smut Pathogen, *Thecaphora frezii*, Fit in the Spectrum of Smut Diseases? *Plant Disease*, 105(9). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2438-FE>
- Astiz Gassó M. y Marinelli A. 2013. Biología de la germinación de *Thecaphora frezii* *in vitro*. XXVIII Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Argentina. 62–63.
- Astiz Gassó M. y Wojszko Y. 2016. Evaluación *in vitro* de fungicidas curasemillas para el control químico del carbón de maní (*Thecaphora frezii*). XXXI Jornada Nacional del Maní. General Cabrera, Argentina.
- Banuett F. 2010. A method to visualize the actin and microtubule cytoskeleton by indirect immunofluorescence. *Methods in Molecular Biology*. 638, 225–233. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_17.
- Bayry J., Beaussart A., Dufrière Y. F., Sharma M., Bansal K., Knemeyer O., Amanianda V., Brakhage A. A., Kaveri S. V., Kwon-Chung K. J., Latgé J. P. & Beauvais A. 2014. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infection and Immunity*, 82 (8), 3141–3153. <https://doi.org/10.1128/IAI.01726-14>.
- Böhmer M., Colby T., Böhmer C., Bräutigam A., Schmidt J. & Bölker M. 2007. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7 (5), 675–685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600900>.

- Brefort T., Doehlemann G., Mendoza-Mendoza A., Reissmann S., Djamei A. & Kahmann R. 2009. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47 (1), 423–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923>.
- Bressano M., Massa A. N., Arias R. S., De Blas F., Oddino C., Faustinelli P. C., Soave S., Soave J. H., Pérez M. A., Sobolev V. S., Lamb M. C., Balzarini M., Buteler M. I. & Seijo J. G. 2019. Introgression of peanut smut resistance from landraces to elite peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L). *PLoS ONE*, 14 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211920>.
- Breyer E., Böhm M., Reitbauer M., Amano C., Heitger M. & Baltar F. 2021. Autofluorescence is a common trait in different oceanic fungi. *Journal of Fungi*, 7 (9). <https://doi.org/10.3390/jof7090709>.
- Cazón L.I. 2015. Detección molecular de *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist en semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.). Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias -UNC, 1–62.
- Cazón L. I., Paredes J. A. & Rago A. M. 2018. The Biology of *Thecaphora frezii* Smut and Its Effects on Argentine Peanut Production. *Advances in Plant Pathology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75837>
- Conforto C., Cazón I., Fernández F. D. Marinelli A., Oddino C. & Rago, A. M. 2013. Molecular sequence data of *Thecaphora frezii* affecting peanut crops in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 137 (4), 663–666. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0296-2>.
- Dijksterhuis J., Nijse J., Hoekstra F. A. & Golovina E. A. 2007. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Eukaryotic Cell*, 6 (2), 157–170. <https://doi.org/10.1128/EC.00247-06>.
- Eisenman H. C. & Casadevall A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93 (3), 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>.
- Fernández E. y Giayetto O. 2006. El cultivo del maní en Córdoba. Fernández E. y Giayetto O. Eds. (1ra ed., Vol. 1). Universidad de Rio Cuarto. Argentina. 280 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Peanuts: Background & Statistics. Publicado en internet, disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Activo noviembre 2017.
- Frantzeskakis L., Courville K. J., Plücker L., Kellner R., Kruse J., Brachmann A., Feldbrügge M. & Göhre, V. 2017. The plant-dependent life cycle of *Thecaphora thlaspeos*: A smut fungus adapted to brassicaceae. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30 (4), 271–282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-16-0164-R>.
- Gow N. A. R., Latge J.-P. & Munro C. A. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>.
- Guyon K., Balagué C., Roby D. & Raffaele S. 2014. Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen

- Sclerotinia sclerotiorum. *BMC Genomics*, 15. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/336>.
- Huber S., Lottspeich F. & Kämper J. 2002. A gene that encodes a product with similarity to dioxygenases is highly expressed in teliospores of *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267 (6), 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0717-y>.
- Instituto Nacional de Semillas. 2021. Sistema de Información Simplificada Agrícola SISA. Argentina.
- Instituto Nacional de Semillas. 2023. Sistema de Información Simplificada Agrícola SISA. Argentina.
- Kahmann R., Steinberg G., Basse C., Feldbrugge M. & Kamper J. 2000. *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. *Fungal Pathology*, 347-371.
- Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L. J., Brefort T., Saville B. J., Banuett F., Kronstad J. W., Gold S. E., Müller O., Perlin M. H., Wösten H. A. B., De Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña C. G., Snetselaar K., McCann M., Pérez-Martín J., Feldbrügge M. & Birren, B. W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444 (7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>.
- Laurie J. D., Linning, R. & Bakkeren, G. 2008. Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 53 (1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0165-7>.
- Lefebvre F., Joly D. L., Labbé C., Teichmann B., Linning R., Belzile F., Bakkeren G. & Bélanger R. R. 2013. The transition from a phytopathogenic smut ancestor to an anamorphic biocontrol agent deciphered by comparative whole-genome analysis. *Plant Cell*, 25 (6), 1946–1959. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113969>.
- Mansoldo F. R. P., Firpo R., Cardoso V. da S., Queiroz G. N., Cedrola S. M. L., Godoy M. G. & de Vermelho A. B. 2020. New method for rapid identification and quantification of fungal biomass using ergosterol autofluorescence. *Talanta*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121238>
- March G. J., Marinelli A., Oddino C. y Kearney M. 2005. Evaluación regional de enfermedades causadas por hongos del suelo en maní. XX Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Argentina.
- Marinelli A., March G. J. y Rago A. 1995. El carbón del maní *Thecaphora frezii*, sobre *Arachis hypogaea* L. VII Congreso de Micología y XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario Santa Fe. p. 134.
- Marinelli A., March G. J. y Oddino C. 2006. Aspectos biológicos y epidemiológicos del carbón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. XXI Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Argentina.
- Mysyakina I. S. & Feofilova E.P. 2011. The role of lipids in the morphogenetic processes of mycelial fungi. *Microbiology (Moscow)*, 80 (3), 297–306.

- Nuero García O.M. 1995. Estudio bioquímico de p-1,3-glucanasas de *Aspergillus nidulans* para el control biológico de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* raza 2. Universidad Complutense de Madrid.
- Oddino S. C. 2011. Efecto de la fertilización sobre la intensidad del carbón del maní. *Resúmenes y trabajos presentados ISSN On line 1851-4987 Estación Experimental Agropecuaria Manfredi*.
<http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/boletines/reuycong/reunionesycongresos.htm>
- Oliw E. H. 2021. Withdrawn: Fatty acid dioxygenase-cytochrome P450 fusion enzymes of the top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology and human-pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 103603. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103603>.
- Pellegrin C., Morin E., Martin F.M. & Veneault-Fourrey C. 2015. Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1278. doi: 10.3389/fmicb.2015.01278.
- Paredes J. A., Edwards Molina J. P., Cazón L. I., Asinari F., Monguillot J. H., Morichetti S. A., Rago A. M. & Torres A. M. 2022. Relationship between incidence and severity of peanut smut and its regional distribution in the main growing region of Argentina. *Tropical Plant Pathology*, 47 (2), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00473-x>.
- Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., Renier G., Saulnier P., Georgeault S., Mallet R., Chabasse D., Symoens F. & Bouchara J. P. 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-177>.
- Roets F., Dreyer L. L., Wingfield M. J. & Begerow D. 2008. *Thecaphora capensis* sp. nov., an unusual new anther smut on Oxalis in South Africa. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 21, 147–152. <https://doi.org/10.3767/003158508X387462>.
- Schirawski J., Mannhaup G., Münch K., Brefort T., Schipper K., Doehlemann G., Di Stasio M., Rössel N., Mendoza-Mendoza A., Pester D., Müller O. M., Stukenbrock E., Güldener U., Kahmann R., Winterberg B., Meyer E., Ghareeb H., Wollenberg T., Münsterkötter M. & Wong P. 2010. Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science*, 330, 1546.
- Sephton-Clark P. C. S. & Voelz K. 2018. Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 102, 117–157. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.002>.
- Shiel A.I. 2014. The microtubule cytoskeleton of the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *University of Exeter*. UK.
- Spinazzé C. y Marraro Acuña F. 2010. Estudio del efecto de la ubicación de las esporas sobre la intensidad del carbón del maní. XXV Jornada Nacional del maní. General Cabrera, Argentina.
- Vanden Bossche, H. 1990. Importance and Role of Sterols in Fungal Membranes. *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*, 135–157.

- Vasighzadeh A., Zafari D., Selçuk F., Hüseyin E. & Kurşat M. 2014. Discovery of *Thecaphora schwarzmaniana* on Rheum ribes in Iran and Turkey: implications for the diversity and phylogeny of leaf smuts on rhubarbs. *Mycological Progress* , 13, 881–892.
- Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H.D. & Jin H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* , 342 (6154), 118–123.
- Westermann S. & Weber K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (12), 938–947. <https://doi.org/10.1038/nrm1260>.
- Xiang X. & Plamann M. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (6): 628–633. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.009>.
- Zhao Z., Liu H., Wang C. & Xu J.-R. 2014. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 15 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-6>.
- Zuo W., Ökmen B., Depotter J. R. L., Ebert M. K., Redkar A., Misas Villamil J. & Doehlemann, G. 2019. *Annual Review of Phytopathology Molecular Interactions Between Smut Fungi and Their Host Plants*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718>.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GERMINACIÓN DE ESPORAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos claves para avanzar en el conocimiento de los factores que intervienen en el desarrollo de una enfermedad vegetal es el aislamiento del agente causal. Una vez logrado, es posible estudiar su morfología, determinar las condiciones para su desarrollo y ciclo de vida. Además, esto permite estudiarlo molecularmente, lo que permitirá compararlo con especies más relacionadas en su filogenia.

Como se describió en el capítulo 1, los estudios sobre la enfermedad de Carbón del maní son recientes. A la fecha, son escasos los estudios que analizan cada una de las estructuras que este hongo fitopatógeno desarrolla en todo su ciclo de vida. Cazón *et al.* (2018) describen las estructuras formadas por el hongo cuando produce la infección de la planta. Estos autores señalan que las teliosporas, que sobreviven en el suelo hasta encontrar las condiciones adecuadas, tienen la capacidad de germinar ante el estímulo del ginóforo (clavo) al ingresar al suelo. Esto conduce a la formación de un probasidio seguido por generación de basidiosporas haploides. Cuando estas germinan, los tubos germinales compatibles se fusionan para producir la hifa dicariótica infectiva. Esta penetra en el ginóforo, coloniza el tejido y reemplaza las células que conforman el fruto del maní en una masa de teliosporas de color marrón, concluyendo así el ciclo de la enfermedad.

Esta descripción realizada a partir de la observación de la infección *in vivo*, resultó fundamental para luego aislar el patógeno y proceder a su cultivo *in vitro*, para avanzar en su conocimientos y caracterización. En este aspecto, los estudios son mucho más limitados. Astiz Gassó y Marinelli (2013) publicaron una metodología para el aislamiento de carbón del maní a partir de teliosporas provenientes de frutos carbonosos. En este estudio se describe cómo las esporas de carbón germinan en medios de cultivo suplementados con extractos de

clavos de maní. Por su parte, Arias *et al.* (2021) describió que medios de cultivos suplementados con extractos de granos favorecían la germinación de las esporas. Esto permitió inferir que existe un estímulo propio de la planta, necesario para la germinación de las esporas. Sin embargo, en estos estudios no se indica el porcentaje final de esporas germinadas; y al ser replicados por otros grupos de investigación, no se obtuvo un alto índice germinativo.

Arias *et al.* (2021) destacan la falta de información sobre la germinación y formación de micelio infectivo *in vitro*, lo cual se podría atribuir a que podría haber una alta proporción de esporas inmaduras o no viables. Un trabajo realizado sobre germinación de esporas de *Tilletia caries*, agente causal del carbón del trigo, destaca que estas presentan un estado de dormancia y que fallan al germinar cuando son colocadas en condiciones *in vitro* adecuadas; por ello estos autores proponen como alternativa el uso de sustancias químicas que permitan romper este estado de dormancia (Trione, 1973). Otra hipótesis propuesta por Andrade *et al.* (2004) para teliosporas de *Thecaphora solani*, es que las mismas podrían perder su viabilidad ante los intensos protocolos de desinfección aplicados antes de su siembra en placas de Petri. Esta falta de información dificulta correlacionar el bajo índice de germinación con las condiciones de cultivo insuficientes. Otra alternativa a tener en cuenta es que las esporas representan estructuras relacionadas a la supervivencia y diseminación del patógeno, por lo que su estructura podría en sí misma actuar como una barrera de protección hasta encontrarse con las condiciones adecuadas.

En relación a la composición y estructura de las esporas, se han realizado estudios en teliosporas de numerosos hongos carbonosos, aunque estos no incluyen a *T. frezzii*. Para estas esporas se señala como característica común a todas ellas, la presencia de una endospora y una exospora o pared externa (Piepenbring *et al.*, 1998). Estos autores destacan las uniones entre esporas, los apéndices y los poros germinativos. Además, se ha observado que la capa exterior se encuentra ornamentada y ésta varía según la especie. Además, se destaca la presencia de una capa más interna, probablemente compuesta por lípidos de diferente naturaleza, lo que les daría a las esporas una importante impermeabilidad. En la especie *T. solani*, Andrade *et al.* (2004), describe a las teliosporas como estructuras sexuales de paredes gruesas, formando cúmulos de varias esporas. Por su parte Aponte *et al.* (2015) realizaron cortes histológicos de *T. solani*, pudiendo identificar núcleo, citoplasma y pared celular interna. En este estudio resulta llamativa la observación realizada por los autores, donde

encontraron que determinadas estructuras presentaban autofluorescencia al ser analizadas en microscopio confocal; en particular esta fluorescencia se ubica en el núcleo, pero mayormente en la pared exterior de las esporas.

La autofluorescencia es un fenómeno presente en algunas esporas de hongos, lo cual podría considerarse como una ventaja para su detección. Sin embargo, podría resultar inconveniente al momento de realizar estudios que involucren marcadores fluorescentes, para lo cual deberán tenerse en cuenta las longitudes de onda de emisión de estos fluoróforos para evitar su superposición con la autofluorescencia de los compuestos celulares. Por ejemplo, muchas veces es necesario conocer la viabilidad celular para poder correlacionarla con otros parámetros. Pero es conocido que la mayoría de los colorantes que marcan viabilidad celular son fluoróforos que se “encienden” por la acción enzimática de células vivas (Diacetato de Fluoresceína - FDA) para producir fluorescencia verde, o la fluorescencia roja emitida por la unión de Ioduro de Propidio (PI) al unirse a material genético celular, cuando las mismas presentan permeabilidad de membrana, marcando células no viables (Stiefel *et al.*, 2015).

El fenómeno de autofluorescencia en hongos no es un hecho descubierto recientemente; ya en el año 1984, Wu y Warren propusieron correlacionar la viabilidad con la autofluorescencia en propágulos de diversas especies fúngicas que afectaban al cultivo del maíz. Estudiaron la germinación de diferentes estructuras *in vitro* y evaluaron la fluorescencia en placas de Petri. Y arribaron a la conclusión de que el aumento de la fluorescencia se correlacionaba en forma negativa con la viabilidad. Una de las teorías propuestas es que el envejecimiento celular produce la acumulación de compuestos fenólicos, causales de autofluorescencia, lo que finalmente lleva a la muerte celular (Wu y Warren, 1984). Zaki *et al.* (2018) describieron que la autofluorescencia en *Pseudozyma flocculosa*, un hongo filogenéticamente cercano a *T. frezzii*, se presenta, dependiendo de las condiciones de cultivo, diferencialmente en las estructuras que crecen en la parte aérea del cultivo o en las estructuras sumergidas en el medio. En particular ellos observaron que la autofluorescencia ocurre en las gruesas paredes celulares de las estructuras que se forman en la parte aérea, indicando que en las partes sumergidas el hongo no alcanza su madurez completa y la autofluorescencia es menor.

Estos resultados generan la incógnita acerca de cuáles son los compuestos de las paredes fúngicas con capacidad de autofluorescer. Es conocido que la quitina es uno de los compuestos más abundantes en las paredes de los hongos y que además posee la capacidad de fluorescer. Dreyer *et al.* (2006) demostraron en el estudio de hongos micorrízicos, que la fluorescencia se encontraba en la pared y que el colorante “Calcofluor White” (CFW), que es un colorante fluorescente azul con capacidad de unirse a quitina, teñía las mismas partes que mostraban autofluorescencia, lo cual demostraba que la quitina era la causante de este fenómeno.

La quitina es un homopolímero de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por enlace β 1,4 y representa el segundo polímero más abundante en la tierra. Constituye un andamio para una amplia variedad de organismos, incluyendo las paredes de los hongos y el citoesqueleto de algunos insectos, artrópodos y crustáceos (Shirasaka *et al.*, 2019). Un análisis ultraestructural demuestra que la quitina posee una estructura casi cristalina, ordenándose en microfibrillas paralelas para constituir diferentes capas o láminas superpuestas (Flaven-Pouchon y Moussian, 2022). Estos autores describen que es un requisito primordial que los genes involucrados en el metabolismo de la quitina se expresen adecuadamente, para el correcto funcionamiento de las proteínas y enzimas involucradas en la construcción y el ensamblado de las paredes celulares.

El fenómeno de autofluorescencia fúngica también ha sido atribuido a otro componente presente en numerosas esporas fúngicas pigmentadas, la melanina, un pigmento descrito como un polímero heterogéneo de naturaleza indólica o fenólica. En la figura 2.1 se muestran las vías biosintéticas de las principales melaninas, que hasta la actualidad se conocen al menos tres tipos: la **eumelanina** o melanina DOPA provenientes de tirosina con DOPA e indol-quinonas como intermediarios; la **feomelanina**, que se destaca por la presencia de una molécula de cysteinil-DOPA como intermediaria, es decir que cuenta con átomos de azufre en su composición; y la **allomelanina**, característica por su composición de 1,8-dihidroxinaftaleno como monómero constituyente (Pralea *et al.*, 2019).

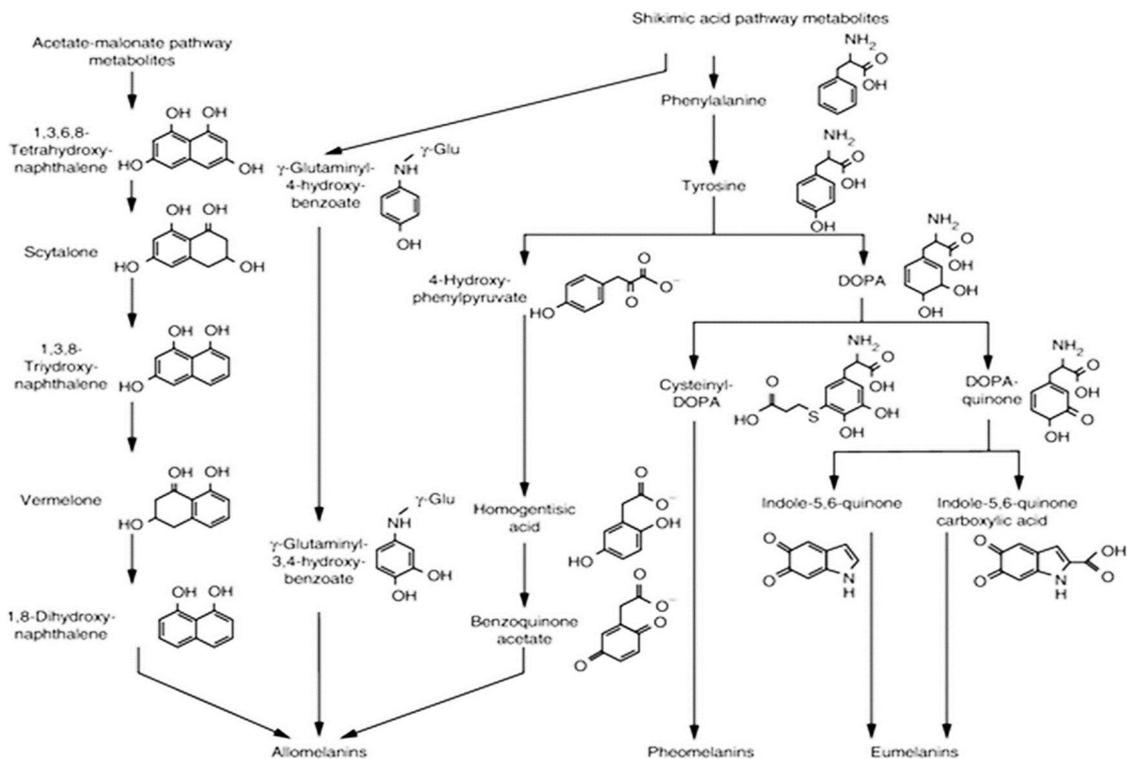


Figura 2.1: Vías biosintéticas de allomelaninas, feomelaninas y eumelaninas.

Se ha descrito la síntesis de melanina en hongos pigmentados de las familias *Ascomycota* y *Basidiomycota*, asociada principalmente a su desarrollo en ambientes hostiles. A diferencia de otros polímeros naturales, las unidades de melanina se asocian radicalariamente generando enlaces covalentes carbono-carbono no hidrolizables, lo que les proporciona una considerable resistencia estructural que dificulta su caracterización y degradación (Bárcena, 2016). Por ello, este polímero se asocia con la resistencia a estrés generados por agentes físicos y químicos, con la patogénesis y la virulencia. Su estructura química y su organización a nivel molecular, supramolecular, así como por la capacidad para formar agregados con proteínas o polisacáridos, le confieren la propiedad de protección contra la energía radiante, el estrés impuesto por la pérdida de agua y las temperaturas extremas. También inmovilizan moléculas orgánicas e inorgánicas, por su interacción de tipo iónica o covalente entre los grupos hidroxilo del anillo aromático de la estructura de la melanina con proteínas, polisacáridos, metales pesados, pesticidas y contaminantes (Solano, 2014).

Se ha propuesto que distintos compuestos orgánicos pueden asociarse con las melaninas a través de reacciones redox. Debido a estas propiedades, la melanina puede actuar como aceptor o donador de electrones, lo que podría ser una de las causas de fluorescencia al ser irradiada con las longitudes de onda adecuadas. Otro rol importante es proteger a los componentes estructurales de la pared celular del hongo frente a la acción de enzimas hidrolíticas como glucanasas y proteasas liberadas por el hospedante. Las melaninas, además de inactivar estas hidrolasas, impiden el contacto físico y su interacción con el sustrato (Jacobson, 2000).

Gran parte del conocimiento de las propiedades químicas de estos pigmentos derivan de estudios realizados en la melanina sintética o en la melanina animal DOPA, la cual a diferencia de la melanina DHN, contiene nitrógeno y grupos carboxilo (Bárcena, 2016). Dado que las melaninas DOPA contienen estructuras aromáticas y grupos hidroxilos, estos compuestos han sido estudiados utilizando numerosas técnicas analíticas que sirvieron para cuantificarlos y caracterizarlos químicamente. La mayor parte de los estudios de caracterización de las melaninas resulta del análisis por espectroscopía UV-visible, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía de resonancia paramagnética nuclear (RMN) (Liu *et al.*, 2018; Vijayan *et al.*, 2017). Dada la organización estructural de sus grupos funcionales con diferentes estados redox, en resonancia con los dobles enlaces del anillo bencénico, las melaninas presentan capacidad de absorción de energía. Por ello, es uno de los pocos radicales libres estables conocidos con la posibilidad de absorber a otros radicales libres que resultan del estrés ambiental. Por medio de la utilización de RMN en estado sólido, Eisenman y Casadevall (2012) demostraron que la melanina purificada desde *Cryptococcus neoformans* está unida covalentemente con polisacáridos de la pared celular. Posteriormente, Beltrán-García *et al.* (2014) haciendo uso de espectrometría de masas MALDI-TOF, reportaron la presencia de DHN-melanina en *Mycosphaerella fijiensis*. Las características químicas de las melaninas se pueden inferir, además, a través de la identificación de algunos de los intermediarios de la ruta de su síntesis mediante la utilización de técnicas como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Se ha descrito que, en contraste con lo que ocurre con las células humanas, las melaninas de bacterias y hongos se asocian y localizan extracelularmente a nivel de la pared celular, a veces como una capa definida y otras veces como gránulos en la superficie celular (Zaki *et al.*, 2018). Los hongos producen melanina en hifas y en otras estructuras

diferenciadas tanto de resistencia y/o de dispersión como clamidosporas, esclerocios, conidios y apresorios, otorgándole rigidez y contribuyendo con su rol en el ciclo de vida del hongo (Bárcena A., 2016).

Por todo lo expuesto, en este capítulo se describen las condiciones de cultivo ensayadas para promover la germinación de las teliosporas, además de evaluar diferentes métodos de conservación a mediano y largo plazo. Además, se realizó una caracterización morfológica de las esporas y un análisis de sus componentes estructurales. Como objetivo principal, se planteó analizar las posibles moléculas responsables de la autofluorescencia fúngica, así como caracterizar los pigmentos presentes en las paredes celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de Thecaphora frezzii

Las teliosporas de *T. frezzii* se obtuvieron a partir de cajas de maní hipertróficas que se consideró como síntoma de la enfermedad. Las vainas fueron desinfectadas superficialmente con una solución al 0,5% (v/v) de hipoclorito de sodio (55 gramos de cloro activo/L). Posteriormente, se abrieron las cajas para obtener las esporas de su interior, las cuales se desinfectaron con una solución al 5% (v/v) de hipoclorito de sodio (55 gramos de cloro activo/L) y luego se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se prepararon tres submuestras de esporas.

El primer grupo se reservó para los estudios de SEM, TEM y microscopía de campo claro y fluorescencia. El segundo grupo se destinó a la extracción de melanina para su caracterización. El tercer grupo se sembró en placas de Petri estériles conteniendo medio de cultivo Agar-papa-dextrosa (PDA - Britania) y se incubaron a 26 °C en oscuridad hasta su germinación. Se realizó una observación y conteo diario de las colonias en PDA durante 30 días para calcular la tasa de germinación. Debido al escaso índice germinativo, se ensayaron medios de cultivo PDA suplementados con hormonas y promotores de la germinación, de acuerdo a la bibliografía consultada. Los ensayos se dividieron de la siguiente manera:

A: Kinetina (KIN)

B: Ácido Naftalenacético (ANA)

C: Ácido Indolacético (AIA)

D: Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)

E: Ácido Jasmónico (JA)

Se utilizó un medio de cultivo PDA sin suplementar como control. Los medios se colocaron en placas de 90 mm de diámetro y se sembraron 5×10^5 cel/placa, provenientes de una dilución de esporas previamente contadas en cámara de Newbauer. Las germinaciones fueron controladas diariamente para evaluar la eficiencia de los tratamientos.

Conservación de Thecaphora frezzii a largo plazo

Con el objetivo de conservar las estructuras obtenidas *in vitro* por un tiempo prolongado, se estudiaron las condiciones para preservar hifas y basidiosporas de *T. frezzii*, ambas obtenidas a partir de la germinación de teliosporas *in vitro*. Para ello, las hifas se sembraron en tubos con agar inclinado, y una vez crecidas, se colocaron a 4 °C y – 20 °C con y sin el agregado de glicerol. Otra de las técnicas ensayadas para la conservación de micelio, es la descrita por Castellani (1963), en la que trozos de micelio tomados directamente de las placas conteniendo PDA, se conservan en discos en agua destilada estéril en tubos plásticos a temperatura ambiente.

Para la preservación de las basidiosporas, inicialmente fueron obtenidas a partir del cultivo de hifas en medio PDA durante un período de más de 15 días. Una vez que las colonias adquirieron una tonalidad verdosa, se confirmó la formación exitosa de basidiosporas *in vitro* por microscopía en campo claro. Las estructuras fueron recolectadas de las placas de Petri cuando más del 90% de las mismas correspondían a basidiosporas, mediante un conteo por campos. Luego fueron lavadas con agua estéril y transferidas a crioviales para su almacenamiento a largo plazo. A un grupo de viales se le agregó medio de cultivo líquido y glicerol 10%; a otro grupo se las recubrió solamente con glicerol 10%. Luego de estabilizar durante 1h a temperatura ambiente, se llevaron a ultrafreezer a -80 °C. Para evaluar la viabilidad de hifas y basidiosporas conservadas a baja temperatura, se evaluó su crecimiento en placas conteniendo PDA fresco a los 30, 60 y 90 días.

Evaluación de viabilidad de teliosporas de Thecaphora frezzii

Una de las técnicas que permite la discriminación entre células vivas y muertas es la tinción con fluorocromos. Para estudiar si la escasa germinación se debe a la baja viabilidad celular, la misma se evaluó aplicando conjuntamente una tinción con diacetato de fluoresceína (FDA)/Ioduro de propidio (PI). El FDA penetra en las células y es transformado por las esterasas celulares en fluoresceína que emite fluorescencia amarillo-verdosa (Emisión: 514 nm) marcando las células metabólicamente activas (viables). El PI es un fluoróforo impermeable, que sólo penetra en las células muertas e interacciona con los ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (Emisión: 617 nm). Para ello, las esporas destinadas

a evaluar la viabilidad, se lavaron dos veces con agua destilada, se agregaron ambos colorantes en igual proporción y se incubaron durante 10 min. Luego de lavar repetidamente las muestras, se realizó una observación microscópica en microscopio de fluorescencia en los canales de emisión de 514 y 617 nm.

Análisis estructural de teliosporas

Microscopía en campo claro

Para analizar la estructura general de las teliosporas, se preparó una suspensión de 20 µg de teliosporas en 100 µl de agua estéril, de la cual se tomaron 10 µl y se colocaron sobre portaobjetos y se cubrió con cubreobjetos para su análisis microscópico. Las muestras se observaron en microscopio Zeiss – Axio observer D1 y las imágenes fueron tomadas con cámara Mono-camera AxioCam 506, y procesadas con el sistema Imaging Software ZEN 2 Core. Se realizaron observaciones del tamaño, características de la superficie y agrupamiento en los glomérulos.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las muestras de teliosporas se prepararon para SEM utilizando un equipo de secado a punto crítico Bal-Tec 030 Critical Point Dryer (CPD) por inmersión en acetona, enfriadas por debajo de 10 °C y centrifugadas. Luego las muestras se lavaron repetidamente con CO₂ y fueron calentadas a 40 °C antes de ser removidas del desecador. Para montar el material a observar, se emplearon tacos de aluminio sobre los que se inmovilizaron las esporas con cinta bifaz. Para cubrir las esporas con lámina de oro de 25 nm para su observación, se empleó un metalizador Balzers SCD 030. Las imágenes fueron capturadas utilizando un sistema Carl Zeiss SIGMA modelo field 45 misión scanning electron microscope (FE-SEM) y el programa Zeiss SmartSEM en los rangos de magnificación desde 187X hasta 78.000X. Estos ensayos se realizaron en LAMARX (FaMAF-UNC).

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para preparar las muestras para su observación, las mismas fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en buffer fosfato salino (PBS) 0,1 M a pH 7,4 por una hora. Luego de la fijación, las suspensiones fueron centrifugadas y se lavaron tres veces con agua destilada. Las muestras fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con una solución de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1%, se lavaron nuevamente con agua estéril y luego se deshidrataron usando soluciones seriadas de acetona-agua en concentraciones crecientes de acetona hasta alcanzar el 100%. Las muestras se colocaron en una solución de resina epoxy “Spurr low viscosity” en acetona (1:1 v/v) durante 4h. Luego, se dejó durante toda la noche en resina 100% (Spurr Low Viscosity Embedding Kit – Polysciences Inc., USA). Para el paso de polimerización, las muestras se colocaron en estufa a 70 °C durante 4 días. Para la observación en microscopio, se realizaron cortes ultra finos (80-100 nm) empleando un ultramicrotomo Leica con cuchilla de diamante de 3mm (Diatom), luego se colocaron en celdas de plata y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% y se dejaron en buffer citrato a pH=12 por 15 min. Las muestras fueron examinadas usando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM EX1200 operando a 80 kV. Por la rigidez de la pared y para permitir el ingreso de la resina dentro de la célula, se probaron tres tratamientos diferentes: A- Digestión ácida en ácido clorhídrico fumante durante 15 min; B- Digestión alcalina en NaOH 3M por 15 min; C- Digestión enzimática con quitinasas, glucanasas y liticasas por separado y juntas en tratamientos consecutivos. Cada tratamiento fue mantenido a la temperatura óptima para la acción de cada enzima, durante 1h. Luego de cada tratamiento las teliosporas fueron lavadas y preparadas para su observación en microscopio.

Análisis de autofluorescencia

Análisis por microscopía de fluorescencia

Para observar la autofluorescencia de las teliosporas, se prepararon las muestras de igual manera que para el análisis de campo claro, y se observaron las esporas en microscopio Zeiss – Axio observer D1 con luz de emisión láser con sistema Colibrí en canal FITC (verde). Se fotografiaron las muestras con Mono-camera AxioCam 506 y se procesaron con el sistema Imaging Software ZEN 2 Core.

Tratamientos para inducir autofluorescencia

Para estudiar si el fenómeno de autofluorescencia se potenciaba con tratamientos químicos, se ensayaron las siguientes condiciones:

1. Tratamiento alcalino con Hidróxido de Sodio (NaOH 1M) por 30 min, 2h y 4h.
2. Tratamiento oxidante con peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 30 vol.) 30 min, 2h y 4h.
3. Tratamiento alcalino con efecto oxidante: Hipoclorito de sodio (NaClO 10%) 30 min, 2h y 4h.
4. Control sin agentes químicos.
5. Tratamientos 1, 2 y 3 aplicados a muestra de quitina comercial.

Se analizaron 10 campos de cada tratamiento, con al menos 100 teliosporas por campo. Para las muestras de quitina comercial, se contaron 10 campos con, al menos, 10 partículas por campo. Las imágenes fueron procesadas con el sistema ImageJ para estimar las diferencias en la fluorescencia.

Análisis de integridad del ADN

Con el fin de correlacionar el incremento de la autofluorescencia obtenida por los tratamientos químicos y la viabilidad de las esporas, se realizó la extracción del ADN de muestras tratadas con NaClO 10% durante 4 h, que fue el tratamiento que alcanzó el mayor aumento de la fluorescencia. Para incluir un control de células muertas, se realizó un tratamiento térmico de las esporas, lo que también aumentó el nivel de fluorescencia. Para ello, se tomaron muestras de 1g de teliosporas y se calentaron por separado en estufa a 50-100-150-200 °C durante 1h. Luego de los tratamientos, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo descrito por Cazón (2015). Brevemente, se les realizó una molienda con nitrógeno líquido en morteros de porcelana esterilizados. La molienda resultante se pasó a tubos eppendorf y se agregaron 490 µl de buffer CTAB al 2% y 10 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 20 min homogeneizando cada 5 min. Se agregaron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1 v/v) y se agitaron 30 seg en vortex. Se centrifugaron por 5 min a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante de cada muestra. Se agregó nuevamente cloroformo/alcohol isoamílico (500 µl) y se centrifugó 5 min a 10.000

rpm. En un nuevo tubo se recuperaron 300 μ l del sobrenadante y se precipitó el ADN con 200 μ l de isopropanol frío (-20 °C). Se incubó 1 h en freezer a -20 °C y se centrifugó 30 min a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 μ l de etanol al 70%, se centrifugó 10 min a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet en una secadora. Se agregaron 40 μ l de H₂O calidad Milli-Q y se dejó resuspender toda la noche a 4 °C. La calidad del ADN extraído se controló mediante espectrofotómetro a 260/280 nm (Perkin Elmer) y mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

Tinción con calcofluor White y tratamiento con quitinasas

El colorante Calcofluor White es empleado para determinar la presencia de patógenos fúngicos, ya que el mismo se une a quitina dando como resultado una coloración fluorescente azul. Para la tinción, se preparó una solución del colorante de 1 mg/ml y se sumergieron las esporas en esta solución durante 10 min. Luego, las esporas fueron lavadas repetidamente con agua destilada para ser observadas por microscopía de fluorescencia en microscopio Zeiss - Axio observer D1 en canal DAPI (azul), acoplado a cámara Mono-camera AxioCam 506, con el sistema Imaging Software ZEN 2 Core para procesamiento de imágenes. Además, se emplearon enzimas quitinasas, las cuales tienen la capacidad de degradar la quitina de las paredes fúngicas. En este ensayo, se emplearon dichas enzimas en condiciones de acción óptimas (3h - 37 °C) para evaluar su actividad sobre las teliosporas; luego de este tiempo, se lavaron las esporas y se observaron en microscopio de campo claro para analizar modificaciones en las paredes por la acción de las enzimas.

Análisis de pigmentos

Con el propósito de identificar si el pigmento responsable de la coloración superficial de las esporas era melanina, se llevó a cabo una caracterización exhaustiva, orientada a determinar la naturaleza precisa de esta molécula.

A partir de 1 gr de teliosporas se procedió a la extracción de los pigmentos mediante el método de Gadd (1982). Brevemente, las esporas fueron lavadas con agua destilada estéril

y centrifugadas, luego resuspendidas en 5 ml de una solución NaOH 3M y calentadas con sistema de reflujo durante 1h a 120 °C. El debris celular fue removido por centrifugación a 10.000 g 5 min, luego el sobrenadante pigmentado se trató con una mezcla de cloroformo/metanol para remoción de lípidos y otros componentes celulares. Los pigmentos se precipitaron por acidificación del medio hasta pH 2 con HCl fumante, seguido por centrifugación a 10.000 g 10 min. El pellet fue lavado con agua destilada, fraccionado en submuestras y mantenido a -20 °C hasta su análisis.

Análisis por espectrofotometría UV-visible

Una fracción de los pigmentos aislados como se describe en el punto anterior, fue resuspendida en 1 ml de una solución de NaOH 0,1 M. Luego se realizó un barrido espectral para determinar el patrón de absorción desde 200 a 600 nm. Se utilizó un equipo Lambda 25 UV-Vis Spectrometer de Perkin Elmer con cubeta de cuarzo de 1cm de paso óptico. El mismo análisis se realizó sobre una muestra de melanina DOPA comercial (Sigma, M0418, USA) con el fin de comparar los espectros obtenidos.

Análisis por espectroscopía infrarrojo (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR)

La composición molecular de la melanina se analizó a través del patrón de absorción por espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR). Los espectros se obtuvieron en un equipo Shimadzu FTIR, con una acumulación de 40 corridas para cada muestra en modo reflectancia difusa. Se analizaron 5 mg de muestra por duplicado y los espectros fueron comparados con los obtenidos con muestras de melanina comercial.

Análisis por UHPLC – Arreglo de Diodo (PDA) y espectrometría de masa

Para el ensayo con UHPLC/PDA se utilizó el equipo de cromatografía líquida de ultra alta presión Shimadzu Nexera XR acoplado a un detector de arreglo de diodo. Los análisis se llevaron a cabo en una columna Shimpack GIST C-18 (2 µm), 100 x 2,1 mm (Shimadzu), mantenida a 30 °C. La fase móvil fue metanol 50% (v/v) con agregado de 1% ácido acético, a flujo constante de 0,1 ml/min.

El análisis de UHPLC-MSMS se realizó en un equipo de cromatografía líquida de ultra alta presión Shimadzu Serie 40 acoplado a un detector de masa de triple cuadrupolo Shimadzu 8050, en modo SCAN utilizando infusión directa en ionizador de electrospray (ESI) en modo ion positivo, con voltaje de capilar de 4 kV, gas nebulizador a 3L/min de flujo, gas de calentamiento a 10L/min, temperatura de interfase 300 °C, temperatura de línea de desolvatación 250 °C, temperatura del bloque de calentamiento 400 °C y gas de secado a flujo de 10L/min. La fase móvil empleada fue metanol 50% (v/v) con tasa de flujo de 0,25 ml/min.

Análisis Estadístico

Para los ensayos de germinación y cultivo de *T. frezii*, se realizaron tres réplicas para cada uno de los tratamientos mencionados. Para corroborar la formación de las basidiosporas, se contaron 10 campos por placa, en un total de 3 placas. Para los estudios de autofluorescencia y correlación con viabilidad, se contaron 10 campos por cada tratamiento. En todos los casos se calculó la media y D.E. (\pm) para cada una de las diferentes muestras. Los datos fueron analizados con el test de Student para establecer las diferencias significativas, utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS

En primera instancia se realizaron ensayos para evaluar la germinación de teliosporas. Entre los hallazgos más llamativos de estos ensayos fue que, en todos los medios, hubo desarrollo de colonias bacterianas en las placas de Petri (Figura 2.2). A pesar de ensayar diferentes medios de desinfección y agregado de antibióticos a los medios de cultivo, el crecimiento de bacterias se desarrollaba en la mayoría de las placas. Durante la evaluación de los medios, se constató que la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *T. frezzii* se registró en los medios suplementados con KIN, seguido por aquellos con ANA. Sin embargo, la germinación fue baja en ambos casos ($1/1 \times 10^4$). Tanto el medio de control como aquellos con EDTA, AIA y JA agregados, la tasa germinativa fue aún menor. Sin embargo, con ninguno de los tratamientos se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de germinación.

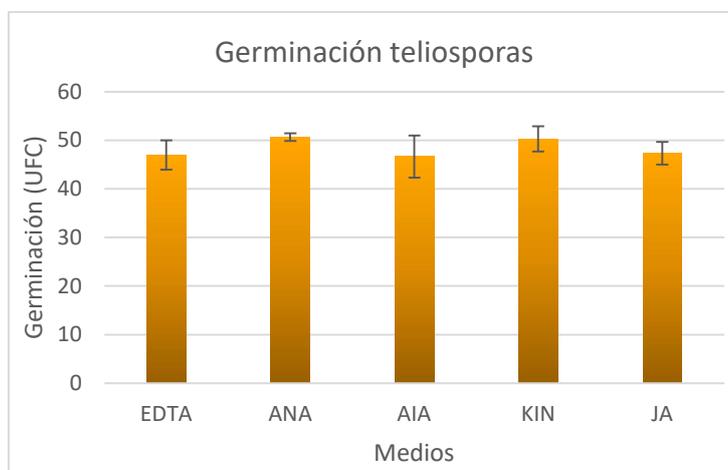


Figura 2.2: Estudio de germinación de teliosporas en placas de PDA suplementadas con hormonas vegetales y promotores de la germinación. EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético, ANA: Ácido Naftalenacético; AIA : Ácido Indolacético; KIN: Kinetina; JA: Ácido Jasmónico.

Uno de los hechos más sobresalientes del seguimiento de la germinación de las esporas, fue que después de 15 días luego de ocurrida la germinación y formación de micelio, este tomaba una coloración verde pardo, diferente al color de las colonias de hifas. Se realizó

un análisis microscópico comparativo entre ambas colonias y se observaron estructuras diferentes, pertenecientes al ciclo de vida del hongo (Figura 2.3). En las colonias claras, las hifas se observaron rectas, sin tabicar y sin ramificaciones perpendiculares, al igual que lo descrito anteriormente en bibliografía; sin embargo, en las colonias verdosas predominaron las estructuras de basidiosporas, pequeñas células refractantes en forma de avellana, que permanecían sin agruparse en el cultivo. Cuando estas estructuras se repicaron en medio PDA fresco, se formaron nuevamente colonias de micelio de color blanquecino, correspondiente a hifas de *T. frezzii* al ser observadas en microscopía de campo claro.

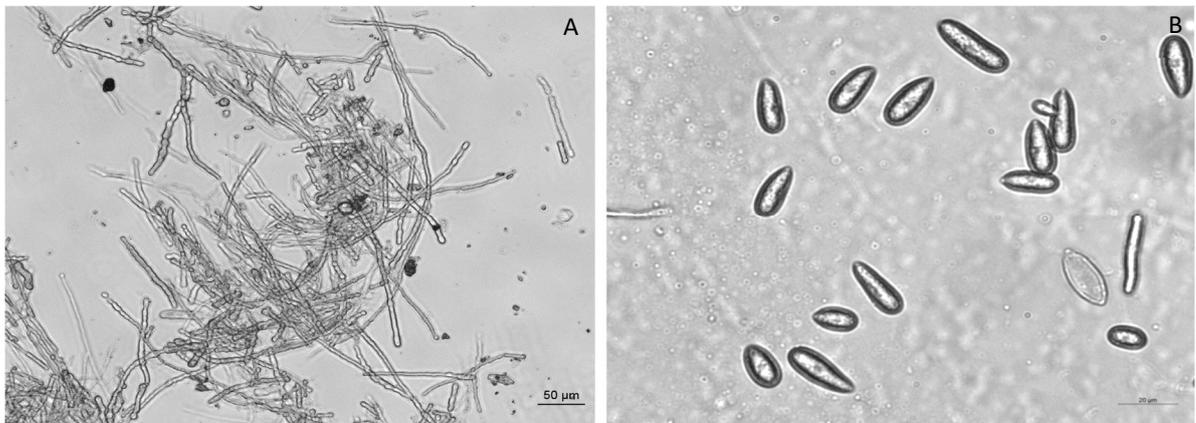


Figura 2.3: Micromorfología de *T. frezzii* en cultivo en PDA: A- Hifas; B- Basidiosporas. Microscopía de campo claro (200X).

Con el propósito de conservar las estructuras de *T. frezzii* a largo plazo, se evaluaron diferentes condiciones de almacenamiento de hifas y basidiosporas desarrolladas *in vitro*. Para ello, las hifas se colocaron a 4 °C y a -20 °C con y sin recubrimiento con glicerol. Sin embargo, luego de 30 días, cuando se recuperaron las hifas y se llevaron a una placa con nuevo medio de cultivo, las mismas no desarrollaron, lo que indica que no lograron conservarse viables por un plazo de 30 días. Sin embargo, a través del método de Castellani (1963) para conservación de micelio en agua estéril a temperatura ambiente, se logró el crecimiento de las hifas luego de ser sembrados en medio fresco a los 30-60 y 90 días de ensayo. Por su parte, las basidiosporas que se conservaron a -80 °C cubiertas con medio de cultivo y glicerol, o solo con el agregado de este crioprotector, mantuvieron su viabilidad en el periodo de ensayo, ya que cuando fueron colocadas en medios de cultivos frescos luego de 30, 60 y 90 días, lograron desarrollarse con normalidad.

Debido al escaso índice de germinación de las esporas en los diferentes medios de cultivo ensayados, se propuso el estudio de la viabilidad de las mismas, a través de las técnicas de tinción con FDA y PI. En este estudio, al intentar colorearlas, se observó que con ninguno de los colorantes se producía la reacción de color, es decir que la viabilidad de las esporas no pudo ser evaluada por esta técnica. Debido a que en las imágenes de microscopía de campo claro ya se observaba que las esporas presentaban una pared externa espiculada pigmentada, se hipotetizó sobre un posible impedimento de los colorantes de llegar al interior celular. Para corroborarlo, se realizaron estudios en la estructura de la pared a través de microscopía SEM (Figura 2.4). Este análisis corroboró lo que ya había sido observado en campo claro, pero con un importante aumento, que permitió ver en forma detallada las diferentes capas de las esporas. Se observó que las esporas se agrupan en glomérulos de 3-5 esporas cada uno, con forma esférica, con un diámetro de $37,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$, observándose que la capa exterior es ornamentada con protrusiones cónicas y pigmentada en color marrón. Además, se muestra una fuerte unión entre las esporas dentro de cada glomérulo. Cuando se observó una espora partida de manera natural, se pudieron ver las diferentes capas que conforman la pared externa; la más externa con crestas de $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de espesor y valles de $0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de espesor. Luego, más hacia el interior, se observa una capa con un ordenamiento diferente, compacta y sin protrusiones. Luego sigue un espacio vacío, para luego encontrar en el interior una endospora, recubierta por una capa externa de fibras organizadas de manera longitudinal.

Cuando se analizó por SEM una muestra de quitina comercial, se observó que la disposición de las fibras es de manera longitudinal, con el mismo patrón al observado en la pared de las endosporas.

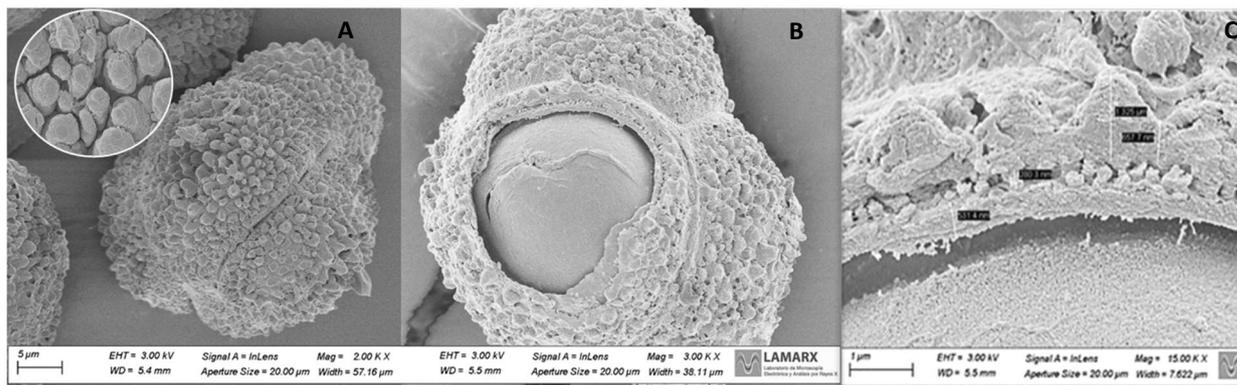


Figura 2.4: Micrografías de teliosporas por SEM. A- Esporas agrupadas en glomérulos; se observa en el círculo una imagen magnificada de las ornamentaciones espiculadas con patrón cónico; B- La gruesa pared externa rota deja expuesta la endospora interna; C- Medición del grosor de las diferentes capas que componen la pared externa.

El análisis por microscopía electrónica de transmisión demostró lo que ya se había visto por SEM en la parte más externa de las esporas. Sin embargo, este análisis permitió realizar un análisis del interior celular y el ordenamiento interno de las esporas. Uno de los principales impedimentos para realizar los cortes del material a observar es la escasa permeabilidad de la resina para fijar el material antes del corte. Esto dio lugar a la observación de esporas completamente vacías o con el citoplasma plegado contra la pared, sin permitir un análisis adecuado del interior celular (Figura 2.5.A). Sin embargo, estas micrografías permitieron la visualización de las paredes de las esporas, como puede observarse en las figuras 2.5 (B-C), donde se destaca la capa más externa con cúmulos electrodensos y hacia adentro, una capa de organización más homogénea, luego una capa con fibras de organización longitudinal, un espacio vacío y por último una endospora interna. Es llamativa la presencia de bacterias en la periferia de los glomérulos, que también aparecen en el interior de estos, entre la capa externa y la membrana de la endospora (Figura 2.5.D).

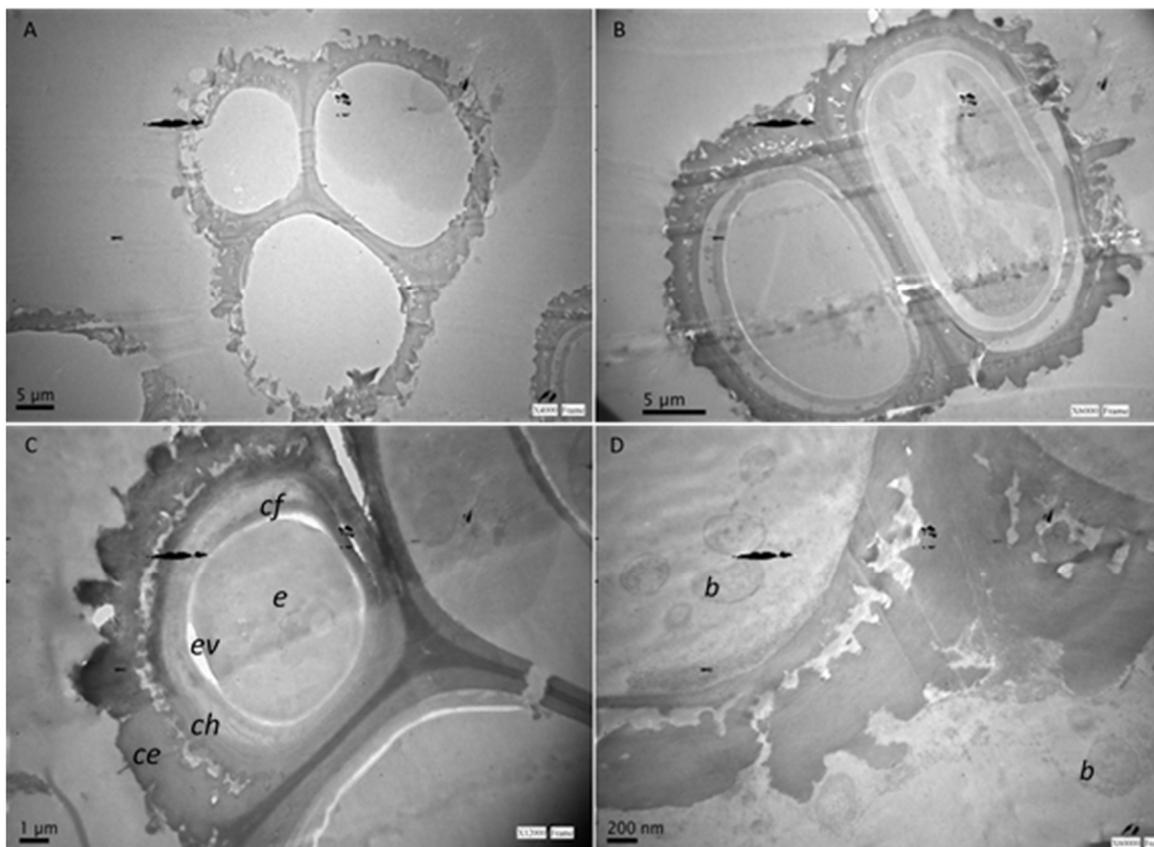


Figura 2.5: Cortes ultrafinos de esporas de *T. frezii* sin tratamiento, observadas por TEM. A- Glomérulos vacíos; B- Esporas con citoplasma electrodenso; C- Identificación y organización estructural de las capas de la pared externa, con presencia de endospora en el interior; D- Observación de bacterias (b) en la periferia de las esporas, y entre la segunda capa interna y la endospora. ce: capa externa con cúmulos densos, ch: capa electrodensa con organización homogénea, cf: capa de fibras con organización longitudinal, ev: espacio vacío, e: endospora rodeada de membrana.

Para mejorar la permeabilidad celular a la resina, se investigó el impacto de tratamientos químicos sobre las esporas; para ello se ensayó un tratamiento ácido con HCl fumante, otro alcalino con NaOH y, por último, un tratamiento enzimático con enzimas glicolíticas. De estos tratamientos, el que mejores resultados produjo fue la hidrólisis ácida, que produjo quiebres en las paredes de las esporas, permitiendo el ingreso de la resina. De esta manera el corte ultrafino fue mucho más preciso y permitió realizar una observación más detallada de la estructura celular. En la figura 2.6.A se observa presencia de cuerpos lipídicos de diferente tamaño. También se vieron compartimentos de baja densidad electrónica (blancos) con un punteado oscuro, sugiriendo la presencia de “clusters” de proteínas o material ribosomal. Adicionalmente, se detectaron diversos centros

electrodensos (de tonalidad oscura) sin que fuera posible distinguir una membrana delimitante clara. En la figura 2.6.B se observan sistemas membranosos, compatibles con mitocondrias. Es llamativa la presencia de ribosomas acumulados en la periferia del citosol, cercanos a la pared de las esporas (Figura 2.6.C). En la figura 2.6.D se destaca el remanente de un sistema membranoso, probablemente un fragmento del retículo endoplásmico.

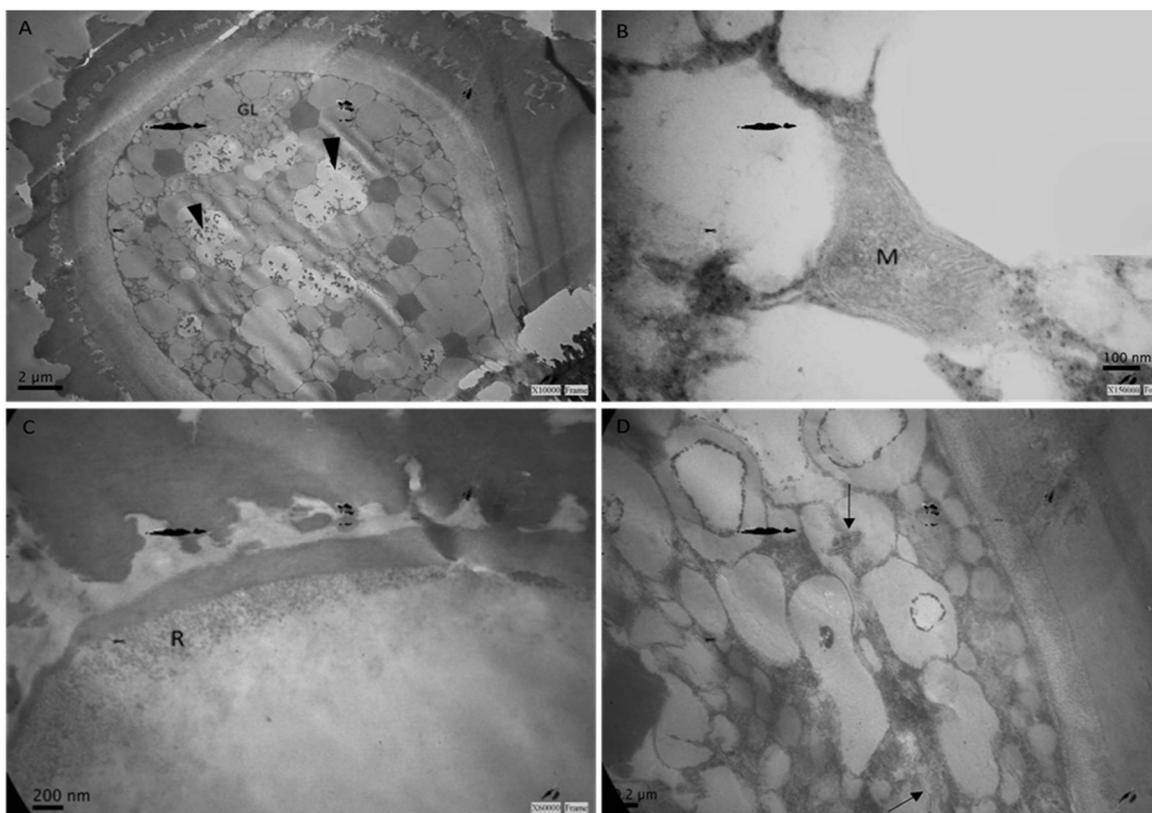


Figura 2.6: Ultraestructura de teliosporas. A- Observación del citosol con cuerpos lipídicos y regiones más claras con puntillado electrodenso (cabezas de flecha); B- Presencia de mitocondria; C- Localización de ribosomas; D- Sistemas membranosos remanentes (flechas). GL: Glóbulos o cuerpos lipídicos de diferente tamaño, M: mitocondria, R: Ribosomas.

Correlación entre autofluorescencia y viabilidad

Uno de los fenómenos observados al analizar la viabilidad de las teliosporas con colorantes fluorescentes, es que las esporas sin tratar, es decir sin colorantes, presentaban autofluorescencia en el canal de FITC (verde) al ser observadas en microscopio de fluorescencia. Esto resultó llamativo, ya que no existen antecedentes de autofluorescencia

en *T. frezzii*; sin embargo, es un atributo conocido en esporas de otros hongos. Debido a que las tinciones tradicionales no permitieron determinar la viabilidad fúngica, se propuso estudiar si el aumento de esta autofluorescencia podría correlacionarse con la muerte celular.

Para ello se realizaron tratamientos térmicos, tendientes a matar a las esporas y evaluar su fluorescencia. Se trataron las esporas durante 1h a temperaturas desde 25 a 200 °C observándose un incremento de la fluorescencia, como se observa en la figura 2.7.

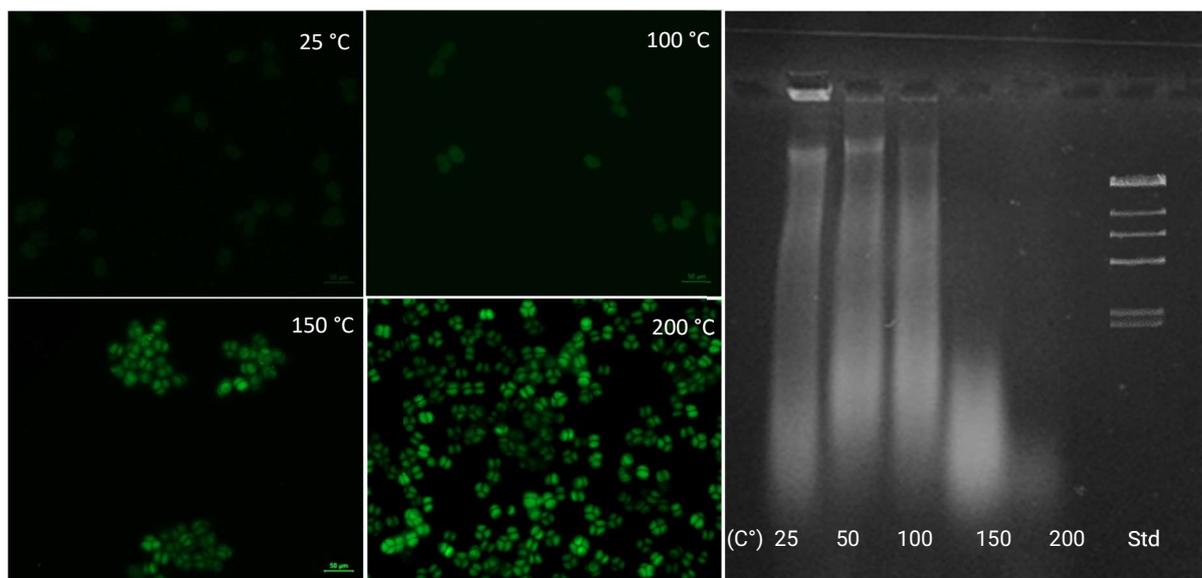


Figura 2.7: Tratamientos térmicos de esporas en estufa durante 1h a 25-50-100-150-200°C. Se observa que el incremento de la autofluorescencia es proporcional al aumento de temperatura. En la figura de la derecha se observa una corrida del ADN extraído de las esporas tratadas con calor.

Para correlacionar el aumento de la autofluorescencia con la integridad del ADN, se realizó una extracción del mismo y se evaluó su integridad en corridas en geles de agarosa al 0,8%. Como puede observarse en la figura 2.7, el incremento de la temperatura produjo fragmentación del ADN, desde los 100 °C en adelante. Ya a 150 °C no se observa la primera banda de ADN genómico entero, sino que se fragmenta en bandas mucho más pequeñas que migran hasta el final del gel. A 200 °C la fragmentación es completa. Esto denota que en los tratamientos donde se produjo un incremento de la fluorescencia, también se observa la fragmentación completa del ADN, por ello, sería correcto suponer que el incremento de la autofluorescencia tiene una correlación inversa con la viabilidad de las esporas.

¿Cuáles son los componentes celulares que causan autofluorescencia?

Este interrogante se presentó dado que no se conocen antecedentes que señalen que *T. frezzii* presente en su pared algún compuesto que cause el fenómeno de autofluorescencia. En la revisión bibliográfica se halló evidencia de hongos autofluorescentes a los que se le atribuía esta propiedad a la quitina de la pared celular. Para corroborar si es este el componente que causa la autofluorescencia en *T. frezzii*, se realizaron tratamientos físicos y químicos sobre teliosporas para inducir fluorescencia, en paralelo con un control de quitina comercial.

Brevemente, los tratamientos consistieron en el uso de agentes oxidantes y alcalinos sobre las esporas que luego fueron observadas en microscopía de fluorescencia (canal FITC), obteniéndose un promedio de intensidad de fluorescencia de cada muestra. Los resultados, que se observan en la figura 2.8, demuestran que, tanto en el control como en las muestras tratadas con NaOH, se presenta una autofluorescencia que se mantiene medianamente constante durante los tiempos ensayados. Sin embargo, se observa un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia, cuando las esporas fueron tratadas con H₂O₂ ya que los valores superaron significativamente el valor de fluorescencia del control. Por su parte, el tratamiento oxidante a pH alcalino (NaClO) fue el que alcanzó los mayores valores de fluorescencia, llegando a quintuplicar el valor del control luego de 4h de tratamiento.

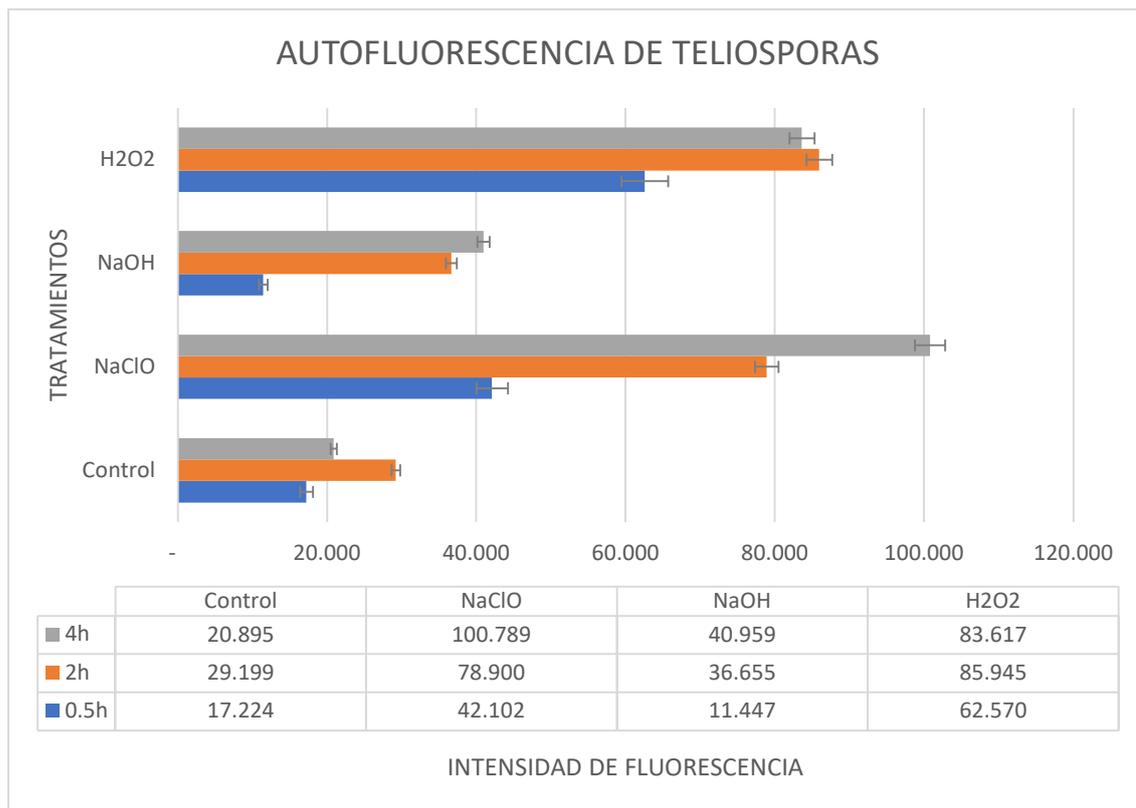


Figura 2.8: Intensidad de fluorescencia en teliosporas tratadas durante 0.5, 2 y 4 h con hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno vs. control.

Cuando los tratamientos se aplicaron sobre quitina comercial, tanto el peróxido de hidrógeno como el hipoclorito de sodio produjeron un incremento de la fluorescencia, probablemente por la formación de un intermediario autofluorescente como se observa en la figura 2.9; sin embargo, el tratamiento alcalino con hidróxido de sodio no causó un aumento marcado de la autofluorescencia. Una posible explicación sería que la quitina, al ser tratada con un agente alcalinizante, puede desacetilarse produciendo quitosano, que no posee la característica de autofluorescer.

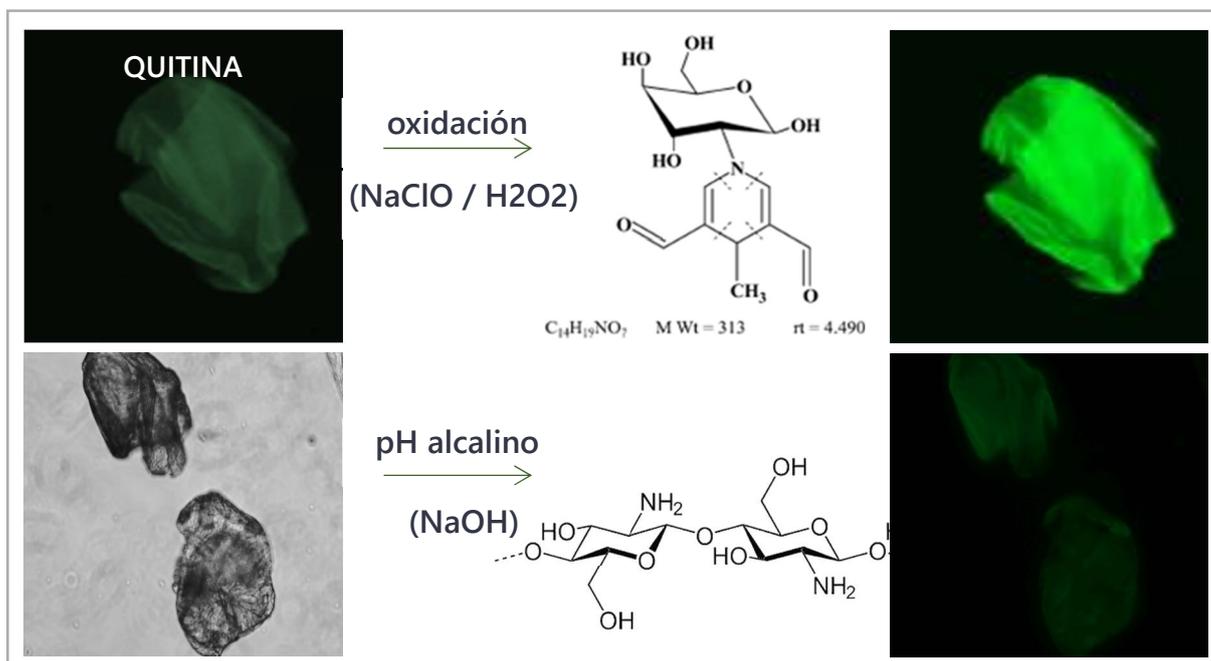


Figura 2.9: Tratamiento de quitina comercial con agentes químicos (hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno e hidróxido de sodio).

Para confirmar la presencia de quitina en las paredes de las esporas, se realizó una tinción con el colorante Calcofluor White, que tiene capacidad de unirse a quitina y fluorescer en color azul al ser observado en el canal de DAPI. Contrario a lo esperado, el colorante no marcó de azul las paredes de las teliosporas enteras, es decir, que la quitina no representa el componente mayoritario de la capa más externa de sus paredes. Esto se condice, además, con el resultado obtenido por el tratamiento con enzimas quitinasas. Las mismas no produjeron ninguna modificación en la estructura de las paredes de las esporas cuando se observaron en microscopio de campo claro, luego de tratarlas enzimáticamente. Sin embargo, un hallazgo llamativo ocurrió cuando una de las esporas rotas, que dejaba expuesta la endospora interior, se tiñó de color azul. Como puede observarse en la figura 2.10, la pared de la endospora fluoresce de color azul, demostrando que quitina es el principal componente de la pared de la endospora.

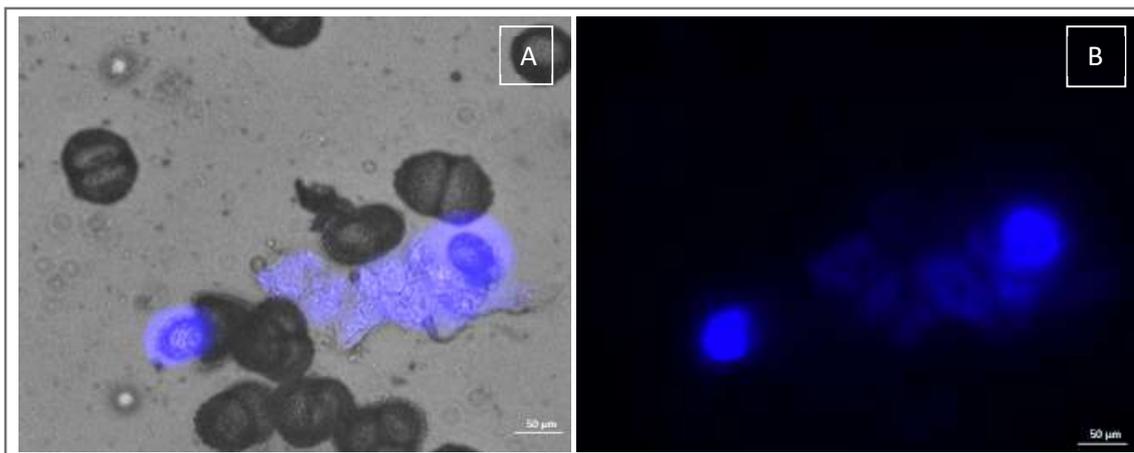


Figura 2.10: Teliosporas teñidas con Calcofluor White. A: Campo claro; B: Fluorescencia (600X).

Caracterización de pigmentos

Debido a que aún no se había podido determinar el componente causante de la fluorescencia de la pared más externa de las esporas, se estudió la posibilidad de que este componente fuera algún tipo de pigmento. La bibliografía indicaba que la melanina, ante cierto estado oxidativo, tiene la capacidad de autofluorescer. Por ello, se avanzó en la caracterización de los pigmentos acumulados en protrusiones sobre la pared externa de las esporas. Para ello, se realizó una hidrólisis alcalina con calor. Luego de este tratamiento, el principal hallazgo fue la total disolución de la pared de las esporas, dejando completamente expuestas las endosporas. En la figura 2.11 se observa una micrografía de campo claro de las endosporas, que además se tiñeron con Calcofluor White para corroborar lo de la pared de quitina. En la figura 2.11.B se observa que las endosporas se tiñen correctamente con el colorante.

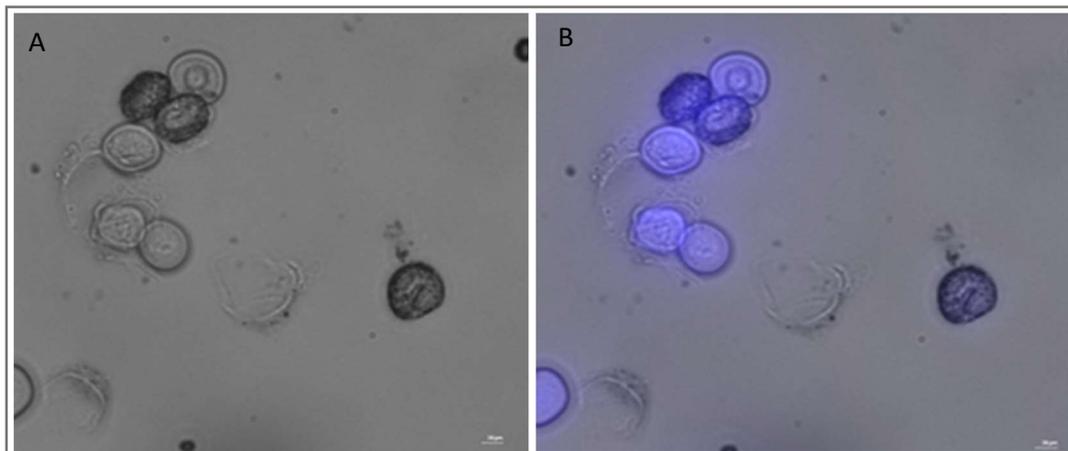


Figura 2.11: Tinción con Calcofluor White de endosporas: A- Endosporas en campo claro, expuestas luego de la hidrólisis alcalina con calor. B- Endosporas teñidas con Calcofluor White donde se observa la tinción de las paredes de las endosporas.

El sobrenadante pigmentado luego de la hidrólisis alcalina, fue neutralizado con HCl fumante hasta alcanzar pH ácido, condición por la cual los pigmentos se precipitaron y se recuperaron por centrifugación. Luego de lavar el pellet y tratar con solventes para remover otros componentes celulares, se analizó un análisis espectrofotométrico (UV-VIS), y se observó un pico máximo de absorción entre 230-250 nm (Figura 2.12) seguido de un descenso marcado de la absorción hasta casi 0 en el rango del visible. Estos resultados fueron comparados, además, con espectros de absorción de melanina comercial y con aquellos hallados en material bibliográfico. En todos los casos el patrón de absorción es muy similar.

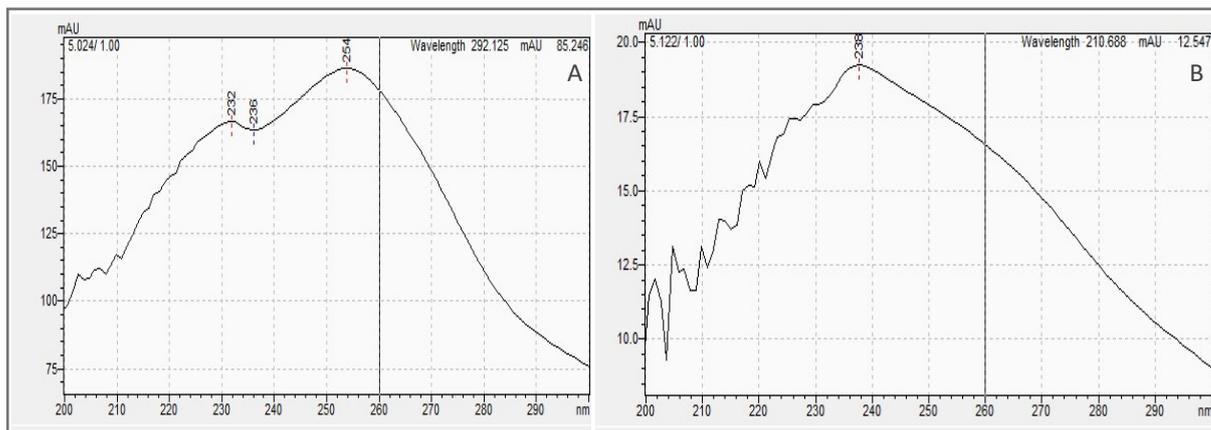


Figura 2.12: Espectro de absorción UV-VIS de melanina DOPA comercial (A) y melanina de teliosporas de *T. frezzii* (B).

En la tabla 2.1, se presentan los resultados comparativos de los picos más significativos obtenidos del análisis por FTIR de absorción de los pigmentos de las esporas de *T. frezzii*. En esta tabla, además se agregan los picos de absorción de melanina DOPA comercial y de melanina obtenida del hongo *Boletus griseus*, según se describe en bibliografía.

Tabla 2.1. Picos principales del espectro FTIR de melanina DOPA sintética, melanina de teliosporas de *T. frezzii* y melanina extraída de *Boletus griseus*.

	PICOS FTIR (cm ⁻¹)					
Melanina sintética	3552	3225	1718	1600	1400	1300
Melanina de <i>T. frezzii</i>	3486	3109	--	1595	1398	1295
Melanina de <i>Boletus griseus</i>	3426	--	--	1600	1390	1300

La señal encontrada entre 3500-3100 cm⁻¹ indica la presencia de enlaces de estiramiento y vibración entre N-H, atribuible a aminas primarias, secundarias y/o aminas asociadas (Ye *et al.*, 2012). El pico a 3480 indica la presencia de enlaces NH₃ libres o unidos correspondientes a amidas primarias. La absorción entre 1680-1550 cm⁻¹ se relaciona con las vibraciones de deformación de enlaces N-H. El pico en 1683 cm⁻¹ y de 1595 cm⁻¹ se

relacionan con la presencia de amidas primarias o secundarias. El pico de 1400 cm^{-1} se corresponde con la energía de vibración de enlaces C-N en amidas primarias. El resto de las bandas se relacionan a enlaces C=C, O-H, fenoles y $\text{CO}_2\text{-H}$. Cabe destacar que, al analizar posibles enlaces para determinar la presencia de azufre (S), no se encontraron absorciones en el rango de energía donde este compuesto es observado, esto es entre $1660\text{-}1620$, $1180\text{-}1160$, $1130\text{-}1080$, $1000\text{-}990$ y $680\text{-}610$. Esto demuestra que el pigmento analizado no contiene S en su composición, por lo que no se trata de feomelanina. Tampoco se detectaron bandas que indiquen la presencia de otros elementos como Cloro (Cl), Bromo (Br), Iodo (I), Manganeseo (Mn) o Silicio (Si). Puede observarse el patrón de absorción de melanina comercial y de *T. frezzii* en la figura 2.13.

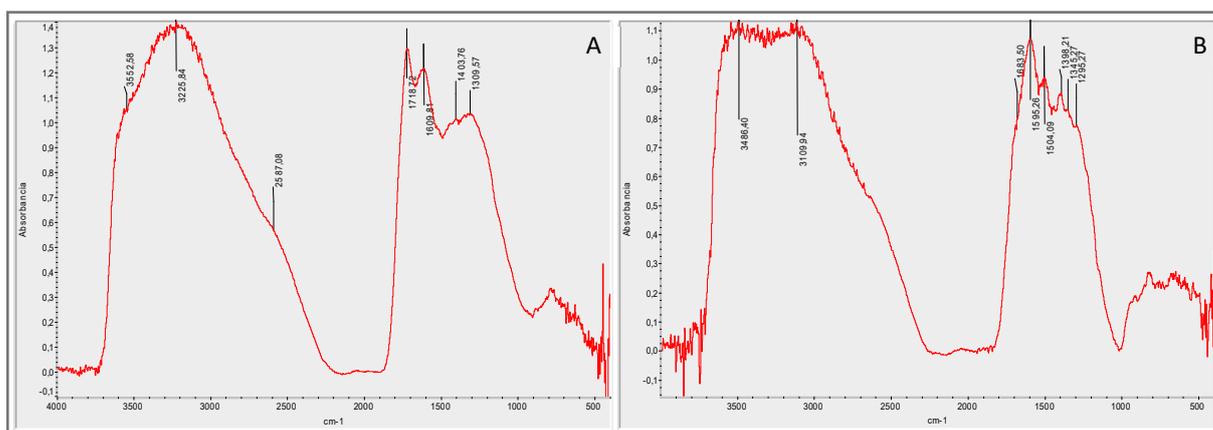


Figura 2.13: Espectro FTIR de melanina DOPA sintética (A) y melanina de teliosporas de *T. frezzii* (B).

Otra herramienta utilizada para la caracterización del pigmento extraído de las esporas de *T. frezzii* fue un análisis por UHPLC/PDA para comparar, en las corridas cromatográficas, si este pigmento se corresponde con la melanina DOPA comercial. En ambas corridas, se observan dos picos superpuestos a los 5 y 5,5 min de corrida. Cuando se realizó un barrido espectral de esos picos, se vio que la absorbancia máxima ocurre a los 250 nm. Esto comprueba que el pigmento aislado de *T. frezzii* corresponde a eumelanina. Para culminar esta caracterización, se realizó un análisis por UHPLC-MSMS con el fin de dilucidar la posible estructura molecular a través de los iones generados en la fragmentación por electrospray (ESI). En la figura 2.14, puede observarse el espectro de masa del pigmento

extraído de teliosporas de *T. frezzii*, donde se detectan 6 picos de mayor abundancia, al realizar el análisis en modo ion+. Los principales picos de interés son los de valor 149 y 181 (m/z) ya que estos picos coinciden con las masas de los compuestos 5,6-dihidroxiindol y tirosina respectivamente. La presencia de ambos picos confirma la existencia de tirosina y sus derivados, los que representan intermediarios claves en la vía sintética de la eumelanina.

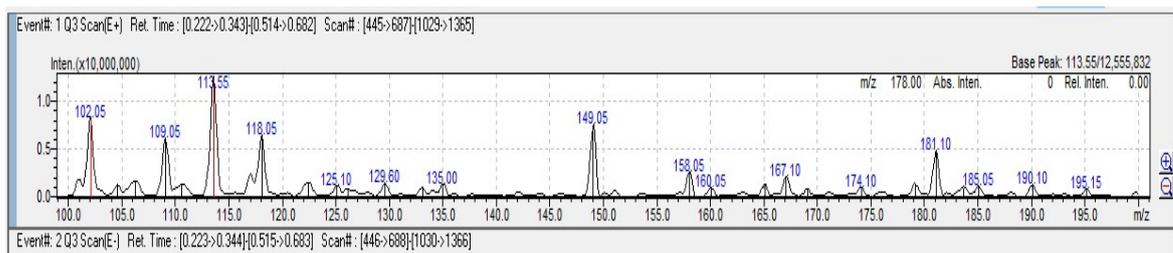


Figura 2.14: Espectro MS – Melanina de *T. frezzii* muestra en NaOH 0,1M inyección 10uL.

DISCUSIÓN

El conocimiento detallado de la estructura de las teliosporas de *T. frezzii*, no documentado previamente, resulta fundamental para entender procesos clave relacionados con la biología del hongo, como el bajo índice de germinación observado en los ensayos de cultivo *in vitro*. Algunos estudios realizados por Astiz Gassó y Marinelli (2013) sugieren que la germinación de las esporas de *T. frezzii* podría aumentar con la presencia de extractos de la planta de maní; sin embargo, estos estudios no proporcionan detalles sobre el índice de germinación alcanzado mediante estos agregados.

Debido a los bajos porcentajes de germinación observados en los medios de cultivo sin aditivos, se planteó la investigación de si la adición de hormonas vegetales podría estimular la germinación, tal como fue observado por Shekara y Safeulla (1979), en el caso de algunos hongos carbonosos, incluyendo especies de la familia *Ustilaginales* y *Tilletias*. Estos autores destacan que el uso de hormonas vegetales como ANA, AIA y giberelinas (GA) incrementan el índice de germinación de estas esporas, así como también, el EDTA resulta un potente estimulador de la germinación. En nuestros resultados, no se encontraron diferencias significativas entre los suplementos ensayados y el control; sin embargo, se constató que la mayor cantidad de UFC de *T. frezzii* se registró en los medios suplementados con KIN, seguido por aquellos con ANA. Andrade *et al.* (2004) destacan que pueden existir variaciones en la germinación de las esporas entre especies de un mismo género y que incluso, estas pueden estar relacionadas con el estadio fisiológico de las esporas aisladas.

A partir de las esporas germinadas *in vitro*, se estudiaron diferentes métodos de conservación a largo plazo para estudios posteriores. Al igual que lo observado en *C. neoformans* (Pérez *et al.*, 2003), la mejor técnica para conservar micelio, resultó ser la de conservación en agua destilada estéril a temperatura ambiente. Cabe destacar que estos autores pudieron conservar la viabilidad de las cepas durante 5 años. Las estructuras de basidiosporas también conservaron su viabilidad durante el periodo ensayado, conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en crioviales.

En la observación de las esporas de *T. frezzii* encontramos que estas se agrupan en glomérulos de 3 a 5 esporas cada uno con un diámetro cercano a 37 μm . Esta característica, coincidente con varias especies de hongos carbonosos (Aponte *et al.*, 2015; Vánky y Lutz, 2007), difiere de lo observado en *Tilletia indica*. En esta última especie, las esporas se encuentran dispersadas de forma individual, sin formación de clusters, y presentan un diámetro promedio cercano a los 40 μm (Turgay *et al.*, 2020). En el trabajo de Vánky y Lutz (2007) se realiza una comparación de la organización de esporas de diferentes especies de *Thecaphoras*, observándose tamaños muy variados entre estas estructuras, con agrupamientos dispares y ornamentaciones heterogéneas.

En *T. frezzii* encontramos una endospora interna protegida por una pared externa, conformada por múltiples capas de estructura variada, al igual que lo hallado en teliosporas de otros carbonos (Piepenbring *et al.*, 1998). Esta pared exterior actúa como barrera de interacción con el hospedante, desempeñando un papel crítico en la patogenicidad. Si esta pared es alterada o no se forma correctamente, esto tiene un efecto marcado en el crecimiento y la morfología de las células fúngicas, llevando probablemente a la lisis celular. Como indica Potón (2008), la integridad y el funcionamiento adecuado de las paredes externas, es crucial para el desarrollo y la patogenicidad del hongo.

En el presente trabajo, se empleó la microscopía de campo claro y SEM para analizar las paredes de las esporas, y se encontró que la superficie se encuentra ornamentada con una pigmentación marrón característica. Estas ornamentaciones se describieron previamente para otros carbonos, como *T. solani*, donde se destaca una rugosidad marcada en la superficie de las teliosporas (Andrade *et al.*, 2004). Piepenbring *et al.* (1998) también describen que la mayor parte de las teliosporas de los hongos carbonosos son ornamentadas, sin embargo, su composición aún es discutida. Estos autores observaron en especies de *Ustilago*, un grosor de la pared de 1 a 4 μm , similar a las mediciones obtenidas en *T. frezzii*. En coincidencia con nuestros hallazgos, estos autores también observaron una capa media de organización uniforme en esporas de *Tilletia* y *Ustilago*, seguida por capa interna densa conformada por lípidos, lo que le daría impermeabilidad a la pared.

La estructura interna de las teliosporas de *T. frezzii* también se analizó mediante microscopía electrónica (TEM) de muestras teñidas con el protocolo estándar de tetróxido de osmio, aunque las teliosporas a menudo fueron difíciles de fijar y cortar para TEM, como

lo describió Piepenbring *et al.* (1998), atribuible a la gruesa pared externa electrodensa, observada previamente por SEM. En la endospora interna se encontró una superficie lisa con fibras alineadas longitudinalmente, coincidiendo con la disposición de las fibras de quitina en muestras comerciales. En *T. solani*, Andrade *et al.* (2004) mencionan las teliosporas vacías, es decir sin endosporas, como teliosporas estériles, aunque con la ornamentación y rugosidad aparentemente intactas. Esto coincide con nuestras primeras determinaciones, sin embargo, el tratamiento con ácido permitió permear la pared, permitir el ingreso de la resina y realizar los cortes correctamente, preservando las ultraestructuras celulares. Luego pudimos observar el citoplasma con organelas poco distinguibles, salvo abundante material poco electrodensado almacenado, compatibles con cuerpos lipídicos que ocupan la mayor parte del citoplasma. Eso también se describió para las esporas de hongos micorrízicos arbusculares, donde los autores destacan el importante papel de los lípidos, no solo como almacenamiento sino también involucrados en la simbiosis con la planta (Kameoka y Gutjahr, 2022).

Luego de analizar por TEM y encontrar las estructuras celulares en las esporas incluidas con resina, se estudió la viabilidad de estas células a través de métodos de tinción con colorantes que marcan células vivas (FDA) y muertas (PI). Debido a que estos colorantes son fluorescentes, encontramos una marcada interferencia entre el color de la marcación y la autofluorescencia propia de las esporas. Dreyer *et al.* (2006) observaron en *Glomus intraradices* que bajo excitación con luz azul o verde las esporas presentaban una autofluorescencia verde y roja respectivamente. En nuestro estudio, observamos la fluorescencia verde en las teliosporas de *T. frezzii*, incluso cuando no se utilizó tinción. También fueron positivos cuando se tiñeron con FDA (verde), sin embargo, no se pudo observar fluorescencia de PI (rojo). Eso difiere de Vittal *et al.* (2012) cuando utilizaron el método de tinción dual FDA-PI para determinar la viabilidad de una amplia variedad de esporas fúngicas y pudieron distinguir con éxito entre uredinosporas viables y no viables en una mezcla que contenía esporas vivas y muertas.

El fenómeno de autofluorescencia ha sido poco investigado en hongos, su principal aplicación fue destinada a detección de hongos en tejidos hospederos, o en ambientes naturales, para estudios de biodegradación de químicos, entre otros (Opitz *et al.*, 2003). Las fuentes potenciales de autofluorescencia celular en hongos pueden ser flavinas, lipofuscinas, porfirina, lignina y otras sustancias (Žižka y Gabriel, 2006). También se planteó la hipótesis

de que la quitina podría ser la causa de la autofluorescencia fúngica debido a las similitudes observadas cuando las células fúngicas se tiñeron con Calcofluor White (que se une a la quitina en las paredes celulares fúngicas). Recientemente, se sugirió al ergosterol, un lípido de membrana que se encuentra en las paredes celulares de los hongos, como otra fuente de autofluorescencia (Breyer *et al.*, 2021). Estos autores observaron una intensidad variable de autofluorescencia al estudiar cuatro especies de hongos marinos diferentes. Esta fluorescencia varía incluso con diferentes canales de emisión y relacionan la fluorescencia con la presencia de quitina, confirmada por tinción con Calcofluor White.

En nuestro estudio, solo encontramos autofluorescencia en el canal FITC al estudiar las teliosporas de *T. frezzii*; eso también se encontró al analizar la intensidad de la autofluorescencia de *Aspergillus flavus*, *Micosporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans* (Lin *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando teñimos teliosporas enteras con colorante Calcofluor White para confirmar la presencia de quitina, las esporas no se tiñeron, por lo que confirmamos que el componente principal de la pared exterior no era quitina. Zaki *et al.* (2018) encontraron autofluorescencia en diferentes estructuras de *Pseudozyma flocculosa*, un hongo basidiomiceto, y la atribuyeron a la melanina en la capa externa, agrupada en gránulos electrodensos. Eso también se describió para *Pseudallescheria boydii*, donde la capa externa de los conidios está compuesta de melanina. Pralea *et al.* (2019) describieron en las paredes externas de *Auricularia auricular*, *Cryptococcus neoformans*, *Inonotus hispidus*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Termitomyces albuminosus*, la presencia de gránulos compuestos por diferentes tipos de melanina. En nuestro trabajo, cuando tratamos las teliosporas con hidrólisis alcalina con temperatura (3M NaOH-120 °C), observamos que los gránulos desaparecen y las endosporas quedan expuestas. Fue luego de eliminar esta gruesa capa externa y añadir el colorante Calcofluor White que la pared de las endosporas se tiñó de azul, indicando la presencia de quitina en esta capa interna.

Debido a la marcada pigmentación natural de las esporas, observadas al microscopio de campo claro, y a la remoción de la capa más externa de las mismas cuando se trataron con hidrólisis alcalina, surgió la posibilidad de analizar si el pigmento externo se trataría de melanina. Existen estudios previos que indican que, en condiciones oxidantes la melanina tiene la capacidad de autofluorescer (Juravel *et al.*, 2023). Kayatz *et al.* (2001) señalan que la fluorescencia de la melanina ante agentes oxidantes sería causada por defectos que causan

estos agentes en el polímero. En aquel estudio, la incubación de melanina con peróxido de hidrógeno condujo a una degradación oxidativa del polímero, incrementando la intensidad de la autofluorescencia.

Por todo lo señalado anteriormente, resultó de gran importancia caracterizar el tipo de melanina en la capa externa, ya que esto podría llevar a describir las rutas sintéticas involucradas en el desarrollo de estas teliosporas. Cuando analizamos los espectros UV de los pigmentos extraídos de las esporas, encontramos un pico a 250 nm, con una forma espectral muy similar a la melanina DOPA. Eso concuerda con los resultados de melanina extraída de *P. flocculosa* (Pralea *et al.*, 2019), aunque en aquel estudio encontraron el máximo de absorción a 296 nm. Estos autores describen que, para la mayoría de los tipos de melanina, la longitud de onda máxima de absorción de las soluciones alcalinas oscila entre 196 y 300 nm, según la fuente de melanina. Estas soluciones exhiben una fuerte absorción de luz UV que disminuye gradualmente hacia longitudes de onda más largas. Esa absorción se asigna a las moléculas conjugadas complejas en la estructura de melanina que absorben y dispersan fotones de luz ultravioleta.

Uno de los métodos más importantes para identificar y caracterizar la estructura de la melanina es la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) (Pralea *et al.*, 2019). Aunque los espectros IR de la melanina fúngica son ligeramente diferentes según el tipo de melanina y el procedimiento de extracción, existen bandas características que se pueden rastrear para identificar los principales grupos funcionales de la macromolécula de melanina. En nuestro análisis FTIR de melanina extraída de teliosporas de *T. frezzii*, encontramos un espectro similar con melanina sintética, con bandas características que cubren $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

Pralea *et al.* (2019) encontraron espectros similares al analizar melanina de diferentes hongos, que presentan estas bandas características en esas longitudes de onda, lo que permite identificar los principales grupos funcionales de esta macromolécula. La ausencia de señales por debajo de 1100 cm^{-1} sugiere la ausencia de moléculas de azufre, específicamente cisteína, que es un componente distintivo de un tipo diferente de pigmento llamado feomelanina. En ausencia de tioles (cisteína o glutatión), se produce eumelanina marrón-negra (Cichorek *et al.*, 2013). La DOPAquinona se cicla espontáneamente a DOPA-chrome que genera 5,6-dihidroxiindol (DHI), que rápidamente se oxida y polimeriza para formar DHI-melanina

insoluble de color marrón oscuro-negro. Sin embargo, DOPA-chrome puede formar ácido DHI-2-carboxílico (DHICA) para posteriores conversiones a una DHICA-melanina de color marrón más claro (Del Marmol y Beermann, 1996). En el análisis de MS de la melanina de *T. frezzii* encontramos dos picos principales (m/z 181 y m/z 149) que podrían considerarse los principales precursores de la eumelanina, es decir, tirosina y DHI.

CONCLUSIONES

En este estudio se presenta la primera descripción completa de la morfología y las estructuras de las teliosporas de *T. frezzii*, proporcionando información esencial sobre sus características. Se realizó un estudio exhaustivo debido al escaso índice germinativo de las teliosporas *in vitro* y se establecieron técnicas de conservación de las estructuras obtenidas en los medios de cultivo. A través de microscopía TEM y SEM, identificamos una endospora con un contenido significativo de lípidos en el citosol, junto con grupos electro-densos compatibles con agregados de proteínas y ribosomas. Las endosporas se presentan cubiertas por una pared externa de quitina.

En el exterior de las esporas, se encuentra una pared con capas de organización variable, que incluyen una capa de fibras longitudinales y otra capa compacta homogénea. Hacia el exterior, se presenta una gruesa capa con ornamentaciones. El análisis reveló que la melanina constituye el componente principal de esta capa externa, identificada específicamente como eumelanina a través de la caracterización química. El análisis reveló que la melanina constituye el componente principal de esta capa externa, identificada específicamente como eumelanina a través de la caracterización química. Si bien la presencia de melanina en varios hongos se ha informado anteriormente, se ha reconocido su papel en la protección contra amenazas ambientales y relacionadas con el huésped, actuando como un componente antigénico y modulando la respuesta inmune del huésped. La importancia de este estudio radica en su descubrimiento pionero, que marca la primera identificación de la melanina como componente principal de las esporas de *T. frezzii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade O., Muñoz G., Galdames R., Durán P. & Honorato R. 2004. Characterization, *in vitro* culture, and molecular analysis of *Thecaphora solani*, the causal agent of potato smut. *Etiology*, 94 (8).
- Aponte P. M., Méndez K. S., Ramírez P. V. y Silvia F. Pachacama. 2015. Caracterización morfológica de esporas de *Thecaphora solani* a través de microscopia confocal y técnicas histológicas. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 2 (1). <https://doi.org/10.36331/revista.v2i1.1>.
- Arias S.L., Mary V.S., Velez P.A., Rodriguez M.G., Otaiza-González S.N. & Theumer M.G. 2021. Where Does the Peanut Smut Pathogen, *Thecaphora frezii*, Fit in the Spectrum of Smut Diseases? *Plant Disease*, 105 (9).
- Astiz Gassó M. y Marinelli A. 2013. Biología de la germinación de *Thecaphora frezii* *in vitro*. 28^o Jornada Nacional de Maní, 62–63.
- Bárcena A. 2016. Estudio de las melaninas de *Pseudocercospora griseola*, agente causante de la mancha angular del poroto y rol biológico. *Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata*.
- Beltrán-García M. J., Prado F. M., Oliveira M. S., Ortiz-Mendoza D., Scalfo A. C., Pessoa A., Medeiros M. H. G., White J. F. & Di Mascio P. 2014. Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black sigatoka disease of bananas. *PLoS ONE*, 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>.
- Breyer E., Böhm M., Reitbauer M., Amano C., Heitger M. & Baltar F. 2021. Autofluorescence is a common trait in different oceanic fungi. *Journal of Fungi*, 7 (9). <https://doi.org/10.3390/jof7090709>.
- Castellani A. 1963. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathol Mycol Appl.* 20, 1-6. 10.1007/BF02054872.
- Cazón L. I., Paredes J. A. & Rago A. M. 2018. The biology of *Thecaphora frezii* smut and its effects on Argentine peanut production. *Advances in Plant Pathology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75837>.
- Cazón L.I. 2015. DETECCIÓN MOLECULAR DE *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist EN SEMILLAS DE MANÍ (*Arachis hypogaea* L.). *Tesis Doctoral FCA-UNC*, 1–62.

- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A. & Tymińska A. 2013. Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30 (1), 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>.
- Del Marmol V. & Beermann F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS 16723 FEBS Letters*, 381.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>. Acceso octubre 2022.
- Dreyer B., Morte A., Pérez-Gilabert M. & Honrubia M. 2006. Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method. *Mycological Research*, 110 (8), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.05.011>.
- Eisenman H. C. & Casadevall A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (3), 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>.
- Flaven-Pouchon, J. & Moussian, B. 2022. Fluorescent microscopy-based detection of chitin in intact *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.856369>.
- Gadd G. M. 1982. Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 78 (1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(82\)80083-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(82)80083-1).
- Jacobson E. S. 2000. *Pathogenic roles for fungal melanins*. *Clin Microbiol Rev.*, 13 (4), 708-717.
- Juravel E., Polacheck I., Isaacson B., Dagan A. & Korem M. 2023. The distinction between dematiaceous molds and non-dematiaceous fungi in clinical and spiked samples treated with hydrogen peroxide using direct fluorescence microscopy. *Journal of Fungi*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jof9020227>.
- Kameoka H. & Gutjahr C. 2022. Functions of lipids in development and reproduction of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Physiol.*, 63 (10), 1356–1365.
- Kayatz P., Thumann G., Luther T. T., Jordan J. F., Ulrich Bartz-Schmidt K., Esser P. J. & Schraermeyer U. 2001. Oxidation Causes Melanin Fluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42 (1), 241-6.
- Lin S. J., Tan H. Y., Kuo C. J., Wu R. J., Wang S. H., Chen W. L., Jee S. H. & Dong C. Y. 2009. Multiphoton autofluorescence spectral analysis for fungus imaging and identification. *Applied Physics Letters*, 95 (4). <https://doi.org/10.1063/1.3189084>.
- Liu Q., Xiao J., Liu B., Zhuang Y. & Sun L. 2018. Study on the preparation and chemical structure characterization of melanin from *Boletus griseus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123736>.

- Opitz S., Schnitzler J.P., Hause B. & Schneider B. 2003. Histochemical analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum* (Hemodoraceae). *Planta*, 216, 881–889.
- Pérez C., Mata-Essayag S., Hartung de Capriles C., Roselló A., Colella M.T. & Olaizola C. 2003. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Rev Soc Ven Microbiol.*, 23, 153–157.
- Piepenbring M., Bauer R. & Oberwinkler F. 1998. Teliospores of smut fungi General aspects of teliospore walls and sporogenesis. *Protoplasma* (204).
- Potón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* , 25, 78–82.
- Pralea I. E., Moldovan R. C., Petrache A. M., Iliés M., Hegheș S. C., Ielciu I., Nicoară R., Moldovan M., Ene M., Radu M., Uifălean A. & Iuga C. A. 2019. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163943>.
- Shekara H. & Safeeulla K. M. 1979. Stimulation of teliospore germination in smut fungi. *Prec. Indian Acad. Sci.*, 88.
- Shirasaka N., Harazono K., Nakahigashi R., Mitsui K., Tanaka J., Tanazawa S., Mitsutomi M. & Ohnuma T. 2019. Characterization of a GH Family 20 Exo-β-N-acetylhexosaminidase with Antifungal Activity from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Applied Glycoscience*, 66(3), 83–88. https://doi.org/10.5458/jag.jag.jag-2019_0001.
- Solano F. 2014. Melanins: Skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>.
- Stiefel P., Schmidt-Emrich S., Maniura-Weber K. & Ren Q. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*, 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>.
- Trione E.J. 1973. The physiology of germination of *Tilletia* teliospores. *Phytopathology*, 63, 643–648.
- Turgay E. B., Oğuz A. Ç. & Ölmez F. 2020. Karnal bunt (*Tilletia indica*) in wheat. *Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat*, 229–241.
- Vánky K. & Lutz M. 2007. Revision of some *Thecaphora* species (Ustilaginomycotina) on Caryophyllaceae. *Mycological Research*, 111 (10), 1207–1219. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.007>.
- Vijayan V., Jasmin C., Anas A., Parakkaparambil Kuttan S., Vinothkumar S., Perunninakulath Subrayan P. & Nair S. 2017. Sponge-associated bacteria produce non-cytotoxic melanin which protects animal cells from photo-toxicity. *Applied*

Biochemistry and Biotechnology, 183(1), 396–411. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2453-0>.

Vittal R., Haudenshield J.S. & Hartman G.L. 2012. A multiplexed immunofluorescence method identifies *Phakopsora pachyrhizi* uredinospores and determines their viability. *Mycologia*, 102 (12).

Wu C. H. & Warren, H. L. 1984. Natural autofluorescence in fungi, and its correlation with viability. *Mycologia*, 76 (6).

Ye M., Wang Y., Guo G. Y., He Y. L., Lu Y., Ye Y. W., Yang Q. H. & Yang, P. Z. 2012. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346. *Food Chemistry*, 135 (4), 2490–2497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.120>.

Zaki O., Weekers F., Compere P., Jacques P., Thonart P. & Sabri, A. 2018. Morphological differences between aerial and submerged sporidia of bio-fungicide *Pseudozyma flocculosa* CBS 16788. *PLoS ONE*, 13 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201677>

Žižka, Z. & Gabriel J. 2006. Primary fluorescence (autofluorescence) of fruiting bodies of the wood-rotting fungus *Fomes fomentarius*. *Folia Microbiol.*, 51 (2). <http://www.biomed.cas.cz/mbu/fovia/>.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS TRES ESTADIOS DE *T. FREZZII*

INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos y los procesos de secuenciación han generado un cambio de paradigma en el campo de la micología contemporánea. Las disciplinas “ómicas” (como la genómica, transcriptómica y proteómica, entre otras) han impulsado significativamente la investigación de diversos patógenos fúngicos. Estas metodologías han reducido tanto el costo como el tiempo requerido en los procedimientos, permitiendo además el análisis simultáneo de múltiples aislamientos (Ramlal *et al.*, 2023). Estas herramientas representan una modalidad novedosa de análisis sistemático, posibilitando la correlación entre diversos factores que explican tanto la patogénesis como los mecanismos empleados por los hongos para completar su ciclo de vida (Chen *et al.*, 2019).

Cabe destacar la importancia de la secuenciación genómica del organismo bajo estudio, dado que es un requisito fundamental para su comparación posterior con información previamente documentada sobre sus semejantes. En el caso de *T. frezzii*, la obtención y secuenciación del genoma fue inicialmente un desafío considerable. En su lugar, se llevó a cabo una caracterización del ADN mitocondrial (Conforto *et al.*, 2013), lo que posibilitó realizar ciertas inferencias. Sin embargo, no fue sino hasta diez años más tarde que se logró secuenciar el genoma de este hongo a partir de sus hifas (Arias *et al.*, 2023). En el pasado, los análisis transcriptómicos mediante técnicas como los “microarrays” presentaban una limitación significativa debido a la necesidad de caracterizar los genes previamente al estudio.

Debido a que aún no se conocía el genoma de *T. frezzii* en el transcurso de realización del presente trabajo, se procedió con la técnica de secuenciamiento de ARN (“RNASequencing” o “RNASeq”) que presenta ciertas ventajas como su menor costo, alta sensibilidad, precisión y gran cobertura de secuenciación. El transcriptoma de un organismo estudia el conjunto completo de transcritos de una célula y la variación en la cantidad de transcritos en una etapa específica del desarrollo o en una condición fisiológica particular (Hernández, 2019). Entre sus principales aplicaciones, se encuentra la diferenciación y clasificación en ARNm, ARN no codificantes y ARN pequeños. Además, permite conocer la estructura transcripcional de los genes, los patrones de empalme y las modificaciones postranscripcionales, incluso también permite cuantificar los niveles de expresión cambiante durante el desarrollo fúngico (Chen *et al.*, 2019).

En este capítulo, se presentan los principales resultados obtenidos a partir de la secuenciación de transcritos por la técnica de RNASeq. Por una parte, se aborda el estudio de los transcritos relacionados al ciclo de vida de *T. frezzii* y a las modificaciones en la expresión génica que acompaña a las alteraciones en su estructura. Por otra parte, se agrupan los análisis de transcritos relacionados a los procesos de patogénesis, compatibles con su expresión en el momento de infección. En ambos casos, se propone denotar la importancia de conocer cómo estos cambios en la expresión génica acompañan a los procesos más relevantes del ciclo de vida del hongo.

Análisis de transcritos relacionados a modificaciones estructurales

Como se ha descrito en capítulos anteriores, el hongo *T. frezzii* atraviesa un estado germinativo para pasar de teliosporas (estructuras de resistencia) a hifas (estructuras infectivas), como parte de su ciclo de vida. Esto también ha sido observado para otros hongos tales como *Ophiostoma ulmi*, *Taphrina deformans* y *Holleya sinecauda* (Gauthier, 2015), como así también aquellos de la familia de Ustilaginales, como *U. maydis* y *Microbotryum violaceum* (Smith *et al.*, 2003). Estudios previos han identificado en *U. maydis* una expresión génica diferencial durante la germinación de sus teliosporas, donde se observó un aumento en el nivel proteico durante las primeras 6 h desde el inicio de la germinación, acompañado de un aumento en la síntesis de ARN (Zahiri *et al.*, 2005). Estos cambios morfológicos,

muchas veces disparados por señales del ambiente, son controlados por vías genéticas complejas que aseguran el desarrollo exitoso del patógeno.

Se puede realizar una agrupación de los genes según su participación durante la transición de un estadio al siguiente; por ejemplo, genes relacionados al metabolismo fúngico, a las vías de transporte y comunicación celular, al procesamiento del ADN, a los procesos de detoxificación, energía, interacción para la nutrición, estrés celular, procesos de diferenciación y biogénesis, transcripción y virulencia.

Durante el desarrollo de estos procesos, se producen modificaciones a nivel estructural de las células. Uno de los componentes que participa en esta reestructuración es la quitina, una molécula que conforma tanto las paredes de los hongos, así como el exoesqueleto de algunos artrópodos, por lo que constituye uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, luego de la celulosa. Esta pared fúngica sirve como un mecanismo de defensa contra varias clases de estreses ambientales, aunque también puede actuar como un factor de virulencia (Kim *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 2011). Se ha descrito con anterioridad que este polímero es requerido para el crecimiento de las hifas y producción de esporas (Lenardon *et al.*, 2010).

La biosíntesis de quitina es catalizada por una familia de enzimas Glicosiltransferasas clase 2 (GT2s) (Coutinho *et al.*, 2003), que representan un grupo de enzimas limitantes en esta vía biosintética, también llamadas enzimas quitina-sintasas (CHS), ampliamente distribuida entre diferentes tipos de hongos (Lenardon *et al.*, 2010; Roncero, 2002). Estas enzimas presentan secuencias características, como los sitios peptídicos de secuencia QXXRW (Campbell *et al.*, 1997).

Numerosas modificaciones estructurales requieren de la plasticidad de la pared celular, para lo cual la quitina debe poder ser degradada por una serie de enzimas, como las Glicosil-hidrolasas (GH), entre ellas GH18 y GH20, y las monooxigenasas de lisis de polisacáridos (LPMO). La quitinasa GH18, libera los oligosacáridos solubles en agua, mientras que la GH20, una acetilglucosaminidasa, degrada los productos removidos por las quitinasas en monómeros. Por su parte la LPMO realiza cortes oxidativos en las cadenas de quitina (Bowman y Free, 2006; Forsberg *et al.*, 2016; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

En este estudio, se realizaron análisis de transcritos y las secuencias proteicas deducidas a partir de ellos, para conocer su potencial actividad quitinasa y quitina-sintasa en los diferentes estadios de *T. frezzii*. Paralelamente, para conocer si estos transcritos se traducen finalmente en enzimas, se midió la actividad quitinasa *in vitro* en extractos proteicos de estas estructuras. Esto se comparó con las secuencias de estas mismas enzimas descritas para los hongos *U. maydis* y *Anthracoystis flocculosa*, debido principalmente a la similitud en las secuencias encontradas entre estos hongos.

Otro de los componentes estructurales de la pared de los hongos pigmentados, es el polímero de melanina, como se ha descrito en el capítulo anterior. La melanina tiene una amplia diversidad de funciones en varios organismos; en particular, en hongos se ha relacionado con la capacidad de supervivencia ante condiciones desfavorables, además de participar como potencial factor de virulencia y resistencia a la acción de drogas antifúngicas (Pralea *et al.*, 2019).

La melanina no es una sustancia única, se la considera como un amplio grupo de pigmentos que tienen propiedades similares (Urán y Cano, 2008). Es dispersada como partículas intactas en agua y algunos solventes polares, aunque su solubilidad es escasa en la mayoría de los solventes, lo que representa un desafío para las técnicas de caracterización convencionales (Cao *et al.*, 2021). Sin embargo, se han presentado avances en la descripción de las vías sintéticas y de las principales enzimas que participan en su constitución. Eisenman y Casadevall (2012) afirman que la participación enzimática depende del tipo de melanina que se crea; así, por ejemplo, en la síntesis de DHN-melanina, una de las enzimas fundamentales en su síntesis es la policétido-sintasa, mientras que para las melaninas derivadas de DOPA, las lacasas cumplen un rol fundamental en su producción. En las eumelaninas, la principal molécula de origen es la tirosina, contando como intermediarios la L-DOPA, el 5,6-dihidroindol (DHI) y ácido 5,6-dihidroindole-2-carboxílico (DHICA), entre otros (Del Marmol y Beermann, 1996). Alternativamente en esta misma vía, la introducción de un aminoácido sulfurado, como la cisteína, da lugar a otro tipo de melanina, la feomelanina, relacionada principalmente a la pigmentación rojiza. Existen otros tipos de moléculas precursoras, como acetato, malonyl-CoA y catecoles, que dan origen a las allomelaninas. En el anterior capítulo se realizó una caracterización exhaustiva de las melaninas presentes en las teliosporas de *T. frezzii*, por lo que en el presente capítulo se

indagó en la presencia de transcriptos relacionados a las vías enzimáticas de la síntesis de eumelanina.

Patogenicidad y expresión génica

Otro de los aspectos analizados a partir de la secuenciación e identificación de los transcriptos, se refiere a aquellos relacionados con los factores de patogenicidad y virulencia. Los organismos fitopatógenos secretan proteínas de virulencia conocidas como efectores, que colonizan y modulan las funciones de las plantas hospederas (Soria *et al.*, 2022). Arias *et al.* (2021) en su trabajo sobre hongos carbonosos, menciona a los efectores como armas con diferentes mecanismos de ataque e incluso de defensa frente a los hospederos. Las proteínas efectoras están clasificadas en apoplásticas o citoplasmáticas, de acuerdo a su zona de acción en el contacto con la planta hospedera; es decir, pueden ser secretadas al espacio intercelular (apoplasto) actuando en el espacio entre la planta y el patógeno, o ser traslocado hacia el citoplasma de la célula hospedera (Lanver *et al.*, 2017). Uno de los mecanismos involucrados en la irrupción de los tejidos vegetales, se produce a partir de la secreción de enzimas que ataquen la pared celular, ya que esta representa una barrera vegetal para limitar la acción de los microorganismos. Estas enzimas se agrupan en las llamadas PCWDE (por las siglas en inglés de “Plant Cell Wall Degrading Enzymes”) (Kubicek *et al.*, 2014) y representan un sistema complejo de degradación de la pared celular. Por su marcada acción sobre los carbohidratos que la forman, han sido denominadas CAZymes (por su sigla en inglés “Carbohydrate-Active enZyme”). Dentro de este amplio arsenal enzimático, podemos mencionar las Glicosido-Hidrolasas (GH), Polisacarido-Liasas (PL), Carbohidrato-Esterasas (CE), enzimas con actividades auxiliares (AA) y Módulos no catalíticos de unión a Carbohidratos (CBM) (Boraston *et al.*, 2004; Cantarel *et al.*, 2009; Levasseur *et al.*, 2013).

Dentro de la familia de las GH, podemos agrupar a las **celulasas** como las Cellobiohidrolasa I y II (GH7 y GH6 respectivamente) y las endoglucanasas (GH5); también se encuentran las **xilanasas**, entre ellas, las endo- β -1,4 xilanasas (GH10, GH11), las α -L-arabinofuranosidasas (GH3, GH10, GH43, GH51, GH54 y GH62), las β -xilosidasas (GH43 y GH3). En el grupo de las CE, se han categorizado las acetilxilano-esterasas (CE1–CE7), y las ácido-ferúlico-esterasas (CE1); además de las **pectinasas**, enzimas encargadas de la degradación de la pectina a través de numerosas vías de acción, entre ellas, las

poligalacturonasas, las polisacárido-liasas y las ramnogalacturonano-liasas, entre otras (Louise Glass *et al.*, 2013).

La identificación y comparación de estas CAZymes en hongos con diferentes métodos de nutrición o mecanismos de infección, pueden proveer información para un mejor entendimiento del ciclo de vida del patógeno y sus patrones de infección (Zhao *et al.*, 2014). En estudios previos relacionados a otros patógenos fúngicos, como *U. maydis* y *M. oryzae*, se ha observado un incremento en la expresión génica que codifican para celulasas, hemicelulasas y pectato-liasas (Mathioni *et al.*, 2011 Martínez-Soto *et al.*, 2013;). Los autores destacan que muchos organismos, de acuerdo a determinadas condiciones ambientales, pueden adaptar la síntesis de enzimas específicas de acuerdo, por ejemplo, a la disponibilidad de carbono. Por ello, la función de algunas enzimas puede ser regulada por los niveles de glucosa disponible, como es el caso de la Snf1 (por sus siglas en inglés “non-fermentative sucrose protein kinase serine threonine 1”) (Tzima *et al.*, 2011) cuyo rol se ha asignado a múltiples mecanismos celulares. En el presente trabajo se propuso identificar, al menos parcialmente, fragmentos de transcritos de *snf1* en *T. frezzii*, cuya expresión podría condicionar los niveles de expresión de otras PCWDEs.

Al igual que Snf1, se han encontrado otros efectores en *U. maydis*, como el Pep1 (por sus siglas en inglés “Protein essential during penetration 1”). Si bien *U. maydis* no posee una maquinaria tan importante en relación a sus PCWDEs, básicamente por el tipo de infección que realiza en el hospedero, sí se ha destacado el rol de esta proteína Pep1 en el proceso de penetración (Doehlemann *et al.*, 2009). Estos autores observaron en mutantes delecionadas del gen *pep1* en *U. maydis*, la adecuada formación de las estructuras de penetración, pero esta se detenía inmediatamente después del traspaso de la epidermis. La función atribuida a Pep1 en este patosistema es la inhibición de una enzima peroxidasa (POX12), la cual representa uno de los componentes principales en el “burst oxidativo”, suprimiendo así la respuesta del huésped. Este efector se acumula particularmente en sitios de pasajes de célula a célula de hifas biotróficas de *U. maydis*, aunque no es exclusivo de este organismo, ya que también se ha relacionado con el carbón de cebada *U. hordei*, indicando la función conservada de Pep1 en otros biótrofos fúngicos (Doehlemann *et al.*, 2017). En *T. thlaspeos*, se describió la función de Pep1 bloqueando la enzima peroxidasa de *A. thaliana* (PR33/34) (Courville *et al.*, 2019).

La búsqueda de proteínas ortólogas generalmente se realiza en base a la homología de secuencia, pero en el caso de los efectores, este análisis se vuelve muy difícil ya que mutan y se adaptan a su huésped y ambiente, transformándose en ocasiones en secuencias muy diferentes. Si bien no hay una descripción exhaustiva de los efectores presentes en *T. frezzii*, se han estudiado alternativas, como la presentada por Mary *et al.* (2019), donde se indica que este hongo podría modular la respuesta inmune vegetal a través de la vía de señalización de jasmonatos, demostrando que estos mecanismos de inmunomodulación pueden ser efectuados por las teliosporas o promicelio presentes en el suelo, favoreciendo potencialmente la invasión.

El conocimiento de los efectores expresados en la interacción planta-patógeno contribuye a la comprensión de los mecanismos utilizados en los procesos infecciosos. Sin embargo, muchas veces estas metodologías son costosas y lentas ya que implican la creación de nuevas variantes o el estudio de la interacción *in vivo*. En la práctica, es posible estudiar algunos efectores expresados por diferentes patógenos en sistemas modelo, como *U. maydis* (Doehlemann *et al.*, 2009). En este capítulo se analiza la presencia de posibles efectores expresados por *Thecaphora frezzii*, a través del análisis de múltiples transcritos asociados a diferentes mecanismos de acción.

MATERIALES Y MÉTODOS

*1. Aislamiento y cultivo de *Thecaphora frezzii**

Las teliosporas de *T. frezzii* fueron obtenidas de cajas de maní que presentaban síntomas de enfermedad (hipertrofia) y desinfectadas superficialmente con etanol. Las teliosporas se desinfectaron con una solución al 5% (v/v) de hipoclorito de sodio (55 gramos de cloro activo/L) durante 5 min y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 10 min. Las hifas fueron obtenidas por germinación de las teliosporas en placas con medio PDA incubadas a 26 °C en oscuridad, hasta el momento de germinación. Las basidiosporas se obtuvieron a partir de las hifas crecidas en medio sólido, las cuales se sembraron en agar agua (1,5% p/v de agar-agar). Se corroboró la formación de dichas estructuras mediante microscopía óptica, como se describió en el capítulo 2.

*2. Tinción de núcleos de hifas de *Thecaphora frezzii**

Para confirmar la presencia de hifas monocarióticas obtenidas a partir de la germinación de las teliosporas en medio de cultivo PDA, se realizó una tinción de núcleos siguiendo la técnica descrita por Arias *et al.* (2023). Brevemente, las hifas se incubaron durante 24 h en etanol al 70% (v/v), luego se lavaron con agua destilada estéril, para luego ser tratadas con enzimas ARNasas (65 °C, 10 min). Luego de sedimentar y lavar el material, se resuspendió en una solución al 1% de yoduro de propidio, se incubó durante 10 min, luego se lavó dos veces con agua destilada estéril. Los núcleos celulares fueron visualizados en microscopio de fluorescencia Zeiss - Axio observer D1 (Zeiss, Alemania). Las micrografías fueron tomadas con una Mono-cámara AxioCam 506 y las imágenes se procesaron con el software Imaging ZEN 2 Core.

3. *Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc*

El ARN total de los estadios de teliosporas, basidiosporas e hifas de *T. frezzii* (se combinaron tres cultivos independientes para cada etapa) se extrajo usando TRIzol (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNg se eliminó mediante digestión en columna con ADNasa (Qiagen) al doble de la concentración recomendada por el fabricante. Se controló la posible degradación y contaminación del ARN en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) y se confirmó la pureza del ARN usando el espectrofotómetro NanoPhotometer (IMPLEN, CA, EE. UU.). La concentración de ARN se midió con el kit de ensayo de ARN Qubit y el fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, CA, EE. UU.). Las librerías de ADNc fueron preparadas a partir del ARN aislado de las diferentes estructuras de *T. frezzii*.

Brevemente el ARNm fue purificado del ARN total usando bolitas magnéticas de poly-T. La fragmentación se llevó a cabo con cationes divalentes a temperatura elevada con NEB Next First Strand Synthesis Reaction Buffer (5x). Para la síntesis de la primera hebra de ADNc, se realizó una reacción con 1 μ L de Oligo-(dT)20 (50 μ M) (Invitrogen), 1 μ g de ARN total y 400 U de SuperScript III RT (transcriptasa inversa, Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 μ l incubado a 55 °C durante 1 h. La segunda hebra de ADNc fue sintetizada con ADN polimerasa I y ARNasa. Luego se realizó una selección del tamaño y ligado de adaptadores, para luego enriquecer los productos de interés.

4. *Análisis del RNASeq y procesamiento de datos*

Las librerías de ADNc fueron secuenciadas en un equipo Illumina HiSeq 1500 para obtener dos fragmentos de 150 pb en cada extremo, en el laboratorio INDEAR (Rosario, Argentina). Brevemente, se construyó un transcriptoma *de novo* a partir de las lecturas obtenidas; luego, la expresión génica fue calculada para cada condición calculando el valor de cuentas por millón (CPM) de dichas lecturas. La lectura del RNASeq fue verificada usando un software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y

comparadas entre los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*. Para analizar estadísticamente las diferencias en los cambios de expresión entre los estadios, se utilizó un modelo de estadística lineal general, utilizando el paquete de EdgeR versión 3.4.2 en ambiente R (versión 3.0.2 (R Core Team, 2018)).

5. Genes de *T. frezzii* expresados diferencialmente en el pasaje de teliospora a hifa

Uno de los objetivos consiste en diferenciar cuáles genes se encuentran sobre (“up”) o sub (“down”) regulados en el pasaje desde teliosporas a hifas. Para ello, se identificaron los genes con una diferencia de al menos dos veces en el nivel de expresión entre ambos estadios, para establecer si hubo una regulación positiva o negativa sobre esos genes; sin embargo, fueron tenidos en cuenta algunos genes de particular interés, que ya habían sido previamente descritos en bibliografía para otros hongos, aun si la diferencia de expresión entre los estadios fuera menor. Se utilizó el software FungiFun2 (Priebe *et al.*, 2015), una herramienta para analizar el enriquecimiento funcional de genes de hongos, para obtener anotaciones funcionales de los genes expresados diferencialmente de *T. frezzii* involucrados en la transición entre teliosporas e hifas. Dado que *T. frezzii* no se encuentra presente en la base de datos FungiFun2, se compararon con las secuencias de genes ortólogos de *U. maydis*.

6. Expresión génica de *T. frezzii* asociada a enzimas de las vías metabólicas de melanina

Para identificar la presencia de enzimas involucradas en las vías metabólicas de melaninas, se realizó un análisis de datos obtenidos por RNASeq. A partir de las secuencias deducidas de las proteínas, se indagó sobre la presencia de tirosinasas, lacasas y policétido-sintasas, todas enzimas que participan en la síntesis de diferentes tipos de melanina. La comparación se realizó con secuencias de proteínas homólogas en *U. maydis* y *A. flocculosa*.

7. Expresión génica de *T. frezzii* asociada a enzimas de las vías metabólicas de quitina

7.1. Identificación Quitin-sintasas (CHS) y Quitinasas (CHT) de *T. frezzii*:

Del análisis de datos del RNASeq se evaluó, a partir de las secuencias deducidas de las proteínas, la presencia de posibles enzimas con actividad sobre carbohidratos (CAZymes) utilizando el software dbCAN (por las siglas en inglés “Carbohydrate-active enzyme ANnotation”) (Huang *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2012). El módulo de anotación de CAZymes de este programa emplea los valores de E-value, longitud de alineamiento y cobertura, con un E-value de $< 1e-5$ para alineamientos de longitud >80 aminoácidos y un E-value de $< 1e-3$ para alineamientos de < 80 aminoácidos.

Para eliminar proteínas identificadas por el dbCAN que en realidad no pertenecen al grupo de las CAZymes, se analizaron todas las proteínas que contienen patrones o secuencias específicas asociadas con las CAZymes utilizando herramientas de la NCBI (por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information”) como MyHits, Prosit y BLASTp (Hulo, 2021; Pagni *et al.*, 2007; Sigrist *et al.*, 2012). Para identificar las enzimas CHSs y CHTs que pudieron no ser identificadas por el sistema dbCAN, se realizaron consultas adicionales de dominios en Pfam (El-Gebali *et al.*, 2019; Mistry *et al.*, 2021) y un análisis tBLAST (Altschul, 1997) con proteínas CAZymes previamente caracterizadas (Lombard *et al.*, 2014).

7.2 Caracterización de CHSs y CHTs de *T. frezzii* y análisis de homología e identidad con sus ortólogos *U. maydis* y *A. flocculosa*

La búsqueda de péptidos señal de CHSs y CHTs se llevó a cabo ingresando las secuencias de estas proteínas en el sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. En particular, se intentaron identificar tres dominios conservados que contienen patrones característicos o “signature motifs” para CHSs: QXXEY, EDRXL y QXRRW en la región central de estas enzimas (Ruiz Herrera *et al.*, 2002). Para las CHT 1, CHT 2 y CHT 3, se buscó la presencia de un péptido al cual se le asigna esta actividad catalítica (DxxDxDxE) (Ruiz Herrera *et al.*, 2002; Synstad *et al.*, 2004). Además, se realizó una comparación entre las CHSs

y CHTs de *T. frezzii* con secuencias homólogas en *U. maydis* y *A. flocculosa* a través del análisis de múltiples secuencias y alineamientos apareados de proteínas, con omisión de los péptidos señal (SP) si estaban presentes (Network Protein Sequence Analysis: CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)). Las proteínas fueron consideradas homólogas si compartían el 25% o más de la identidad con una longitud de alineamiento superior a los 80 aminoácidos (Sander y Schneider, 1991).

A modo de correlacionar lo hallado en la expresión génica con la actividad enzimática, se realizó un ensayo para cuantificar la actividad quitinasa empleando quitosan de alto peso molecular como sustrato. Para ello, se pesó 1g de pellet húmedo de cada estructura y se agregó 1 ml de buffer de lisis (50 mM buffer fosfato, pH: 7; 5 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA); 5 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT); 1 mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF); y 20% glicerol). Se procesó en mortero con el agregado de nitrógeno líquido; luego el homogenato se centrifugó a 4 °C a 20000 rpm durante 40 min. y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas fueron concentradas por el método de “salting out” empleando sulfato de amonio (Wingfield, 1998) y la concentración de proteínas fue medida por el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar. Este método permite la detección y cuantificación de proteínas basado en la propiedad del colorante Azul Brillante de Coomassie de unirse a proteínas, cambiando su pico máximo de absorbancia de 465 a 595 nm. Para ello, se agregó el reactivo de Bradford a 100 µL de muestra, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina y se calculó la concentración de proteínas de cada muestra extrapolando de la curva de calibración.

La actividad quitinasa fue medida por el método de Tanabe (2000). Brevemente, se evaluó la actividad con quitosan 54% desacetilado como sustrato, ya que es más fácil de hidrolizar que la quitina. La cantidad de azúcares reductores liberados fue determinada por el método descrito por Imoto y Yagishita (1971). Una unidad de actividad quitinasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores por minuto. Para ensayar la actividad enzimática de posibles ectoenzimas, esta fue medida solo en hifas, para lo cual se preparó una suspensión en caldo papa hasta una $DO_{505nm}=1$. Luego de 24 h de crecimiento, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se incubó directamente con el sustrato y se midieron los azúcares reductores como se señaló anteriormente.

8. Expresión génica de *T. frezzii* asociada a enzimas degradadoras de la pared vegetal

Para la identificación de estas enzimas, por tratarse principalmente de celulasas, xilanasas y pectinasas, todas perteneciente a la familia de las CAZymes, se empleó la misma metodología de análisis descrita en el punto 6.1 de este apartado. La comparación se realizó utilizando el software dbCAN y se siguieron los mismos criterios de longitud de alineamiento y cobertura. Las proteínas con una cobertura de alineamiento inferior a 0.5, se analizaron individualmente. Las enzimas se clasificaron según su acción en glicósido-hidrolasas (GH), polisacárido-liasas (PL), carbohidrato-esterasas (CE), enzimas con actividades auxiliares (AA) y módulos no catalíticos de unión y reconocimiento de carbohidratos (CBM), todos ellos asociados con actividad de degradación de la pared vegetal. Para identificar posibles PCWDE que puedan no haber sido reconocidas por dbCAN, se realizaron búsquedas adicionales en los softwares pFAM y tBLAST, como se describe en el punto 6.2.

Para la identificación de las PCWDE producidas por *T. frezzii*, se las comparó con secuencias homólogas en *U. maydis*, *Thecaphora thlaspeos* (*T. thlaspeos*), *Anthracoystis flocculosa* (*A. flocculosa*), *Sporisorium reilianum* (*S. reilianum*), *Kalmanozyma brasiliensis* (*K. brasiliensis*), *Ustilago hordei* (*U. hordei*) y *Moesziomyces antarcticus* (*M. antarcticus*), a través del análisis de múltiples secuencias y alineamientos apareados de proteínas, con omisión de los péptidos señal (SP) si estaban presentes (Thompson *et al.*, 1994). Las proteínas se consideraron homólogas si compartían más del 25% de la identidad con una longitud de alineamiento >80 aminoácidos.

9. Identificación de proteínas secretadas por *T. frezzii* asociadas a potenciales efectores o factores de virulencia

Para este análisis, solo se tuvieron en cuenta secuencias proteicas no mayores a 400 aminoácidos, que serían potencialmente secretadas por el hongo. La predicción de péptidos señal se realizó con el software SignalP 5.0 web server <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0> (parámetros: “organism group: eukaryotes”) (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) en combinación con el servidor web Phobius

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/> (parámetros: “default”)) (Kall *et al.*, 2007). Las proteínas se consideraron secretadas cuando ambos programas predijeron la presencia de péptidos señal. Además, para excluir las proteínas de membrana, se empleó el servidor web TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0> (parámetros: “default”)) (Krogh *et al.*, 2001), en combinación con el servidor Phobius (parámetro: “no TM domain”) para predecir la presencia de dominios transmembrana (TM). La presencia de dominios TM en los primeros 40 aminoácidos del extremo amino-terminal se consideró como proteínas secretadas.

Para excluir las secuencias que contenían un péptido señal, pero podían permanecer en el retículo endoplásmico (RE), se buscaron motivos de retención en todas las secuencias predichas, empleando la base de datos PROSIT (PS00014 ER_Targeting) con escaneo ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/> (parámetros: “default”) (de Castro *et al.*, 2006). Se utilizó el servidor de predicción PredGPI (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/gpipe/pred.htm> (parámetro: “general model”)) para predecir proteínas de anclaje con dominios glicosilfosfatidilinositol (GPI).

9.1 Identificación de efectores

Se combinaron diferentes estrategias para la predicción de efectores. Para ello, se consideraron las proteínas potencialmente secretadas, según se describe en el punto anterior. Aquellas secuencias que presentaban un mínimo de 3% de cisteínas fue el primer criterio de selección. Se utilizó el software Effector P 3.0 (<http://effectorp.csiro.au/>) (Sperschneider y Dodds, 2022) para predecir potenciales efectores. El servidor web ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) fue utilizado para buscar ciertos motivos como: [Y/F/W/W-x-C] (Godfrey *et al.*, 2010), [RxLR dEER] (Jiang *et al.*, 2008), [RSIDELD] y [KRHQSA][DENQ][EL] (Sonah *et al.*, 2016).

La identificación de los potenciales efectores se realizó en base a su homología con otras especies, empleando el software BLASTp del sitio NCBI NIH con los siguientes parámetros: “Organism: fungi; Expected threshold value: 0.05; Word size: 2; Matrix: BLOSUM45; Gap Costs: Existence: 13; Extension: 3” (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

9.2 Identificación del efector *Pep1*

Las secuencias de aminoácidos completas de la proteína *Pep1* se compararon las secuencias de *Pep1* de las siguientes especies (número de acceso de GenBank entre paréntesis): *A. flocculosa* PF-1 (XP_007878051.1), *U. maydis* 521 (XP_011387901.1), *U. hordei* (XP_041411115.1) y *K. brasiliensis* (XP_016292919.1). Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para deducir la secuencia de *Pep1* de *T. thlaspeos* fue necesario utilizar los programas tBLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y <http://bioinf.unigreifswald.de/augustus/submission.php> (UWYS01000010.1). El análisis filogenético fue realizado utilizando las condiciones por defecto del software disponible en http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi.

10. Cuantificación de los transcriptos de los genes de interés en cada estadio de *T. frezzii*

Se realizó la cuantificación de la expresión génica de los genes de interés en los tres estadios de *T. frezzii* a través del sistema de detección de PCR en tiempo real StepOne Plus Real-Time PCR system® (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.). Para la qPCR, se llevaron a cabo 3 réplicas técnicas empleando el kit Sybr Green Master Mix Kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific™, California) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa accesible en la página de GenScript® (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>) (Tabla 3.1). El ADNc se preparó a partir de las mismas muestras de ARNs utilizadas para el análisis de RNASeq utilizando la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen; California).

La expresión génica relativa se realizó usando el transcripto de actina como gen de referencia para la normalización de la expresión. El análisis se realizó en las siguientes condiciones: 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C por 10 seg y 60 °C por 30 seg. Se realizó la lectura de fluorescencia luego de este paso. Al final del programa, la temperatura se redujo de 95 °C a 65 °C con rampa de 0,1 °C/s, lo que permitió la evaluación de las curvas de fusión

(“melting”) para cada reacción. La especificidad de los amplicones se verificó mediante el análisis de las curvas de fusión y mediante el secuenciamiento de los fragmentos obtenidos. El cambio de expresión en el gen *pep1*, en relación con la expresión de actina se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 3.1: Oligonucleótidos empleados en PCR en tiempo real.

GENES RELACIONADOS AL PROCESO DE TRANSICION DE TELIOSPORA A HIFA	GenBank Accession Num.	Gene Description	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Amplification Size (base pairs)
	MW691335	Clb2 – b-type cyclin 2	CTACTGGACCATCGCTTCT	GTACGAGCTGTTCTCGGTA	139
	MW691336	Related to G1/S-specific cyclin	GACTACCAGCACGAGGCTAT	GGAACGTTTGGTGGATCTCG	148
	MW691347	Thioredoxin-dependent peroxidase	ACCTCGACTTTAGCAAGGCT	CGTCTCGGCAGCAAAGTAG	125
	MW691349	Lanosterol 14 alpha-demethylase	CGACGCTTTCACCTTTGTCC	CGTAGACGACCTCCTTTCCA	158
	MW691229	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	GCGAGGGCTTCAAGAAGATG	TGAGGTTTCGACAGGATCGAG	192
	MW691282	Allo-ketoreductase yalc [NADP+]	GGCCTTTGAGACGATGAAGG	AAGCGCTTGATGAGCTTGAG	114
	MW691284	Acetyltransferase	CGAGCGTTACGGTTAGTGTC	TAGGCTGGTCTCGACGATTC	152
	MW691292	Peroxisomal copper aminoxidase	GTCCCGGAGAAGATGATTCG	GGATGGCGTAAAGGTTGTC	188
	MW691359	Wd repeat-containing protein slp1	CGGAGACCGATACATCCCA	CGATGACTGCGATCGAACAG	106
	MW691363	Related to GTP-binding protein Rab5c	CCTCTCGATTCTTCGACA	CGGTAGTACATCGGAGCCAT	136
	MW691295	Related to aquaporin	AACACCCAGTCACTATCGCA	GACACTCGGTAGAAGGTCCA	113
	MW691315	Related to acetate kinase	CGTTCCTCTCTTCTTTGCG	TGGTGGAACGTAGTGTGAA	133
	MW691321	Related to opsin-1	CGCCTGTACAACCAAGTGAG	CACCACATCCAGAATCGCAA	135
	MW691322	Putative oligopeptide transporter	CATGGTCGGAGACCTCAAGA	GATGCATGGGTAAAGCCTTGG	142
	MW691368	Putative rib protein	CGAAGAAACCTGCTCCCTTG	CATTCTGCCCTCTGTTTCG	173
	MW602863	Actin	CTACGTTGCCCTCGACTTTG	CGTTTCGGACAGTGATGACC	107
GENES RELACIONADOS A LAS ENZIMAS DE LA VIA DE LA QUITINA	MW595363	Chitinase 1	TGGTGCCTACTTCGTCAACT	CTCGTAGTGGATCTGCTCGT	166
	MW595364	Chitinase 2	TACTGGAACATCACCGGCTT	TACCGGCTCTTGAACACTT	128
	MW595365	Chitinase 3	CCCTTCGTACGGGTACTTGA	CATCTCGGATCGCCAACATC	95
	MW595366	Chitinase 4	CGAGCAGATCGACCAGTACA	TCTCCCTGACGTCCAAGAAC	188
	MW595355	Chitin Synthase 1	GTGCTCAAGGTGCTGTTCAA	ACCGACGCAATCAGGTAGAT	86
	MW595356	Chitin Synthase 2	AACCAACGTAGACCTCAGCA	CGAGTGTCCGTAGCTCATCT	133
	MW595357	Chitin Synthase 3	CTCTTACCAGCTTCTCCA	CAACTCCTTTGCCGGATGAG	163
	MW595358	Chitin Synthase 4	GGGCGAGGTGATCTATCAT	TGAGCGGCTTATCCAAGAT	155
	MW595359	Chitin Synthase 5	GTTACCTGCTTGCCTGGATG	GCTCCACAATGTGGGATTC	103
	MW595360	Chitin Synthase 6	ACTACGGCAAGGTCTACTCG	AGATAGCGCATCAGCAGGAT	148
	MW595361	Chitin Synthase 7	TGTTTGCCCGGATGCTTAG	TTGACAATGATCGGGACCCA	80
	MW595362	Chitin Synthase 8	CTTCATGGACCTGCTCTCCA	GCATGAGGACCATCAGGTA	75

Tabla 3.1 (Cont.): Oligonucleótidos empleados en PCR en tiempo real.

GENES RELACIONADOS A LA PRODUCCION DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA PARED VEGETAL	MW602834	putative GMC oxidoreductase	CTCAAGAAGACGCTCAAGGC	GATGATGCTCTCAGGGTGGT	183
	MW602838	putative GMC oxidoreductase	CAGGGCTACAACCTCACGTA	GCAGACCTCCAAGCTGATG	100
	MW602839	putative GMC oxidoreductase	ACCCGAGAACAAGCCATAA	GGAACCATGGAAAGGATGCC	135
	MW602840	putative GMC oxidoreductase	GCAACCCTTACCTGCTGAAG	GATGGACGAGTCGACAAACG	182
	MW602841	putative GMC oxidoreductase	ACCGACGTTGGCAAATATGG	GATGAGGGTGGCGAGGTTAT	192
	MW602847	putative exo-beta-glucanase	CACCACAATCCAGGACCTCT	GAGTGAGGGATTCTGCCAGT	121
	MW602848	putative glucan-beta-glucosidase	AACCACTGAGTACTCGCCAA	AACCACTGAGTACTCGCCAA	182
	MW602849	putative exo-beta-glucanase	CAGCACCTCAACACGTTTCAT	TTCAGCAGGTCGTAAGTGGT	149
	MW602850	putative exo-1,3-beta-glucanase	AACTGGCTGCTGTTTGAAGG	ACTCGTCAAAGTCTTCTGC	166
	MW602851	putative glycoside hydrolase family	TCAACGAGCCCAACAACATC	GGTAGAGGCGGTAGACCTTG	147
GENES RELACIONADOS A EFECTORES Y FACTORES DE VIRULENCIA	OM056771	Uncharacterized protein	CCGCGAAAGTTTCAACAGGA	TGGCAGAGGAAGCTCAAGAA	117
	OM056775	Uncharacterized protein	TGTTGAAGTCGTCGGAAACG	TCCTGTGCTCTTTGGGATA	198
	OM056776	Uncharacterized protein	TTGTGCCGTATCTGCGAAAG	TAATGTTTGGCAGCCCTTG	140
	OM056779	Uncharacterized protein	GCCAAGTGCCAGAATGTCTT	ATAAGACGGGTGCCGTATCC	146
	MZ337396	PEP1	CATCTCTCTCACGTACC	GCCTTCTGCTGTTGTTGAA	141

11. Análisis Estadístico

Para la expresión de los diferentes genes analizados, normalizados al gen de actina, se calculó la media y D.E. (\pm) para cada una de las diferentes muestras. Los datos fueron analizados con el test de Student para establecer las diferencias significativas, utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016). Para la elaboración de gráficos de calor o Heat Maps, se empleó la librería Pheatmap versión 1.0.12 en RStudio (2022.07.1 Build 554, R environment version 4.2.1). Los genes fueron clasificados en base a su nivel de expresión por un proceso de agrupamiento jerárquico.

RESULTADOS

En este apartado se presentan los principales resultados derivados del análisis transcriptómico llevado a cabo en teliosporas, basidiosporas o hifas de *T. frezzii*, según los genes seleccionados para los diferentes estudios. El ARN total fue extraído de estas estructuras empleando el protocolo de TRIZol®, obteniendo cantidad y calidad adecuada de ARN, el cual fue usado para crear las librerías de ADNc y, a partir de ello, realizar un análisis comparativo en el nivel de expresión de los diferentes estadios. Estas estructuras se obtuvieron a partir de condiciones de cultivo variadas, por lo que la confirmación de la formación de las estructuras se realizó microscópicamente. Una de las características evaluadas fue la formación de hifas no infectivas, que son las estructuras que pueden obtenerse *in vitro*. Para ello, se realizó una tinción de núcleos con yoduro de propidio, con la adición de ARNasa, para favorecer la eliminación del ARN y optimizar así la visualización del núcleo. Como se muestra en la figura 3.1 el micelio obtenido en las placas de Petri, corresponden a hifas monocarióticas no infectivas, ya que el colorante demarca la presencia de un solo núcleo.

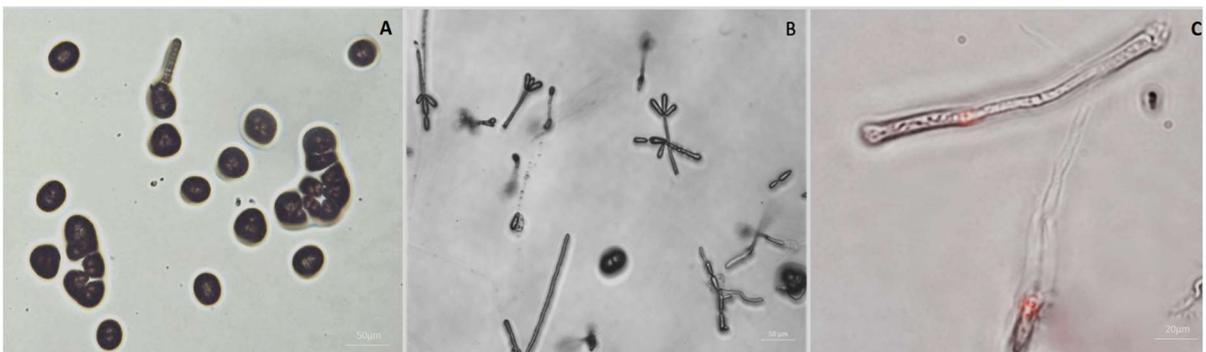


Figura 3.1: Germinación de teliosporas en placas de PDA: A- Germinación y desarrollo de un probasidio desde una teliospora, luego de 5 días de incubación. B- Formación de probasidios y basidiosporas luego de 10 días de incubación. C- Tinción de núcleo de hifas con PI.

Análisis de transcritos relacionados a modificaciones estructurales de *T. frezzii*

Para el estudio de los transcritos expresados en cada uno de los estadios fúngicos, se focalizó en el análisis de dos grupos principales; por un lado, aquellos genes que modificaron marcadamente su expresión en el pasaje de teliospora a hifa; por el otro, se analizaron los genes involucrados en las vías metabólicas de la quitina y de la melanina, principales componentes de las paredes fúngicas.

Búsqueda de genes diferencialmente expresados durante la germinación

En relación al primer grupo, se encontraron 200 genes diferencialmente expresados, de los cuales 134 fueron up-regulados y 66 fueron down-regulados en el pasaje desde teliospora a hifa. Basados en las secuencias de ARN obtenidas, se dedujeron las secuencias de las proteínas de interés y se analizaron mediante con la herramienta BLASTp de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2022)

En la figura 3.2 se visualiza un agrupamiento de genes en distintas categorías, de acuerdo a su función, que presentaron un nivel de expresión génica diferencial en el pasaje de teliospora a hifa. Los genes se clasificaron en: 1) Ciclo celular y procesamiento del ADN (CCDP); 2) Destino celular (CF); 3) Rescate celular, defensa y virulencia (CRDV); 4) Detoxificación con participación del CYP450 (DIC); 5) Energía (EN); 6) Interacción de nutrientes y adaptación nutricional (INNA); 7) Metabolismo (ME); 8) Proteínas con función de unión a cofactores (PBF); 9) Estrés, diferenciación celular y componentes de la biogénesis celular (SDBCC); 10) Transporte y comunicación celular (TCC); 11) Transcripción (TPF); 12) Proteínas no clasificadas (UNCL) y 13) Enzimas involucradas en varias vías metabólicas (SW).

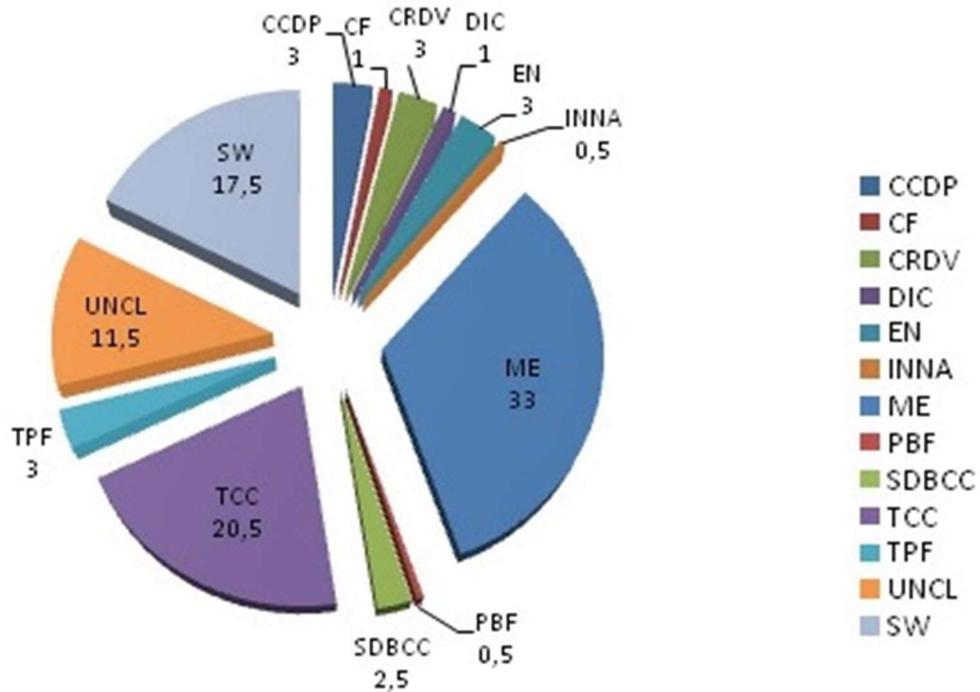


Figura 3.2: Categorización funcional de genes expresados diferencialmente en el pasaje de teliospora a hifa (% relativos) en cultivos de *T. frezzii*.

Del total de genes expresados diferencialmente, se destacan 3 categorías: aquellos involucrados en el metabolismo (66 genes), los involucrados en el transporte y comunicación celular (41 genes) y las proteínas enumeradas como No Clasificadas (23 genes), cuya contribución al total fue de 33%, 20,5% y 11,5% respectivamente.

Cuando se analizaron los genes de la categoría Metabolismo celular (Tabla 3.2) encontramos 52 genes up-regulados y 14 genes down-regulados en la transición de teliosporas a hifas de *T. frezzii*. Entre los genes up-regulados, se destaca el transcripto del gen de Citocromo-C peroxidasa (MW691239) con un incremento de 14 veces en teliosporas y el transcripto de GAPDH (MW691253) con un nivel de expresión 8,4 veces mayor en el estadio de teliospora, comparados con sus correspondientes expresiones en hifas. En este mismo sentido, se halló la sobreexpresión de hidrolasas de tipo dehalogenasas de haloácido (HAD) (MW691229) cercana a 86 veces en teliosporas, y la enzima Glutaminasa A (MW691236) incrementada 20 veces en teliosporas, en relación a los transcriptos encontrados en hifas. Los transcriptos para la enzima 2-metilcitrato deshidratasa (MW691261) aumentaron unas 7 veces, y la transcripción del gen de glicerol 2- deshidrogenasa (NADP(+)) (MW691268),

involucrado en el catabolismo del glicerol, aumentó alrededor de 5 veces en teliosporas, respecto a hifas. Similarmente, la expresión de ARN de UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (MW691270) se vio incrementada 4,7 veces en teliosporas.

En esta misma categoría, dentro de los genes down-regulados en teliosporas respecto a hifas, encontramos que la aldo-ceto reductasa [NADP+] (MW691282), una enzima de la superfamilia de las reductasas, disminuyó 1,6 veces; además el gen de Fer6 asociado con una proteína transportadora del cassette de unión a ATP (MW691283), disminuyó cerca de 2 veces su valor de expresión en teliosporas, mientras que Fer5, asociada a una enzima N6-hidroxisilina acetil- transferasa (MW691284), se observó una disminución cercana a 3 veces en teliosporas. Otros dos genes cuya expresión se encontró disminuida en teliosporas, fueron los relacionados a los de la cadena de 7 alfa-cefem-metoxilasa P8 (MW691288) con un descenso de 8,3 veces su expresión, y el gen relacionado a aminoácido-oxidasa peroxisomal (con cobre) (MW691292), con una sustancial disminución en su expresión, cercana a 19 veces.

Tabla 3.2 Genes involucrados en Metabolismo celular de *T. frezii*. Se detalla la dirección de cambio de cada gen desde teliospora a hifa.

Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)
MW691228	92,50 UP	MW691245	10,75 UP	MW691262	6,78 UP	MW691279	1,27 UP
MW691229	85,75 UP	MW691246	10,27 UP	MW691263	6,29 UP	MW691280	1,04 DOWN
MW691230	69,27 UP	MW691247	9,95 UP	MW691264	6,27 UP	MW691281	1,56 DOWN
MW691231	60,44 UP	MW691248	9,02 UP	MW691265	6,21 UP	MW691282	1,63 DOWN
MW691232	51,26 UP	MW691249	9,00 UP	MW691266	6,06 UP	MW691283	1,91 DOWN
MW691233	32,16 UP	MW691250	8,84 UP	MW691267	6,06 UP	MW691284	2,74 DOWN
MW691234	31,51 UP	MW691251	8,76 UP	MW691268	4,87 UP	MW691285	5,21 DOWN
MW691235	23,02 UP	MW691252	8,75 UP	MW691269	4,87 UP	MW691286	6,62 DOWN
MW691236	19,74 UP	MW691253	8,40 UP	MW691270	4,72 UP	MW691287	8,56 DOWN
MW691237	17,49 UP	MW691254	8,16 UP	MW691271	4,48 UP	MW691288	8,33 DOWN
MW691238	15,40 UP	MW691255	7,99 UP	MW691272	4,43 UP	MW691289	10,48 DOWN
MW691239	14,08 UP	MW691256	7,88 UP	MW691273	4,42 UP	MW691290	11,96 DOWN
MW691240	14,03 UP	MW691257	7,72 UP	MW691274	3,41 UP	MW691291	16,30 DOWN
MW691241	13,51 UP	MW691258	7,52 UP	MW691275	3,08 UP	MW691292	18,86 DOWN
MW691242	13,11 UP	MW691259	7,42 UP	MW691276	1,57 UP	MW691293	20,21 DOWN
MW691243	11,28 UP	MW691260	7,31 UP	MW691277	1,37 UP		
MW691244	11,09 UP	MW691261	7,12 UP	MW691278	1,31 UP		

Dentro de la categoría de transcritos involucrados en el transporte y comunicación celular, observamos la sobreexpresión de 21 genes y 20 genes sub-expresados durante la transición de teliosporas a hifas (Tabla 3.3). Entre los genes up-regulados, se identificó el gen de aspártico-proteasa (MW691301), con un marcado incremento de 9,3 veces en teliosporas, mientras que los genes MET22 – fosfatasa de serina/treonina de proteínas (MW691299) y el relacionado a monooxigenasa putativa (MW691314), aumentaron 13,6 y 1,1 veces

respectivamente. Uno de los genes llamativamente down-regulados fue el de la aminoácido-permeasa (MW691333), con una marcada disminución de 36 veces en su expresión. Del mismo modo, se observó una disminución en la expresión del gen relativo a la acetato-quinasa (MW691315), el relativo a opsina-1 (MW691321), y una proteína no caracterizada (um02763) (MW691322) con valores de expresión de 1,59, 4,96 y 5,39, respectivamente menor en teliosporas, con relación a las hifas. Se encontró otra disminución pronunciada en la transcripción de la proteína relacionada a autofagia (MoAtg14) (MW691320), con un valor 4,4 veces menor en teliosporas, respecto a hifas.

Tabla 3.3 Genes involucrados en el transporte y comunicación celular de *T. frezii*. Se detalla la dirección de cambio de cada gen desde teliospora a hifa.

Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)
MW691295	25,79 UP	MW691306	7,24 UP	MW691317	1,70 DOWN	MW691328	8,36 DOWN
MW691296	17,53 UP	MW691307	6,46 UP	MW691318	3,80 DOWN	MW691329	8,99 DOWN
MW691297	16,45 UP	MW691308	6,34 UP	MW691319	4,2 DOWN	MW691330	16,20 DOWN
MW691298	16,08 UP	MW691309	6,29 UP	MW691320	4,37 DOWN	MW691331	17,02 DOWN
MW691299	13,65 UP	MW691310	6,27 UP	MW691321	4,96 DOWN	MW691332	19,67 DOWN
MW691300	10,66 UP	MW691311	3,25 UP	MW691322	5,39 DOWN	MW691333	35,90 DOWN
MW691301	9,4 UP	MW691312	2,37 UP	MW691323	5,88 DOWN	MW691334	37,81 DOWN
MW691302	8,28 UP	MW691313	2,00 UP	MW691324	7,10 DOWN		
MW691303	7,84 UP	MW691314	1,13 UP	MW691325	7,47 DOWN		
MW691304	7,82 UP	MW691315	1,59 DOWN	MW691326	7,49 DOWN		

Por otra parte, se realizó una categorización de los transcritos relacionados a las funciones de Ciclo celular y procesamiento del ADN (CCDP¹), Destino celular (CF²), Rescate celular, defensa y virulencia (CRDV³), Detoxificación con participación del CYP450 (DIC⁴), Energía (EN⁵), Interacción de nutrientes y adaptación nutricional (INNA⁶), Proteínas con función de unión a cofactores (PBF⁷), Estrés, diferenciación celular y componentes de la

biogénesis celular (SDBCC⁸), y Transcripción (TPF⁹); en estas categorías se encontraron 22 genes up-regulados (2, 0, 5, 1, 6, 1, 1, 4 y 2 respectivamente) y 13 genes down-regulados (4, 2, 1, 1, 0, 0, 0, 1 y 4 respectivamente) en la transición de teliospora a hifa de *T. frezzii*. En la categoría de ciclo celular y procesamiento del ADN, se observaron particularmente dos genes up-regulados: Clb2 (ciclina tipo-b 2) (MW691335) y el relacionado a la ciclina específica de G1/S (MW691336) (2,2 y 1,7 veces respectivamente).

En la categoría de rescate celular, defensa y virulencia, se destaca la up-regulación de la proteína de membrana peroxisomal (MW691347) y de la proteína Hsp70 (MW691345) en 7,3 y 14,3 veces respectivamente, en teliosporas respecto a hifas. En la categoría de detoxificación con participación del CYP450, encontramos solo un gen up-regulado, el de la 14 alfa-demetilasa (MW691349), una enzima esencial en la biosíntesis de esteroides, que se encontró 5,5 veces sobreexpresada en teliosporas. Dentro de los transcritos de la categoría relacionada a estrés, diferenciación celular y componentes de la biogénesis celular, se encontraron algunos genes up-regulados, entre ellos el de la proteína de control de división celular CDC20 (MW691359), relativo a YSC84, una proteína involucrada en la organización del citoesqueleto de actina (MW691361) y el relativo a un precursor de quitinasa A (MW691362) (25,1, 5,0 y 2,4 respectivamente). En igual sentido, la enzima putativa permeasa de aminoácidos neutros (MW691357), una enzima categorizada dentro del grupo de funciones de adaptación nutricional, se encontró 9,1 veces up-regulada en teliosporas. En la categoría de energía, se halló un incremento de 27,1 veces en la expresión de la enzima enoil-(proteína transportadora de acilo) reductasa (MW691352), que participa en la elongación de ácidos grasos.

Respecto a los genes down-regulados en teliosporas respecto a hifas, se observaron diferencias significativas en la expresión de dos genes de la categoría destino celular: Ssp1 protein-quinasa (MW691342) y el promotor de inhibición de apoptosis Bax1 (MW691341), disminuyendo su expresión en teliosporas respecto a hifas en alrededor de 18 y 17 veces respectivamente. El gen que codifica para la enzima putativa de la familia de proteínas Rer1 (MW691367) también se encontró down-regulado.

Tabla 3.4 Genes involucrados en las categorías CCDP¹, CF², CRDV³, DIC⁴, EN⁵, INNA⁶, PBF⁷, SDBCC⁸ y TPF⁹ de *T. frezii*. Se detalla la dirección de cambio de cada gen desde teliospora a hifa.

Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)
MW691336 ¹	1,73 UP	MW691345 ³	14,27 UP	MW691354 ⁵	11,96 UP	MW691363 ⁸	1,98 DOWN
MW691337 ¹	4,96 DOWN	MW691346 ³	13,01 UP	MW691355 ⁵	9,46 UP	MW691364 ⁹	13,87 UP
MW691338 ¹	4,97 DOWN	MW691347 ³	7,36 UP	MW691356 ⁵	8,42 UP	MW691365 ⁹	11,02 UP
MW691339 ¹	8,22 DOWN	MW691348 ³	29,24 DOWN	MW691357 ⁶	9,74 UP	MW691366 ⁹	4,53 DOWN
MW691340 ¹	9,37 DOWN	MW691349 ⁴	5,53 UP	MW691358 ⁷	12,42 UP	MW691367 ⁹	5,13 DOWN
MW691341 ²	17,37 DOWN	MW691350 ⁴	6,97 DOWN	MW691359 ⁸	25,06 UP	MW691368 ⁹	5,69 DOWN
MW691342 ²	18,32 DOWN	MW691351 ⁵	47,90 UP	MW691360 ⁸	6,48 UP	MW691369 ⁹	129,88 DOWN
MW691343 ³	36,83 UP	MW691352 ⁵	27,10 UP	MW691361 ⁸	4,99 UP		

CCDP¹ : Ciclo celular y procesamiento del ADN; CF² :Destino celular; CRDV³: Rescate celular, defensa y virulencia; DIC⁴: Detoxificación con participación del CYP450; EN⁵: Energía; INNA⁶: Interacción de nutrientes y adaptación nutricional; PBF⁷ : Proteínas con función de unión a cofactores; SDBCC⁸: Estrés, diferenciación celular y componentes de la biogénesis celular; TPF⁹:Transcripción.

Se ha observado que algunos genes que presentan una expresión diferencial entre los estadios analizados, participan en más de una vía metabólica, según la descripción bibliográfica. En la tabla 3.5 se presentan un total de 26 genes up-regulados y 9 genes down-regulados.

Notablemente, en la expresión de la proteína probable de segregación cromosómica SMC2 (MW691373) se observó un ligero aumento, de 1,1 veces más en teliosporas que en hifas. En contraste, se observó una disminución de la expresión del factor de transcripción PacC (MW691404), de alrededor de 2,5 veces. La enzima putativa adenosil-homocisteinasa (MW691399) mostró un substancial aumento de 6,9 veces. Además, encontramos otros tres genes up-regulados, TPM2 - Tropomiosina isoforma 2 (MW691380), porina mitocondrial (MW691376) y proteína con homología a CipC (MW691370), que presentaron un incremento de 7,4, 5,0 y 8,4 veces en su expresión, respectivamente.

Tabla 3.5 Genes involucrados en las categorías CCDP¹, CF², CRDV³, DIC⁴, EN⁵, INNA⁶, PBF⁷, SDBCC⁸, TPF⁹, ME¹⁰, TCC¹¹ de *T. frezii*. Se detalla la dirección de cambio de cada gen desde teliospora a hifa.

Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)	Num. Acceso "GenBank"	Dirección cambio T→H (veces)
MW691370 1,2,8,11	8.44 UP	MW691379 3,7,9	4.48 DOWN	MW691388 5,10	7.16 UP	MW691397 5,11	10.95 UP
MW691371 1,2,7, 8,11	1.16 DOWN	MW691380 8,11	7.40 UP	MW691389 5,10	6.85 UP	MW691398 5,7,11	3.20 UP
MW691372 1,2,8,11	2.82 UP	MW691381 5,10	19.00 UP	MW691390 5,10	5.80 UP	MW691399 7,10	6.93 UP
MW691373 1,7,8	1.09 UP	MW691382 5,10	13.69 UP	MW691391 5,10	3.45 UP	MW691400 7,10	5.29 DOWN
MW691374 2,8	1.27 UP	MW691383 5,10	13.50 UP	MW691392 5,10	2.62 UP	MW691401 7,11	12.67 UP
MW691375 2,11	5.59 UP	MW691384 5,10	11.52 UP	MW691393 5,10	5.41 DOWN	MW691402 7,11	8.89 UP
MW691376 2,5,11	5.00 UP	MW691385 5,10	10.03 UP	MW691394 5,10	19.67 DOWN	MW691403 7,9	2.86 DOWN
MW691377 3,10	44.34 UP	MW691386 5,10	9.97 UP	MW691395 5,10	39.41 DOWN	MW691404 7,9	2.48 DOWN
MW691378 3,9	6.84 DOWN	MW691387 5,10	8.73 UP	MW691396 5,11	11.91 UP		

CCDP¹ : Ciclo celular y procesamiento del ADN; CF² :Destino celular; CRDV³: Rescate celular, defensa y virulencia; DIC⁴: Detoxificación con participación del CYP450; EN⁵: Energía; INNA⁶: Interacción de nutrientes y adaptación nutricional; PBF⁷ : Proteínas con función de unión a cofactores; SDBCC⁸: Estrés, diferenciación celular y componentes de la biogénesis celular; TPF⁹:Transcripción; ME¹⁰ :Metabolismo; TCC¹¹ :Transporte y comunicación celular.

Finalmente, se encontraron otros genes con expresión diferencial, cuya relación entre las proteínas para las que codifican y su función, no pudo ser establecida; por ello se agruparon en la categoría de genes No Clasificados. En la transición de teliosporas a hifas, se encontró que 13 de estos genes estaban up-regulados y 10 down-regulados; entre ellos la proteína um10414 (MW691406) con una significativa sobreexpresión cercana a 50 veces en teliosporas. Por el contrario, los genes que codifican para um05276 (MW691418), um10868 (MW691421), um04575 (MW691424) y um10208 (MW691425) se presentaron down-regulados en 1,4, 1,7, 12,5 y 15,7 veces, respectivamente.

Transcriptos relacionados a la vía metabólica de melanina y quitina

La constitución de la pared fúngica varía en función de la especie en estudio, aunque la clase de componentes se mantienen medianamente constantes, es decir, en muchos de ellos se describe la presencia de glucanos, glicoproteínas y quitina (Agrios, 2005). Una característica frecuente encontrada en varios hongos pigmentados, es la presencia de melaninas, describiéndose para numerosos hongos, el tipo Eumelanina o DOPA-melanina. Como ya se ha descrito en el capítulo 2, en la pared de las teliosporas pigmentadas de *T. frezzii* se encontró melanina, la cual fue clasificada como eumelanina. Por ello, surgió el interrogante sobre la posible expresión génica de enzimas que participarían en la biosíntesis de este pigmento.

Trabajos previos realizados en otros hongos del filo Basidiomycota, destacan la presencia de eumelanina, a diferencia de lo descrito para hongos tipo Ascomycotas, donde se hallaron pigmentos del tipo allomelaninas (Singh *et al.*, 2021). En el análisis de transcriptos realizados en *T. frezzii* se encontraron al menos cuatro enzimas con posible intervención en la vía sintética de las melaninas. Como puede observarse en la tabla 3.6, se hallaron dos enzimas con posible actividad de lacasas, que son enzimas intervinientes en la transformación del precursor L-Dopa en Dopaquinona, un compuesto poco estable químicamente, por lo que suele ciclarse y constituir las unidades de polimerización (Pralea *et al.*, 2019). A través de este último paso se crea el polímero de eumelanina. Llamativamente, también se encontraron transcriptos que codificarían para enzimas con actividad policétido-syntasa, la cual participa en la vía de las allomelaninas, actuando sobre el precursor Acetil-CoA o Malonil-CoA. Sin embargo, en la caracterización de los pigmentos extraídos de las teliosporas de *T. frezzii*, no se detectó la presencia de este tipo de melaninas.

Los porcentajes de identidad de estas enzimas se compararon con las descritas para algunos hongos de la familia de los Ustilaginales, como *U. maydis* 521, *P. flocculosa* PF-1, *Ustilago hordei*, *Kalmanozyma brasiliensis*, *Moesziomyces antarcticus* y *Sporisorium reilianum* f. sp. Reilianum. Sin embargo, los porcentajes más altos de identidad se encontraron en las dos primeras especies mencionadas.

Tabla 3.6: Análisis de secuencias de proteínas deducidas con actividad enzimática relacionadas a la síntesis de melanina en *T. frezzii* (expresados en % de identidad, comparado con proteínas ortólogas en *U. maydis* y *A. flocculosa*).

Enzimas vía melanina	N° AA	% de identidad con <i>U. maydis</i> 521	% de identidad con <i>P. flocculosa</i> PF-1
Lacasa 1 putativa	761	79	86
Lacasa 2 putativa	731	62	71
Policétido-sintasa 1	2064	72	78
Policétido-sintasa 2	2076	87	92

Como se mencionó anteriormente, uno de los elementos claves constituyentes de la pared fúngica es la quitina, un polímero conformado por monómeros de N-acetilglucosamina, que le otorga a la pared rigidez, aunque también puede ser considerado un factor de virulencia (Munro y Gow, 2001). Durante las transformaciones morfológicas que ocurren durante el desarrollo del ciclo de vida de *T. frezzii*, la quitina es modificada por múltiples vías metabólicas, que incluyen enzimas del grupo de las CAZymes, como las quitin-sintasas (CHS) y las quitinasas (CHT) (Kong *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 2011).

Con el objetivo de analizar cómo se fue modificando la expresión génica de esta familia enzimática, se extrajo el ARN de cada una de las estructuras de *T. frezzii* desarrolladas *in vitro*. Luego de secuenciar y analizar el ARNm por la técnica de RNASeq, se emplearon una serie de softwares para identificar la presencia de módulos con actividad sobre carbohidratos, como el Carbohydrate-active enzyme Annotation, haciendo foco principalmente en las Glicosil-hidrolasas (GH) y en las Glicosil-transferasas (GT). Se identificaron ocho transcriptos que codifican para CHSs y cuatro para CHTs (secuencias depositadas en GenBank – Tabla S.3.1).

A partir de estos resultados, se dedujeron las secuencias de las proteínas y se analizó su identidad y homología en relación a proteínas de especies relacionadas filogenéticamente. Las CHSs se ubicaron dentro de la familia de las GT, de las cuales, para cuatro de ellas se logró comparar la secuencia completa (CHS1, CHS2, CHS3 y CHS6) al ser comparadas con secuencias homólogas en *U. maydis*. Las CHS4, CHS5, CHS7 y CHS8 fueron identificadas

parcialmente, de las cuales se cubrió entre un 50 y un 80% de la secuencia total de la proteína. Además, se obtuvieron similares resultados al realizar la comparación con *A. flocculosa*. En la tabla 3.7 se describen los porcentajes de identidad de los genes de CHS, como así también los de CHT, al ser comparados con ambos organismos homólogos (*U. maydis* y *A. flocculosa*). Como puede observarse en las cuatro CHT identificadas, de la familia de las GHs, pudieron compararse en su totalidad con sus homólogas en los demás organismos, donde se encontró un rango de identidad entre el 42 y el 75 %.

Tabla 3.7: Análisis de secuencias de proteínas deducidas con actividad enzimática quitin-sintasas (CHS) y quitinasa de *T. frezzii* (expresados en % de identidad, comparado con proteínas ortólogas en *U. maydis* y *A. flocculosa*).

Quitin-sintasas (CHS)	<i>U. maydis</i> 521	<i>P. flocculosa</i> PF-1	Quitin-sintasas (CHS)	<i>U. maydis</i> 521	<i>P. flocculosa</i> PF-1	Quitinasas (CHT)	<i>U. maydis</i> 521	<i>P. flocculosa</i> PF-1
CHS 1	79	86	CHS 5	76	84	CHT 1	69	72
CHS 2	62	71	CHS 6	73	85	CHT 2	69	75
CHS 3	72	78	CHS 7	73	82	CHT 3	68	62
CHS 4	87	92	CHS 8	84	90	CHT 4	42	63

Para la caracterización de las diferentes CHSs y CHTs se analizaron los dominios proteicos característicos que definen la función enzimática. En relación a las 8 CHSs, todas presentaron tres dominios característicos típicos, denominados QXXEY, EDRXL y QXRRW (Ruiz Herrera *et al.*, 2002) sin encontrarse en ningún caso, secuencias compatibles con péptidos señal, que dan indicios de enzimas que serían excretadas al exterior celular.

Respecto a la identificación de posibles CHTs, se halló el dominio GH18 (PF00704) en las CHT1, CH2 y CHT3, mientras que la CHT4 se describe como una acetil-beta-glucosaminidasa que contiene el dominio GH20 (PF00728). Los residuos catalíticos activos DxxDxDxE se mantuvieron en las CHT1, CHT2 y CHT3, sugiriendo que estos tres genes codifican para estas enzimas activas. Los péptidos señal para la secreción de enzimas estuvieron presentes en CHT2, CHT3 y CHT4, y ausente en CHT1, al igual que lo observado en *U. maydis* (Langner *et al.*, 2015).

A partir de las secuencias obtenidas por RNASeq, se pudieron diseñar oligonucleótidos específicos para cuantificar la expresión de diferentes CHSs y CHTs. Así, se pudieron establecer diferencias cuantitativas en el nivel de expresión entre las estructuras obtenidas *in vitro*. En la figura 3.3.A, se observa que, a excepción de la CHS3, las demás CHSs se encuentran en los tres estadios de *T. frezzii*, en cantidades relativas significativamente diferentes ($p < 0.03$); los valores que no presentaron diferencias significativas fueron los hallados en la expresión de CHS2 y CHS4 en hifas y teliosporas, así como también los valores de CHS3 entre los tres estadios. En la figura 3.3.B se muestran los niveles de expresión de las cuatro quitinasas, donde CHT 1 y CHT 2 presentaron los valores más altos de expresión, particularmente en los estadios de basidiosporas e hifas. En todos los casos, se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión ($p < 0.01$), excepto en CHT3 entre los estadios de basidiosporas e hifas, donde no se encontraron diferencias significativas.

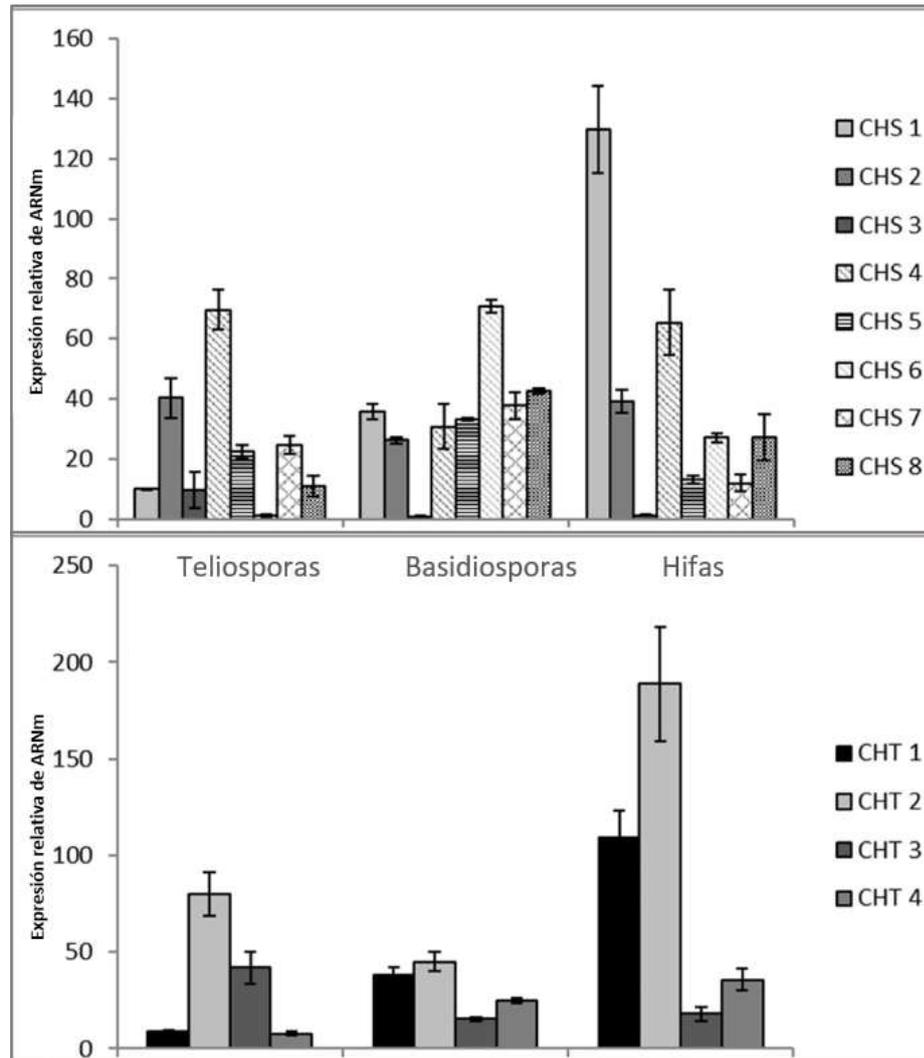


Figura 3.3: Niveles de expresión de CHSs (A) y CHTs (B) de *T. frezzii* por PCR en tiempo real en cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas). Los datos representan los valores promedio de las muestras por triplicado \pm su D.E. y se encuentran expresados en relación a los valores de transcripción del gen de actina.

Igualmente, para correlacionar los resultados del RNASeq con la actividad enzimática, se realizó un ensayo para determinar la actividad quitinasa *in vitro* a partir de extractos proteicos de los tres estadios de *T. frezzii* empleando quitosán de alto peso molecular como sustrato.

Como se muestra en la tabla 3.8, los extractos proteicos de hifas y basidiosporas presentaron actividad enzimática, degradando el quitosán polimérico; sin embargo, en el extracto proteico de las teliosporas no se observó actividad enzimática, lo cual era lo previsto, por tratarse de estructuras de resistencia con escasa o nula actividad enzimática en general. Por

otra parte, tampoco se detectó actividad enzimática en las proteínas secretadas al medio de cultivo, durante el crecimiento de las hifas.

Tabla 3.8: Actividad quitinasa de extractos proteicos de hifas, basidiosporas, teliosporas y medio de cultivo de hifas de *T. frezzii*.

Estructura	Proteínas totales (mg/ml)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)
Hifas	1.470	0.134	0.091 ± 0.002
Basidiosporas	0.990	0.068	0.068 ± 0.013
Teliosporas	0.200	ND	ND
Sobrenadante	0.250	ND	ND

(*)Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol GlcNAc por min durante 1 hora de reacción. Las desviaciones estándar fueron calculadas a partir la realización del ensayo sobre tres réplicas. ND: no detectable.

Análisis de transcriptos de T. frezzii relacionados a patogenicidad y factores de virulencia

- Enzimas degradadoras de componentes de la pared vegetal

Como ya se ha mencionado anteriormente, las modificaciones morfológicas que transcurren durante el ciclo de vida de *T. frezzii* se ven acompañadas de modificaciones en la transcripción génica, que codifican para proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, involucradas en las vías metabólicas de componentes propios de los hongos. Sin embargo, hay otros transcriptos que codifican para moléculas que le otorgan al microorganismo atributos de patogenicidad o factores de virulencia.

A través del análisis del transcriptoma de los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*, se dedujeron las secuencias proteicas correspondientes y se encontraron enzimas con la función de degradación de la pared celular vegetal. Esto se realizó utilizando un servidor web dbCAN2 metaserver, donde se identificaron módulos para enzimas con actividad en carbohidratos (CAZymes) complementando el análisis con los sitios MyHits, Prosite y BLASTp. La búsqueda se enfocó en identificar enzimas de las familias de las GH, PL, CE, CBM y AA. Se identificaron más de 135 transcriptos de ARNm con estas características, pero en solo 40 de ellos se identificaron funciones de PCWDE: 27 en el grupo GH, 2 en PL, 3 en CE y 8 en AA (todas las secuencias fueron depositadas en GenBank en

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> site y se detallan en la tabla suplementaria S.3.1). Entre estos transcritos encontramos 18 enzimas asociadas a la degradación de celulosa, 1 asociada a cutina, 1 a galactomananos, 9 a pectinas, 7 a xilanos y 4 a xiloglucanos (Tabla 3.9).

Tabla 3.9: Nivel de expresión de genes relacionados a enzimas que degradan la pared celular vegetal (PCWDE) en basidiosporas, hifas y teliosporas de *T. frezzii*.

Num. Acceso "GenBank"	Sustrato	Familia CAZyme	Expresión ARNm (Basidiospora)*	Expresión ARNm (Hifa)*	Expresión ARNm (Teliospora)*
MW602835	Celulosa	AA3	0.0703	0.0135	0.0773
MW602836	Celulosa	AA3	0.0042	0.0029	0.0091
MW602837	Celulosa	AA3	0.0792	0.0712	0.1233
MW602842	Celulosa	GH5	0.0089	0.0075	0.0297
MW602843	Celulosa	GH5	0.1832	0.1052	0.1708
MW602844	Celulosa	GH5	0.0665	0.0302	0.0658
MW602845	Celulosa	GH5	0.0164	0.0117	0.0646
MW602846	Celulosa	GH5	0.0453	0.0343	0.2179
MW602852	Cutina	CE5	0.0506	0.0592	0.1508
MW602853	Galactomannano	GH27	0.0009	0.0007	0.0006
MW602854	Pectina	GH105	0.0061	0.0069	0.0187
MW602855	Pectina	GH2	0.1867	0.1894	0.3174
MW602856	Pectina	GH28	0.0016	0.0030	0.0173
MW602857	Pectina	GH28	0.2733	0.0250	0.0839
MW602858	Pectina	GH28	0.0350	0.0336	0.0374
MW602859	Pectina	GH43	0.0584	0.1232	0.1640
MW602860	Pectina	GH53	0.0418	0.0547	0.3930
MW602861	Pectina	PL1	0.0076	0.0010	0.0200
MW602862	Pectina	PL4	0.0277	0.0140	0.0537
MW602864	Xilanos	GH10	0.0276	0.0087	0.0042
MW602865	Xilanos	GH43	0.0382	0.0031	0.0052
MW602866	Xilanos	GH43	0.1381	0.0628	0.0618
MW602867	Xilanos	GH43	0.1000	0.0876	0.1461
MW602868	Xilanos	GH51	0.0106	0.0095	0.1315
MW602869	Xilanos	CE1	0.0313	0.0218	0.0423
MW602870	Xilanos	CE7	0.0292	0.0111	0.0119
MW602871	Xyloglucanos	GH31	0.0409	0.0487	0.0213
MW602872	Xyloglucanos	GH31	0.0358	0.0147	0.0853
MW602873	Xyloglucanos	GH42	0.0003	0.0018	0.0040
MW602874	Xyloglucanos	GH35	0.0338	0.0473	0.1283

GH: Glicosil-hidrolasas; AA: Enzimas con actividades auxiliares; CE: Carbohidrato-esterasas; PL: Polisacárido-liasas. *Valor medio de las tres replicas técnicas, normalizadas al valor de expresión de actina.

En la figura 3.4 se observa la expresión génica, medida por la técnica de qPCR, donde pueden observarse diferencias significativas en la expresión al ser comparadas entre los estadios de *T. frezzii*.

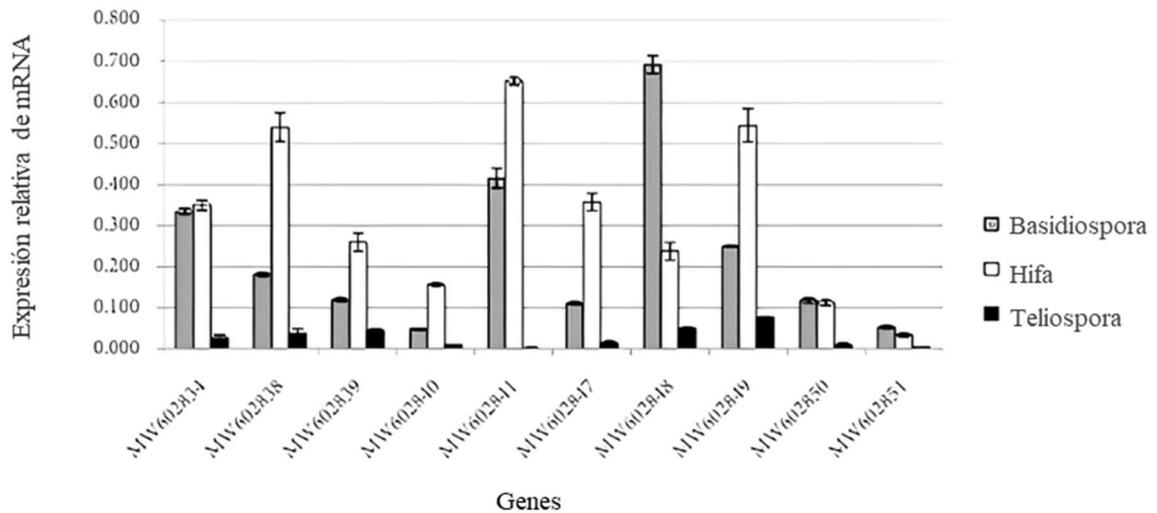


Figura 3.4: Niveles de expresión de genes que codifican para PCWDE, cuantificados por RT-PCR. MW602834: GMC-oxidoreductasa putativa; MW602838: GMC-oxidoreductasa putativa; MW602839: GMC-oxidoreductasa putativa; MW602840: GMC-oxidoreductasa putativa; MW602841: GMC-oxidoreductasa putativa; MW602847: exo-beta-glucanasa putativa; MW602848: glucano-beta-glucosidasa putativa; MW602849: exo-beta-glucanasa putativa; MW602850: exo-1,3-beta-glucanasa putativa; MW602851: familia de glicosido hidrolasa putativa.

Celulasas: En el análisis de transcritos de *T. frezzii* se detectaron genes que codifican para enzimas con potencial actividad sobre celulosa, ocho de ellas de la familia de enzimas con actividades auxiliares (AA) y otras diez de la familia de las Glicosil-hidrolasas (GH) (Tabla 3.9). La familia de actividad auxiliar CAZy 3 (AA3) incluye enzimas de la familia de las oxidorreductasas de glucosa-metanol-colina (GMC) que respaldan la actividad de otras enzimas de la familia AA a través de sus productos de reacción o apoyan la acción de las glicosil-hidrolasas en la degradación de la lignocelulosa (Sützl *et al.*, 2018). Bajo estas condiciones, una de las enzimas AA3 cuyo nivel de transcripción fue cuantificado en *T.*

frezzii (oxidorreductasa putativa GMC, MW602841) presentó los mayores valores de expresión en hifas y basidiosporas y fue casi nula su expresión en teliosporas.

La familia GH5 tiene una variedad de actividades y sustratos objetivos y recientemente ha sido clasificada en 51 subfamilias (Aspeborg *et al.*, 2012). Las β -glucosidasas se encuentran predominantemente en las familias GH1 y GH3. Sin embargo, en las familias GH5 también se encuentran otras glicosidasas. Una característica típica de la mayoría, pero no de todas las celulasas, y que también se encuentra en otras PCWDE, es la presencia de un polisacárido que se une a un dominio ligado por una región de bisagra que ayuda en la unión de las celulasas a sus sustratos insolubles (Boraston *et al.*, 2004). Encontramos una alta expresión del gen que codifica para GH1 (glicosil-hidrolasa putativa 1, MW602851) en las etapas de basidiosporas e hifas (Figura 3.4).

Galactomananasas: Las alfa-galactosidasas, que se agrupan dentro de la familia glicosil-hidrolasa 27 (GH27), catalizan la hidrólisis de las terminaciones alfa-1,6-galactosidos de los galacto-oligosacáridos y los galactomananos poliméricos (Fernández-Leiro *et al.*, 2010). Particularmente, encontramos un transcripto (alfa-galactosidasa putativa, MW602853) con estas propiedades, cuya expresión fue similar entre los tres estadios comparados (Tabla 3.9).

Xilanasas: Numerosas proteínas son codificadas por genes de las familias de las GH y de CE, y actúan sobre hemicelulosas y otros polisacáridos. Las proteínas del grupo GH10 son endo- β -1,4-xilanasas que actúan sobre xilanos, glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (Kubicek *et al.*, 2014). Entre los genes que codifican para estas enzimas, encontramos un alto nivel de transcripción en el estadio de basidiospora, en comparación a los demás estadios (Tabla 3.9).

Xiloglucanasas: Como se observa en la tabla 3.9, se identificaron dos alfa-xilosidasas de la familia GH31, que liberan alfa-xilosas de estos oligosacáridos. La expresión de dos beta-galactosidasas (MW602873 y MW602874), de las familias GH42 y GH35 respectivamente, fue decreciendo desde teliosporas, pasando por hifas y con menor nivel de expresión en basidiosporas.

Pectinasas: En el análisis del transcriptoma de *T. frezzii* se hallaron alrededor de 9 PCWDEs que actúan específicamente sobre pectinas, y derivan de siete familias de CAZymes diferentes. Solo un transcripto (MW602857) fue sobreexpresado en basidiosporas, comparado con teliosporas. Todos los demás transcriptos se hallaron down-regulados en el estadio de hifas, también al compararse con su expresión en teliosporas (MW602854, MW602855, MW602856, MW602857, MW602858, MW602859, MW602860, MW602861, MW602862). Dentro de las familias de las GHs, encontramos una GH105 con actividad ramnogalacturonil-hidrolasa insaturada (MW602854), una GH2 con actividad beta-glucuronidasa (MW602855), tres GH28 con actividad endopoligalacturonasa (MW602856, MW602857 y MW602858), una GH43 con actividad endo-1,5-alpha-L-arabinasa (MW602866) y una GH53 con actividad arabinogalactano endo-beta-1,4-galactanasa (MW602860). Por su parte, se hallaron dos pectina-liasas, PL1 y PL4, con actividades pectato-liasa (MW602861) y ramnogalacturonano endoliasa (MW602862) similares, ambas expresadas mayormente en teliosporas.

Cutininas: La cutina está compuesta por hidroxí e hidroxiepoxi ácidos grasos. Varios hongos expresan enzimas con actividad cutinasa (de la familia CE5), que catalizan el clivaje de las uniones éster del polímero, para liberar monómeros de cutina (Zhao *et al.*, 2014). En el análisis del transcriptoma de *T. frezzii*, encontramos un nivel similar de transcriptos en basidiosporas e hifas, sin embargo, se halló una expresión unas 3 veces superior en las teliosporas.

En la tabla suplementaria S.3.2 se analizan las principales PCWDE encontradas en el transcriptoma de *T. frezzii*, con la longitud de aminoácidos de las proteínas deducidas y el porcentaje de identidad al ser comparadas con microorganismos análogos (*U. maydis*, *T. thlaspeos*, *A. flocculosa* y *U. hordei*).

- *Efectores y factores de virulencia*

Dado que hasta la actualidad no se han descrito factores de virulencia asociados a la patogenicidad de *T. frezzii*, se propuso como objetivo analizar el repertorio de efectores del hongo necesarios para la infección. El conocimiento de estos factores permitiría, por

ejemplo, generar variantes “knock out” para estos genes, y a partir de allí evaluar las diferencias fenotípicas entre ellos. Si bien esto último aún no ha sido llevado a cabo, se avanzó en la predicción de la patogenicidad y virulencia de determinados factores de *T. frezzii*. En el archivo adjunto I, se anexa una publicación realizada por nuestro equipo de trabajo en el cual, a través de herramientas informáticas, se establecieron parámetros basados en el conocimiento de hongos emparentados a *T. frezzii*, para los cuales ya se había hallado evidencia científica de la función que desempeñan estos factores. Al igual que para otros factores de virulencia, como las PCWDE, los porcentajes de identidad hallados entre *T. frezzii* y los descriptos para *U. maydis* y *A. flocculosa* son elevados. Sin embargo, el porcentaje más alto de identidad fue el descripto para *T. thlaspeos*. Si bien este trabajo representó una primera aproximación general al estudio de factores de virulencia, se avanzó en la caracterización de dos agentes de particular interés: uno de ellos, el Snf1, con acción PCWDE con una alta homología con otros hongos de la familia; el otro, Pep1, con un elevado nivel de expresión en hifas y alta homología con estos organismos.

En relación a Snf1 (MW691285), cuando el transcripto fue traducido a proteína, se encontró que se compone por 763 aminoácidos, con una treonina conservada en la posición 202 (característica esencial para activación por vía de las quinasas). En relación a identidad con otros microorganismos, esta fue del 68% con el ortólogo *U. maydis*, 71% con *T. thlaspeos*, 76% con *A. flocculosa*, 69% con *S. reilianum*, 71% con *K. brasiliensis*, 69% con *U. hordei* y *M. antarcticus*. Al comparar las expresiones relativas que surgen de los datos de RNASeq normalizados con los de actina, es interesante destacar su sobreexpresión en teliosporas (0,32), respecto a basidiosporas (0,02) e hifas (0,02).

El segundo factor de virulencia en el que se enfocó el estudio, el Pep1, representa en *U. maydis* un efector clave al momento de penetración del hongo en el tejido vegetal. A partir del ADNc de *T. frezzii* se logró amplificar un fragmento de 543 pb correspondientes a la totalidad del transcripto del gen pep1, depositado en GenBank (MZ337396). La secuencia codificaría para una proteína de 180 aminoácidos, compatible con los tamaños observados en otras proteínas ortólogas. Paralelamente se analizó la posible presencia de un péptido señal a través del predictor SignalP-5.0, el cual arrojó una probabilidad del 0,9062 de presencia del mismo. Además, para evaluar la posibilidad de que la proteína deducida

pudiera actuar como efector, la analizamos mediante el programa EffectorP, asignando una probabilidad del 0,67; 0,80; 0,55 y 0,68 de presentar esa función para *T. frezzii*; *U. maydis*; *U. hordei* y para *T. thlaspeos*, respectivamente. Los porcentajes de identidad y homología entre proteínas de los diferentes organismos se detallan en la tabla 3.10.

Tabla 3.10: Porcentaje de identidad y homología a nivel proteico de las distintas Pep1 de hongos fitopatogénicos (excepto *A. flocculosa*) respecto *Thecaphora frezzii*.

Hongo	N° de AA deducidos	Identidad (%)	Homología (%)
<i>Thecaphora frezzii</i>	180	100	100
<i>Anthracoystis flocculosa</i> PF1	161	47	63
<i>Thecaphora thlaspeos</i>	142	44	62
<i>Ustilago maydis</i> 521	178	44	65
<i>Ustilago hordei</i>	175	34	48
<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	181	42	61

En la figura 3.5A se observa el resultado de comparación y alineamiento de secuencias de proteínas ortólogas de Pep1 presentes en estos organismos. Para ser consideradas homólogas, se consideraron proteínas que compartieran $\geq 25\%$ de identidad con una longitud de alineación superior al 80%. En la figura 3.5B se detalla la estructura de la proteína Pep1 de *T. frezzii*, con su péptido señal y sus 4 cisteínas conservadas.



v

Figura 3.5: Alineamientos de secuencias de Pep1 con organismos ortólogos y secuencia completa deducida: A: Alineamiento de secuencias de Pep1 de *T. frezzii*, *T. thlaspeos*, *A. flocculosa PF1*, *U. maydis 521*, *U. hordei* y *K. brasiliensis*. En rectángulos se señalan las cuatro cisteínas conservadas. (*) identidad de secuencia en todo el conjunto de la alineación; (:) una sola discrepancia en el conjunto de la alineación; (.) dos discrepancias en la alineación. Las secuencias subrayadas corresponden a los péptidos señales. B: Secuencia completa de la proteína Pep1 de *T. frezzii* señalando al péptido señal (subrayado) y a las 4 cisteínas conservadas (en negritas y sombreadas).

Una posible relación evolutiva entre los hongos alineados anteriormente pudo observarse a través de la construcción de un árbol filogenético basados en las secuencias proteicas de Pep1 (Figura 3.6).

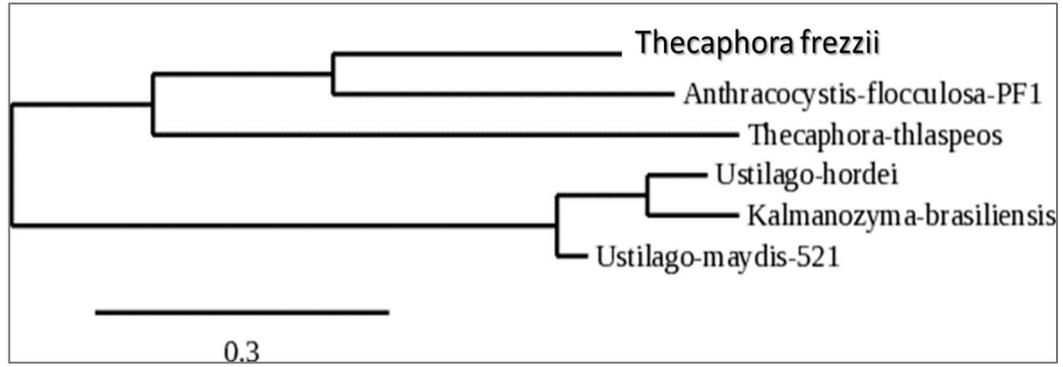


Figura 3.6: Árbol filogenético de *Pep1* construido en base a *T. frezzii*, *U. maydis* 521, *U. hordei*, *K. brasiliensis*, *T. thlaspeos* y *A. flocculosa* PF1.

Los niveles de expresión del ARNm de *Pep1* fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real en los tres estadios del *T. frezzii*. Coincidentemente con lo esperado, los niveles del transcripto de *Pep1* fueron más elevados en las hifas y basidiosporas, respecto a lo que sucede en teliosporas (Figura 3.7). La diferencia de expresión no fue significativa cuando se compararon los niveles presentes en las basidiosporas vs. hifas ($p > 0,05$), mientras si se encontraron diferencias significativas entre basidiosporas vs. teliosporas e hifas vs. teliosporas ($p < 0,001$).

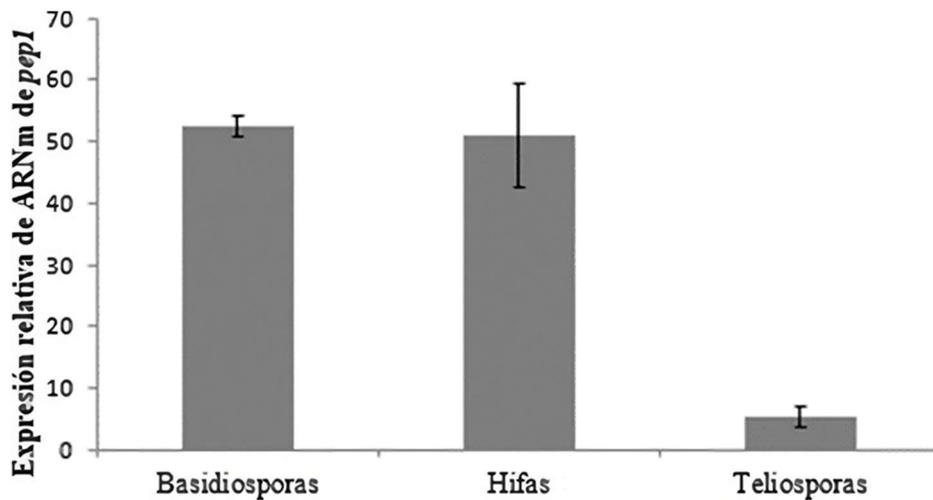


Figura 3.7: Niveles de expresión del ARNm de *pep1* en los tres estadios de *T. frezzii*. La media y D.E. (\pm), fueron calculadas para cada una de las diferentes muestras.

DISCUSIÓN

A la fecha, son escasos los estudios que analizan cuales con las modificaciones génicas que acompañan al desarrollo y formación de nuevas estructuras durante el ciclo de vida de *T. frezzii*. En el presente trabajo de tesis, se presenta una idea general de cómo cambia la transcripción génica, haciendo foco en determinados procesos, asociado también a antecedentes presentados en otros hongos de la familia de Ustilaginales.

Análisis de transcriptos relacionados a modificaciones estructurales de T. frezzii

- *Genes categorizados en funciones celulares de metabolismo (ME):*

Como se presentó en la sección de resultados, se observaron diferencia en el nivel de transcriptos al comparar los procedentes de teliosporas y los de hifas. Lo primero a destacar es la formación de hifas monocarióticas (no infectivas) *in vitro*, como se observó a través de la tinción de núcleos. Esto también fue descripto para *C. neoformans* al ser cultivado en condiciones similares (Zhao y Lin, 2021).

En relación a la transcripción génica diferencial, encontramos un gran aporte del total de los transcriptos asociados a enzimas que participan en el metabolismo celular. Mediante el análisis de patrones de genes específicos, identificamos el gen de citocromo-C peroxidasa (MW691239), relacionado a los procesos de oxidación celular, con un marcado aumento de transcriptos de 14 veces en teliosporas, respecto a hifas. Cabe destacar que en hongo *C. albicans*, esta proteína ha sido un sitio blanco de tratamientos con el compuesto “quinonemethide” (Seo *et al.*, 2016) que reduce efectivamente su expresión, por lo cual podría ser considerado como alternativa para el control de *T. frezzii*. Del mismo modo, nuestro análisis demostró en teliosporas, un aumento de 8 veces el nivel de transcriptos relacionados a GADPH (MW691253), lo que concuerda con observaciones en *Penicillium marneffe* (Lau *et al.*, 2013), donde la expresión génica se encontró aumentada alrededor de 20 veces. Está descripto que este gen codifica para una enzima que desempeña un rol crucial como factor de adhesión de conidios.

Por otra parte, encontramos una enzima hidrolasas de tipo deshalogenasas de haloácido (HAD) (MW691229) que ha sido reportada previamente como un importante factor de virulencia en *Pyrenophora teres* f. *teres* (Ismail y Able, 2016). Es notable el valor de expresión de este gen sustancialmente elevado en las teliosporas de *T. frezzii*. En *U. maydis*, el análisis de transcriptoma reveló un aumento de 3 veces la expresión génica, mientras que en su respectiva proteína se observó un aumento de 2,0-2,2 veces (Böhmer *et al.*, 2007).

Por el contrario, la expresión del ARNm para la enzima Glutaminasa A (MW691236) se encontró llamativamente elevada en *U. maydis* (Böhmer *et al.*, 2007) encontrándose un incremento de 85 veces, comparable con las 20 veces que está sobreexpresado en teliosporas de *T. frezzii*. De igual forma, la enzima 2-metilcitrato deshidratasa (MW691261) exhibió un aumento cercano a 2 veces a nivel de proteínas en *U. maydis* (Martínez-Salgado *et al.*, 2013), en concordancia con un aumento cercano a 7 veces en la transcripción de gen para esta enzima en teliosporas de *T. frezzii*.

La enzima Glicerol 2-deshidrogenasa (NADP (+)) (MW691268) ha sido descrita por el importante rol que desempeña en el catabolismo de glicerol en condiciones microaeróbicas en *U. maydis* (Böhmer *et al.*, 2007). Cabe destacar que en teliosporas de *T. frezzii*, se encontró un aumento de 5 veces en el nivel de transcriptos, en comparación con lo hallado en hifas. La expresión de esta proteína también se encontró elevada en *U. maydis* (Böhmer *et al.*, 2007). Estos autores también describen un aumento de 5 veces de la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (MW691270), en concordancia con los niveles de transcriptos encontrados en teliosporas de *T. frezzii*. Algo semejante observamos en la enzima aldo-ceto reductasa [NADP+] (MW691282), cuyo aumento fue de 2 veces en teliosporas respecto a hifas. Se encontró un aumento similar de esta enzima de la superfamilia de las reductasas, entre las proteínas de *U. maydis* (Martínez-Salgado *et al.*, 2013).

Respecto a genes down-regulados, tanto Fer6 (MW691283), enzima asociada transportadoras con unión a ATP, como Fer5 (MW691284), asociada a N6-hidroxilysina-acetil transferasa, ambas exhibieron una expresión 2 veces menor en teliosporas respecto a hifas de *T. frezzii*. Esto coincide con lo encontrado con *U. maydis*, aunque los niveles de sub-expresión génica fueron mucho más marcados, con un nivel de 80,5 veces down-regulados para Fer6 y 165 veces para Fer5. Entre otros genes también down-regulados, se encontró

una disminución en la expresión de 7 alfa-cefem-metoxilasa P8 (MW691288) tanto en *T. frezzii* como en *U. maydis* (8 veces y 2 veces respectivamente) (Martínez-Soto *et al.*, 2013). Estos autores además mencionan que la expresión relacionada a aminoácido-oxidasa peroxisomal (con cobre) (MW691292), se encuentra 61 veces down-reguladas en *U. maydis*; en el mismo sentido, encontramos que está 19 veces down-regulado en teliosporas de *T. frezzii*.

- ***Genes categorizados en funciones celulares de transporte y comunicación (TCC):***

Durante el análisis de expresión génica en *T. frezzii* encontramos numerosas enzimas involucradas en los procesos de comunicación y transporte celular, donde notamos un aumento de 9 veces en la expresión de genes relacionados a aspártico-proteasa (MW691301) en teliosporas; dicha enzima descrita previamente en estadios primarios de la infección de *Sclerotinia sclerotiorum* en girasol (Poussereau *et al.*, 2001). En *T. frezzii*, la expresión de esta enzima fue 9 veces sobreexpresada en teliosporas, respecto a hifas, sugiriendo su potencial importancia en el proceso de infección. Martínez-Soto *et al.* (2013) realizaron una comparación en los niveles de expresión de varios genes ortólogos en *U. maydis*, encontrando que genes relacionados a probable MET22 – fosfatasa de serina/treonina de proteínas (MW691299) y la monooxigenasa putativa (MW691314) se encontraban up-regulados, al igual que lo hallado en teliosporas de *T. frezzii*, con un aumento de 13,6 y 1,1 veces en este hongo, contra 2,3 y 2,5 veces en *U. maydis* respectivamente.

Por su parte, en el grupo de genes down-regulados, dichos autores reportaron que los genes asociados a acetato-quinasa (MW691315), opsina-1 (MW691321), y la proteína no caracterizada (um02763) (MW691322) exhibieron una sub-expresión en *U. maydis*; en el mismo sentido, se encontraron sub-expresados en teliosporas de *T. frezzii* con valores de 1,6, 4,9 y 5,4 veces en *T. frezzii*, y 10,9, 5,0 y 114 veces en *U. maydis*, respectivamente. Además, encontramos la sub-expresión de genes relacionados a aminoácido-permeasas (MW691333), que juegan un papel fundamental en la resistencia a fluconazol. En *U. maydis*, se encontró un nivel de expresión 6 veces mayor en estructuras germinativas que en esporas, al igual que en *T. frezzii*, donde el nivel fue 36 veces más elevado en hifas que en teliosporas. Así mismo, en un estudio realizado por Liu (2017) se describe que la delección de una enzima relacionada a autofagia (MoAtg14) (MW691320) en *Magnaporthe oryzae* resultó en una falta absoluta

de virulencia y problemas en la conidiación. Sin embargo, contrario a lo esperado, en *T. frezzii* se observó una down-regulación génica en teliosporas.

- ***Genes categorizados en funciones CCDP, CF, CRDV, DIC, EN, INNA, PBF, SDBCC y TPF:***

En el grupo de proteínas relacionadas al ciclo celular y procesamiento de ADN, se encontraron solo dos genes con una marcada sobreexpresión en esporas de *T. frezzii*, Clb2 (ciclina tipo-b 2) (MW691335) y el relacionado a ciclina específica de G1/S (MW691336), también sobreexpresados en *U. maydis* (Martínez-Soto *et al.*, 2013). En el grupo de Rescate, defensa celular y virulencia, la proteína de membrana peroxisomal (MW691347) mostró una marcada up-regulación de alrededor de 7 veces en *T. frezzii*, similar a lo observado en *U. maydis*, con un aumento de 2,3 veces en su expresión (Martínez-Salgado *et al.*, 2013). El gen que codifica para la enzima Hsp70 (MW691345), proteína relacionada a varios procesos celulares, entre ellos, su rol celular ante condiciones de estrés, se halló sobreexpresado alrededor de 5 veces en *U. maydis* (Tiwari y Shankar, 2018), en coincidencia con lo encontrado en *T. frezzii*, con un aumento de 14 veces en la expresión en teliosporas.

Dentro de la categoría DIC, se encontró solo un gen up-regulado en *T. frezzii*, que codifica para 14 alfa-demetilasa de esterol (MW691349), enzima que participa en la biosíntesis de ergosterol en células eucarióticas, utilizado como un target antifúngico para el grupo de los azoles. La expresión de este gen se encuentra aumentada también en *U. maydis* alrededor de 3 veces (Martínez-Soto *et al.*, 2013). Estos autores también indican que los genes relacionados a la proteína de control de la división celular CDC20 (MW691359), a YSC84 (MW691361) y al precursor de quitinasa A (MW691362) también se encontraron up-regulados en *U. maydis* (2,5, 2,0 y 6,7 veces respectivamente).

Uno de los factores de virulencia descrito para varios hongos, incluyendo a *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* está asociado a la enzima putativa permeasa de aminoácidos neutros (MW691357) (Martho *et al.*, 2016). Se describió que estos hongos tienen alrededor de 24 y 27 genes, respectivamente, que codifican para esta proteína. Dentro del grupo de las proteínas relacionadas a Energía, la enoil-(proteína transportadora de acilo) reductasa (MW691352) (ENRs) se encontró marcadamente sobreexpresada en teliosporas de *T. frezzii*. Resulta interesante su estudio debido al rol que desempeña en la elongación de los ácidos grasos, esencial para la supervivencia de células de mamíferos, plantas, hongos y

bacterias. Existe un creciente interés en las ENRs por el hecho de que varios agentes antimicrobianos, como triclosán, las usan como sitios blanco de acción.

Respecto a los genes down-regulados, encontramos la expresión de una enzima marcadamente disminuida (18 veces) en teliosporas en relación a hifas, la Ssp1 proteinquinasa (MW691342), identificada con un importante papel en la reorganización del citoesqueleto de actina en condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, en estudios en *U. maydis*, la expresión de esta enzima también está down-regulada, pero en niveles no tan marcados (4 veces) (García-Pedrajas y Gold, 2004). La enzima putativa de la familia de proteínas Rer1 (MW691367), relacionada a la recuperación de proteínas del compartimento de Golgi, se encontró cerca de 5 veces menos expresada en teliosporas en relación a hifas, al igual que en *M. haptotylum* con una sub-expresión de 1,4 veces en su transición a hifas (Ahrén *et al.*, 2005).

En el estudio realizado por Martínez-Soto *et al.* (2013) encontraron varios genes expresados diferencialmente en la transición de espora a hifa de *U. maydis*, particularmente dos genes up-regulados y uno down-regulado: probable adenosil-homocisteinasa (MW691399), probable proteína de segregación cromosomal SMC2 (MW691373) sobreexpresados 2 y 10 veces respectivamente, y el factor de transcripción PacC (MW691404), down-regulado 9 veces; estos genes ortólogos presentaron el mismo comportamiento en *T. frezzii*. Finalmente, otros 3 genes fueron up-regulados en el pasaje dimórfico de *U. maydis*: TPM2 (Tropomiosina isoforma 2 (MW691380), componente de los filamentos fúngicos), porina mitocondrial (MW691376) (que permite el pasaje de moléculas pequeñas a través de la membrana mitocondrial) y el homólogo de CipC (MW691370) (5,9, 2,2 y 14,1 veces a nivel proteico, respectivamente) (Martínez-Salgado *et al.*, 2013). En concordancia con estos autores, estos genes ortólogos también se encontraron sobreexpresados en *T. frezzii*.

Al menos 5 proteínas no caracterizadas presentaron la misma tendencia de expresión en ambos organismos, *T. frezzii* y *U. maydis*: proteína um10414 sobreexpresada 3,5 veces en *U. maydis*, y proteínas um05276, um10868, um04575 y um10208 todos down-regulados (11,7, 2,7, 2,6 y 4,7 veces respectivamente).

- ***Genes categorizados en funciones de síntesis de componentes de la pared:***

Como se mencionó previamente, se describen varias funciones de la melanina en los hongos, entre ellas, la protección contra agentes oxidantes, radiación UV, resistencia a agentes antifúngicos, unión a iones de hierro, interacción con plantas hospederas, entre otros (Belozerskaya *et al.*, 2015). En relación a su síntesis, numerosos genes han sido descritos como partícipes esenciales para la producción de enzimas que participan en las vías de síntesis de los diferentes pigmentos, como feniloxidasas, tirosinasas, catecolasas y lacasas (Agustinho y Nosanchuk, 2017).

Como se describió en el capítulo anterior, en la caracterización de los pigmentos de las teliosporas de *T. frezzii*, encontramos que la misma deriva del precursor tirosina, a través de la vía de la L-Dopa. Sin embargo, en el análisis de transcritos, encontramos diferentes enzimas que participan en la síntesis de las eumelaninas (lacasas), como así también de otros pigmentos, en particular de las policétido-sintasas, relacionadas a la síntesis de allomelaninas (derivadas de DHN).

En el trabajo de Eisenman y Casadevall (2012) relacionado al ensamblado de las melaninas, describen a estas últimas enzimas como esenciales en la síntesis de pigmentos de hongos como *A. fumigatus*, cuyo pigmento fue previamente caracterizado como allomelanina; incluso se menciona a un “cluster” de seis genes que codifican para estas enzimas. Estos mismos autores mencionan otros dos precursores utilizados por otros hongos: si el precursor es L-Dopa, esta se oxida a Dopaquinona por la vía de las lacasas; en cambio, si el precursor es tirosina, esta es convertida a L-Dopa y luego a Dopaquinona, aunque ambos pasos son llevados a cabo por las tirosinasas. En nuestro estudio encontramos dos enzimas: las Lacasas putativas 1 y 2, con alto porcentaje de homología con *U. maydis* y *P. flocculosa*. En *C. neoformans* se describe a L-Dopa como el principal precursor, y en su genoma se encuentran los genes que codifican para estas mismas dos lacasas (Eisenman y Casadevall, 2012), e incluso se llega a diferenciar su ubicación en las células, *lac1* localizada en la pared celular (Zhu *et al.*, 2001), y *lac2* de localización citoplasmática (Missall *et al.*, 2005).

Respecto a la síntesis y degradación de la quitina, otro de los principales componentes de las paredes celulares fúngicas, se la ha descrito además como una de las primeras moléculas que entran en contacto con la célula vegetal hospedera. Este polímero de N-acetilglucosamina, requiere una continua remodelación, que es mantenida por enzimas

quitinolíticas, incluyendo monooxigenasas de lisis de polisacáridos, N-acetilglucosaminidasas y quitinasas (Langner *et al.*, 2015). Estos autores señalan que el número de quitinasas en los hongos es altamente variable y se agrupan en diferentes familias con funciones varias. Por ejemplo, se describió el rol de las quitinasas GH18, codificadas a partir de un pequeño repertorio de genes y cuya función se relaciona a los procesos de citocinesis, esporulación y crecimiento de las hifas.

Sin embargo, es escasa la información sobre esta y otras familias de enzimas relacionadas a la vía de la quitina en *T. frezzii*, por lo que se hizo foco en hallar en el transcriptoma de este hongo, enzimas relacionadas tanto de síntesis (CHS) como de degradación de la quitina (CHT). Por otra parte, se buscó medir verdaderamente la actividad quitinasa, empleando los sustratos adecuados. Solo se logró detectar actividad quitinasa en basidiosporas e hifas, sin encontrarse actividad en teliosporas ni en el medio extracelular. Un resultado similar se describe en *Trichoderma virens*, para el cual se describen dos sistemas, uno de endoquitinasas (EC 3.2.1.14) y otro de exoquitinasas (EC 3.2.1.30) (Suraini *et al.*, 2007). Estos resultados indican que la expresión de las enzimas quitinasas estaría relacionada a estadios activos del hongo y no cuando se encuentra en su fase de latencia. Inclusive, el hecho de encontrar actividad en extractos proteicos de hifas y basidiosporas, sugiere que la actividad se orienta a los procesos de degradación y posterior reorganización de la quitina en el hongo.

En relación a la síntesis de quitina, se encontraron 8 enzimas GT del grupo de las CHS y 4 enzimas GH pertenecientes a las CHT, en coincidencia con el número de enzimas encontradas en *U. maydis*, con esta misma función (Weber *et al.*, 2006). Los elevados porcentajes de homología e identidad entre estas enzimas y las de *U. maydis* y *A. flocculosa* obtenidas por BLASTp sugieren una función similar, superior al 25% según lo sugerido por Sander y Schneider (1991), lo cual resulta inesperado para *A. flocculosa*, ya que, si bien pertenece a la misma familia que *T. frezzii*, es considerado un hongo no fitopatogénico (Lefebvre *et al.*, 2013). Así mismo, se analizó la presencia de dominios compatibles y conservados relacionados a esta función enzimática. En las 8 CHS se encontraron las secuencias QxxEY, LxEDRxL y QRRRW, lo que sugiere que se trata de CHS al igual que lo descrito para *U. maydis* (Ruiz Herrera *et al.*, 2002). Otro de los dominios conservados hallados fue DxxDxDxE (Sander y Schneider, 1991) en CHT1, CHT2 y CHT3, señalando la actividad quitinolítica de dichas enzimas.

Análisis de transcriptos relacionados a efectores y factores de virulencia de *T. frezzii***- *Análisis de enzimas degradadoras de las paredes vegetales (PCWDE)***

La superficie vegetal representa la primera línea de defensa para prevenir la penetración e infección de los patógenos, y su composición y estructura dificultan que estos avancen. Las paredes celulares están formadas por celulosas, hemicelulosas, pectinas, proteínas estructurales y laminillas medias, que constan principalmente de pectinas. Para superar esta línea de defensa, los hongos generalmente secretan una mezcla de enzimas hidrolíticas que incluyen cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* produce varias enzimas que actúan sobre los componentes pécticos y celulósicos de las paredes celulares de la planta huésped (Rajeswari, 2015). La fitopatogenicidad de algunos hongos está relacionada con la expresión de determinadas enzimas, las cuales se clasifican como PCWDE.

Mediante análisis bioinformático, identificamos transcriptos en *T. frezzii* con potencial para traducir y producir enzimas que forman el grupo PCWDE. En este estudio se analizaron en paralelo las enzimas expresadas por los hongos *U. maydis*, *T. thlaspeos*, *A. flocculosa*, *S. reilianum*, *K. brasiliensis*, *U. hordei* y *M. antarcticus*, todos pertenecientes a la familia de los Ustilaginales. Las identidades más altas de las PCWDE deducidos se encontraron con sus ortólogos de *A. flocculosa*, *T. thlaspeos* y *U. maydis*, respectivamente. Esto podría significar una mayor cercanía filogenética entre estos hongos. En *T. frezzii* se expresaron 40 genes candidatos con potencial de PCWDE que contribuyen a la interacción y patogenicidad de las plantas. Se clasificaron en 27 GHs, 2 PLs, 3 CHEs y 8 enzimas con actividades auxiliares (AA). Para la degradación de celulosa, galactomananos, xilanos, xiloglucanos y pectina, los hongos pertenecientes a la división Basidiomycota expresaron las enzimas AA3, GH1 y GH5; GH27; GH10, GH43; GH31, GH35; GH105, GH2, GH28, GH43, GH53, PL1 y PL4, lo que concuerda con lo hallado en *T. frezzii* (Rytioja *et al.*, 2014).

- ***Análisis de transcriptos que codifican para potenciales efectores***

En el trabajo adjuntado como Anexo I, se describen los hallazgos realizados en transcriptos de *T. frezzii* con potencial acción efectora al momento de infección. Uno de los principales efectores encontrados se refiere a la protein-quinasa Snf1. De acuerdo a los estudios realizados por Ludin *et al.* (1998) en *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *snf1* es esencial para la transcripción de genes reprimidos por la glucosa. La interacción directa entre el factor Snf1 y su subunidad activadora, Snf4, dentro del complejo quinasa está regulada por la señal de glucosa. Además, demostraron que el dominio catalítico de Snf1 presenta un aminoácido crítico conservado de treonina, en la posición 220.

Nuestros resultados en *T. frezzii* demuestran la presencia de treonina en esa misma posición. Al mismo tiempo, según la evidencia de Ahuatzí *et al.* (2007) señalan que la quinasa Snf1 se activa en condiciones de niveles bajos de glucosa. En concordancia, en nuestro trabajo encontramos niveles muy altos de Snf1 en teliosporas que, precisamente, no están expuestas a niveles elevados de glucosa, ya que se encuentran directamente en las vainas del maní. Mientras tanto, se encuentran niveles bajos de expresión de este gen en los estadios de hifas y basidiosporas que se cultivan en medio con dextrosa.

De forma similar a lo encontrado en el efector Snf1, otro de los efectores esenciales para el inicio del proceso de patogenicidad encontrado en *T. frezzii* se relaciona a Pep1 (Proteína esencial durante la penetración 1) descrito previamente para *U. maydis* (Doehlemann *et al.*, 2009). A partir de la obtención del ADNc de *pep1*, procedimos a la secuenciación del mismo y a la deducción de la secuencia aminoacídica correspondiente. Los análisis de esta secuencia mostraron la posible presencia de un péptido señal, el cual se encuentra presente en todos los efectores (Stergiopoulos y de Wit, 2009).

Además, en el análisis de homología con ortólogos de *pep1* de hongos próximos filogenéticamente con *T. frezzii*, pudimos encontrar ciertas regiones conservadas, particularmente la presencia de cuatro cisteínas que ya se ha demostrado que son esenciales para la función Pep1 (Hemetsberger *et al.*, 2015). Estos autores además describen que esta estructura proteica también se encuentra presente en hongos que afectan a plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, entre otros, *Sporisorium reilianum*, *Sporisorium*

scitamineum, *Ustilago avenae*, *Ustilago nuda* y *Melanopsichium pennsylvanicum*. Otro aspecto importante encontrado en *T. frezzii* es que la presencia del transcripto de *pep1* está altamente expresado en basidiosporas e hifas, las cuales son estructuras asociadas al estadio infectivo del hongo (Cazón *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Podemos concluir este capítulo destacando la participación de la expresión génica que acompaña a los cambios morfológicos de *T. frezzii* durante su ciclo de vida. Si bien estas transiciones representan procesos complejos de entender, solo podrán ser explicados al ser analizados desde diferentes aristas, para finalmente ser abordados a nivel molecular. El análisis del transcriptoma proporciona las bases para comprender los diferentes fenómenos que ocurren en el desarrollo de *T. frezzii* y su patogenicidad. Cabe aclarar que todos los estudios se realizaron sobre ARNs extraídos de estructuras obtenidas *in vitro*, a excepción de las teliosporas, que se obtienen directamente de cajas de maní infectadas.

Es por ello que consideramos primordial continuar con esta clase de estudios, contemplando la posibilidad de analizar transcriptos producidos, por ejemplo, al momento de la interacción con el tejido vegetal, donde probablemente se encuentre efectivamente la expresión de más enzimas con acción PCWDE. En este mismo sentido, se debe continuar investigando acerca de la producción de potenciales efectores, con acciones similares a Snf1 o Pep1. Sin embargo, consideramos que estos primeros hallazgos representan una importante contribución al entendimiento de los mecanismos biológicos de *T. frezzii*. Esto, en conjunto con los nuevos avances en el estudio del genoma de esta especie, abre las puertas para proponer o diseñar nuevas estrategias más específicas para su control.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios G. 2005. *Plant Pathology 5th ed.* Elsevier Academic Press, London, UK. 922p.
- Agustinho D. P. & Nosanchuk J. D. 2017. Functions of Fungal Melanins. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.12091-6>.
- Ahrén D., Tholander M., Fekete C., Rajashekar B., Friman E., Johansson T. & Tunlid A. 2005. Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*. *Microbiology*, 151(3), 789–803. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27485-0>.
- Ahuatzi D., Riera A., Peláez R., Herrero P. & Moreno F. 2007. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (7), 4485–4493. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606854200>.
- Almagro Armenteros J. J., Tsirigos K. D., Sønderby C. K., Petersen T. N., Winther O., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37 (4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- Altschul S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Arias S.L., Mary V.S., Velez P.A., Rodriguez M.G., Otaiza-González S.N. & Theumer M.G. 2021. Where Does the Peanut Smut Pathogen, *Thecaphora frezii*, Fit in the Spectrum of Smut Diseases? *Plant Disease*, 105 (9).
- Arias R. S., Conforto C., Orner V. A., Carloni E. J., Soave J. H., Massa A. N., Lamb M. C., Bernardi-Lima N. & Rago A. M. 2023. First draft genome of *Thecaphora frezii*, causal agent of peanut smut disease. *BMC Genomic Data*, 24 (1). <https://doi.org/10.1186/s12863-023-01113-w>.
- Aspeborg H., Coutinho P. M., Wang Y., Brumer H. & Henrissat B. 2012. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol Biol.*, 12, 186.
- Belozerskaya T. A., Gessler N. N. & Averyanov A. A. 2015. Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites*, 1–29. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_29-1.
- Böhmer M., Colby T., Böhmer C., Bräutigam A., Schmidt J. & Bölker M. 2007. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7 (5), 675–685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600900>.

- Boraston A. B., Bolam D. N., Gilbert H. J. & Davies G. J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382 (3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>.
- Bowman S. M. & Free S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28 (8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1), 248–254.
- Campbell J. A., Davies G. J., Bulone V. & Henrissat B. 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 326 (3), 929–939. <https://doi.org/10.1042/bj3260929u>.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V. & Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37 (Database), D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>.
- Cao W., Zhou X., McCallum N. C., Hu Z., Ni Q. Z., Kapoor U., Heil C. M., Cay K. S., Zand T., Mantanona A. J., Jayaraman A., Dhinojwala A., Deheyn D. D., Shawkey M. D., Burkart M. D., Rinehart J. D. & Gianneschi N. C. 2021. Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143(7), 2622–2637. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12322>.
- Cazón L. I., Paredes J. A. & Rago A. M. 2018. The biology of *Thecaphora frezii* smut and its effects on Argentine peanut production. *Advances in plant pathology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75837>.
- Chen F., Ma R. & Chen X. L. 2019. Advances of metabolomics in fungal pathogen–plant interactions. *Metabolites*, 9 (8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo90801690>.
- Conforto C., Cazón I., Fernández F. D. Marinelli A., Oddino C. & Rago A. M. 2013. Molecular sequence data of *Thecaphora frezii* affecting peanut crops in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 137 (4), 663–666. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0296-2>.
- Courville K.J., Frantzeskakis L., Gul S., Haeger N., Kellner R., Heßler N., Day B., Usadel B., Gupta Y.K., van Esse, H. P., Brachmann A., Kemen E., Feldbrügge M. & Göhre V. 2019. Smut infection of perennial hosts. *The New Phytologist*, 222 (3), 1474–1492.
- Coutinho P. M., Deleury E., Davies G. J. & Henrissat B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328 (2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00307-3).
- de Castro E., Sigrist C. J. A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P. S., Gasteiger E., Bairoch A. and Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34, W362–W365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>.

- Del Marmol V. & Beermann F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS 16723 FEBS Letters*, 381.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>. Acceso octubre 2022.
- Doehlemann G., van der Linde K., Aßmann D., Schwammbach D., Hof A., Mohanty A., Jackson D. & Kahmann R. 2009. Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens*, 5 (2), e1000290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000290>.
- Doehlemann G., Ökmen B., Zhu W. & Sharon A. 2017. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1), 573–644. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>.
- Eisenman H. C. & Casadevall A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93 (3) 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>.
- El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S. R., Luciani A., Potter S. C., Qureshi M., Richardson L. J., Salazar G. A., Smart A., Sonnhammer E. L. L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto S. C. E. & Finn R. D. 2019. The Pfam protein family database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>.
- Fernández-Leiro R., Pereira-Rodríguez Á., Cerdán M. E., Becerra M. & Sanz-Aparicio J. 2010. Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* α -galactosidase and its complexes with natural substrates reveals new insights into substrate specificity of GH27 glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (36), 28020–28033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144584>.
- Forsberg Z., Nelson C. E., Dalhus B., Mekasha S., Loose J. S. M., Crouch L. I., Røhr Å. K., Gardner J. G., Eijsink V. G. H. & Vaaje-Kolstad G. 2016. Structural and functional analysis of a lytic polysaccharide monooxygenase important for efficient utilization of chitin in *Cellvibrio japonicus*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7300–7312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700161>.
- García-Pedrajas M. D. & Gold S. E. 2004. Fungal dimorphism regulated gene expression in *Ustilago maydis*: II. Filament down-regulated genes. *Molecular Plant Pathology*, 5 (4), 295–307. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00233.x>.
- Gauthier G. M. 2015. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLOS Pathogens*. 11 (2). e1004608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>.
- Godfrey D., Böhlenius H., Pedersen C., Zhang Z., Emmersen J. & Thordal-Christensen H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*, 11 (1), 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-317>.
- Hemetsberger C., Mueller A. N., Matei A., Herrberger C., Hensel G., Kumlehn J., Mishra B., Sharma R., Thines M., Hüchelhoven R. & Doehlemann G. 2015. The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytologist*, 206 (3), 1116–1126. <https://doi.org/10.1111/nph.13304>.

- Hernández G.E. 2019. Análisis bioinformático del transcriptoma de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* producidos *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Méjico, 128 pp.
- Huang L., Zhang H., Wu P., Entwistle S., Li X., Yohe T., Yi H., Yang Z. & Yin Y. 2018. dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation. *Nucleic Acids Research*, 46 (D1), D516–D521. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx894>.
- Hulo N. 2021. The PROSITE database. <https://prosite.expasy.org/>. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj063>.
- Imoto T. & Yagishita K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35 (7), 1154–1156.
- Ismail A. & Able A.J. 2016. Secretome analysis of virulent *Pyrenophora teres* f. *teres* isolates. *Proteomics and Systems Biology*, 1 (20), 2625–2636.
- Jiang R. H. Y., Tripathy S., Govers F. & Tyler B. M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (12), 4874–4879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709303105>.
- Kall L., Krogh A. & Sonnhammer E. L. L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 35, W429–W432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>.
- Kim J. E., Lee H. J., Lee J., Kim K. W., Yun S. H., Shim W. B. & Lee Y. W. 2009. *Gibberella zeae* chitin synthase genes, GzCHS5 and GzCHS7, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Current Genetics*, 55 (4), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0258-6>.
- Kong L. A., Yang J., Li G. T., Qi L. L., Zhang Y. J., Wang C. F., Zhao W. S., Xu J. R. & Peng Y. L. 2012. Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002526>.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. & Sonnhammer E. L. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305 (3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Kubicek C. P., Starr T. L. & Glass N. L. 2014. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52 (1), 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>.
- Langner T., Öztürk M., Hartmann S., Cord-Landwehr S., Moerschbacher B., Walton J. D. & Göhrea V. 2015. Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, 14 (9), 846–857. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-15>.
- Lanver D., Tollot M., Schweizer G., Lo Presti L., Reissmann S., Ma L.S., Schuster M., Tanaka S., Liang L., Ludwig N. & Kahmann R. 2017. *Ustilago maydis* effectors and

- their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15 (7), 409–421. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.33>.
- Larson T. M., Kendra D. F., Busman M. & Brown D. W. 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases CHS5 and CHS7 are required for normal growth and pathogenicity. *Current Genetics*, 57 (3), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0334-6>.
- Lau K.P., Tse H., Chan J.S.Y., Zhou A.C., Curreem S.O.T., Lau C.C.Y., Yuen K.Y. & Woo P.C.Y. 2013. Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. *FEBS Journal*, 280 (24), 6613–6626.
- Lefebvre F., Joly D. L., Labbé C., Teichmann B., Linning R., Belzile F., Bakkeren G. & Bélanger R. R. 2013. The transition from a phytopathogenic smut ancestor to an anamorphic biocontrol agent deciphered by comparative whole-genome analysis. *Plant Cell*, 25 (6), 1946–1959. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113969>.
- Lenardon M. D., Munro C. A. and Gow N. A. R. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13 (4), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>.
- Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P. M. & Henrissat B. 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 6 (1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>.
- Liu X. H., Zhao Y. H., Zhu X. M., Zeng X. Q., Huang L. Y., Dong B., Su Z. Z., Wang Y., Lu J. P. & Lin F. C. 2017. Autophagy-related protein MoAtg14 is involved in differentiation, development and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep40018>.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P. M. & Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42 (Database issue), D490-5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Louise Glass N., Schmoll M., Cate J. H. D. & Coradetti S. 2013. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, 67, 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>.
- Ludin K., Jiang R. & Carlson M. 1998. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95. www.pnas.org.
- Martho K. F. C., De Melo A. T., Takahashi J. P. F., Guerra J. M., Da Silva Santos D. C., Purisco S. U., Melhem M. D. S. C., Dos Anjos Fazioli R., Phanord C., Sartorelli P., Vallim M. A. & Pascon R. C. 2016. Amino acid permeases and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 11 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163919>.

- Martínez-Salgado J. L., León-Ramírez C. G., Pacheco A. B., Ruiz-Herrera J. & de la Rosa A. P. B. 2013. Analysis of the regulation of the *Ustilago maydis* proteome by dimorphism, pH or MAPK and GCN5 genes. *Journal of Proteomics*, 79, 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.022>.
- Martínez-Soto D., Robledo-Briones A. M., Estrada-Luna A. A. & Ruiz-Herrera J. 2013. Transcriptomic analysis of *Ustilago maydis* infecting *Arabidopsis* reveals important aspects of the fungus pathogenic mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 8 (8), e25059. <https://doi.org/10.4161/psb.25059>.
- Mary V., Velez P., Rodriguez M., Rubinstein H. y Theumer M. 2019. Estudio de jasmonatos y precursores biosintéticos en extractos de clavos de maní inductores de germinación de esporas de *Thecaphora frezii*. *II Congreso Científico Profesional de Bioquímica, Córdoba, Argentina*.
- Mathioni S. M., Beló A., Rizzo C. J., Dean R. A. & Donofrio N. M. 2011. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and *in vitro* stresses. *BMC Genomics*, 12 (1), 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-49>.
- Missall T. A., Moran J. M., Corbett J. A. & Lodge J. K. 2005. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryotic Cell*, 4 (1), 202–208. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.202-208.2005>.
- Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G. A., Sonnhammer E. L. L., Tosatto S. C. E., Paladin L., Raj S., Richardson L. J., Finn R. D. & Bateman A. 2021. *Pfam: The protein families database in 2021*. <http://pfam.sanger.ac.uk>. Accessible en Marzo 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- Munro C. A. & Gow, N. A. R. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 39(1), 41–53. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.1.41.53>.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso julio 2022.
- Pagni M., Ioannidis V., Cerutti L., Zahn-Zabal M., Jongeneel C. V., Hau J., Martin O., Kuznetsov D. & Falquet L. 2007. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 35, W433–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm352>.
- Poussereau N., Gente S., Rasclé C., Billon-Grand G. & Fe M. 2001. aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 194 (1), 27–32.
- Pralea I. E., Moldovan R. C., Petrache A. M., Ilieș M., Hegheș S. C., Ielciu I., Nicoară R., Moldovan M., Ene M., Radu M., Uifălean A. & Iuga C. A. 2019. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163943>.
- Priebe S., Kreisel C., Horn F., Guthke R. & Linde J. 2015. FungiFun2: a comprehensive online resource for systematic analysis of gene lists from fungal species. *Bioinformatics*, 31 (3), 445–446. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu627>.

- Rajeswari P. 2015. *In vitro* inhibition of cellulolytic enzymes of *Fusarium Oxysporum* by *Trichoderma spp* and *Pseudomonas Fluorescens* on *Arachis Hypogaea L.* *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3 (1), 106–110. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v3i1.12138>.
- Ramlal P., Rani A., Nautiyal A., Alra C. K., Kumari R., Kumar J., Veeranna S. & Mishra V. 2023. Importance of omics approaches in plant-microbe interaction for plant disease control rights and content. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 128, 102153. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102153>.
- Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics*, 41(6), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0318-7>.
- Ruiz Herrera J., González Prieto J. & Ruiz Medrano R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research*, 1 (4), 247–256. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(01\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(01)00049-6).
- Rytioja J., Hildén K., Yuzon J., Hatakka A., de Vries R. P. & Mäkelä M. R. 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 (4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/mubr.00035-14>.
- Sander C. & Schneider R. 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 9 (1), 56–68. <https://doi.org/10.1002/prot.340090107>.
- Seo W. D., Lee D. Y., Park K. H. & Kim J. H. 2016. Downregulation of fungal cytochrome c peroxidase expression by antifungal quinonemethide triterpenoids. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59 (4), 281–284. <https://doi.org/10.3839/jabc.2016.048>.
- Sigrist C. J. A., de Castro E., Cerutti L., Cuche B., Hulo N., Bridge A., Bougueleret L. & Xenarios I. 2012. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>.
- Singh S., Nimse S. B., Mathew D. E., Dhimmarr A., Sahastrabudhe H., Gajjar A., Ghadge V. A., Kumar P. & Shinde P. B. 2021. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances*, 53. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107773>.
- Smith D. G., Garcia-Pedrajas M. D., Gold S. E. & Perlin M. H. 2003. Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Molecular Microbiology*, 50 (1), 259–275. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03680.x>.
- Sonah H., Deshmukh R. K. & Bélanger R. R. 2016. Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00126>.
- Soria N. W., Badariotti E. H., Alasino V. R., Figueroa A. C., Díaz M. S., Yang P. & Beltramo D. M. 2022. Elucidating potential effectors, pathogenicity and virulence factors expressed by the phytopathogenic fungus *Thecaphora frezii* through analysis of its

- transcriptome. *European Journal of Plant Pathology*, 164 (3), 325–335. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02562-2>.
- Sperschneider J. & Dodds P. N. 2022. EffectorP 3.0: Prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and Oomycetes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35 (2), 146–156. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0201-R>.
- Stergiopoulos I. & de Wit P. J. G. M. 2009. Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47 (1), 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>.
- Sützl L., Laurent C. V. F. P., Abrera, A. T., Schütz G., Ludwig R. & Haltrich, D. 2018. Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (6), 2477–2492. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8784-0>.
- Suraini A.A., Teoh L. S., Noorjahan A., Neelam S. & Kamarulzaman K. 2007. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Sciences*, 8 (1), 52–59. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.52.59>.
- Synstad B., Gåseidnes S., Van Aalten D. M. F., Vriend G., Nielsen J. E. & Eijsink V. G. H. 2004. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271 (2), 253–262. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03923.x>.
- Tanabe T., Kawase T., Watanabe T., Uchida Y. & Mitsutomi M. 2000. Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)88046-9](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)88046-9).
- Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tiwari S. & Shankar J. 2018. Hsp70 in Fungi: Evolution, Function and Vaccine Candidate. A. Asea & P. (eds) Kaur (Eds.), *HSP70 in Human Diseases and Disorders. Heat Shock Proteins*, 14. Springer, Cham.
- Tzima A. K., Paplomatas E. J., Rauyaree P., Ospina-Giraldo M. D. & Kang S. 2011. VdSNF1, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation. *MPMI*, 24 (1), 129–142. <https://doi.org/10.1094/MPMI>.
- Urán M.E. y Cano L.E. 2008. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Infectio*, 12 (2), 357–378.
- Vaaje-Kolstad G., Horn S. J., Sørli M. & Eijsink V. G. H. 2013. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal*, 280 (13), 3028–3049. <https://doi.org/10.1111/febs.12181>.

- Weber I., Abmann D., Thines E. & Steinberg G. 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 18 (1), 225–242. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037341>.
- Wingfield P. 1998. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*. A.3F.1-A.3F.8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>.
- Yin Y., Mao X., Yang J., Chen X., Mao F. and Xu Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40 (W1), W445–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>.
- Zahiri A. R., Babu M. R. & Saville B. J. 2005. Differential gene expression during teliospore germination in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 273 (5), 394–403. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-1142-9>.
- Zhao Z., Liu H., Wang C. & Xu J.-R. 2014. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-6>.
- Zhao Y. & Lin X. 2021. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*, 89, 104731. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104731>.
- Zhu X., Gibbons J., Garcia-Rivera J., Casadevall A. & Williamson P. R. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*, 69 (9), 5589–5596. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001>.

Tabla S.3.1: Identificación de genes relacionados a los diferentes procesos metabólicos (depositados en banco de datos de GenBank).

	Gene Bank acc number	Descripción del Gen	Familia/Tipo de efector
GENES RELACIONADOS AL PROCESO DE TRANSICION DE TELIOSPORA A HIFA (METABOLISMO -ME)	MW691228	Uricase	ME
	MW691229	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	ME
	MW691230	Putative dihydroxy-acid dehydratase	ME
	MW691231	Catalase/peroxidase HPI	ME
	MW691232	Related to ADH6 – NADPH-dependent alcohol dehydrogenase	ME
	MW691233	Putative formate dehydrogenase (NAD+)	ME
	MW691234	Putative phosphomannomutase	ME
	MW691235	Putative sterol C-24 reductase	ME
	MW691236	Glutaminase A	ME
	MW691237	K homology RNA-binding domain	ME
	MW691238	Putative adenylosuccinate synthase	ME
	MW691239	Cytochrome-c peroxidase	ME
	MW691240	Acetyl-CoA synthetase	ME
	MW691241	Related to deacetylase	ME
	MW691242	Related to b2-aldehyde-forming enzyme	ME
	MW691243	Glycosyltransferase family 1	ME
	MW691244	Putative alanine/arginine aminopeptidase	ME
	MW691245	Short chain dehydrogenase	ME
	MW691246	Putative glycine decarboxylase subunit P	ME
	MW691247	Putative inositol polyphosphate kinase	ME
	MW691248	Glycosyltransferase family 20	ME
	MW691249	PTPLA-domain-containing protein	ME
	MW691250	Nucleotide-Binding Domain of the sugar kinase/HSP70/actin	ME
	MW691251	FBP1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1)	ME
	MW691252	Putative bifunctional (2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase/dimethylallyltransferase	ME
	MW691253	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	ME
	MW691254	Putative bifunctional purine biosynthetic protein ade1	ME
	MW691255	Asparagine synthase	ME
	MW691256	CoA-transferase family III	ME
	MW691257	Putative adenylyl-sulfate kinase	ME
	MW691258	Putative pre-mRNA splicing factor prp1	ME
	MW691259	Putative histidine biosynthesis trifunctional protein	ME
	MW691260	Putative xylulokinase	ME
	MW691261	2-methylcitrate dehydratase	ME
	MW691262	Aspartate aminotransferase	ME
	MW691263	Putative triose-phosphate isomerase TPI1	ME
	MW691264	Putative molybdenum cofactor synthesis protein	ME
	MW691265	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	ME
	MW691266	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family	ME
	MW691267	Putative 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase	ME
	MW691268	Glycerol 2-dehydrogenase (NADP+)	ME
	MW691269	Probable UDP-galactopyranose mutase	ME
	MW691270	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	ME
	MW691271	Putative fumarate reductase	ME
	MW691272	Probable LYS12 (Homo-isocitrate dehydrogenase)	ME
	MW691273	Putative aspartate aminotransferase	ME
	MW691274	Conserved hypothetical protein	ME
MW691275	GLN1	ME	
MW691276	HOM6	ME	
MW691277	Related to betaine lipid synthase	ME	
MW691278	Uncharacterized protein	ME	
MW691279	ILV5-ketol-acid reductoisomerase	ME	
MW691280	Uncharacterized protein	ME	
MW691281	Fatty acid elongase	ME	
MW691282	Aldo-keto reductase yakc [NADP+]	ME	
MW691283	Fer6 – related to ATP-binding cassette transporter protein	ME	
MW691284	Fer5 – related to N6-hydroxyllysine acetyltransferase	ME	
MW691285	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	ME	
MW691286	Peptide methionine sulfoxide reductase	ME	
MW691287	Inositol phospholipid synthesis y fat-storage-inducing TM	ME	
MW691288	Related to 7alpha-cephem-methoxylase P8 chain	ME	
MW691289	Putative carboxyl methyl esterase	ME	
MW691290	UDP-glucose 6-dehydrogenase	ME	
MW691291	Sodium-independent sulfate anion transporter	ME	
MW691292	Related to peroxisomal amine oxidase (copper-containing)	ME	
MW691293	Pyridoxal 5'-phosphate synthase lyase subunit PdxS	ME	

Tabla S.3.1 (Cont.): Identificación de genes relacionados a los diferentes procesos metabólicos (depositados en banco de datos de GenBank).

GENES RELACIONADOS AL PROCESO DE TRANSICION DE TELIOSPORA A HIFA (TRANSPORTE Y COMUNICACIÓN CELULAR - TTC)	MW691294	Mitogen-activated serine/threonine-protein kinase	TTC
	MW691295	Related to aquaporin	TTC
	MW691296	Putative monosaccharide transporter	TTC
	MW691297	Putative aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	TTC
	MW691298	Putative nicotinate-nucleotide diphosphorylase (carboxylation)	TTC
	MW691299	Probable MET22 – protein ser/thr phosphatase	TTC
	MW691300	Sugar transport protein	TTC
	MW691301	Aspartic protease	TTC
	MW691302	Cation efflux family	TTC
	MW691303	Mitochondrial carrier protein	TTC
	MW691304	Mitochondrial carrier protein	TTC
	MW691305	Transmembrane amino acid transporter protein	TTC
	MW691306	Putative heat shock protein Hsp88	TTC
	MW691307	Mitochondrial matrix Mmp37	TTC
	MW691308	Conserved hypothetical ATP binding protein	TTC
	MW691309	Hexose transporter	TTC
	MW691310	Major Facilitator Superfamily	TTC
	MW691311	ABC transporter	TTC
	MW691312	Uncharacterized protein	TTC
	MW691313	Rac1 GTP binding protein	TTC
	MW691314	Related to putative monooxygenase	TTC
	MW691315	Related to acetate kinase	TTC
	MW691316	Related to MDR1 – Mac1p interacting protein	TTC
	MW691317	Probable monosaccharide transporter	TTC
	MW691318	Uncharacterized protein	TTC
	MW691319	Choline transporter-like protein 2	TTC
	MW691320	Autophagy-related protein 8	TTC
	MW691321	Related to opsin-1	TTC
	MW691322	Uncharacterized protein	TTC
	MW691323	SNF7 family protein	TTC
	MW691324	ESCRT-III subunit protein SNF7	TTC
	MW691325	RasGEF domain	TTC
	MW691326	Derlin-2	TTC
	MW691327	Putative ATP-binding cassette glutathione S-conjugate transporter	TTC
MW691328	Putative GTP-binding protein ypt5	TTC	
MW691329	Putative vacuolar ATP synthase subunit D	TTC	
MW691330	Putative iron-Sulfur cluster nifU-like protein	TTC	
MW691331	Lysine-specific permease	TTC	
MW691332	Plasma membrane P-type ATPase	TTC	
MW691333	Amino acid permease	TTC	
MW691334	Probable ZRT2 – zinc transporter II	TTC	

Tabla S.3.1 (Cont.): Identificación de genes relacionados a los diferentes procesos metabólicos (depositados en banco de datos de GenBank).

GENES RELACIONADOS AL PROCESO DE TRANSICION DE TELIOSPORA A HIFA (Ciclo celular y procesamiento de DNA (CCDP); Destino celular(CF); Rescate celular, defensa y virulencia (CRDV); Detoxificacion que involucra CYP450 (DIC); Energia (EN); Interaccion de nutrientes y adaptacion nutricional (INNA); Metabolismo (ME); Proteinas con función de unión o requerimiento de cofactores (PBF); Estrés, diferenciación celular y biogenesis de componentes celulares (SDBCC); Transporte y comunicacion celular (TCC); Transcripción (TPF).	MW691335	Clb2 (b-type cyclin 2)	CCDP
	MW691336	Related to G1/S-specific cyclin	CCDP
	MW691337	Related to DAD4 – outer kinetochore protein (part of Dam1 complex)	CCDP
	MW691338	Hus1-like protein	CCDP
	MW691339	DNA repair protein RAD51 homolog 1	CCDP
	MW691340	Putative fimbrin	CCDP
	MW691341	Inhibitor of apoptosis-promoting Bax1	CF
	MW691342	Putative dioxygenase Ssp1	CF
	MW691343	Ion protease homolog 2	CRDV
	MW691344	Putative chaperone ATPase	CRDV
	MW691345	HSP70	CRDV
	MW691346	Chitin synthase	CRDV
	MW691347	Peroxisomal membrane protein	CRDV
	MW691348	Taurine catabolism dioxygenase TauD	CRDV
	MW691349	Erg11 (sterol 14 alpha-demethylase)	DIC
	MW691350	Cytochrome P450 94A1	DIC
	MW691351	Putative glutamate dehydrogenase, NAD(+)-specific	EN
	MW691352	Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase	EN
	MW691353	Long-chain acyl-CoA synthetase	EN
	MW691354	Putative carnitine O-acetyltransferase	EN
	MW691355	Putative acetyl-CoA C-acyltransferase	EN
	MW691356	Putative acetyl-CoA C-acyltransferase precursor	EN
	MW691357	Putative neutral amino acid permease	INNA
	MW691358	Methylcrotonyl-CoA carboxylase	PBF
	MW691359	Related to CDC20 (cell division control protein)	SDBCC
	MW691360	Root hair defective 3 GTP-binding protein	SDBCC
	MW691361	Related to YSC84 (protein involved in the organization of actin cytoskeleton)	SDBCC
	MW691362	Related to chitinase A precursor	SDBCC
	MW691363	Related to GTP-binding protein Rab5c	SDBCC
	MW691364	S8 family peptidase	TPF
	MW691365	Serine carboxypeptidase S28	TPF
	MW691366	tRNA methyl transferase	TPF
	MW691367	Putative Rer1 family protein	TPF
	MW691368	Uncharacterized protein	TPF
MW691369	Peptidase family M28	TPF	
GENES RELACIONADOS AL PROCESO DE TRANSICION DE TELIOSPORA A HIFA (involucrados en más de una función)	MW691370	Hypothetical protein mRNA	CCDP, CF, CTD, SDBCC y TCC
	MW691371	SEP-03	CCDP, CF, PBF, SDBCC y TCC
	MW691372	CipC homologue	CCDP, CF, SDBCC y TCC
	MW691373	Probable SMC2 (chromosome segregation protein)	CCDP, PBF y SDBCC
	MW691374	Aspartyl protease	CF y SDBCC
	MW691375	SSC-mitochondrial HSP70 member	CF y TCC
	MW691376	Mitochondrial porin	CF, EN y TCC
	MW691377	Gamma-glutamyltransferase	CRDV y ME
	MW691378	Putative proteasome core particle subunit alpha 3	CRDV y TPF
	MW691379	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	CRDV, PBF y TPF
	MW691380	TPM2-tropomyosin isoform 2	CTD, SDBCC y TCC
	MW691381	Putative succinate-CoA ligase (GDP-forming) subunit beta	EN y ME
	MW691382	Putative phosphoenolpyruvate carboxykinase	EN y ME
	MW691383	Putative 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	EN y ME
	MW691384	Putative isocitrate dehydrogenase (NAD(+)) IDH2	EN y ME
	MW691385	Malic enzyme	EN y ME
	MW691386	Putative alpha-ketoglutarate dehydrogenase KGD1	EN y ME
	MW691387	Putative homoaconitate hydratase LYS4	EN y ME
	MW691388	Transketolase	EN y ME
	MW691389	Glucose-6-phosphate isomerase	EN y ME
	MW691390	Putative pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) subunit E1 alpha	EN y ME
	MW691391	Short-chain alcohol dehydrogenase	EN y ME
	MW691392	FBA1	EN y ME
	MW691393	Putative 6-phosphofructokinase	EN y ME
	MW691394	Serine dehydratase alpha chain	EN y ME
	MW691395	Alcohol dehydrogenase AdhP	EN y ME
	MW691396	ATP2-F1FO-ATPase complex, F1 beta subunit	EN y TCC
	MW691397	H+ -ATP synthase alpha chain	EN y TCC
	MW691398	Putative ubiquinol-cytochrome-c reductase catalytic subunit CYT1	EN, PBF y TCC
	MW691399	Probable adenosylhomocysteinase	ME y PBF
	MW691400	Aldo-keto reductase family 1 member A1	ME y PBF
	MW691401	Chitinase	ME y TCC
	MW691402	Putative NADPH-cytochrome P450 reductase	ME y TCC
	MW691403	Related to C2H2-type zinc finger protein	PBF y TPF
MW691404	PacC – transcription factor pacC	TPF y PBF	

Tabla S.3.1 (Cont.): Identificación de genes relacionados a los diferentes procesos metabólicos (depositados en banco de datos de GenBank).

GENES RELACIONADOS A LAS ENZIMAS DE LA VIA DE LA QUITINA	MW595363	Chitinase 1	CHT
	MW595364	Chitinase 2	CHT
	MW595365	Chitinase 3	CHT
	MW595366	Chitinase 4	CHT
	MW595355	Chitin Synthase 1	CHS
	MW595356	Chitin Synthase 2	CHS
	MW595357	Chitin Synthase 3	CHS
	MW595358	Chitin Synthase 4	CHS
	MW595359	Chitin Synthase 5	CHS
	MW595360	Chitin Synthase 6	CHS
	MW595361	Chitin Synthase 7	CHS
	MW595362	Chitin Synthase 8	CHS
	GENES RELACIONADOS A LA PRODUCCION DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA PARED VEGETAL	MW602835	putative long chain fatty alcohol oxidase partial mRNA
MW602836		putative GMC oxidoreductase partial mRNA	AA3
MW602837		putative GMC oxidoreductase partial mRNA	AA3
MW602842		putative glycoside hydrolase	GH5
MW602843		putative glycoside hydrolase family 5 protein	GH5
MW602844		putative beta-galactanase partial mRNA	GH5
MW602845		putative endo-beta-mannosidase	GH5
MW602846		putative glucan 1,3-beta-glucosidase	GH5
MW602852		putative cutinase partial mRNA	CE5
MW602853		putative glycoside hydrolase family 27 protein partial mRNA	GH27
MW602854		putative glycoside hydrolase family protein	GH105
MW602855		putative glycoside hydrolase family 2 sugar binding protein	GH2
MW602856		putative glycoside hydrolase family 28 protein partial mRNA	GH28
MW602857		putative glycoside hydrolase family 28 protein	GH28
MW602858		putative glycoside hydrolase family 28 protein	GH28
MW602859		putative glycosyl hydrolase family 43 protein	GH43
MW602860		putative glycosyl hydrolase family 53 protein	GH53
MW602861		putative pectin lyase a precursor	PL1
MW602862		putative rhamnogalacturonan lyase	PL4
MW602864		putative glycosyl hydrolase family 10 partial mRNA	GH10
MW602865		putative glycosyl hydrolase family 43 protein partial mRNA	GH43
MW602866		putative alpha-n-arabinofuranosidase 2 partial mRNA	GH43
MW602867		putative glycosyl hydrolase family 43 protein	GH43
MW602868		putative alpha-L-arabinofuranosidase partial mRNA	GH51
MW602869		putative carbohydrate esterase family 1 protein	CE1
MW602870		putative feruloyl esterase b	CE7
MW602871		putative glycoside hydrolase family 31 protein	GH31
MW602872		putative neutral alpha-glucosidase ab precursor	GH31
MW602873	putative beta-galactosidase	GH42	
MW602874	putative glycoside hydrolase family 35 protein partial mRNA	GH35	
GENES RELACIONADOS A EFECTORES Y FACTORES DE VIRULENCIA	OM056770	Uncategorized Protein	Localización Citoplasmica/apoplastica
	OM056771	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056772	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056773	Uncategorized protein	Localización Citoplasmica
	OM056774	Uncategorized protein	Localización Citoplasmica/apoplastica
	OM056775	Uncategorized protein	Localización Citoplasmica/apoplastica
	OM056776	Uncategorized protein	Localización Citoplasmica/apoplastica
	OM056777	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056778	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056779	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056780	Uncategorized protein	Localización apoplastica
	OM056781	Uncategorized protein	Localización Citoplasmica
	OM056782	Probable Chorismate Mutase	Localización Citoplasmica
	OM056783	Zincin or MEP1	Localización apoplastica
	OM056784	Related to PRY1 (yeast pathogen-related protein)	Localización Citoplasmica
	MW602861	Probable precursor of pectin lyase	Localización apoplastica
	OM056785	Glycoside hydrolase (family 28)	Localización apoplastica
	MZ337396.1	Pep1 virulence factor	Localización apoplastica

Tabla S.3.2 Análisis de PCWDE en *T. frezzii* (longitud de AA y comparación de identidad entre *U. maydis*, *T. thlaspeos*, *A. flocculosa* y *U. hordei*).

Num. Acc GenBank	Longitud de Proteínas deducidas (número de AA)	Identidad entre proteínas (%)			
		<i>U. maydis</i>	<i>T. thlaspeos</i>	<i>A. flocculosa</i>	<i>U. hordei</i>
MW602834	600	83	80	87	83
MW602835	710	75	82	84	74
MW602836	564	55	76	75	54
MW602837	610	75	82	86	76
MW602838	692	57	62	68	54
MW602839	628	60	72	78	29
MW602840	697	68	76	79	43
MW602841	623	55	70	73	54
MW602842	818	63	69	69	62
MW602843	882	57	68	77	59
MW602844	476	55	67	74	54
MW602845	511	67	57	69	ND
MW602846	463	64	59	73	52
MW602847	535	31	73	75	35
MW602848	632	52	64	65	52
MW602849	517	59	72	73	57
MW602850	628	65	73	76	66
MW602851	409	ND	72	76	ND
MW602852	259	61	65	59	62
MW602853	365	57	ND	60	39
MW602854	396	66	69	75	67
MW602855	664	ND	ND	60	53
MW602856	376	55	43	56	57
MW602857	462	26	57	60	ND
MW602858	358	64	65	65	64
MW602859	315	ND	59	67	ND
MW602861	388	47	66	66	ND
MW602862	685	ND	58	61	45
MW602860	355	ND	53	68	ND
MW602864	340	50	53	51	47
MW602865	300	50	81	79	30
MW602866	406	62	69	81	ND
MW602867	388	69	65	76	65
MW602868	317	48	64	66	50
MW602869	311	64	56	71	63
MW602870	594	ND	53	53	27
MW602871	1069	73	81	80	72
MW602872	880	61	91	74	61
MW602873	787	60	77	79	62

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE *T. FREZZII*

INTRODUCCIÓN

Ya ha sido descrito en capítulos anteriores la relevancia de la enfermedad del Carbón del maní, causada por el hongo *Thecaphora frezzii*, el cual permanece en el suelo año tras año mediante sus estructuras de resistencia, las teliosporas. Una vez que el ginóforo del maní ingresa al suelo, estas teliosporas reciben un estímulo que rompe la dormición e induce su germinación. A partir de allí se desarrollan diferentes estructuras propias de su ciclo de vida, para llegar a la formación de hifas infectivas que son las que finalmente ingresan en el tejido vegetal para producir la infección (Astiz Gassó y Marinelli, 2013). Todos estos cambios morfológicos que ocurren durante el desarrollo del hongo, se acompañan de modificaciones en la expresión de genes, de las cuales muchos se traducirán en enzimas que intervienen en el metabolismo de diferentes componentes celulares. En tal sentido, los lípidos componen un grupo de interés, ya que algunos tratamientos químicos en campo se enfocan en bloquear las enzimas que participan en su biosíntesis. Sin embargo, es escasa la información sobre los componentes lipídicos de *T. frezzii*. Por ello, se propuso realizar una caracterización exhaustiva de los lípidos presentes en cada estadio del hongo y cómo la expresión génica acompaña a cada proceso.

Los lípidos, principalmente los fosfolípidos y lisofosfolípidos, modulan la unión de las ATPasas a la membrana celular, por lo que han sido estudiados como dianas de compuestos antifúngicos (Hernández *et al.*, 1994). Pan *et al.* (2018) describen a los fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) entre otros, como principales constituyentes de las membranas celulares. Estos glicerofosfolípidos, junto con los esteroides y esfingolípidos, pueden agregarse y crear vacuolas que regulan la señalización molecular y desempeñan un papel importante en la patogenicidad y virulencia de los hongos.

Así mismo, se ha informado el importante papel de los ácidos grasos (FAs) en el almacenamiento como reserva de energía celular, en la integridad y dinámica de la membrana plasmática, en el metabolismo y la señalización celular (Chayakulkeeree *et al.*, 2007). Pan y colaboradores (2018) señalan que el almacenamiento de lípidos ocurre en las formas esterificadas de FAs y esteroides libres, es decir, triacilglicerol (TAGs) y ésteres de esteroles, respectivamente. Por ello, estos componentes han sido estudiados como posibles objetivos de los fungicidas; por ejemplo, la anfotericina B (AmB), que produce poros en las membranas al unirse al ergosterol (Mesa Arango, 2014). Palacios y colaboradores (2011) destacan la resistencia a AmB de algunas cepas de levaduras, debido principalmente a la modificación de los esteroides de membrana.

En el estudio de *Cryptococcus neoformans* (Chayakulkeeree *et al.*, 2007) se describieron las funciones de los genes involucrados en la biosíntesis de los FAs y su importancia en la estructura de la membrana, señalando que el bloqueo en la síntesis de los FAs potencia la acción de azoles en la formación de membrana. Otros trabajos han informado acerca de la variación en el contenido de lípidos de las estructuras infecciosas y de resistencia, como se describe para las hifas y esporas de *Penicillium roqueforti* (Andriyanova *et al.*, 2011).

En el presente estudio se planteó como objetivo principal comparar el perfil lipídico de cada estructura de *T. frezzii* desarrollada durante su ciclo biológico. La composición de lípidos en cada etapa podría estar relacionada con la susceptibilidad a diferentes antifúngicos, por ejemplo, bloqueando las vías involucradas en la etapa infectiva, impidiendo su desarrollo. En el mismo sentido, como ya se ha estudiado en otros hongos levaduriformes, se analizó la posible acción fungicida de AmB que se une al ergosterol y consecuentemente provoca la muerte celular. Este análisis se complementa desde una perspectiva molecular, en la identificación de transcritos que codificarían diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de diferentes lípidos, para plantear posibles dianas antifúngicas (Sant *et al.*, 2016). Estos cambios transcripcionales pueden ser analizados a través de técnicas de secuenciación de ARNm. Los datos obtenidos de los estudios RNASeq facilitan la identificación de numerosos genes que codifican para enzimas implicadas en diferentes vías biosintéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo estos análisis, en primer lugar, se procedió a la obtención de las diferentes estructuras del hongo. Las teliosporas fueron extraídas directamente de cajas carbonosas, previamente desinfectadas superficialmente. El cultivo de basidiosporas e hifas se realizó *in vitro*, como se describe en el capítulo 2. Todos los reactivos para análisis de biología molecular, cromatografía HPLC o espectrometría de masa (MS) fueron de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los medios y suplementos de cultivo fueron de la marca Britania (CABA, Argentina).

Se realizó una desinfección de las esporas con una solución al 5% (v/v) de hipoclorito de sodio (55 gramos de cloro activo/L) y luego de lavar con agua destilada estéril, se separó un grupo para extracción lipídica. Otro grupo se empleó para la germinación, de las cuales se obtuvieron basidiosporas e hifas *in vitro*. Luego de confirmar la correcta formación de cada estructura por microscopia en campo claro, se prepararon pellets por centrifugación a 4.000 rpm. Luego el pellet de cada estructura fue lavado y pesado. Los pesos de las muestras húmedas fueron de 0,5 g de teliosporas, 0,6 g de basidiosporas y 0,6 g de hifas. Todas las muestras fueron molidas en mortero con agregado de nitrógeno líquido. Luego se realizó la extracción descrita por Folch *et al.* (1957) para extracción de lípidos. De cada muestra, se prepararon tres fracciones separadas y se procesaron como se describe en la figura 4.1. La derivatización a metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) se realizó a partir de los extractos de cloroformo, por reflujo con 0,5 M de NaOH en metanol, seguido de 14% (v/v) de tricloruro de boro en metanol. Los FAMES fueron analizados por el método de AOAC (AOAC 996.01, 2012) para determinación de ácidos grasos utilizando ácido undecanoico como estándar interno.

Luego del paso de saponificación con 500 μ L de KOH 1N a 80 °C durante 10 min, se realizó una extracción con hexano (3 veces con 500 μ L cada vez). Los lípidos insaponificables fueron recuperados mediante secado del extracto en atmósfera de N₂ y solubilizados en 200 μ L de piridina. Luego se agregó N-metil-N-(trimetilsilil)-

trifluoroacetamida (BSTFA) para finalizar la derivatización. El producto fue resuspendido en 1 mL de n-hexano.

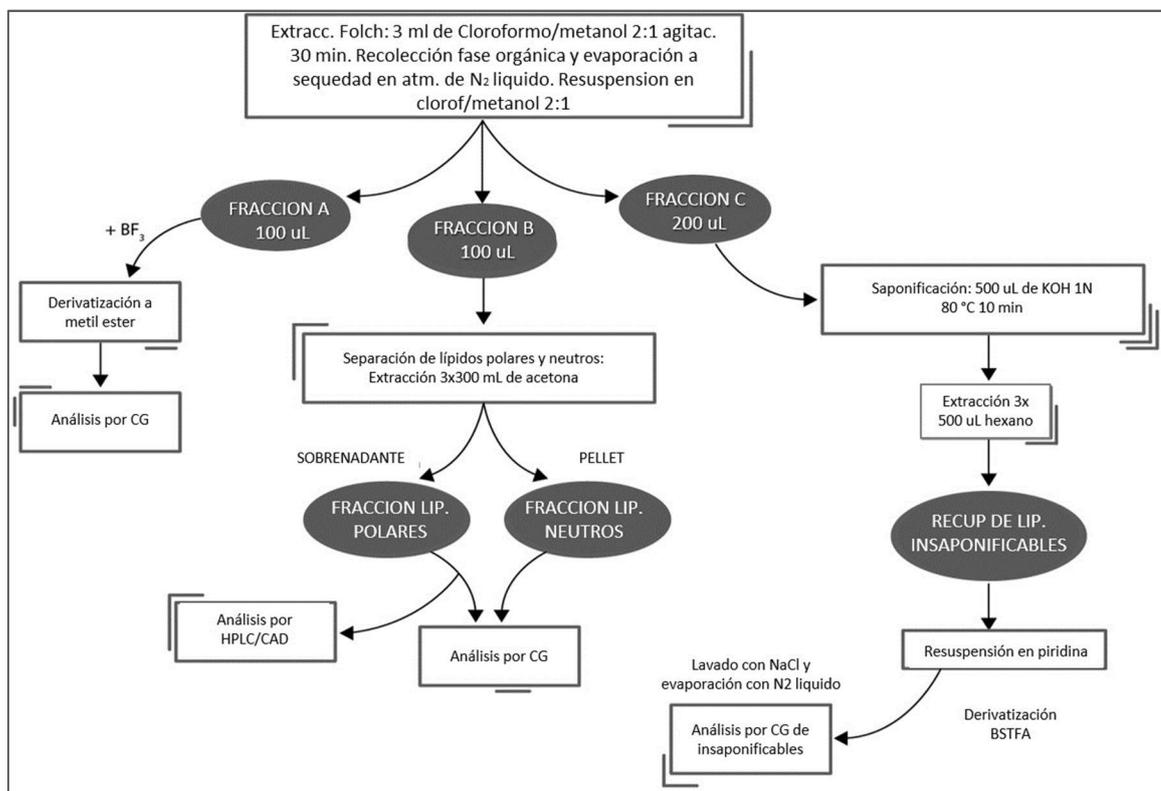


Figura 4.1: Procesamiento de muestras para separación de lípidos polares, neutros e insaponificables y análisis por técnicas de cromatografía gaseosa (CG) y líquida de alta performance (HPLC) con detector CAD (por sus siglas en inglés de “Charged Aerosol Detector”).

Para los análisis cromatográficos se emplearon como estándares mezclas de fosfolípidos de soja, conteniendo PC (3,8 mg), PE (3,0 mg), PI (1,8 mg), PA (0,7 mg) y LPC (0,7 mg) con 0,1% BHT (p/v). Para la caracterización de CL, también se empleó una mezcla de CLs estándar. En la determinación de Fas, se empleó como estándar una mezcla de 37 FAMES (Supelco), y como estándar de la fracción de insaponificables se empleó un estándar de ergosterol (Sigma-Aldrich).

Análisis cromatográficos de los lípidos polares y neutros

Los ensayos de HPLC se llevaron a cabo en un equipo Alliance 2690 LC (Waters, USA) equipado con mezclador de solventes y programación de flujo. Las muestras (30 µL

de cada una) fueron inyectadas automáticamente en un “loop” de inyección y la elución fue monitoreada con un equipo Corona Veo Charged Aerosol Detector (CAD) (Thermo Fisher, USA). La columna empleada fue una Phenomenex Luna C8 (5 μm , 100A, 150 \times 4, 6 mm D.I.). Las corridas se realizaron a 45 ± 1 °C a un flujo de solvente de 1,2 ml/min.

El análisis de CG de los FAMES fue realizado en un equipo a PerkinElmer Clarus 680 Gas Chromatography System equipado con un “autosampler” y detector FID. La separación se realizó en columna Varian W-COT FUSED SILICA CP-7420 (100 \times 0,25 mm D.I. x 0,25 μm df) usando H_2 (1 m/min) como gas carrier; la temperatura del horno fue programada en 100 °C por 5 min, seguido por una rampa de 2 °C/min hasta 140 °C, mantenida por 10 min, luego 2 °C/min hasta 240 °C y mantenida durante 20 min; el volumen de inyección de cada muestra fue de 1 μl y los datos se procesaron con el Sistema Total Crome. Para analizar la fracción de lípidos insaponificables, se utilizó un equipo de CG Shimadzu Nexis GC – 2030 equipado con sistema automático de muestreo Shimadzu AOC 20i – Plus con una columna Restex Rtx - 5 MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm df). El programa del horno fue de 80 °C 1 min, rampa de 15 °C/min hasta 260 °C durante 5 min, rampa de 30 °C/min hasta 290 °C, y finalmente se mantuvo 1 min. La temperatura del inyector se seteo a 220 °C y la del detector a 260 °C. El flujo total del gas Carrier fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de las muestras fue de 1 μl .

Ensayo del efecto de AmB sobre hifas de T. frezzii

Para evaluar el efecto de AmB sobre el crecimiento de las hifas, se preparó una solución (10 mg/ml) de AmB en DMSO. Las hifas se resuspendieron en 10 ml de caldo de papa por lo que el análisis se realizó en la etapa de crecimiento exponencial del micelio. Se añadió la solución de AmB para obtener una concentración final de 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Después de 2, 4 y 24 h de incubación, las hifas se lavaron del medio de cultivo y se añadió yoduro de propidio (IP) para evaluar el efecto fungicida mediante tinción fluorescente de las células muertas. El porcentaje de células muertas se calculó por triplicado contando el número de células teñidas con IP de un total de 100 células.

Análisis de ARN

Entre los objetivos del trabajo, se planteó estudiar la modificación en los transcritos de *T. frezzii*, relacionados a proteínas con posible participación en la biosíntesis lipídica. Para ello, se realizó la extracción de ARN de cada estadio como se explica en el apartado “materiales y métodos” del capítulo 3. Una vez corroborada la cantidad y calidad de los ARN extraídos se procedió a la preparación de las librerías de ADNc como se explica en ese mismo apartado y se enviaron a secuenciar en INDEAR (Rosario, Argentina). Para el análisis de homología de proteínas y genes ortólogos, se buscaron mediante el programa ORF Finder site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) del NCBI-NIH. La comparación tipo Blast se realizó con el programa https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, contra una base de datos del NCBI-NIH de hongos, y PSI-BLAST (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/>) en la base de datos UniProt/Swiss-Prot usando parámetros predeterminados. De ellos, se dedujeron los porcentajes de identidad, homología y “e-value”, lo que permitió su identificación con proteínas deducidas de otras especies fúngicas.

Para el estudio cuantitativo mediante PCR en tiempo real se cuantificaron algunos de los genes correspondientes a enzimas implicadas en la ruta del ergosterol, fosfolípidos y ácido linoleico. La lista de oligonucleótidos para los genes se diseñó utilizando el programa PriBlastatt (NCBI, NIH) (Tabla 4.1). La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real Step One Plus® (Thermo Fisher, Massachusetts, EE. UU.). El ADNc se preparó a partir de las mismas muestras de ARNs que las utilizadas para el análisis RNASeq, utilizando la enzima transcriptasa inversa Super Script® III (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific™) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La qPCR se realizó con tres réplicas técnicas utilizando el kit Sybr® Green Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La expresión genética relativa se realizó utilizando la transcripción de actina como gen de referencia para la normalización de la expresión; este gen se usa frecuentemente para la normalización de la expresión de genes fúngicos (Mosquera *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2021). El programa utilizado para las mediciones fue: 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C por 10

seg y 60 °C por 30 seg. La fluorescencia se leyó después de este paso. Al final del programa, la temperatura se redujo a 65 °C con una rampa de 0,1 °C/seg, lo que permitió evaluar las curvas de fusión de cada reacción. La especificidad de los amplicones se verificó analizando las curvas de fusión y secuenciando los fragmentos obtenidos. El cambio de expresión en el gen diana con respecto a la expresión de actina se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Luego se determinaron las medias y la D.E. (\pm) para cada una de las diferentes muestras.

Tabla 4.1: Oligonucleótidos empleados para PCR en tiempo real.

Nombre de Enzimas	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Amplif. (en pb)
Delta (12) Desaturasa de Ácidos grasos (EC 1.14.19.6)	CACCGTCAAAGACCTCCTCT	GGTAGCTGCATAGCCGAAAG	121
HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.34)	ACATCCTGACGGCCATCTAC	CTCGCCGTTGTTGATTGACT	101
PS Sintasa (EC 2.7.8.8)	TCACCCTCATGAACGCCTTT	CCGTCGAGGAGGTCAAAGAT	136
PI Sintasa (EC 2.7.8.11)	GCCTCGAACAACACCGAAT	TGGGCACAAAGAGAAAGACG	116
PS Decarboxilasa (EC 4.1.1.65)	AACGGCATCCAGTATAGCCT	TGACATTGCTCGTCTGCTTG	142
PGP Fosfatasa (EC 3.1.3.27)	GACAAGGACAACCTGCCTCAC	CGCTAGAGTTGCTGACGATG	124
Actina	CTACGTTGCCCTCGACTTTG	CGTTTCCGACAGTGATGACC	107

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2016). Todos los datos se calcularon como media \pm D.E. La significancia de las diferencias en los valores medios de cada grupo se probó mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Composición de ácidos grasos de lípidos totales en estructuras de T. frezzii

Considerando la masa total de teliosporas analizadas, encontramos que alrededor del 2,8% del peso corresponde a lípidos totales, mientras que en hifas y basidiosporas este porcentaje fue marcadamente mayor (8,8 y 7,8 respectivamente). Al analizar los lípidos por separado, se hallaron diferencias en la composición de lípidos polares y neutros, de acuerdo con el estadio ontogénico. Si bien las hifas y basidiosporas presentaron similares porcentajes de lípidos neutros (60%) y polares (40%) se observó un porcentaje notablemente mayor de lípidos neutros en las teliosporas (81%). Los perfiles de FAMES se analizaron a partir de la fracción de cloroformo de la extracción de Folch (fracción A, Figura 4.1) y encontramos diferencias estadísticamente significativas en la composición de lípidos de los tres estadios. Las teliosporas mostraron FAs monoinsaturados como componentes principales (54%), mayormente ácido cis-oleico (18:1), seguido de FAMES saturados (43%), conformados por ácidos caprílico, láurico, palmítico, esteárico y lignocérico. La cantidad de FAs poliinsaturados alcanzó el 3,2% de los lípidos totales.

La relación entre FAs saturados e insaturados se invierte en basidiosporas e hifas, en las cuales los Fas saturados alcanzaron el 62% y el 52%, respectivamente. Las basidiosporas también presentaron un 26% de FAs monoinsaturados y un 12% de FAs poliinsaturados. En las hifas, se observó el 23% de los FAs monoinsaturados y el 25% de los FAs poliinsaturados (Figura 4.2A). En cuanto a los FAs monoinsaturados, el ácido linoleico aparece como componente principal en los tres estadios, cerca del 97% en teliosporas y basidiosporas, y el 90% en hifas. Al caracterizar la longitud de cadena de los FAs aislados en cada estructura, se observó que en todos los casos prevalecieron los FAs de cadena larga ($\geq 18C$), alcanzando un valor mayor en teliosporas (77%), que en basidiosporas (65%) e hifas (71%) (Figura 4.2B).

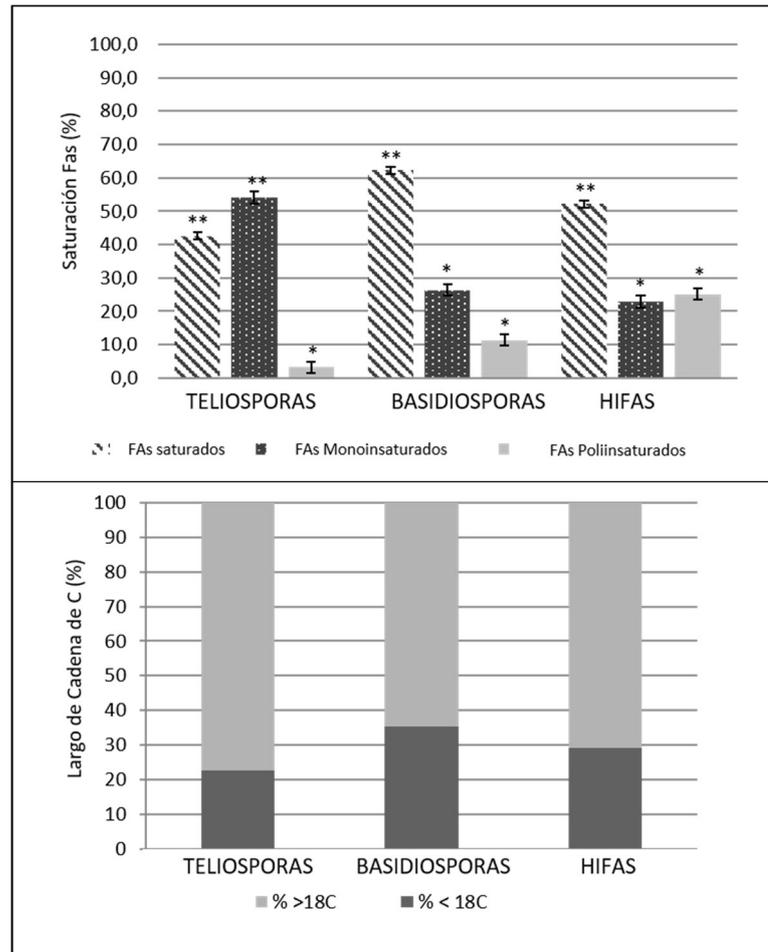


Figura 4.2: Grados de saturación de FAs (A) y largo de cadena (B) en teliosporas, basidiosporas e hifas de *T. frezzii* analizados por CG. Las barras de error representan una DE (n = 3). Diferencias significativas entre los grupos se indican con * y ** (p<0,01).

Análisis de FAME en lípidos polares y neutros

Los restos de FAs de lípidos totales se convirtieron en sus ésteres metílicos de FA (FAME) mediante la adición de trifluoruro de boro. Se llevó a cabo un paso de extracción adicional con acetona en la fracción B (Figura 4.1), para analizar los FAMEs en lípidos polares y neutros por separado, en los tres estadios ontogénicos (Tabla suplementaria S.4.1). Se considera que los FAMEs de la fracción lipídica polar constituyen fosfolípidos y los de la fracción neutra constituyen triglicéridos. El ácido oleico aparece como el principal componente de FAs de los lípidos polares en las tres estructuras de *T. frezzii*. Además, fue el componente más abundante de la fracción lipídica neutra en las teliosporas; este se modifica

notablemente en las basidiosporas, en las que se encontraron los ácidos palmítico y esteárico como componentes principales de la fracción lipídica neutra. En las hifas también puede observarse este cambio, donde se destaca la presencia de ácido esteárico y ácido linoleico poliinsaturado como componentes principales en la fracción lipídica neutra.

Perfil lipídico en fracción polar analizado por HPLC/CAD

El perfil de lípidos solubles en acetona (fracción B-Figura 4.1) se realizó mediante análisis HPLC/CAD. Encontramos a PC como el fosfolípido más abundante en los tres estadios ontogenéticos. Aunque PI y PE presentan cantidad similar entre las etapas, se observó que Liso-PC fue más abundante en teliosporas que en basidiosporas e hifas, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tres fases. Sin embargo, encontramos diferencias en el contenido de cardiolípidos en las teliosporas, en relación con las basidiosporas y las hifas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Perfil de fosfolípidos (fracción polar) de teliosporas, basidiosporas e hifas de *T. frezzii*.

Fosfolípidos	Teliosporas	Basidiosporas	Hifas
Liso-PC	2,4 ^a	1,4 ^a	0,9 ^a
CL	19,5 ^b	14,8 ^b	14,7 ^b
PI	2,0 ^a	2,9 ^a	2,8 ^a
PC	74,8 ^c	79,2 ^c	79,9 ^c
PE	1,3 ^a	1,7 ^a	1,7 ^a

Liso-PC: liso-fosfatidiletanolamina, CL: cardiolípidos, PI: fosfatidilinositol, PC: fosfatidilcolina y PE: fosfatidiletanolamina. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores (media ± DE., $n = 3$, $P < 0,01$, ANOVA de una vía).

Perfil de lípidos insaponificables analizados por CG-FID

El análisis de la fracción C (Figura 4.1) se realizó por CG/FID para determinar la presencia de ergosterol. Luego de derivatizar con MSTFA y resuspensión en hexano, se hallaron dos picos principales en el cromatograma de CG. Dado que los tiempos de retención de estos picos no coinciden exactamente con el pico de ergosterol estándar utilizado para el ensayo, se confirma que el ergosterol no se encuentra presente en las estructuras en estudio, al menos como la molécula conservada original. Sin embargo, se sospechó sobre posibles modificaciones de ergosterol, como oxidación o metilación, que pueden producir un determinado corrimiento en los tiempos de retención. Si bien estos derivados todavía no han sido acabadamente descritos, aún queda el interrogante de conocer cuáles son esas modificaciones del ergosterol que el hongo realiza para ser funcional a la constitución de la membrana.

Para corroborar la presencia de alguna molécula derivada del ergosterol, se ensayó la acción de AmB, un fungicida que produce su efecto uniéndose al ergosterol de la pared fúngica generando una permeabilización celular. Este ensayo se realizó sobre hifas de *T. frezzii* crecidas *in vitro*, donde se encontró que la viabilidad celular decrece aceleradamente en medios con AmB, en comparación con las células crecidas en medio de cultivo sin AmB. Luego de 2h de incubación con AmB en dos concentraciones (100 µg/ml y 500 µg/ml) el porcentaje de células teñidas (muertas) aumenta en un 60 y 90% respectivamente. Luego de 4h de incubación a las mismas concentraciones de AmB, en ambos tratamientos se observa muerte celular de 100%.

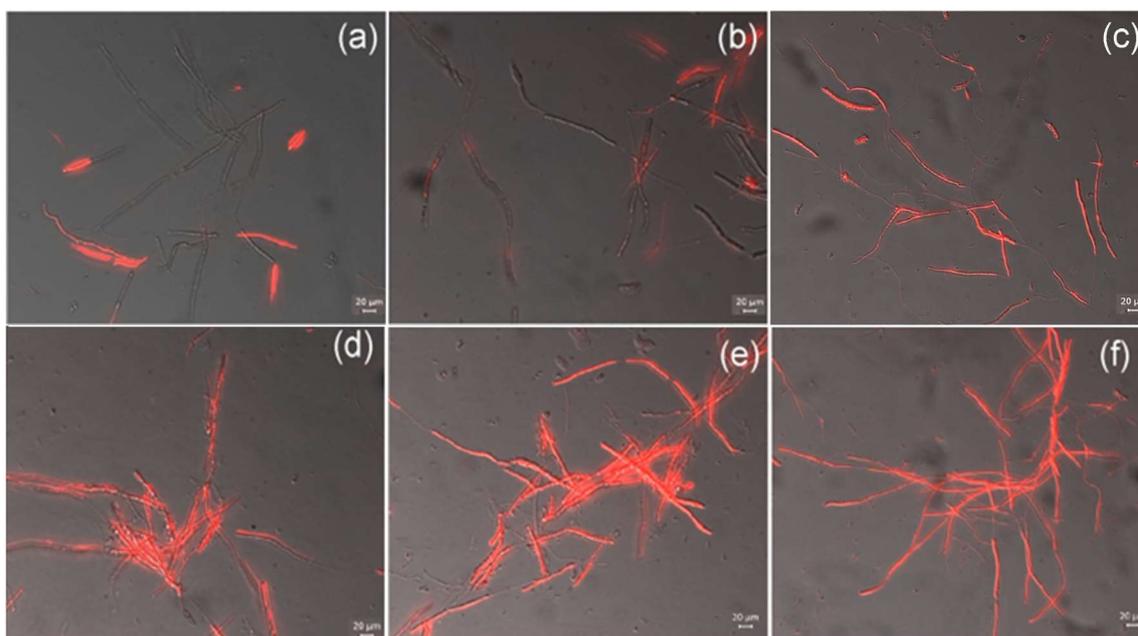


Figura 4.3: Efecto de la concentración y tiempo de tratamiento con AmB en la viabilidad de hifas de *T. frezzii* (200X). Las células muertas se observan teñidas con PI. a) Control 2h; b) Control 4h; c) 100 µg/ml AmB 2 h; d) 100 µg/ml AmB 4 h; e) 500 µg/ml AmB 2 h; f) 500 µg/ml AmB 4 h.

Identificación de ARNm que codifican para enzimas de las vías metabólicas de lípidos

Con el fin de identificar posibles transcritos que codifican para enzimas de las vías lipídicas por técnicas de RNASeq, se analizaron las secuencias de las enzimas de interés, las cuales fueron comparadas con aquellas de *Anthracocystis flocculosa* PF-1, *Thecaphora thlaspeos* y *Ustilago maydis* 521. Se encontraron 16 enzimas deducidas del análisis del RNASeq de la vía de biosíntesis de ergosterol; entre ellas, una de las más relevantes fue la 3- Hidroxi-3-Metil-CoA Reductasa (EC 1.1.1.34).

En relación a la vía sintética de fosfolípidos, en nuestro trabajo se encontraron 11 transcritos relacionados a enzimas involucradas en esta vía, de los cuales resultó uno de particular interés, cuya secuencia deducida codifica para delta 12 desaturasa de ácidos grasos, una enzima responsable de la conversión de ácido oleico a linoleico. Estas secuencias deducidas fueron comparadas con bases de datos de otros hongos de la familia, y se hallaron altos porcentajes de homología con *A. flocculosa* PF-1, *T. thlaspeos* y *U. maydis* 521. (Tabla

4.3) En esta tabla también se presentan los sitios blanco de diferentes drogas con actividad fungicida, con conocida acción sobre la biosíntesis lipídica.

Tabla 4.3: Comparación de homología de enzimas involucradas en la biosíntesis lipídica en diferentes microorganismos (*A. flocculosa* PF-1 y *U. maydis* 521).

	Identificación de Enzimas deducidas	Organismo	NUM. ACC.	Identidad	Inhibidores
ERGOSTEROL	Acetil-CoA C transferasa (EC 2.3.1.9)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007877115.1	91,0%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011390921.1	84,0%	
	HMG-CoA sintasa (EC 2.3.3.10)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007881168.1	96,3%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011392062.1	96,3%	
	HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.34)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007876894.1	93,8%	Estatinas
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011389590.1	89,5%	
	Mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007880873.1	83,0%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011391823.1	73,1%	
	Fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007878963.1	60,0%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011386538.1	45,2%	
	Difosfomevalonato decarboxilasa (EC 4.1.1.33)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007878778.1	90,1%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011388229.1	86,1%	
	Farnesil difosfato sintasa (EC 2.5.1.1)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	SPO40951.1	81,0%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011391077.1	68,3%	
	Oxidoescualeno ciclasa (EC 5.4.99.7)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007878255.1	88,8%	SD
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011388806.1	78,3%	
Lanosterol 14 (alfa demetilasa) (EC 1.14.13.70)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007876928.1	82,0%	SD	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011390148.1	69,1%		
Esterol 14 reductasa (EC 1.3.1.70)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007876920.1	86,2%	Morfolinas	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011390352.1	77,7%		
C4 Esterol metil oxidasa (EC 1.14.13.72)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007878329.1	91,5%	ND	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011392231.1	84,7%		
C24 Esterol 14 metil transferasa (EC 2.1.1.41)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007881327.1	85,5%	ND	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011389634.1	80,9%		
C8-7 Esterol isomerasa (EC 5.3.3.5)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007875813.1	89,2%	SD	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011387854.1	77,0%		
C5-6 Esterol desaturasa (EC 1.14.19.20)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007878201.1	86,7%	ND	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011390019.1	66,3%		
C24 Esterol reductasa (EC 1.3.1.72)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007881545.1	93,4%	ND	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011387540.1	82,2%		
C22 Esterol desaturasa (EC 1.14.19.41)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007879354.1	83,1%	SD	
	<i>U. maydis</i> 521	XP_011386244.1	76,3%		

Tabla 4.3 (Cont.): Comparación de homología de enzimas involucradas en la biosíntesis lipídica en diferentes microorganismos (*A. flocculosa* PF-1 y *U. maydis* 521).

	Identificación de Enzimas deducidas	Organismo	NUM. ACC.	Identidad	Inhibidores
FOSFOLÍPIDOS	Glicerol fosfato Aciltransferasa (EC 2.3.1.15)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007881329.1 XP_011389834.1	83,1% 78,3%	ND
	Fosfatasa de Ácido fosfatídico (EC 3.1.3.4)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007881728.1 XP_011390773.1	57,1% 69,3%	SD
	CDP-DAG Sintasa (EC 2.7.7.41)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007878313.1 XP_011388599.1	75,9% 65,3%	ND
	CL Sintasa (EC 2.7.8.41)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007878842.1 XP_011388392.1	66,5% 55,6%	ND
	PS Sintasa (EC 2.7.8.8)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	SPO36295.1 XP_011390894.1	83,3% 83,6%	HNO ₃ + Hidroxilamina
	PI Sintasa (EC 2.7.8.11)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007875931.1 XP_011386441.1	71,1% 75,7%	ND
	PS Decarboxilasa (EC 4.1.1.65)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007879331.1 XP_011388869.1	78,8% 67,4%	Hidroximato de Serina
	Etanolamina fosfotransferasa (EC 2.7.8.1)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007876605.1 XP_011387390.1	82,1% 73,2%	SD
	PE N-metil Transferasa (EC 2.1.1.17)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007880717.1 XP_011389589.1	81,2% 64,1%	Edifenfos + Iprobenfos
	PGP fosfatasa (EC 3.1.3.27)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007879274.1 XP_011387680.1	70,0% 55,2%	ND
	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa (EC 2.3.1.23)	<i>A. flocculosa</i> PF-1 <i>U. maydis</i> 521	XP_007879190.1 XP_011386793.1	73,6% 65,5%	ND
ÁCIDO LINOLEICO	Delta (12) Desaturasa de Acidos grasos (EC 1.14.19.6)	<i>A. flocculosa</i> PF-1	XP_007876613.1	86,0%	ND
		<i>U. maydis</i> 521	XP_011387393.1	73,2%	

Cuantificación de la expresión de ARNm para enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos

A partir de las secuencias obtenidas mediante análisis RNASeq, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cuantificar la expresión de algunos genes que codifican para enzimas de lípidos. Como se observa en la Figura 4.4, se demostró la expresión relativa de seis genes implicados en la biosíntesis de ergosterol, fosfolípidos y ácido linoleico en los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para casi todas las enzimas cuando se compararon las tres estructuras entre sí. Sin embargo, la HMG-CoA reductasa no mostró diferencias en los niveles de expresión cuando se compararon los estadios de basidiosporas e hifas con las teliosporas. Esto también se observó en la PS-sintasa al comparar las hifas con las basidiosporas. Finalmente, en la enzima PGP- fosfatasa no hubo diferencias significativas entre hifas y teliosporas.

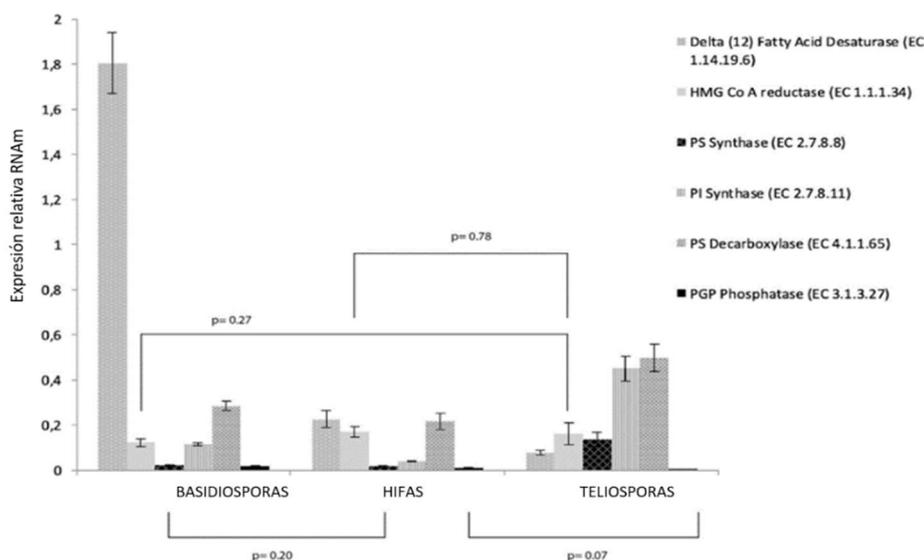


Figura 4.4: Expresión diferencial de ARNm de Delta 12 desaturasa de ácidos grasos (“Delta (12) fatty acid desaturase” (EC 1.14.19.6)), HMG-Co A reductasa (“HMG-Co A reductase” (EC 1.1.1.34)), PS sintasa (“PS synthase” (EC 2.7.8.8)), PI sintasa (“PI synthase” (EC 2.7.8.11)), PS decarboxilasa (“PS decarboxylase” (EC 4.1.1.65)) y PGP fosfatasa (“PGP phosphatase” (EC 3.1.3.27)) en estructuras de *T. frezzii*. Todas las comparaciones entre las estructuras, es decir, basidiosporas vs. hifas, hifas vs. teliosporas y basidiosporas vs. teliosporas, presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), excepto aquellas indicadas en las barras horizontales con $P > 0,05$ (por análisis de ANOVA).

DISCUSIÓN

La membrana celular, rica en glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides, desempeña un papel importante en las funciones celulares y las vías de transducción de señales (Pan *et al.*, 2018). En el presente trabajo, analizamos los cambios en la composición lipídica de fosfolípidos y FAs presentes en las células en los diferentes estadios, especialmente al comparar células en crecimiento activo (hifas), células germinales (basidiosporas) y estructuras de resistencia (teliosporas) de *T. frezzii*.

Encontramos que los lípidos neutros conformaron la fracción más abundante en las teliosporas; sin embargo, en hifas y basidiosporas, la proporción de lípidos polares en el contenido lipídico total aumentó. Esto concuerda con Kieliszek y Dourou (2021) quienes señalaron el papel fisiológico de los lípidos neutros en el almacenamiento y suministro de energía según las necesidades celulares. Por el contrario, estos autores señalan que un alto contenido de lípidos polares es típico en células en crecimiento, ya que son componentes mayoritarios de membranas celulares y organelas. Además, resaltan la importancia de fracción lipídica polar en el transporte e intercambio de compuestos, especialmente en condiciones de estrés, cuando se activan mecanismos protectores y, en consecuencia, las células pueden alterar la composición de sus membranas.

En relación a los ácidos grasos, estos representan bloques constitutivos de lípidos complejos como los fosfolípidos y los esfingolípidos, mientras que el exceso de FAs se almacena en las células como gotitas de lípidos en forma de triacilglicerol o ésteres de esterol, lo que constituye una reserva de energía (Pan *et al.*, 2018). La longitud de la cadena de carbonos y el número de insaturaciones confieren a los FAs algunas de sus cualidades diferenciales. En el presente estudio, encontramos un alto porcentaje de Fas de cadena larga (18C), cercano al 70% en las tres etapas ontogenéticas. Esto también fue encontrado por Juzlová *et al.* (1996) en otros hongos del filo Ascomycota, cuyos componentes principales fueron ácido oleico, linoleico y linolénico.

En el presente estudio, encontramos los mismos niveles de FAs saturados en las tres etapas analizadas; sin embargo, las teliosporas mostraron un mayor porcentaje de FAs monoinsaturados (35%) en comparación con basidiosporas (11%) e hifas (23%). Estos resultados concuerdan con los informes de Feofilova *et al.* (2015) para *P. roqueforti*, quienes

encontraron valores similares de FAs saturados en micelio y conidios. Existe evidencia que indica que los niveles de insaturación están asociados con la actividad respiratoria, que se intensifica en la etapa vegetativa, como se encuentra en *P. lanosum* y *P. nigricans* con un mayor porcentaje de FAs poliinsaturados en el micelio que en los conidios (Feofilova *et al.*, 2015). Sin embargo, los altos niveles de FAs monoinsaturados encontrados en las estructuras de resistencia podrían indicar la formación de polos lipídicos involucrados en la señalización necesaria para iniciar la germinación, o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, como se encuentra en las esporangiosporas de *Cunninghamella japonica* (Andriyanova *et al.*, 2011).

Cuando se analizaron los FAs de la fracción de lípidos polares, encontramos que el ácido oleico es el componente principal en las tres etapas. Estos resultados concuerdan con los descritos por Dourou *et al.* (2021) con el ácido oleico (18:1) como el principal FA en todos los lípidos producidos por las levaduras *Meyerozyma guilliermondii*, *Scheffersomyces coipomoensis* y *Sugiyamaella paludigena*. En concordancia con Feofilova *et al.* (2015) en su estudio sobre la composición de FAs en diferentes estadios de hongos de los filos mucuromycotas y ascomycotas, en nuestra investigación también encontramos ácido esteárico, cáprico y palmítico en la composición lipídica de teliosporas y basidiosporas, aunque no se encontró ácido cáprico en las hifas. Por el contrario, Dourou *et al.* (2021) encontraron solo pequeñas cantidades de ácido esteárico en levaduras de *Yarrowia lipolytica*.

En la fracción lipídica neutra, la cantidad de FAs monoinsaturados de las teliosporas fue seis veces mayor en las teliosporas que en hifas y basidiosporas, con el ácido oleico como componente principal. Sin embargo, los FAs poliinsaturados son dos y seis veces mayores en basidiosporas e hifas, respectivamente. Se ha informado que los mecanismos de desaturación disminuyen a medida que los hongos ingresan en fase estacionaria y allí se producen mayor cantidad de TAGs que luego serán almacenados como productos de reserva (Kamel y Kakuda, 1994). En *C.neoformans*, otro hongo del filo Basidiomycota, el contenido de FAs estaba relacionado con genes implicados en la síntesis. La supresión de estos genes, además de bloquear la síntesis de novo de FAs, inhibió notablemente su crecimiento vegetativo (Chayakulkeeree *et al.*, 2007). Esto resalta la importancia de los FAs intracelulares, ya que, si estos disminuyen y la célula no puede producirlos de manera eficiente para formar membranas, la muerte ocurre rápidamente.

Modificación en el perfil de fosfolípidos

Respecto a este grupo, encontramos a PC como componente principal en los tres estadios ontogenéticos, lo que concuerda con lo hallado por Feofilova *et al.* (2015) quienes también describieron la PC y la PE como los componentes principales de los lípidos de *Saccharomyces cerevisiae*. Curiosamente encontramos a las cardiolipinas como el segundo lípido más abundante en todas las estructuras analizadas. Joshi *et al.* (2009) describen el importante papel de este fosfolípido no sólo como asociado a la función mitocondrial, sino también con muchos otros procesos celulares esenciales. Algunos de ellos incluyen el transporte de sustancias, la biogénesis de la pared celular, el envejecimiento y la apoptosis. Kieliszek y Dourou (2021) señalan que los cambios en la composición lipídica pueden dar lugar a procesos de peroxidación y sus productos pueden alterar la estructura y dinámica de las membranas y así afectar la fluidez de la membrana, que lleva a desestabilizar su estructura.

Análisis de lípidos insaponificables

En el presente estudio se identificaron al menos dos estructuras diferentes de esteroides en *T. frezzii* con tiempos de retención desfasados respecto al estándar de ergosterol. Zinser *et al.* (1993) analizaron la composición de esteroides de *S. cerevisiae* y encontraron a ergosterol como el componente principal de las vesículas secretoras. Sin embargo, encontraron grandes cantidades de intermediarios de la ruta biosintética de los esteroides como zimosterol, fecosterol y episterol, destacando el papel de la delta 4-esterol metiltransferas, que cataliza uno de los últimos pasos en la biosíntesis de esteroides; cabe mencionar que también encontramos esta enzima en el análisis de transcritos de ARNm en *T. frezzii*.

Aunque en el análisis cromatográfico no encontramos al ergosterol como molécula intacta, ya que no coincidió con los tiempos de retención del estándar, nos preguntamos si, aun así, el antifúngico AmB encontraría una molécula similar para producir su acción en membrana. Y, efectivamente, este compuesto causó la muerte celular al tratar a las hifas durante 2 y 4 hs. Palacios *et al.* (2011) señalan que el mecanismo antifúngico de esta molécula aún no está claro y vinculan la actividad antifúngica con la inserción de AmB en la bicapa de fosfolípidos, dando lugar a canales iónicos. En este caso, en el que no se detectó

ergosterol, el efecto de AmB podría estar relacionado con la unión del compuesto a los dos esteroides aun no caracterizados.

Identificación de transcritos relacionados a las vías sintéticas lipídicas

Si bien el genoma de *T. frezzii* aún no se ha delineado completamente, existen algunas secuencias reportadas para diferentes propósitos. En este estudio, buscamos identificar la secuencia de varios genes que codificarían enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos, lo que podría usarse para el diseño de tratamientos antifúngicos. En este sentido, comparamos las secuencias obtenidas por RNASeq de *T. frezzii* con otras presentes en las bases de datos NCBI y UniProtKB. Curiosamente, las homologías más altas de las diferentes secuencias de enzimas deducidas de *T. frezzii*, fueron con el hongo *A. flocculosa* PF-1, un hongo no patógeno (Lefebvre *et al.*, 2013), y con el hongo patógeno *T. thlaspeos* (Frantzeskakis *et al.*, 2017). A su vez, dadas las características patogénicas de *T. frezzii* en maní, se decidió comparar las enzimas antes mencionadas con las codificadas por el hongo *U. maydis* 521, que afecta a cultivares de maíz (Kahmann *et al.*, 2000) y, aunque la identidad fue alta, no lo fue tanto como con *A. flocculosa* PF-1 y *T. thlaspeos*.

En la vía biosintética del ergosterol, se dedujeron 16 posibles enzimas de *T. frezzii*, con porcentajes de identidad que oscilaron entre el 45 y el 97% en comparación con *U. maydis* 521, *T. thlaspeos* y *A. flocculosa* PF-1. En relación con los fosfolípidos cuantificados en este estudio, existen varias enzimas involucradas en su ruta biosintética, algunas de las cuales podrían identificarse a partir del estudio de la expresión del ARN mensajero de *T. frezzii*. Se identificaron las tres enzimas clave para la síntesis de PS, PE y PC, es decir: PC sintasa, PS descarboxilasa y PE N-metiltransferasa, respectivamente. En cuanto a la similitud con *U. maydis* 521, *T. thlaspeos* y *A. flocculosa* PF-1, coincidieron en un rango del 54% al 84%. Completando el análisis de los genes implicados en la síntesis de lípidos cuantificados, encontramos la secuencia del ARNm que codificaría la enzima implicada en la conversión de ácido oleico a ácido linoleico, es decir, la delta (12) desaturasa de ácidos grasos. Las secuencias presentaron un valor de identidad muy alto al comparar con los hongos *A. flocculosa* PF-1, *T. thlaspeos* y *U. maydis* 521, de acuerdo a los criterios de homología de Sander y Schneider (1991), en los cuales debe encontrarse un porcentaje de identidad superior al 25% en un alineamiento de al menos 80 aminoácidos, lo que ocurre con las proteínas analizadas.

En la actualidad se continúan estudiando nuevas alternativas en compuestos fungicidas, ya que muchos de los conocidos, tanto sistémicos como locales, van reduciendo su eficacia, en especial por la aparición de nuevas cepas resistentes (Pan *et al.*, 2018); particularmente, se postula el uso de fungicidas combinados que representen un amplio espectro de protección contra patógenos. Entre las principales estrategias analizadas se contemplan aquellas con la capacidad de inhibir la acción de enzimas en la vía metabólica de determinados componentes celulares (Agrios, 2005). Así como las carboxamidas y las estrobilurinas se dirigen a las proteínas mitocondriales, los azoles se relacionan con la biosíntesis de ergosterol de membrana (Bromley *et al.*, 2016). Arias *et al.* (2021) indicaron un posible desarrollo de resistencia de *T. frezzii* a los fungicidas de carboxamida y estrobilurina, y proporcionaron una base para investigar la resistencia al triazol en este patógeno después de secuenciar el mitogenoma. Por lo tanto, monitorear las mutaciones de las moléculas diana de los fungicidas resultaría clave para implementar cambios en los tratamientos con fungicidas y determinar si la resistencia del patógeno es la causa por la cual la enfermedad no está controlada (Brent y Hollomon, 2007).

CONCLUSIONES

Debido a que existe escasa información en relación a las modificaciones biológicas que ocurren durante el ciclo de vida de *T. frezzii*, en este estudio se propuso describir cómo cambia la composición lipídica en diferentes estructuras del hongo. No representa en absoluto un estudio acabado del tema, ya que deben explorarse aún más los procesos de síntesis y funciones de fosfolípidos, ácidos grasos y esteroides, además de continuar con la identificación de compuestos con potencial actividad inhibidora de su síntesis. Resulta de interés comprender cómo intervienen los procesos de producción de lípidos en las diferentes fases del ciclo de vida del hongo, apuntando al estudio de alternativas terapéuticas que actúen, ya sea modificando los microdominios de membrana o por la actividad de proteínas transmembrana. Se ha demostrado que muchas de las enzimas implicadas en las vías de síntesis de lípidos pueden inhibirse con compuestos como morfollinas, hidroxilaminas, hidroximato de serina y estatinas, entre otros. Esto representaría un nuevo objetivo antifúngico para el desarrollo de compuestos individuales o combinables con agentes antifúngicos ya estudiados, como polienos y azoles, que ejercen su acción a nivel de membrana.

Aunque el genoma de *T. frezzii* aún no ha sido completamente dilucidado, en este estudio se realizó por primera vez un análisis de secuencias de ARNm relacionadas a transcritos que codifican para estas enzimas de las vías lipídicas, comparando entre *T. frezzii* y *A. flocculosa* PF-1, *T. thlaspeos* y *U. maydis* 521, observándose mayores similitudes con el hongo no patogénico *A. flocculosa* PF-1 y el hongo fitopatogénico *T. thlaspeos*, más que con *U. maydis* 521.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. 2005. *Plant Pathology 5th ed.* Elsevier Academic Press, London, UK. 922p.
- Andriyanova D. A., Sergeeva Y. E., Kochkin, G. A., Galanina L. A., Usov A. I. & Feofilova E. P. 2011. Filamentous fungi's cell-wall extraction at different stages of ontogenesis and exploration of their carbohydrate composition. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47 (4), 405–411. <https://doi.org/10.1134/S0003683811040028>.
- AOAC 996.01. 2012. GC Analysis of Fatty Acids in Powdered Infant Formula on SPTM-2560. *AOAC Method*. 13.
- Arias S.L., Mary V.S., Velez P.A., Rodriguez M.G., Otaiza-González S.N. & Theumer M.G. 2021. Where Does the Peanut Smut Pathogen, *Thecaphora frezii*, Fit in the Spectrum of Smut Diseases? *Plant Disease*, 105(9).
- Astiz Gassó M. y Marinelli A. 2013. Biología de la germinación de *Thecaphora frezii* *in vitro*. *XXVIII Jornada Nacional de Maní*, General Cabrera, Argentina. 62–63.
- Brent K.J. & Hollomon D.W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens how can it be managed. (1st ed.). *FRAC Monograph*. GIFAP, Bruselas, 48pp.
- Bromley M., Johns A., Davies E., Fraczek M., Gilsenan J. M., Kurbatova N., Keays M., Kapushesky M., Gut M., Gut I., Denning D. W. & Bowyer P. 2016. Mitochondrial complex is a global regulator of secondary metabolism, virulence and azole sensitivity in fungi. *PLoS ONE*, 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158724>.
- 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*, 51 (10), 3537–3545. <https://doi.org/10.1128/AAC.00442-07>.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>. Acceso octubre 2022.
- Dourou M., Economou C.N, Aggelia L., Janák M., Gabriela Valdés G., Elezi N., Kakavas D., Papageorgiou T., Vayenas D.V., Certik M. & Aggelis G. 2021. Bioconversion of pomegranate residues into biofuels and bioactive lipids. *J Cleaner Prod.*, 323, 129–193.
- Feofilova E. P., Sergeeva Y. E., Mysyakina I. S. & Bokareva D. A. 2015. Lipid composition in cell walls and in mycelial and spore cells of mycelial fungi. *Microbiology*, 84 (2), 170–176. <https://doi.org/10.1134/S0026261715020046>.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), 497–509. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781>.

- Frantzeskakis L., Courville K. J., Plücker L., Kellner R., Kruse J., Brachmann A., Feldbrügge M. & Göhre V. 2017. The plant-dependent life cycle of *Thecaphora thlaspeos*: A smut fungus adapted to brassicaceae. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30 (4), 271–282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-16-0164-R>.
- Hernández A., Cooke D. T. & Clarkson D. T. 1994. Lipid composition and proton transport in *Penicillium cyclopium* and *Ustilago maydis* plasma membrane vesicles isolated by two-phase partitioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1195(1), 103–109. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90015-9).
- Joshi A.S., Zhou J., Gohil V.M., Chen S. & Greenberg M.L. 2009. Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 212–218.
- Júzlová P., Martínková L. & Křen V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16 (3), 163–170. <https://doi.org/10.1007/BF01569999>.
- Kahmann R., Basse C., Feldbrügge M. & Kämper J. 2000. *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease, *Fungal pathology*. W. Kronstad (ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Springer, 347-371.
- Kieliszek M. & Dourou M. 2021. Effect of Selenium on the growth and lipid accumulation of *Yarrowia lipolytica* yeast. *Biological Trace Element Research*, 199 (4), 1611–1622. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02266-w>.
- Lefebvre F., Joly D. L., Labbé C., Teichmann B., Linning R., Belzile F., Bakkeren G. & Bélanger R. R. 2013. The transition from a phytopathogenic smut ancestor to an anamorphic biocontrol agent deciphered by comparative whole-genome analysis. *Plant Cell*, 25 (6), 1946–1959. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113969>.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Mesa Arango A.C. 2014. Papel del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la Anfotericina B y evaluación de la virulencia de hongos patógenos y de la eficacia de antifúngicos en *Galleria mellonella*. *Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid*. España.
- Mosquera G., Giraldo M. C., Khang C. H., Coughlan S. & Valent B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *The Plant Cell*, 21 (4), 1273–1290. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055228>.
- National Center for Biotechnology Information. NCBI. 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso julio 2022.
- Palacios D. S., Dailey I., Siebert D. M., Wilcock B. C. & Burke M. D. 2011. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Natl Acad Sci*, 108 (17), 6733-8. doi: 10.1073/pnas.1015023108.

- Pan J., Hu C. & Yu J.-H. 2018. Lipid biosynthesis as an antifungal target. *Journal of Fungi*, 4 (2), 50. <https://doi.org/10.3390/jof4020050>.
- Sander C. & Schneider R. 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 9 (1), 56–68. <https://doi.org/10.1002/prot.340090107>.
- Sant D. G., Tupe S. G., Ramana C. V. & Deshpande M. V. 2016. Fungal cell membrane-promising drug target for antifungal therapy. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (6), 1498–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.13301>.
- Song Y.D., Hsu C.C., Lew S.Q. & Lin C.H. 2021. *Candida tropicalis* RON1 is required for hyphal formation, biofilm development, and virulence but is dispensable for N-acetylglucosamine catabolism. *Med Mycol.* 59 (4), 379–391.
- Zinser E., Paltauf F. & Daum G. 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175 (10), 2853–2858. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.2853-2858.1993>.

Tabla S.4.1: Composición porcentual de FAs en las fracciones de lípidos polares (PL) y neutros (NL) en los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*

ACIDOS GRASOS	TELIOSPORAS		BASIDIOSPORAS		HIFAS	
	PL (%)	NL (%)	PL (%)	NL (%)	PL (%)	NL (%)
C 8:0		0,5	3,3	0,7		
C 10:0	5,3	4,4	9,5	1,7		
C 12:0		0,1	5,1	1,3	4,4	7,0
C 13:0		0,1	3,2	0,5	1,3	3,6
C 14:0		0,2		1,3	6,2	5,0
C 14:1		0,1		1,1		
C 16:0	12,9	10,1	13,9	32,5	15,3	10,0
C 16:1		0,7		1,6	1,5	3,3
C 17:0		0,1		0,9		0,5
C 17:1 c-10		0,1				
C 18:0	14,5	5,2	14,0	29,3	18,3	24,4
C 18:1 t-9		0,4				
C 18:1 c-9	57,3	64,2	41,7	6,4	34,2	7,2
C 18:2 t-						
C 18:2 c-		4,5	3,5	9,5	12,9	22,0
C 18:3 c-6,9,12 gamma linolenic (O6)		0,8	1,8	0,5	1,1	6,0
C 18:3 c-9,12,15 (O3)						
C 18:2 c-9,t-11 CLA						
C 20:0		0,1		1,0	0,3	0,5
C 18:2 c-12,t-10 CLA						
C 20:1 c-11		1,4		0,7	0,1	0,6
C 21:0		0,1				
C 20:2					1,0	1,5
C 22:0		0,3	1,3	1,0	0,8	4,1
C 22:1 + c 22:2		0,1		1,4	1,3	1,0
C 22:4						
C 24:0	10,0	5,8	2,7	7,4	1,3	3,3
C 24:1		0,4		0,3		
C 22:6		0,3		0,9		
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE *T. FREZZII*

INTRODUCCIÓN

Como se ha detallado en los capítulos anteriores, el hongo fitopatógeno *Thecaphora frezzii* experimenta, en el transcurso de su ciclo de vida, modificaciones a nivel morfológico, formando diversas estructuras según el estadio en que se encuentre. Este desarrollo se encuentra acompañado por cambios a nivel de expresión génica. Esto a su vez, puede traducirse en la formación de nuevas proteínas, algunas de ellas enzimas, involucradas en la síntesis de nuevas moléculas, como lípidos u otras proteínas. Claramente este hecho repercute en el reajuste de los perfiles lipídicos, como se estudió en el capítulo anterior, así como también se producen modificaciones en el esquema general de proteínas.

Numerosos estudios abordan la capacidad de las células fúngicas para percibir una variedad de señales químicas y físicas, las cuales resultan esenciales para su supervivencia y función en diversos entornos (Beauvais *et al.*, 2014; Feofilova, 2010). Agrios (2005) destaca que los hongos pueden percibir señales como nutrientes, osmolaridad, pH, luz y la hidrofobicidad de la superficie. Esto activa a las células fúngicas para, por ejemplo, desarrollar las estructuras del siguiente estadio. Bölker *et al.* (1992) subraya que estas señales también comprenden aquellas involucradas en el reconocimiento de pares sexuales e incluso las que permiten la identificación de las plantas hospederas. En este sentido, Elías-Villalobos *et al.* (2019) se enfocan en la relación patógeno-huésped durante el proceso de infección y cómo esto conlleva a cambios morfológicos en las células fúngicas que son necesarios para avanzar en el ciclo patogénico.

Cada estadio fúngico involucra programas genéticos específicos que deben estar bajo un control preciso para asegurar una infección exitosa (Rocher *et al.*, 2022). Si bien estos cambios repercuten a nivel molecular, no necesariamente se expresarán todos los genes al

mismo tiempo; las células producirán los componentes necesarios de acuerdo a la demanda del ambiente en el estadio que se encuentren (Martínez-Soto *et al.*, 2013). En relación a esto, existe entre los autores un abordaje marcadamente diferente en función del tipo de proteína que se expresa en la interacción hongo-patógeno y aquellas involucradas en los procesos de transición y cambios de estadio (Ruiz-Herrera y Campos-Góngora, 2012).

En línea con este último concepto, ciertos autores centran su análisis en la identificación de proteínas constitutivas de células en los diferentes estadios fúngicos y cómo se va modificando su perfil. En tal sentido Gow *et al.* (2017) estudia la composición proteica de la pared celular, destacando su diversidad y variedad de funciones específicas, ya que pueden actuar modificando las propiedades de la pared, en la adhesión a diferentes superficies, o protegiendo a los hongos de condiciones ambientales amenazantes.

Asimismo, Böhmer *et al.* (2007) centran su estudio en las proteínas citosólicas solubles sintetizadas durante el dimorfismo de *U. maydis*, y destaca la importancia de indagar en los genes involucrados en estos procesos, relacionados con la nutrición, la patogenicidad y la diferenciación del hongo, incluso como posibles objetivos de ataque para bloquear el desarrollo fúngico. Por su parte, Millanes *et al.* (2008) se enfoca en la polarización del citoplasma y el papel de la actina en el crecimiento del hongo, indicando que esta proteína se encuentra involucrada en el pasaje entre estadios dimórficos del hongo y en la polarización del citoesqueleto que permite luego el crecimiento celular. Además, señalan también que participa en la incorporación de sustancias hacia el interior celular y en la secreción de polímeros de la pared celular (Pollard y Borisy, 2003).

En tal sentido, Westermann y Weber (2003) refuerzan este concepto, destacando la importancia de los componentes del citoesqueleto en diferentes funciones de las células eucariotas, entre ellas en ensamblaje de los husos, la segregación de cromosomas, el movimiento de organelas, el transporte de proteínas y el mantenimiento de la polaridad celular.

En los hongos filamentosos, los microtúbulos son importantes para el rápido crecimiento de las hifas (Horio, 2007), además de participar en la migración nuclear, el transporte de proteínas y ARN, involucrados en el desarrollo patógeno (Fuchs *et al.*, 2005; Shiel, 2014). Los microtúbulos se ensamblan a partir de heterodímeros de tubulina α/β , donde también puede participar la tubulina γ (Shiel, 2014). La isoforma γ -tubulina se

descubrió por primera vez en *A. nidulans* y desempeña un papel esencial en el inicio del ensamblaje de microtúbulos, ya que es necesaria para la su polimerización (Xiang y Plamann, 2003). Fuchs *et al.* (2005) demostraron que los microtúbulos en *U. maydis* son esenciales para la migración nuclear y, por lo tanto, para el crecimiento de hifa.

El dinamismo de los microtúbulos está regulado por su capacidad para unirse a proteínas específicas en su superficie, las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP; Shiel, 2014). Las tubulinas están sujetas a una amplia gama de modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés), como detirosinación/tirosinación, acetilación, fosforilación, poliglutamilación y poliglicosilación. Estos PTM afectan la dinámica de los microtúbulos, su organización e interacción con otros componentes celulares como proteínas asociadas a microtúbulos (MAP su sigla en inglés) o proteínas motoras (Janke y Magiera, 2020).

Existen enzimas específicas que participan en estos procesos postraduccionales, entre ellas, la acetil-transferasa α -TAT1 es una de las enzimas que cataliza la acetilación de K40 en la α -tubulina para convertirla en la denominada tubulina-acetilada (Ac-Tub), y la reacción inversa es catalizada por las deacetilasas Sirtuin 2 (SIRT2) o Histona deacetilasa 6 (HDAC6). La formación de tubulina detirosinada (Glu-Tub) está mediada por la carboxipeptidasa (CCP-detirosinación), y el residuo de tirosina eliminado puede volverse a unir mediante tubulina-tirosina ligasa (TTL; Song *et al.*, 2021; Wloga *et al.*, 2017).

Debido a la escasa información sobre la distribución, localización y función de las diferentes proteínas que componen el sistema de *T. frezzii*, se propuso el estudio del perfil proteico de estas proteínas del citoesqueleto fúngico en sus diferentes estadios. Cabe destacar que la mayoría de los estudios referentes al proteoma celular fúngico han sido desarrollados en patógenos humanos y solo algunos en fitopatógenos (Araújo *et al.*, 2017; Liu y Free, 2016; Longo *et al.*, 2014). Algunos estudios determinan el perfil proteico general basado en la extracción de proteínas totales y separación en geles por la técnica de SDS – PAGE (Corrochano, 2013). La separación electroforética tanto en 1D (SDS-PAGE) como en 2D (IEF-SDS PAGE) es la técnica de separación más aplicada en estudios proteómicos (Magdeldin *et al.*, 2014; Rabilloud *et al.*, 2010) usándose de manera previa a los análisis de identificación con espectrometría de masas. Otros estudios avanzan en la identificación de proteínas de interés, a través del secuenciamiento peptídico, lo que permite incluso

compararlas con proteínas de otros sistemas fúngicos, además de asignarle funciones previamente descritas.

Manikandan *et al.* (2018) encontraron proteínas de *Fusarium* expresadas diferencialmente en dos condiciones de cultivos distintas, que a través de su secuenciamiento por MALDI-TOF, se identificaron cómo proteínas que participan en el crecimiento, esporulación y desarrollo de la enfermedad. Por su parte, Liu y Free (2016) analizaron cómo varía la composición proteica de la pared fúngica de hifas de *S. sclerotiorum*, encontrando diferencias entre los medios de cultivos empleados. Así, mediante análisis por MALDI-TOF, hallaron proteínas relacionadas a la biosíntesis de la pared celular y la patogénesis, como celulasas, pectina liasas, glucosidasas y proteasas, entre otras.

Entre las técnicas empleadas para la identificación de proteínas y sus modificaciones postraduccionales, el análisis por Western-Blot es uno de los principales métodos que permiten la detección de moléculas de interés. Esta técnica representa una poderosa herramienta para evaluar modificaciones entre proteínas de diferente peso molecular (Mazheika *et al.*, 2021); entre ellas, las modificaciones postraduccionales de tubulina en numerosos hongos.

Considerando la función relevante de los microtúbulos en las diferentes estructuras fúngicas, resulta de particular interés analizar en *T. frezzii*, la presencia y ubicación subcelular de diferentes PTM en α -tubulina en los estadios de desarrollo de este hongo. Dado que dichas modificaciones ocurren acompañadas de una expresión génica diferencial, se plantea mediante la técnica de RNASeq, la identificación de genes de tubulina y aquellos que codifican enzimas implicadas en sus PTM en las tres estructuras del desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los detergentes Triton X-100, TritonX-114, 4-chloro naphthol, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1, 4-dithiothreitol (DTT), ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), glycol ether diamine tetra acetic acid (EGTA), mix de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), sulfato de magnesio, citrato de sodio, albúmina sérica bovina, peróxido de hidrógeno, sorbitol y glicerol fueron adquiridos en Sigma Aldrich; acetona y formaldehído en Cicarelli; membrana de nitrocelulosa en Bio-Rad. Anticuerpos policlonales de conejo fueron generados in situ (se describe en el apartado “obtención de anticuerpos”), mientras que los anticuerpos monoclonales para análisis de tubulina anti-detirosinada fueron obtenidos por el Dr. Carlos Arce (Dpto. de Qca. Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC). Para analizar las modificaciones de α -tubulina se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios de ratones: anti- α -tubulina (clon DM1A), anti-tubulina-acetylated (6-11B-1) y anti-tubulina-tirosinada (TUB1A2); los anticuerpos secundarios anti-mouse IgG y anti-rabbit IgG conjugados con peroxidasa o FITC, todos adquiridos de Sigma Aldrich.

Cultivo de T. frezzii y obtención de proteínas

Para obtener las diferentes estructuras que *T. frezzii* desarrolla durante su ciclo de vida, es decir, teliosporas (T), basidiosporas (B) e hifas (H), se procedió como se indica en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 4. Una vez corroborada la formación de las diferentes estructuras por microscopía en campo claro, se procedió a la extracción de proteínas. Para ello, se partió de teliosporas y basidiosporas desinfectadas y recolectadas por centrifugación; para las hifas se partió de un cultivo líquido de hifas de 24 h. En todos los casos, se obtuvieron pellets por centrifugación a 2.000 rpm por 5 min, que luego fueron

lavados dos veces con solución fisiológica estéril, resuspendidos en buffer de lisis frío (buffer fosfato 50 mM, pH: 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, glicerol 20% v/v) y molidos en mortero con ayuda de nitrógeno líquido. El homogenato se centrifugó a 20.000 rpm por 40 min a 4 °C; luego se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas citosólicas (SN1).

Por otra parte, el pellet fue resuspendido en buffer TBS (10 Mm Tris-HCl pH: 7,4, 150 mM NaCl) con el agregado de 1% (v/v) de Tritón X-114 para obtener las proteínas de membrana. La solución se mantuvo a 4 °C por 1 h y luego se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 min para remover el detrito celular. Se recuperó el sobrenadante que luego fue incubado por 5 min a 35 °C y centrifugado a 3.000 rpm por 5 min. Se produjo la separación de dos fases las cuales fueron recuperadas por separado: una fase acuosa superior (SN3) y una fase inferior, rica en detergente (SN4).

Se obtuvieron entonces las diferentes fracciones proteicas para cada estructura: SN1T, SN3T, SN4T, SN1B, SN3B, SN4B, SN1H, SN3H, SN4H. Luego se realizó la concentración de proteínas de todos los extractos mediante precipitación con acetona fría (1h – 4 °C), se centrifugó a 10.000 rpm 40 min a 4 °C y los pellets fueron resuspendidos en buffer PBS con 1% (v/v) de SDS. Para la cuantificación de proteínas, se empleó el método de Bradford (1976), como se describió en la sección de materiales y métodos del capítulo 3.

Separación de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar el perfil proteico general de cada muestra extraída en el paso anterior, se realizó una separación de las mismas a través de corridas en geles de poliacrilamida. Además, se agregó el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), que desnaturaliza las proteínas y crea una densidad de carga negativa uniforme por toda la superficie de las proteínas a separar. Así, cuando aplicamos una corriente eléctrica, las proteínas se separaron de acuerdo a su diferencia de tamaño. En la tabla 5.1 se presentan las proporciones de preparación de los geles separadores y concentradores:

Tabla 5.1: Preparación de geles para SDS-PAGE.

GEL SEPARADOR			GEL CONCENTRADOR	
% A-BA	12,5 %	17 %	% A-BA	4%
Agua destilada	3,1 ml	1,5 ml	Agua destilada	3 ml
Tris/HCl 1,5 M pH 8,6	2,5 ml	2,5 ml	Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
A 30% - BA 0,8%	4,2 ml	5,8 ml	A 30% - BA 0,8%	0,65 ml
TEMED conc.	10 μ l	10 μ l	TEMED conc.	5 μ l
PSA 10 % (p/v)	70 μ l	70 μ l	PSA 10 % (p/v)	50 μ l

Luego de preparar estas soluciones y antes que gelifiquen, se colocaron entre vidrios ajustados adecuadamente para evitar derrames. Las muestras se trataron con buffer de corrida que contiene SDS y un colorante que permite su posterior visualización. Luego fueron sembradas en cada carril en iguales concentraciones. La corrida electroforética se realizó a 80 V, aumentando paulatinamente hasta 120 V. Luego de 1,5 h de corrida, se procedió a la tinción del gel con azul de Coomasie. Las bandas encontradas en el gel indican la presencia de las proteínas en estudio, y mediante la comparación con los patrones de peso molecular agregados también en la corrida, se estableció el peso molecular de las mismas.

Análisis MS/MS

Luego de identificar las bandas expresadas diferencialmente en los geles de poliacrilamida, se procedió a su análisis mediante MS/MS. Para ello, se realizaron nuevos geles a las concentraciones de Acrilamida/Bisacrilamida adecuadas para separar las bandas de interés con pesos moleculares marcadamente diferentes. Luego de teñir los geles con azul de Coomasie coloidal, se enviaron las bandas de interés para su identificación en LANAIS-PROEM (UBA). Allí se trataron las bandas con DTT (ditiotretitol) y IAM (iodoacetamida), y se digirieron “in gel” con tripsina incubando durante toda la noche. El extracto de las muestras se sometió al análisis por espectrometría de masas, en un equipo ABI 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer, Matriz: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA). Desalinización de muestras: Millipore ZipTip C18.

Los datos se obtuvieron primeramente en modo reflectrón (espectro MS) y luego se realizaron las fragmentaciones de las señales de interés obteniéndose los espectros MS/MS. Los resultados se analizaron mediante el programa Mascot MS/MS en un servidor local. La búsqueda se realizó con el empleo de una base de datos general para hongos Ustilaginales y luego se envió una lista de proteínas deducidas a partir del análisis de RNASeq.

Debido a que algunas bandas no lograron ser identificadas con exactitud, se realizó un segundo envío de bandas al instituto CEQUIBIEM (UBA) para su análisis. Allí las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 min y alquiladas con Iodoacetamida 50 mM durante 45 min en oscuridad. Luego se digirió con tripsina durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo. Luego las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y nuevamente resuspendidas en 10 µl de Ácido Fórmico 0,1%. Se realizó un desalado pasando por Zip Tip C18 (Merck) y se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que nos permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos.

La ionización de las muestras se realizó por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa ProteomeDiscoverer. Para la separación se empleó una columna C18, ThermoScientific EASY-Spray Accucore de 2µm, 75 µm x 150 mm; la temperatura se mantuvo constante a 35°C. Como fase móvil se emplearon dos soluciones: Solución A) Agua con 0,1% de Ácido Fórmico y Solución B) Acetonitrilo con 0,1 de Ácido Fórmico. La corrida duró 75 min en total y el gradiente de los solventes fue 93% A+ 7% B durante 60 min; luego 70% A + 30% B durante 2 min y finalmente 5% A + 95% B hasta el final de la corrida. El volumen de inyección de muestra fue de 5 µl en todos los casos. Para el análisis de MS/MS, se empleó un espectrómetro marca ThermoScientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (High CollisionDissociation) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MS/MS.

Generación de anticuerpos y Western Blot

Para identificar posibles fragmentos proteicos de las bandas secuenciadas por MS/MS en otras estructuras de *T. frezzii* se generaron anticuerpos (Acs) que fueron empleados posteriormente en el análisis de Western Blot (WB). Para ello, se prepararon dos bandas proteicas (una de 14 KDa y otra de 110 KDa) que se escindieron directamente del gel y se molieron en mortero con ayuda de nitrógeno líquido. A ambas muestras se les agregó el adyuvante de Freund completo, que permite incrementar la inmunogenicidad.

Para la obtención de los anticuerpos, se adquirieron dos conejos hembra de la especie *californiana*, los cuales fueron criados y mantenidos en el bioterio de INTA-IPAVE durante todo el período de ensayo. Dicho espacio asegura las condiciones adecuadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio, adherido al Sistema Nacional de Bioterios, según resolución 2019-5-APN-SECACT-MECCYT. Previo a la inmunización de los conejos, se les realizó una extracción de sangre y se estudió mediante hibridación en Dot-Blot si el animal tenía previamente Acs generados contra alguna de las proteínas del hongo (ensayos preinmunes). Luego de corroborar que no existían Acs previos, se procedió a inmunizar a ambos conejos, cada uno con una proteína diferente. Se repitió este procedimiento 2 veces más con 15 días de diferencia, empleando el adyuvante Freund incompleto. Luego se les extrajo sangre a ambos conejos, a los que se les agregó azida sódica y glicerol para conservarlo en freezer hasta su uso.

Se midieron las concentraciones de Acs (títulos) por la técnica de Dot-Blot. Para ello, se sembraron sobre membranas de nitrocelulosa en “spots” los extractos de teliosporas, basidiosporas e hifas conteniendo aproximadamente 20 µg de proteínas cada uno, previamente desnaturalizadas con buffer conteniendo β-mercapto-etanol. Luego de bloquear con albúmina y lavar, se incubaron con los sueros de ambos conejos por separado, a las concentraciones 1/100 – 1/250 – 1/500 – 1/1.000 y 1/5.000 a 4 °C durante toda la noche. Luego se lavaron repetidamente las membranas con buffer conteniendo tritón X-100 y se incubaron entonces con el Ac secundario, una IgG anti rabbit unido a peroxidasa. Luego de incubar 2 h a 37 °C se lavaron las membranas y se incubaron con la solución de revelado,

que contiene 4 cloro-1naftol en metanol, con el agregado de buffer Tris/Glicina más H₂O₂ de 100 vol. Se mantuvo en esta solución hasta aparición de color.

Una vez corroborado el título de Acs, se procedió al análisis por WB. Para ello, una vez realizada la corrida electroforética y separadas las proteínas de cada estructura del hongo, se realizó la transferencia de estas proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda. Se armó el “cassette” conteniendo el gel y la membrana previamente embebidos en buffer de transferencia con metanol y se procedió a realizar la transferencia en cuba de electroforesis durante 1 h. Posteriormente se incubó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para corroborar el éxito de la transferencia. Luego de fotografiar y lavar la membrana para eliminar el colorante, se procedió a su bloqueo con albumina y, luego de lavar repetidamente, se procedió a la incubación con Acs primarios obtenidos de los sueros de conejos. Nuevamente se lavaron las membranas, se incubaron con los Acs secundarios y finalmente se revelaron con la solución de color descripta anteriormente. Se identificaron mediante fotografía de las membranas, las bandas marcadas por los Acs.

Análisis de modificaciones postraduccionales de tubulinas

Con el fin de identificar los tipos de tubulinas y sus modificaciones postraduccionales, se realizó mediante hibridación por Dot-Blot una comparación entre los diferentes estadios de *T. frezzii*. Se sembraron en “spots” sobre membrana de nitrocelulosa, los diferentes extractos de SN1 – SN3 y SN4 de teliosporas, basidiosporas e hifas, conteniendo aproximadamente 75 µg de proteínas en cada extracto. Luego de fijar y lavar con buffer, se bloquearon las membranas con albumina y luego de lavar se incubaron con los Acs primarios a 4 °C durante toda la noche.

Los Acs primarios ensayados fueron Mouse monoclonal antibody clone DM1A (dilución 1/1.000) específico para α-tubulina total, mouse monoclonal antibody 6–11B-1 (dilución 1/1.000) para tubulina acetilada, mouse monoclonal antibody TUB1A2 (dilución 1/1.000) específico para tubulina tirosinada (Tyr-Tub) y “rabbit polyclonal antibody” (dilución 1/500) para tubulina detirosinada (Glu-Tub). Luego de incubar y lavar las membranas como se indica en el paso anterior, se agregó el Ac secundario correspondiente

unido a peroxidasa, que luego de ser incubado y lavado, se reveló con la misma solución de revelado con H₂O₂, hasta aparición de color. Como control positivo de la reacción, se empleó un extracto de cerebro de rata.

A modo de caracterización espacial de las tubulinas encontradas y siguiendo los antecedentes bibliográficos de Beltramo *et al.* (1994) que describen asociaciones entre tubulina con componentes integrales de las membranas celulares, se trataron membranas de teliosporas de *T. frezzii* con tratamientos alcalinos, con el fin de disociar dichas uniones. Para ello, se resuspendieron y homogeneizaron en buffer TBS con 100 mM Na₂CO₃ pH: 12.

Luego de incubar 30 min a 4 °C se centrifugó a 20.000 g por 30 min, y luego el pellet fue extraído con Tritón X-114 como se describe más arriba, para nuevamente obtener la fase acuosa superior (AP) y la fase rica en detergente inferior (DP). Cada uno de los extractos fueron sembrados y fijados en membranas de nitrocelulosa, y luego incubadas con “rabbit polyclonal antibody” (dilución 1/500) contra Glu-Tub en las mismas condiciones del Dot-Blot. Se procedió a la incubación con Ac secundario y se reveló como se indicó anteriormente.

Inmunodetección de microtúbulos con inmunofluorescencia indirecta

Para la inmunodetección de microtúbulos, las muestras se trataron según el protocolo de Banuett (2010) con algunas variaciones. Los cultivos frescos de hifas y basidiosporas se fijaron con buffer PEM (PIPES 50 mM, pH: 6,7, EGTA 25 mM, pH 7,0 y MgSO₄ 50 mM) con formaldehído al 3,7% (v/v), durante 40 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min. El pellet se lavó y estas células ya fijadas se sembraron en cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina y se digirieron durante 1 hora a temperatura ambiente con un mix de enzimas lítica de pared celular (2 mg/ml de enzimas líticas de *T. harzianum* en sorbitol 1 M, citrato de sodio 50 mM, pH: EGTA de 5,7 y 5 mM).

Después de incubar, se lavó y se incubó con buffer de permeabilización (PIPES 100 mM, pH: 6,7, EGTA 25 mM, pH: 7,0 y Triton X-100 al 0,1%) durante 5 min. Las muestras se bloquearon durante 30 minutos en PBS más 1% BSA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario para Glu-Tub, el anticuerpo para Tyr-Tub y el anticuerpo para DM1A

de α -tubulina durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Después del lavado, las muestras se incubaron durante 1 h en el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con FITC. Luego se lavaron con PBS y se prepararon para microscopía de fluorescencia. Las muestras fueron examinadas con un microscopio Axio-Observer.D1 Carl Zeiss adaptado con una cámara mono-axiocam 506. Las imágenes fueron procesadas con el programa Zen 2 lite.

Expresión génica asociada a modificaciones proteicas

Con el objetivo de encontrar modificaciones en la expresión génica que acompañen las variaciones encontradas en el perfil proteico, se procedió a extraer el ARN de las tres estructuras fúngicas en estudio. Para ello, se realizó la extracción con el protocolo de TRIzol® como se describe en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 3. Luego de corroborar la calidad del ARN extraído en geles de agarosa y confirmada su pureza mediante espectrofotometría, se midió la concentración empleando un kit “Qubit RNA Assay Kit” con fluorómetro Qubit 2.0. Luego se prepararon las librerías de ADNc con un kit “NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit” de Illumina. Este material fue remitido para su secuenciación en laboratorio INDEAR (Rosario, Argentina). Allí se realizó un ensamblaje “de novo” del transcriptoma; luego se calculó la expresión génica utilizando las cuentas por millón (CPM) de las lecturas. La calidad de las lecturas del RNASeq fue verificado usando el software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), lo que permitió comparar las lecturas entre los tres estadios.

Los análisis de identidad y homología de las tubulinas y las enzimas que las modifican fueron realizados comparando con aquellas descritas previamente para *U. maydis*, *A. flocculosa* y *T. thlaspeos*. Las secuencias de ARNm obtenidas del análisis RNASeq se convirtieron en secuencias de proteínas hipotéticas mediante la búsqueda de marcos de lectura abiertos utilizando el sitio ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) en el NCBI-NIH. A partir de estas secuencias deducidas, entre tubulinas y enzimas modificadoras de tubulina, se realizó un análisis de comparación tipo Blast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) contra la base de datos NCBI-NIH para hongos y PSI-BLAST (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/>) contra UniProtKB/Swiss-Prot.

La atención se centró en la identificación de α , β y γ -tubulinas, así como de las proteínas TTL (tubulina-tirosina ligasa), CCP1 (carboxipeptidasa citosólica 1) y HDAC6 (histona deacetilasa 6), todas enzimas modificadoras de tubulina. Al alinear estas moléculas con aquellas pertenecientes a hongos de la misma clase de *T. frezzii* y utilizando la herramienta de búsqueda de alineación básica (BLASTP), encontramos secuencias conservadas que nos permitieron identificar los ortólogos correspondientes de *T. frezzii*. Se analizaron mediante secuenciación múltiple y alineamientos de pares de proteínas (análisis de secuencia de proteínas en red: Network Protein Sequence Analysis: CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)). Las proteínas con $\geq 25\%$ de identidad y un largo de alineación de aminoácidos superior a 80 se consideraron homólogas (Sander y Schneider, 1991).

Análisis qPCR de tubulinas de T. frezzii y enzimas modificadoras de tubulina

Un estudio cuantitativo de la transcripción génica correspondiente a tubulinas (α , β y γ), enzima TTL, enzima carboxipeptidasa citosólica 1 (CCP1) e histona deacetilasa 6 (HDAC6) fue llevado a cabo mediante PCR en tiempo real. La lista de oligonucleótidos se diseñó utilizando el programa Primer-Blast (NCBI-NIH; Tabla 5.2). La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando el sistema de detección por PCR en tiempo real como se describe en el capítulo 3.

El ADNc se preparó a partir de las mismas muestras de ARNm utilizadas para el análisis RNASeq, utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific); la qPCR se realizó con tres réplicas técnicas utilizando el kit Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La expresión génica relativa se realizó utilizando la transcripción de actina como gen de referencia para la normalización de la expresión (Mosquera *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2021). El programa utilizado para todos los objetivos fue: 95 °C 3 min, 40 ciclos de 95 °C 10 s y 60 °C 30 s. Luego se leyó la fluorescencia y al final del programa, la temperatura se redujo de 95 a 65 °C en una rampa de velocidad de 0,1 °C/s, lo que permitió evaluar las curvas de fusión para cada reacción. La especificidad de los amplicones se verificó mediante análisis de las curvas de fusión y secuenciación de los

fragmentos obtenidos. El cambio en la expresión de los genes relativizados al gen de actina se calculó por el método de Livak y Schmittgen (2001) como se describe en el capítulo 3.

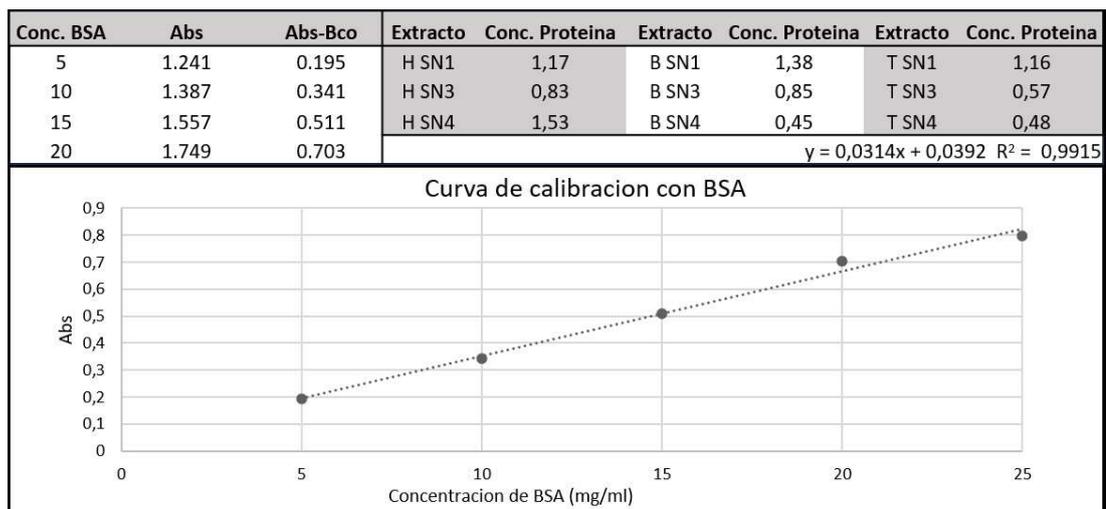
Tabla 5.2: Oligonucleótidos para PCR en tiempo real.

Num. Acceso "GenBank"	Nombre del Gen	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (5'→3')	Amplif. (pb)
MW595346	α-tubulin	AGTTCGACCTGCTCTACTCG	CGACCTCCTCGTAGTCCTTC	126
MW595347	β-tubulin	CCGAGAACTGTGACATGCTG	GTGGCATTGTAGGGTTTCGAC	187
MW595348	γ-tubulin	TTTCCCAACTCGGAGGAGAC	GGTTGGTTTGGCTGTAGCTC	175
MW595353	TTL	CGGTGCAAGAGGTCAAGAAG	GTTTGGACGAGCAGATCCAC	136
MW595352	CCP1	GACTTTGCGCTCGAATGGAT	ATCGAGACCAAACATCATGC	171
MW595351	HDAC6	GTCGTTCAATCCGCACAAGA	CATCGTTGTCCATCGTCGAG	155
MW602863	Actin	CTACGTTGCCCTCGACTTTG	CGTTTCCGACAGTGATGACC	107

RESULTADOS

Con el objetivo de encontrar posibles diferencias en el perfil proteico entre las diferentes estructuras de *T. frezzii* se realizó una extracción diferencial de proteínas citosólicas (SN1), proteínas asociadas a membrana (SN3) y proteínas integrales (SN4). Esto se logró separando, en primer lugar, las proteínas citosólicas solubles en el buffer de lisis. Luego se trataron los pellets, que contienen las proteínas asociadas e integrales de membrana, con una solución de detergente, el Triton X- 114 al 5%. Este compuesto tiene la capacidad de extraer estas proteínas, pero además cuenta con una propiedad de gran utilidad. Dado que dentro de este extracto hay proteínas más hidrofóbicas y otras más hidrofílicas, esta solución de detergente, al ser calentada por 10 min a 37 °C se separa en dos fases. Por un lado, la fase acuosa superior mantiene en solución las proteínas hidrofílicas; por otra parte, en la fase inferior rica en detergente, se mantienen en solución las proteínas de carácter hidrofóbico. Luego de lograr separar cada fracción proteica de hifas, basidiosporas y teliosporas, se cuantificaron por el método de Bradford. Los resultados de la concentración de proteínas de cada extracto se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina (BSA) y cálculo de la concentración proteica en cada extracto (Abs: Absorbancia; Bco: Absorbancia del blanco).



A partir de los datos de concentración de proteínas obtenidos, se calculó el volumen de siembra en los geles de poliacrilamida. De cada muestra, se calculó un volumen

equivalente a 20 µg de proteínas y se incubó con el buffer de corrida. Luego de incubar a 95 °C por 5 min, se sembraron en los geles de acrilamida al 12,5%. La corrida electroforética se llevó a cabo a 80-100V hasta que se visualizó el final de la corrida. El resultado luego de la tinción con azul de Coomasie, se visualiza en la figura 5.1. Se agregó un marcador de peso molecular (LMW de 14 a 100 KDa aprox.).

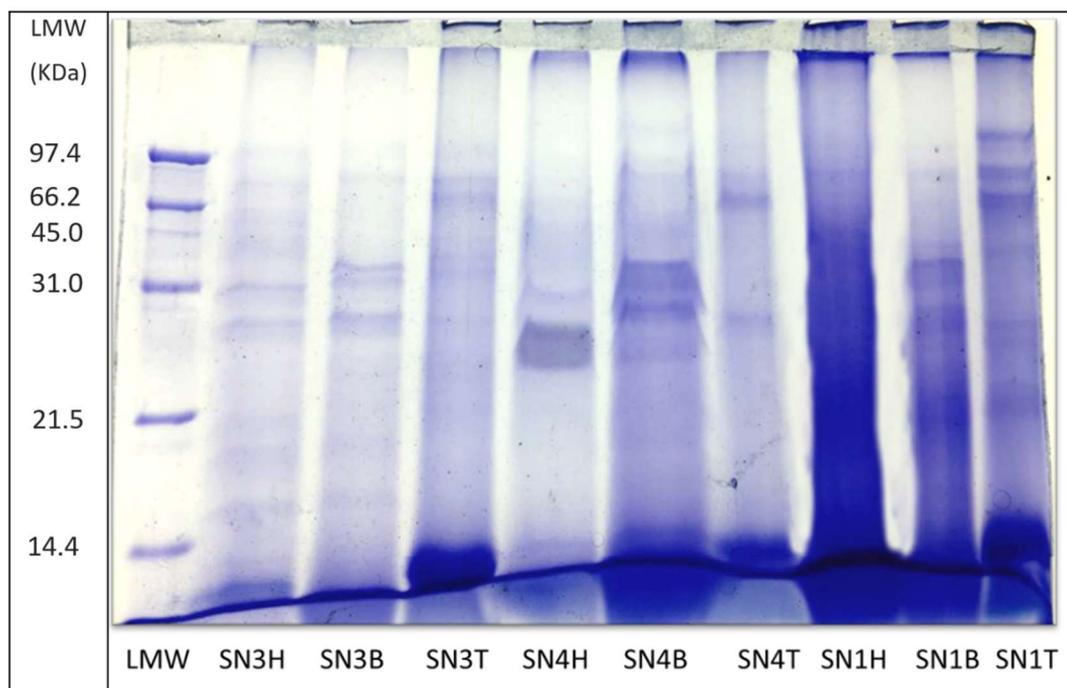


Figura 5.1: Geles de poliacrilamida al 12.5%. Siembra de 20 µg de proteínas de cada extracto. LMW: Marcador de peso molecular bajo; SN3H: Sobrenadante 3 de hifas correspondiente a fracción de proteínas asociadas a membrana; SN3B: Sobrenadante 3 de basidiosporas correspondiente a fracción de proteínas asociadas a membrana; SN3T: Sobrenadante 3 de teliosporas correspondiente a fracción de proteínas asociadas a membrana; SN4H: Sobrenadante 4 de hifas correspondiente a fracción de proteínas integrales de membrana; SN4B: Sobrenadante 4 de basidiosporas correspondiente a fracción de proteínas integrales de membrana; SN4T: Sobrenadante 4 de teliosporas correspondiente a fracción de proteínas integrales de membrana; SN1H: Sobrenadante 1 de hifas correspondiente a fracción de proteínas citosólicas; SN1B: Sobrenadante 1 de basidiosporas correspondiente a fracción de proteínas citosólicas; SN1T: Sobrenadante 1 de teliosporas correspondiente a fracción de proteínas citosólicas.

Como puede observarse, se encontraron diferencias en los perfiles proteicos de cada estructura de *T. frezzii*, no solo entre ellas, sino en la composición proteica de cada fracción, es decir, en una misma estructura, se encontraron proteínas de diferente peso molecular

constituyendo las membranas o asociadas a ellas, en comparación a las encontradas en la fracción citosólica.

Así, por ejemplo, al analizar las proteínas de bajo peso molecular, encontramos que en las teliosporas hay una banda de menos de 14 KDa presente tanto en citosol, como proteínas del sistema de membranas; además esta banda se encuentra marcadamente más expresada en teliosporas, respecto a basidiosporas e hifas. Entre las proteínas de peso intermedio, entre 30 y 45 KDa se encuentran algunas en hifas y basidiosporas, ambas en el sistema de membranas (SN4) que se encontrarían en menor concentración en teliosporas.

Entre las proteínas de alto peso molecular, es llamativa la presencia de tres bandas notablemente más marcadas, que se encuentran en el citosol de las teliosporas (SN1T), cuyos pesos exceden los 65 KDa. Estas bandas con tal peso molecular no se encontraron ni asociadas a membrana de teliosporas ni como parte integral de las mismas. Tampoco se hallaron en los extractos de basidiosporas e hifas.

Debido a estas diferencias en los perfiles proteicos, se enfocó el estudio en proteínas de teliosporas, para lo cual se preparó un segundo gel de acrilamida/bisacrilamida al 17%. Esto permitió una mejor separación de las bandas de bajo peso molecular. Lo que se observaba en el gel anterior como una sola banda menor a 15 KDa, pudo visualizarse como bandas separadas (Figura 5.2). Estas bandas fueron escindidas del gel y enviadas al instituto LANAIS-PROEM para su identificación.

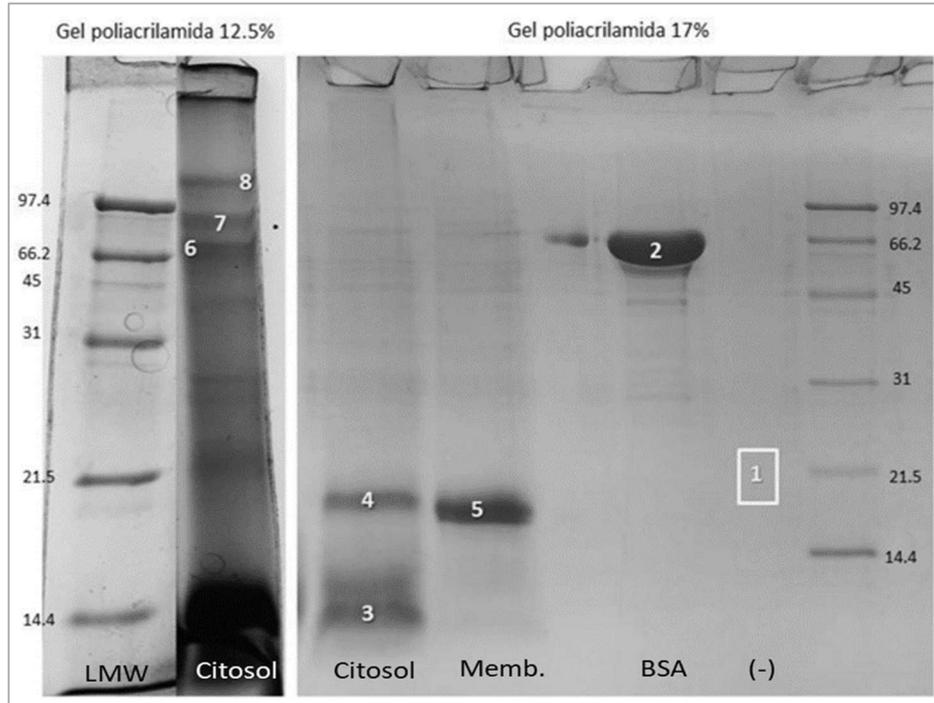


Figura 5.2: Geles de poliacrilamida al 12.5% (izq.) y 17% (der.). Siembra de 20 μ g de proteínas de citosol (SN1) y asociadas a membrana (SN3) de teliosporas. Las bandas escindidas fueron enviadas a LANAIS-PROEM para su identificación. Banda: 1-control negativo; 2-BSA (control positivo); 3-Banda de 14 KDa en citosol; 4-Banda de aprox. 20 KDa de citosol; 5- Banda de aprox. 20 KDa de extracto de membrana (SN3); 6,7 y 8- Bandas de más de 66 KDa de citosol.

En la figura 5.3 se presentan los resultados de identificación de bandas informados por el laboratorio. Como puede observarse en la figura 5.3.A, la identificación de las proteínas al ser contrastadas con las bases de datos de hongos Ustilaginales, tuvieron un muy bajo porcentaje de coincidencia. Por ello, se le envió al analista un listado de las proteínas deducidas a partir del secuenciamiento del ARN. A partir de los espectros de MS se dedujo que las proteínas analizadas coincidían con la id:72, que corresponde a la proteína identificada como número 72 deducida a partir del análisis del RNASeq. En la figura 5.3.B se observa que, si bien las bandas 4 y 5 no pudieron ser identificadas por esta tecnología, presentan entre ellas patrones de fragmentación de masa similares.

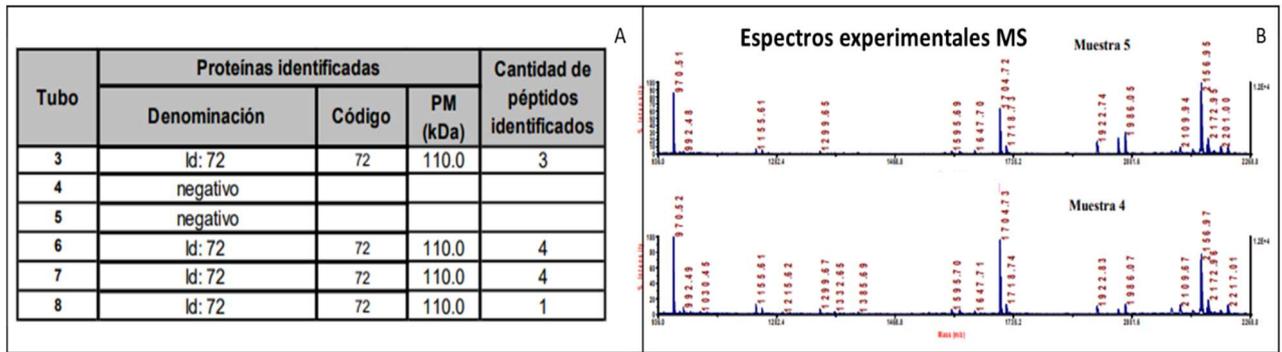


Figura 5.3: Informe de identificación de proteínas de LANAIS-PROEM. A: Tabla de identificación de bandas; B: Espectros experimentales de MS de las bandas 4 y 5.

Debido a que la tecnología ofrecida por el LANAIS-PROEM no permitió resolver adecuadamente la identidad de las bandas 4 y 5, remitimos las muestras al laboratorio CEQUIBIEM, que cuenta con una tecnología de Orbitrap, que permite una mejor separación de los iones, incrementando el poder resolutivo. Como puede observarse en la tabla 5.4, en la banda 4, se obtuvieron 12 péptidos que permitieron realizar la comparación con las proteínas deducidas del RNASeq. En este análisis se identificó dicha proteína con Id:8; sin embargo, también se lograron identificar 9 péptidos, que, si bien alcanzaron un porcentaje de cobertura menor, permiten identificar esta banda como Id:72, que coincide con la identificación y el peso molecular de las proteínas informadas por LANAIS. A su vez, al analizar el espectro de la banda 5, se consiguieron identificar 15 péptidos, lográndose un porcentaje de cobertura de 19% de la misma proteína Id:72.

Tabla 5.4: Identificación de bandas 4 y 5 por tecnología Orbitrap (Id: número de codificación de la proteína con la que se compara; #PSMs: número total de secuencias de péptidos identificados; #AAs: cantidad de aminoácidos totales de la proteína, MW: Peso molecular de la proteína, pI calc.: Punto isoeléctrico calculado).

	Id	Cobertura[%]	#Peptidos	#PSMs	# AAs	MW [kDa]	pI calc.
Banda 4	8	25	12	13	541	60,7	6,87
	72	9	9	10	991	110,3	6,11
Banda 5	72	19	15	16	991	110,3	6,11

Considerando que, con los métodos utilizados para la identificación de proteínas de las diferentes bandas, en todos los casos se reconoce la misma proteína, se procedió con la alternativa de realizar una identificación empleando técnicas inmunológicas. A tal efecto, y debido a que no existen disponibles Acs comerciales específicos que permitan analizar estas proteínas, estos se generaron inmunizando conejos con las proteínas de interés. Para ello, se separaron del gel dos bandas de proteínas de citosol de teliosporas, una más pesada de aprox. 110 KDa y una más liviana, de unos 14 KDa. Previo a la inmunización de los animales, se realizó un análisis en búsqueda de Acs que pudieran tener los conejos (preimmune). Como se observa en la figura 5.4, se realizaron diluciones desde 1/100 hasta 1/5.000 y en ningún caso se encontró que los animales tuvieran Acs previos a la inmunización.

Dil. suero	Conejo A (Banda 14 KDa)	Conejo B (Banda 110 KDa)
1/100		
1/1000		
1/5000		

Figura 5.4: Verificación de ausencia de Acs contra las dos bandas de proteínas de teliosporas en conejos, previo a su inmunización.

Luego de corroborar que los animales se encontraban aptos para el estudio, se prepararon por separado las bandas a inyectar, las cuales fueron mortereadas y mezcladas con el adyuvante de Freund. Luego de las inmunizaciones, se le extrajeron 3 ml de sangre a los conejos para realizar la medición del título de Acs. Se obtuvo un título de 1/500 en ambos conejos. Luego de esto, se les volvió a extraer sangre y se separó el suero para futuros análisis.

Análisis de bandas por Western Blot

Para poder determinar si los Acs producidos reconocen a las proteínas, o si estos sitios de reconocimiento se replican en otros extractos de los diferentes estadios de *T. frezzii*, se realizaron nuevos geles de poliacrilamida al 12,5% y se sembraron las muestras en el orden que se detalla en la figura 5.5.A. En la imagen se representa cómo los diferentes Acs reconocieron las proteínas, sin observarse entre ellos una marcación cruzada. En la figura 5.5.B se observa que el Ac reconoció la banda liviana de teliosporas, tanto de citosol como asociada a membrana. Además, este Ac presentó una tenue marcación de una Banda en el SN3 de basidiosporas y otra de SN3 de hifas. En relación al Ac generado con la banda más pesada, se observa en la figura 5.5.C que éste reconoce la banda del SN1 de teliosporas, así como las del SN3, asociadas al sistema de membranas. Este Ac también reconoció una proteína en el SN3 de basidiosporas; sin embargo, no se observó marcación en los diferentes extractos de hifas.

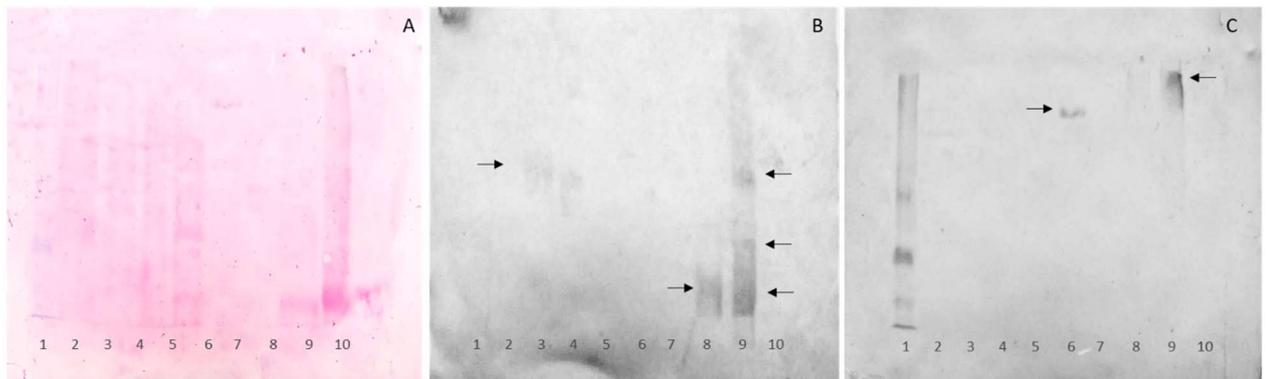


Figura 5.5: Análisis de proteínas por Western Blot. A- Membrana de nitrocelulosa con proteínas ya transferidas y teñidas con Rojo Ponceau; B- Membrana incubada con suero de conejo A (banda liviana); C- Membrana incubada con suero de conejo B (banda pesada) (1: LMW; 2: SN1H; 3: SN3H; 4: SN4H; 5: SN1B; 6: SN3B; 7: SN4B; 8: SN1T; 9: SN3T; 10: SN4T)

Identificación de isotipos de tubulina

Se fijaron los volúmenes de extractos proteicos de los tres estadios de *T. frezzii*, cada uno con el equivalente a 75 µg de proteína, en membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos específicos para las diferentes tubulinas. En primer lugar, se evaluó la

presencia de α -tubulina en las tres etapas de desarrollo de *T. frezzii* utilizando un anticuerpo monoclonal DM1A. Este subtipo de tubulina no se detectó en los ensayos de Dot-blot, ni en proteínas del citosol ni en las fracciones de membrana. Para dilucidar por qué el anticuerpo DM1A no detecta la α -tubulina de *T. frezzii*, comparamos la secuencia reconocida por el anticuerpo anti- α -tubulina, clon DM1A con la secuencia de α -tubulina de *T. frezzii*. La Figura 5.6 muestra el epítopo reconocido por el anticuerpo DM1A, donde se pueden observar algunas diferencias con la α -tubulina de *T. frezzii*.

<p>α-Tubulina de cerebro : 426 – AALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEGEE - 450 α-Tubulina de <i>T. frezzii</i> 424 – AALEKDYEEVGLDSVETEEEVLDY - 448</p>
--

Figura 5.6: Comparación entre la secuencia que reconoce el anticuerpo anti- α -tubulina clon DM1A con la secuencia de α -tubulina de *T. frezzii*. Los aminoácidos resaltados en rojo son aquellos que no coinciden entre ambas secuencias.

Al evaluar las fracciones frente al anticuerpo anti-Glu-Tub que identifica la tubulina detirosinada, se encontró una diferencia con lo observado para el clon DM1A, en los tres estadios del hongo; es decir en extractos de teliosporas, basidiosporas e hifas, se observó una reacción positiva con el Ac anti-Glu-Tub, tanto en la fracción citosólica como en las proteínas de membrana (Figura 5.7.A). La única fracción en la que no se detectó la Glu-Tub fue en la fase acuosa del tratamiento con tritón X-114 (SN3) en hifas (Figura 5.7.A).

Otro de los ensayos consistió en confrontar los extractos de los diferentes estadios, con el anticuerpo monoclonal anti-Tyr-Tub, y se observó que solo las proteínas presentes en la fase detergente del tratamiento con Tritón X-114 (SN4) mostraron un reconocimiento positivo en los tres estadios fúngicos (Figura 5.7.B). Ninguna de las fracciones restantes, ni la citosólica ni la fase acuosa superior del tratamiento con Tritón X-114, revelaron la presencia de Tyr-Tub. Para evaluar la naturaleza hidrofóbica de las tubulinas que aparecieron en la fracción de membrana, evaluamos el efecto del tratamiento con carbonato alcalino sobre la tubulina presente en la membrana de teliosporas. Para ello, el sedimento de membrana se trató primero con carbonato a pH 12 y luego se incubó con Tritón X-114 para obtener la fase acuosa y la fase rica en detergente. La figura 5.7.C muestra que Glu-Tub

aparece solo en la fracción de carbonato (SN1), no en SN3 o SN4 de Tritón X-114, lo que demuestra el carácter hidrofílico de esta tubulina.

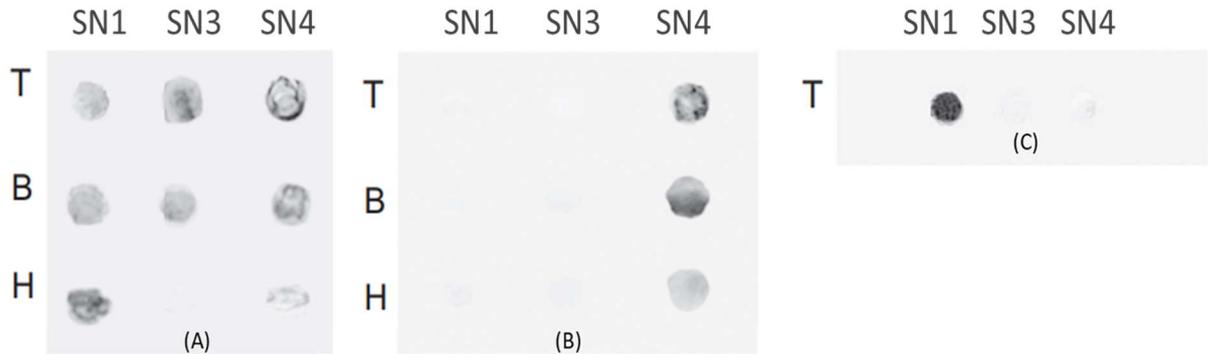


Figura 5.7: Reactividad de los Acs de los diferentes isotipos de α -tubulina contra los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*. Los extractos proteicos de teliosporas (T), basidiosporas (B) e hifas (H) fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa en un ensayo de dot blot e incubadas con los anticuerpos primarios contra α -tubulina: A) Reactividad del Ac anti-tubulina-detyrosinada (Glu-Tub); B) Reactividad del Ac anti-tubulina-tyrosinada (Tyr-Tub); C) Reactividad del Ac anti-tubulina-detyrosinada (Glu-Tub) solo contra extracto de membrana de teliosporas tratada previamente con carbonato de sodio. Fig. A y B: SN1: Proteínas del citosol, SN3: Proteínas de la fracción acuosa del tratamiento con Triton X-114 y SN4: Proteínas de la fracción rica en detergente del tratamiento con Triton X-114. Fig. C: SN1: Fracción de proteínas extraídas del tratamiento de las membranas con carbonato.

Por último, la presencia de tubulina acetilada se evaluó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón 6-11B-1. Al igual que DM1A para α -tubulina, la tubulina acetilada no se detectó ni en el citosol ni en la membrana, independientemente de las etapas de desarrollo de *T. frezzii*. Este resultado podría explicarse por al menos dos alternativas, (a) la ausencia de la enzima tubulina-acetilasa, que agrega el grupo acetilo en la lisina-40 de la α -tubulina; o (b) la falta de lisina en la posición 40, el sitio específico para la acetilación. Para analizar estas hipótesis, utilizamos datos de análisis RNASeq de tubulina de *T. frezzii*. Allí, se comparó la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 1 y 55 de las α -tubulinas de cerebro y del hongo, con el objetivo de evaluar si la falta de reconocimiento de la α -tubulina por el anticuerpo monoclonal 6-11B-1 está relacionada a la ausencia del aminoácido lisina en la posición 40 de la cadena. La comparación de ambas secuencias muestra que la α -tubulina de *T. frezzii* no contiene la lisina en la posición 40, como la tubulina neuronal (Figura 5.8).

T. frezzii 1- MREVL^SLHVGQAGIQIGNACWELYLAEHGLSPDGRILEG^SP-SQHDDGFSTFFSET - 55
 Human 1 - MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSD^KTIGGGDDSFNTFFSET - 56

Figura 5.8: Secuencia de aminoácidos 1 a 55 de α -tubulina en cerebro y *T. frezzii*. Los AA resaltados en rojo indican la posición 40 en la cadena.

Con el objetivo de visualizar la presencia de la red microtubular en hifas y basidiosporas, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando Acs específicos para cada isotipo de tubulina. En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de Dot-Blot, los microtúbulos de Glu-Tub están presentes en hifas y basidiosporas (Figura 5.9.A y B). Sin embargo, ni Tyr-Tub ni α -tubulina (clon DM1A) pudieron detectarse mediante inmunofluorescencia en ninguno de los estadios ontogénicos analizados (Figura 5.9.C a F).

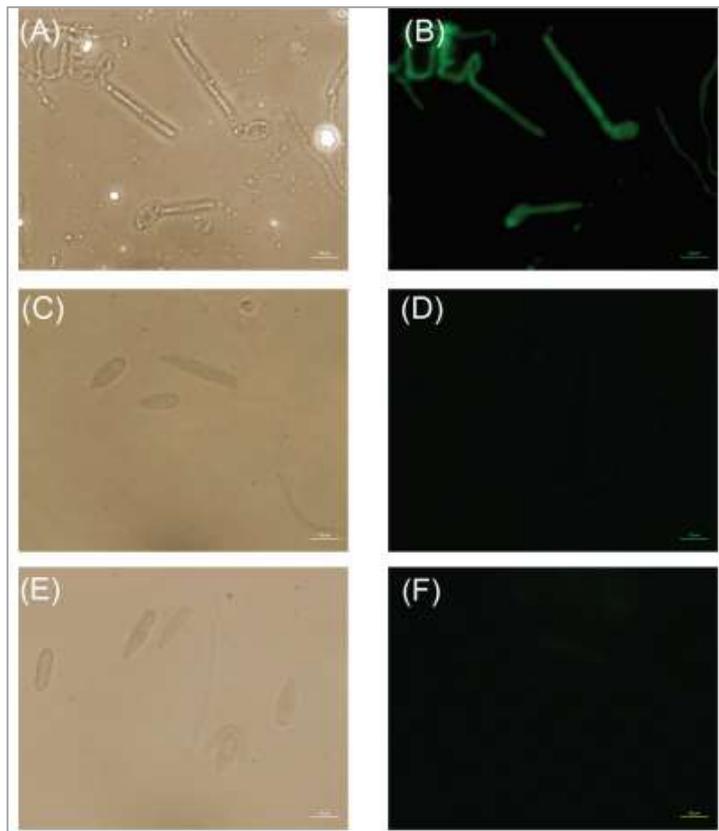


Figura 5.9: Immunodetección de α -tubulinas de *T. frezzii*. Cultivos frescos de hifas y basidiosporas fueron incubados con Acs anti- α -tubulina. A y B): Ac anti tubulina-detyrosinada; C y D): Ac anti tubulina-tyrosinada; E y F): Ac anti- α -tubulina clon DM1A

(A, C y E: microscopia de campo claro; B, D y F: microscopia de fluorescencia, aumento 600x).

Análisis de homología, identidad y niveles de expresión de tubulinas y enzimas modificadoras

A partir de las secuencias obtenidas del análisis de RNASeq, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cuantificar la expresión de las diferentes tubulinas y enzimas que la modifican. Se identificaron un total de seis transcritos que codifican estas proteínas. Todas las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos GenBank (los números de accesoión se describen en la Tabla 5.2 de la sección de materiales y métodos). Como se observa en la figura 5.10, las tubulinas α , β y γ se expresan en los tres estadios ontogénicos de *T. frezzii*, aunque se encontraron niveles de expresión cuantitativamente diferentes en cada una ($p < 0,02$).

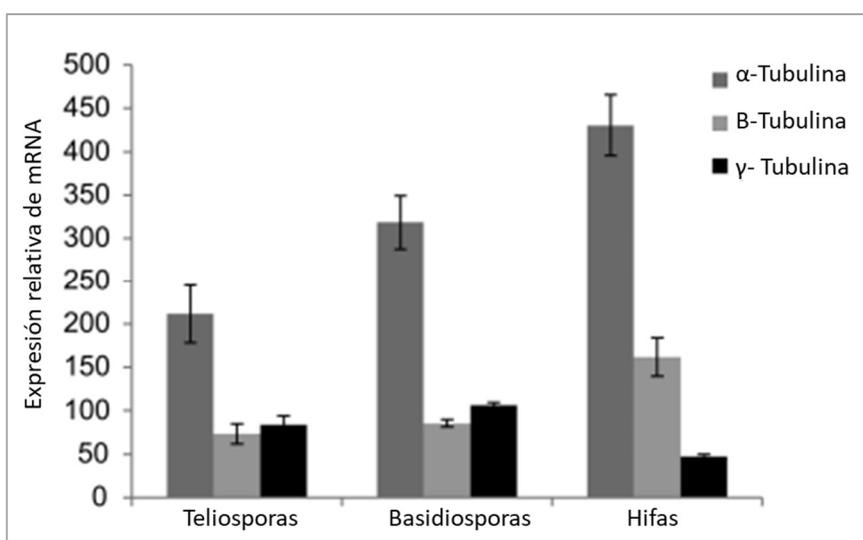


Figura 5.10: Niveles de expresión relativos de ARNm de tubulinas de *T. frezzii* de acuerdo a cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas) medido por RT-PCR. Los datos representan el valor promedio de expresión medido en tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los valores se relativizaron al valor de expresión del gen de Actina.

Se logró obtener la secuencia deducida completa de tres tubulinas, con un total de 448 aminoácidos para la α -tubulina, 447 aminoácidos para la β -tubulina y 454 aminoácidos para

la γ -tubulina (Tabla 5.5). El análisis comparativo con la secuencia completa de tubulinas de otros hongos, reveló un alto porcentaje de identidad y homología con *A. flocculosa*, *U. maydis* y *T. thlaspeos*. La α -tubulina presentó un 95% de identidad y un 97% de homología con la misma proteína del hongo *A. flocculosa*, un 93% y 96% con la α -tubulina de *U. maydis* y un 95% y 96% con *T. thlaspeos*, respectivamente. En el caso de β -tubulina, se observó un 92% de identidad con *A. flocculosa* y *U. maydis*, y un 91% en comparación con *T. thlaspeos*, mientras que el porcentaje de homología fue el mismo para los tres hongos (96%). La γ -tubulina presentó altos valores de identidad (94% –98%) y homología (97% –98%) con los tres hongos.

Tabla 5.5: Análisis de secuencias de tubulinas y enzimas involucradas en las modificaciones postraduccionales: longitud de AA, porcentaje de homología e identidad comparados con *U. maydis*, *A. flocculosa* y *T. thlaspeos*.

Genes	Numero de aminoácidos de proteínas deducidas	Numero de aminoácidos - Porcentaje de identidad (%) / Porcentaje de homología (%)			
		<i>T. frezii</i>	<i>U. maydis</i>	<i>A. flocculosa</i>	<i>T. thlaspeos</i>
α -TUB	448	448- 93/96	448- 95/97	448- 95/96	
β -TUB	447	448- 92/96	448- 92/96	448- 91/96	
γ -TUB	454	454- 94/97	454- 98/98	454- 97/98	
TTL	519	513-55/68	543-59/68	514-61/73	
CCP1	401	432-72/81	424-79/84	411-79/80	
HDAC6	799 (parcial)	1461-70/80	1482-84/89	1538-80/85	

Los niveles de expresión de tres enzimas, que podrían estar involucradas en las modificaciones postraduccionales de tubulinas durante el ciclo de *T. frezzii*, fueron medidos mediante RT-PCR. La figura 5.11 muestra el nivel de expresión de las enzimas TTL, CCP1 y HDAC6, donde se observa que la expresión más alta ocurre en el estadio de basidiosporas. Para cada una de estas enzimas, las diferencias de expresión en cada etapa son significativas ($P < 0,02$), excepto para TTL entre las etapas de teliospora e hifas, donde no hay diferencia significativa.

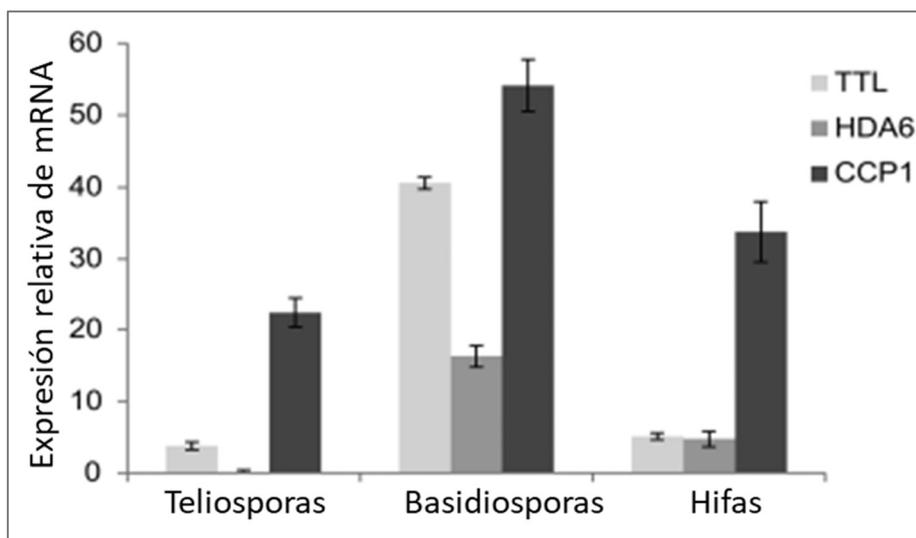


Figura 5.11: Niveles de expresión relativos de ARNm de enzimas modificadoras de tubulinas TTL, CCP1 y HDAC6 de *T. frezzii* de acuerdo a cada estadio ontogénico (teliosporas, basidiosporas e hifas) medido por RT-PCR. Los datos representan el valor promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar y los valores se relativizaron al valor de expresión del gen de Actina.

En la tabla 5.4 se detallan las secuencias de dichas enzimas de *T. frezzii* y su nivel de homología e identidad con las de sus ortólogos *A. flocculosa*, *U. maydis* y *T. thlaspeos*. En el caso de TTL se pudo identificar una secuencia de 519 aminoácidos, con valores moderados de identidad y homología con los otros tres hongos (55%-61% y 68%-73%, respectivamente). En CCP1, una enzima de 401 aminoácidos, se encontró un porcentaje moderado de identidad y homología (72%–79% y 80%–84%). En relación a la transcripción de HDAC6, los porcentajes de identidad y homología se encontraron entre 70%-84% y 80%-89%, respectivamente.

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue analizar los perfiles proteicos de cada una de las estructuras que desarrolla *T. frezzii* durante su ciclo de vida. La identificación de cambios en la expresión de diferentes proteínas en cada estadio contribuye a investigaciones posteriores en el desarrollo de alternativas para el control de dicho hongo. En particular este estudio representa el primer trabajo tendiente a identificar dichas diferencias en esta especie y, además, es uno de los pocos estudios en basidiomicetes, ya que la mayoría de los análisis de proteomas fúngicos se llevaron a cabo en hongos pertenecientes al filo Ascomycota.

Con la finalidad de refinar la localización de estas proteínas, se realizó un fraccionamiento estratégico que permitió definir la composición proteica tanto en citosol, como de proteínas asociadas a los sistemas de membranas. Esto se logró tratando las diferentes estructuras con detergentes iónicos (SDS) como señala la literatura. Longo *et al.* (2014) presentan diferentes maneras de unión de proteínas a la membrana, entre ellas, las de unión covalente o proteínas estructurales, unidas principalmente a cadenas de glucanos por anclajes vía glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Estos autores también destacan la importancia del estudio de las proteínas de unión no covalente, las cuales pueden extraerse con agentes caotrópicos o detergentes iónicos. Otro método de extracción emplea agentes reductores para la detección de proteínas asociadas por enlaces disulfuro. Este tipo de tratamiento deja expuestas, además, las proteínas citosólicas permitiendo optimizar su análisis.

Diferencias en los perfiles proteicos de las diferentes estructuras

Los resultados del presente trabajo demuestran que el perfil proteico varía marcadamente de una estructura a la otra, además de modificarse cuando se estudia cada fracción extraída diferencialmente. Champer *et al.* (2016) en el análisis del proteoma de varios hongos ascomycotas y algunos basidiomicotas lograron identificar diferencias en el perfil proteico, principalmente en las proteínas de membrana de los hongos analizados. Si

bien estos autores encuentran valores elevados de identidad y homología al comparar entre hongos del mismo género, estas proteínas no resultaron ser tan conservadas al comparar entre géneros de una misma división. En nuestro trabajo se hallaron valores elevados de homología e identidad al comparar proteínas de hongos de diferentes géneros, dentro del mismo filo.

En el hongo *Paracoccidioides lutzii*, un hongo dimórfico del filo Ascomycota, Araújo *et al.* (2017) describen una marcada diferencia en el proteoma de las levaduras (244 proteínas totales) respecto a las hifas (268 proteínas totales), hallando alrededor de 135 proteínas en común presentes en ambos estadios. Estos resultados coinciden con los hallados en *T. frezii*, donde se observaron bandas diferenciales entre los perfiles proteicos de basidiosporas e hifas. En igual sentido, en la transición dimórfica de *U. maydis*, Böhmer *et al.* (2007) identificaron alrededor de 13 proteínas que aumentan su expresión en la transición desde levadura a hifa. Durante este fenómeno pudo observarse un aumento de la transcripción génica en igual sentido; dependiendo de la proteína, se observó que el nivel de transcritos aumentaba 2, 4 y hasta 84 veces durante las primeras 24 h de la transición. Estos autores destacan que el micelio aéreo de *U. maydis* se caracteriza por su hidrofobicidad, lo cual coincide con el incremento de proteínas tipo hidrofóbicas al analizar el proteoma de esta estructura.

Huber *et al.* (2002) al examinar el proceso de esporulación, destaca su activación por parte de la planta hospedera, evidenciando su estrecha regulación genética. Estos autores identificaron una proteína marcadamente expresada en teliosporas maduras, designada como ssp1 (por las siglas en inglés Spore Specific Protein 1) de peso molecular de 110 KDa, coincidente con la banda más pesada del extracto citosólico de teliosporas de *T. frezii*. Mediante el análisis por espectrometría MS/MS, se pudo identificar cierta homología entre esta banda (Id:72) y la proteína Ssp1 de *U. maydis*, aunque con un grado de similitud moderado, posiblemente debido a la identificación limitada de péptidos en una proteína de gran tamaño con más de 990 aminoácidos. Además, nuestro análisis reveló la presencia de una banda de bajo peso molecular (14 KDa) en el perfil electroforético de las teliosporas de *T. frezii*, la cual no fue mencionada por los autores previamente citados.

En este punto, este resultado nos plantea la posibilidad que pueda tratarse de una proteína entera de 110 KDa, que, por algún proceso biológico propio de la espora, pueda

fragmentarse en péptidos de menor peso molecular. Y lo más llamativo es que, de todos los fragmentos generados, solo uno se modifica de forma tal, que se asocia con un enlace débil al sistema de membranas. Numerosos autores describen las modificaciones postraslacionales que experimentan las proteínas con diferentes propósitos. Pang *et al.* (2007) destacan la importancia de estas modificaciones, como son las uniones a grupos esteres, fosforilación, sulfotirosinación entre otros, que permiten nuevas interacción proteína-proteína, lo que incluso podría generar uniones a la membrana. Tamanoi *et al.* (2001) mencionan que los procesos de farnesilación de las proteínas facilitan su asociación a membranas, lo que permite a las proteínas modificar sus funciones durante el ciclo de vida celular.

Con el fin de identificar por técnicas inmunológicas si esta misma proteína de 110 KDa es la que genera estos fragmentos más pequeños, se diseñó un experimento para generar anticuerpos, para analizar si los mismos reconocían algunos epitopes en estas otras bandas más livianas. Para ello, se inocularon en dos conejos por separado, dos bandas de peso molecular diferentes, de 14 KDa y 110 KDa. El resultado del ensayo de Western Blot reveló que, si bien se podría tratar de la misma proteína, los Acs reconocieron cada banda por separado, es decir que se generaron Acs contra epitopes diferentes o bien contra un epitope único, pero común en cada banda.

Gupta *et al.* (2009), al generar Acs contra proteínas totales de teliosporas de *Tilletia indica*, encontraron dos bandas dominantes, de 15 y 35 KDa aprox., que no presentaron reacción cruzada con esporas de otros hongos como *Fusarium spp.*, *Tilletia foetida*, *Puccinia recondita*, *Aspergillus niger* o *Ustilago nuda tritici*. Estos autores señalan, además, que estos resultados podrían explotarse en una etapa posterior de caracterización, aislamiento y desarrollo de inmunosondas para el diagnóstico diferencial de teliosporas del carbón del trigo.

Modificaciones postraslacionales de tubulina

Entre las proteínas con más modificaciones postraslacionales estudiadas, se encuentran las tubulinas, integrantes de la red microtubular. Hemos descripto anteriormente la importancia de los microtúbulos en el funcionamiento celular durante todo el ciclo de vida; en particular en hongos filamentosos, contribuyendo a la elongación de las hifas y movilización de material citosólico. En tal sentido, se estudiaron las modificaciones

postraslacionales de α -tubulina y la localización dentro de la célula. Se evaluó la presencia de α -tubulinas en extractos proteicos de citosol y membranas de las tres estructuras de *T. frezzii*, mediante la técnica de Dot-Blot con Acs específicos e inmunotinción; los datos además fueron correlacionados con los obtenidos del análisis de RNASeq.

Cuando se incubaron extractos de proteínas de *T. frezzii* con el anticuerpo DM1A, no se observó ningún reconocimiento específico de tubulina. Este es un resultado muy llamativo, teniendo en cuenta que este anticuerpo reconoce la mayoría de las α -tubulinas presentes en las células eucariotas. Cuando se estudió la secuencia reconocida por este anticuerpo, observamos que esta se encuentra entre los aminoácidos 426–451 del extremo carboxi-terminal de la α -tubulina, siendo particularmente importante el fragmento 426–430 (Breitling y Little, 1986). Aunque se observó cierto grado de homología con la secuencia deducida de *T. frezzii*, ésta no sería suficiente para ser reconocida por el anticuerpo.

Otra razón por la cual el Ac puede no reconocer a α -tubulina, podría ser la desnaturalización de esta proteína durante el proceso de extracción. Esta última explicación se ve reforzada por el trabajo de (Breitling y Little, 1986), quienes describieron que DM1A es más reactivo con el dímero de tubulina nativo que con la subunidad α desnaturalizada, y que tiene baja reactividad con los péptidos. Además, estos autores sugieren que el anticuerpo anti-DM1A tiene un epítipo discontinuo o conformacional y que la tirosinación C-terminal no tiene efecto sobre la antigenicidad. Esto también podría explicar la ausencia de fluorescencia en la inmunotinción de hifas y basidiosporas. Es probable que el procesamiento de las muestras resulte en la pérdida del plegamiento de la proteína, modificando el sitio del epítipo que reconoce el anticuerpo.

El extremo C de la α -tubulina se caracteriza por dos residuos glutámicos seguidos de un aminoácido aromático (tirosina o fenilalanina) en células eucariotas. La secuencia deducida completa de α -tubulina de *T. frezzii* (448 aminoácidos) confirmó que los últimos tres aminoácidos son leucina, aspartato y tirosina; lo cual pudo ser demostrado en el ensayo de Dot-Blot. Usando el anticuerpo TUB1A2, que reconoce el residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal de α -tubulina, solo detectamos esta tubulina formando parte del sistema de membranas, pero no en la fracción citosólica, al analizar todas las estructuras fúngicas de *T. frezzii*.

Wolff (2009) describió que una parte de las tubulinas extraídas de algunas membranas son hidrofóbicas, y permanecen en la fase rica en detergente (Triton X-114), mientras que otras permanecen en la fracción citoplasmática, como se observa, por ejemplo, en las membranas hepáticas y renales que contienen una pequeña cantidad de tubulinas hidrofóbicas. Esto coincide con la detección de Tyr-Tub en la fase rica en detergente, en la extracción de membranas de teliosporas, basidiosporas e hifas del hongo. Si bien se había descrito la presencia de estructuras de citoesqueleto y tubulinas en membranas (Corrochano, 2013), este resultado fue inesperado, ya que Tyr-Tub generalmente estaba asociado a tubulinas citosólicas o a microtúbulos altamente dinámicos (Andrieux *et al.*, 2019). Zekert y Fischer (2009) detectaron Tyr-Tub en el citoplasma y en los husos mitóticos de *A. nidulans*. Por otro lado, los microtúbulos que contienen Tyr-Tub no se detectaron en *T. frezzii* mediante la técnica de inmunofluorescencia. Este resultado probablemente se deba a que probablemente Tyr-Tub esté asociada a proteínas de membrana como monómeros, y no formando microtúbulos, por lo que no pudo ser detectado por el anticuerpo.

Gran parte de los microorganismos sintetizan Tyr-Tub, que puede modificarse postraduccionalmente. La presencia de genes que codifican para Tyr-Tub en *T. frezzii* se verificó mediante RNASeq. La enzima tubulina-tirosina-carboxipeptidasa puede eliminar este aminoácido produciendo la llamada tubulina detirosinada o Glu-Tub. Este fenómeno es reversible ya que TTL (tubulina-tirosina ligasa) cataliza la retirosinación (Janke, 2014; Westermann y Weber, 2003; Zekert y Fischer, 2009). La presencia de esta PTM en *T. frezzii* se detectó en los tres estadios del desarrollo mediante la prueba Dot-Blot en proteínas citosólicas. En basidiosporas y teliosporas, también se detectó Glu-Tub en la fracción de membrana; en hifas, sin embargo, solo se detectó en la fase rica en detergente de la extracción con Triton X-114. La presencia de Glu-Tub asociado a membrana en hifas, podría sugerir un papel específico de esta tubulina en el proceso infeccioso. En las imágenes de inmunofluorescencia pudimos observar que todo el citoplasma de las hifas y basidiosporas se marcaron con Glu-Tub.

Se demostró que las PTM como la detirosinación, la acetilación y la poliglutaminación ocurren preferentemente en microtúbulos tendientes a sufrir diversas modificaciones y combinaciones de PTM. La detirosinación y la acetilación se asocian con la longevidad de los microtúbulos, aunque no implica que le otorguen mayor estabilidad (Janke, 2014; Kesarwani *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021). Se desconoce si la detirosinación de los

microtúbulos los hace más flexibles o altera la interacción con las proteínas asociadas, ya que la Glu-Tub o tubulina detirosinada se asocia a la flexión en la contracción muscular (Janke y Magiera, 2020). Zekert y Fischer (2009) demostraron por primera vez la existencia de microtúbulos detirosinados en *A. nidulans*, observando que ambos microtúbulos tirosinados y detirosinados coexisten en las células en interfase y los microtúbulos tirosinados se despolimerizan, mientras que los microtúbulos detirosinados permanecen en las células mitóticas. Además, sugieren que estos microtúbulos son independientes de la fase de crecimiento, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que no encontramos diferencias en las tubulinas de los tres estadios de *T. frezzii*.

Se ha demostrado que la proteína motora Kinesin-1 se une preferentemente a los microtúbulos detirosinados, para un transporte más eficiente, involucrada además en el movimiento de los núcleos en *Saccharomyces cerevisiae* (Hammond *et al.*, 2008; Zekert y Fischer, 2009). Zekert y Fischer (2009) demostraron que la proteína motora UncA de la familia de la kinesina-3 transporta vesículas y endosomas a lo largo de una subpoblación de microtúbulos detirosinados a diferencia de otras kinesinas, y estas vesículas son necesarias para la rápida extensión de las hifas. Estos autores suponen que estos microtúbulos estables podrían ser importantes para la extensión de las hifas durante la mitosis. Aunque no existen reportes sobre el crecimiento de *T. frezzii*, podemos hipotetizar que esta detirosinación podría ser fundamental en el transporte de vesículas para mantener el desarrollo de basidiosporas e hifas. En cambio, en las teliosporas, las tubulinas estarían implicadas en el mantenimiento de la organización del citoplasma, núcleo y organelas, ya que no son células en división.

No se detectó tubulina acetilada ni en el citosol ni en la fracción de membrana de ninguna de las tres estructuras de *T. frezzii*. La falta de reactividad con el anticuerpo 6-11B-1 puede deberse a cambios en la secuencia primaria de la molécula. Con la secuencia deducida de α -tubulina obtenida mediante el análisis RNASeq, pudimos observar que hay una serina en lugar de lisina en la posición 40, lo que corroboró los resultados negativos obtenidos en el ensayo Dot-Blot. Estos resultados coinciden con los descritos por Zekert y Fischer (2009), quienes no detectaron tubulina acetilada en los hongos filamentosos *A. nidulans*. Westermann y Weber (2003) además destacan que no encontraron PTMs como acetilación, poliglutaminación, o poliacetilación en *S. cerevisiae*.

El término tubulina de membrana incluye tubulina integral y tubulina periférica como dímeros libres, en complejos o como microtúbulos unidos a membranas directamente o mediante proteínas o modificaciones de lípidos, pero que requieren extracción con detergente. Beltramo *et al.* (1994) demostraron que las membranas cerebrales contienen tubulinas que se comportan como proteínas integrales de membrana, ya que aparecen localizadas en la fase rica en detergente, al ser extraídas con Tritón X-114. Esta tubulina de membrana hidrofóbica está enriquecida en el subtipo acetilado. Sin embargo, estas membranas se trataron primero con una solución alcalina, una condición para eliminar solo las proteínas asociadas a membranas, y entonces la tubulina aparece en una fase acuosa proveniente de la extracción con Tritón X-114, al igual que la tubulina citosólica hidrofílica. Esto demuestra que el comportamiento hidrofóbico se debió a una interacción con una proteína integral de membrana que luego fue identificada como la Na-K-ATPasa (Alonso *et al.*, 1998). En nuestro caso, también detectamos en *T. frezzii* la presencia de Tyr-Tub y Glu-Tub en la fase rica en detergente, lo que sugiere un comportamiento similar al de una proteína integral de membrana. Sin embargo, después de tratar las membranas de teliosporas con carbonato de sodio a pH: 12, observamos que Glu-Tub desaparece de la fase rica en detergente y demuestra un comportamiento hidrofílico. Este resultado nos permitió establecer que, aunque Glu-Tub se comporta como proteína integral de membrana en teliosporas, este comportamiento es probablemente debido a la asociación con algún componente de la misma.

La mayoría de las tubulinas de la membrana periférica están unidas en el lado citoplásmico; esta interacción podría ser a través de receptores de tubulinas integrales o proteínas unidas a receptores o anclajes lipídicos (Wolff, 2009). Estos autores señalan que proteínas tales como HPC-1/Syntaxin A, característica de las membranas neuronales se une a dímeros de tubulinas, pero no a microtúbulos. Alonso *et al.* (1998) identificaron que la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa interactúa con tubulina acetilada otorgándole un carácter hidrofóbico. Otro complejo hidrofóbico entre tubulina acetilada y H⁺-ATPasa se describe en *S. cerevisiae* (Wolff, 2009).

Si bien aún no se conoce con exactitud el proteoma asociado a membranas de *T. frezzii*, o si existen este tipo de receptores ATPasas, se pudo observar claramente que las tubulinas en este hongo podrían presentar este carácter hidrofóbico por la unión a alguno de estos receptores y que entonces no se tratan de tubulinas integrales de membrana. Por otra parte,

Wolff (2009) resume en su trabajo acerca de que diferentes autores reportan que la tubulina interactúa con vesículas lipídicas. Esta interacción depende de la cabeza polar de los fosfolípidos. Los lípidos neutros y los lípidos cargados positivamente favorecen la interacción, mientras que los fosfolípidos cargados negativamente interfieren con la interacción. Esta interacción puede ser directamente con la tubulina o a través de las proteínas MAPs, por lo que se requerirán estudios adicionales para evaluar esta interacción en *T. frezzii*.

Análisis de proteínas deducidas del RNASeq

Teniendo en cuenta los datos de RNASeq, que muestran la presencia del gen Tyr-Tub pero no del gen que codifica Glu-Tub, la identificación por reconocimiento inmunológico específico de Tyr-Tub y Glu-Tub en *T. frezzii* sugiere la existencia de PTM de tubulina. Basado en estos resultados, analizamos la presencia de genes que sintetizan las enzimas implicadas en estas modificaciones en *T. frezzii*. Encontramos la secuencia de TTL expresada principalmente en basidiosporas y en menor medida en teliosporas e hifas. También encontramos a CCP1, una enzima que elimina un residuo glutámico del extremo carboxilo terminal de los microtúbulos destirosinados, de manera irreversible, formando delta 2 tubulina; esta modificación previene otras PTMs como la tirosinación y la poliglutamilación (Song *et al.*, 2021). Tanco *et al.* (2015) demostraron que CCP1 procesa glutamatos y aspartato en los residuos C-terminales de α -tubulina. La secuencia deducida demuestra que en el extremo carboxilo terminal de *T. frezzii* se encuentra una tirosina seguida de aspartato; CCP1 podría así cortar este residuo de aspartato generando tubulina delta 2.

Si bien no se logró determinar si existe otra carboxipeptidasa que escinde el residuo de tirosina de la tubulina para dar lugar a tubulina detirosinada, sí se detectó una carboxipeptidasa que actúa sobre los residuos glutámicos. Con estos resultados, nos preguntamos si el anticuerpo policlonal utilizado en este estudio podría reconocer otras tubulinas modificadas, ya que la secuencia de α -tubulina de *T. frezzii* no coincide completamente con el epítipo del anticuerpo y que la intensidad de marcación fue mayor para Glu-Tub.

Por su parte, la enzima TTL no es capaz de tirosinar microtúbulos, ya que depende de una conformación específica del dímero de tubulina α/β ; en primer lugar, deben

desensamblarse para la retirosinación de sus dímeros antes de su nuevo reensamblaje. En tal caso, la carboxipeptidasa tiene una posición preferencial para su acción sobre los microtúbulos, que se demuestra por la existencia de microtúbulos con dominios ricos en tubulinas detirosinadas en el inicio y terminales ricos en tubulinas tirosinadas (Kesarwani *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021). Especulamos que la Glu-Tub detectada en el citosol se encuentra como parte de los microtúbulos y no como tubulina libre, por lo tanto, no se pudo volver a tirosinar mediante TTL. Esta podría ser la razón por la cual no detectamos Tyr-Tub citosólico de ninguno de los tres estadios del desarrollo del hongo, tanto en el Dot-Blot como en el ensayo de inmunofluorescencia. El ciclo de tirosinación y destirosinación depende del equilibrio entre las dos enzimas modificadoras (Zekert y Fischer, 2009); podría ser que haya más detirosinación porque la carboxipeptidasa mostró un mayor nivel de expresión que TTL en las tres etapas ontogénicas estudiadas.

Los datos obtenidos mediante el análisis RNASeq nos permitieron no sólo para deducir la secuencia de α , β y γ -tubulina de *T. frezzii*, sino también analizar el nivel de variación de expresión según etapa del hongo. En las hifas, la expresión de α -tubulina fue aproximadamente un 50% mayor que en las basidiosporas y el doble de lo expresado en teliosporas. Con respecto a la β -tubulina, la cantidad expresada en hifas fue aproximadamente el doble que las encontradas en las basidiosporas y teliosporas, mientras que la expresión de γ -tubulina es mayoritaria en basidiosporas, siendo el doble que en las hifas. Si bien debe recordarse que los niveles de ARNm pueden no estar directamente relacionados con los niveles de proteína debido a numerosos posibles PTM, estas variaciones en el contenido de tubulinas podrían relacionarse a las funciones cambiantes de cada estructura durante el ciclo fúngico (Oakley, 2011).

A partir de las respectivas secuencias proteicas deducidas, evaluamos la homología e identidad con las de otras especies relacionadas (desde el punto de vista filogenético y de patogenicidad: *U. maydis*, *A. flocculosa* y *T. thlaspeos*). El análisis comparativo muestra un alto grado de identidad con tubulinas de *A. flocculosa* (entre 92% y 98%), *U. maydis* (92%-94%) y con *T. thlaspeos* (91%-97%). Cuando se analizaron las enzimas implicadas en las PTM de tubulina, pudimos encontrar tres enzimas relacionadas. Estas enzimas también mostraron porcentajes de identidad y homología de moderados a altos en comparación con los hongos fitopatógenos *U. maydis* y *T. thlaspeos*, y con el hongo no patógeno *A. flocculosa*. Cabe destacar que, en estos hongos, no se conocen estudios de PTM de tubulinas.

CONCLUSIONES

Los enfoques genómicos y proteómicos se complementan al analizar las funciones biológicas de las proteínas, reflejando así resultados bioquímicos fehacientes de la información genética y proporcionando una visión detallada de las vías bioquímicas en las que pueden estar involucradas. Dada que no hay una correlación lineal entre el nivel de transcripción de ARNm y la abundancia de proteínas, se requiere aún más el uso de enfoques proteómicos comparativos para identificar proteínas acumuladas diferencialmente en todo el perfil de expresión proteica en los patógenos.

En este trabajo, se llevaron a cabo ensayos orientados a comparar los perfiles proteicos de las estructuras de *T. frezzii*, con énfasis en las proteínas relacionadas con la conformación del citoesqueleto. Se hallaron diferencias significativas en los perfiles proteicos de las diversas estructuras de *T. frezzii*, tanto entre ellas, como dentro de cada fracción. Se identificaron proteínas de diferentes pesos moleculares en una misma estructura, lo que sugiere adaptaciones específicas en la composición proteica. El enfoque del estudio se centró en las proteínas de las teliosporas, cuyos análisis permitieron compararlas con los datos de RNASeq. Se encontró que todos los péptidos identificados coincidían con una misma proteína, lo que sugiere la presencia de una proteína de alto peso molecular que podría ser escindida de manera diferencial en las esporas. Sin embargo, la generación de anticuerpos contra proteínas de diferente peso molecular no permitió dilucidar si se trata de la misma proteína.

En cuanto a las tubulinas, se demostró la presencia de tubulina detirosinada y tirosinada en la membrana de las tres etapas ontogénicas de *T. frezzii*. La tubulina de membrana, de naturaleza hidrofílica, forma un complejo con algún componente de la membrana, adquiriendo un comportamiento hidrofóbico cuyo ligando aún se desconoce. En el citosol, solo se detectó la presencia de tubulina detirosinada, independientemente de la etapa de desarrollo.

La caracterización del perfil proteico de este patógeno proporciona herramientas para diseñar estrategias de control basadas en la biología del hongo, como el bloqueo de enzimas

que modifican las tubulinas o la unión de la tubulina a la membrana, interrumpiendo así el desarrollo normal del hongo y la infección. Este estudio es el primero en identificar las tubulinas presentes en *T. frezzii*, su ubicación y la expresión de los ARNm que las codifican, lo que revela factores proteicos clave y proporciona información sobre los mecanismos moleculares asociados con la virulencia de los hongos patógenos en sus plantas hospedadoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. 2005. *Plant Pathology 5th ed.* Elsevier Academic Press, London, UK. 922p.
- Alonso A. D. C., Nuñez-Fernandez M., Beltramo D. M., Casale C. H. & Barra H. S. 1998. Na-K-atpase was found to be the membrane component responsible for the hydrophobic behavior of the brain membrane tubulin. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 253 (3):824-7. doi: 10.1006/bbrc.1998.9859.
- Andrieux A., Aubry L. & Boscheron C. 2019. CAP-Gly proteins contribute to microtubule-dependent trafficking via interactions with the C-terminal aromatic residue of α -tubulin. *Small GTPases*, 10 (2), 138–145. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1277002>.
- Araújo D. S., de Sousa Lima P., Baeza L. C., Parente A. F. A., Melo Bailão A., Borges C. L. & de Almeida Soares C. M. 2017. Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865 (11), 1304–1314. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.016>.
- Banuett F. 2010. A method to visualize the actin and microtubule cytoskeleton by indirect immunofluorescence. *Methods in Molecular Biology*, 638, 225–233. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_17.
- Beauvais A., Fontaine T., Aïmanianda V. & Latgé J. P. 2014. Aspergillus cell wall and biofilm. *Mycopathologia*, 178 (5–6), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9766-0>.
- Beltramo D. M., Nuñez M., Alonso A. D. C. & Ban H. S. 1994. The relationship of hydrophobic tubulin with membranes in neural tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 141. Kluwer Academic Publishers.
- Böhmer M., Colby T., Böhmer C., Bräutigam A., Schmidt J. & Bölker M. 2007. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7 (5), 675–685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600900>.
- Bölker M., Urban M. & Kahmann R. 1992. The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, 68 (3), 441–450.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1), 248–254.
- Breitling F. & Little M. 1986. Carboxy-terminal Regions on the Surface of Tubulin and Microtubules. *Journal of Molecular Biology*, 189, 367–370.
- Champer J., Ito J. I., Clemons K. V., Stevens D. A. & Kalkum M. 2016. Proteomic analysis of pathogenic fungi reveals highly expressed conserved cell wall proteins. *Journal of Fungi*, 2 (1). <https://doi.org/10.3390/jof2010006>.

- Corrochano A.R. 2013. Digestibilidad de proteínas de los hongos comestibles, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, España.
- Elías-Villalobos A., Barrales R. R. & Ibeas J. I. 2019. Chromatin modification factors in plant pathogenic fungi: Insights from *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 129, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.006>.
- Feofilova E. P. 2010. The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. *Microbiology*, 79 (6), 711–720. <https://doi.org/10.1134/S0026261710060019>.
- Fuchs U., Manns I. & Steinberg G. 2005. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*, 16 (6), 2746–2758. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-03-0176>.
- Gow N. A. R., Latge J. P. & Munro C. A. 2017. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>.
- Gupta M. K., Narwal S., Umopathy V., Mall R. and Kumar A. 2009. Characterization of potential antigen(s) of *Tilletia indica* teliospore walls to develop a specific immunoassay for Karnal bunt detection. *Food and Agricultural Immunology*, 20 (2), 79–94. <https://doi.org/10.1080/09540100902810791>.
- Hammond J. W., Cai D. & Verhey K. J. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 20 (1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.010>.
- Horio T. 2007. Role of microtubules in tip growth of fungi. *Journal of Plant Research*, 120 (1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0043-2>.
- Huber S., Lottspeich F. & Kämper J. 2002. A gene that encodes a product with similarity to dioxygenases is highly expressed in teliospores of *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267 (6), 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0717-y>.
- Janke C. 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *Journal of Cell Biology*, 206 (4), 461–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406055>.
- Janke C. & Magiera M. 2020. Mechanisms and functions of the tubulin code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 307–326.
- Kesarwani S., Lama P., Chandra A., Reddy P. P. Jijumon A. S., Bodakuntla S., Rao B. M., Jank C., Das R. & Sirajuddin M. 2020. Genetically encoded live-cell sensor for tyrosinated microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 219 (10). <https://doi.org/10.1083/jcb.201912107>.
- Liu L. & Free S. J. 2016. Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. *Molecular Plant Pathology*, 17 (6), 985–995. <https://doi.org/10.1111/mpp.12352>.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- Longo L. V. G., da Cunha J. P. C., Sobreira T. J. P. & Puccia R. 2014. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. *EuPA Open Proteomics*, 3, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.03.003>.
- Magdeldin S., Enany S., Yoshida Y., Xu B., Zhang Y., Zureena Z., Lokamani I., Yaoita E. & Yamamoto T. 2014. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical proteomics*, 11 (16). <http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/11/1/16>.
- Manikandan R., Harish S., Karthikeyan G. & Raguchander T. 2018. Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>.
- Martínez-Soto D., Robledo-Briones A. M., Estrada-Luna A. A. & Ruiz-Herrera J. 2013. Transcriptomic analysis of *Ustilago maydis* infecting *Arabidopsis* reveals important aspects of the fungus pathogenic mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 8 (8), e25059. <https://doi.org/10.4161/psb.25059>.
- Mazheika I. S., Semenova M. A., Voronko O. V., Psurtseva N. V., Kolomiets O. L. & Kamzolkina O. V. 2021. Evaluation of the carbonylation of filamentous fungi proteins by dry immune dot blotting. *Fungal Biology*, 125 (11), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.06.006>.
- Millanes A. M., Vicente C. & Legaz M. E. 2008. Sugarcane glycoproteins bind to surface, specific ligands and modify cytoskeleton arrangement of *Ustilago scitaminea* teliospores. *Journal of Plant Interactions*, 3 (2), 95–110. <https://doi.org/10.1080/17429140701861727>.
- Mosquera G., Giraldo M. C., Khang C. H., Coughlan S. & Valent B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *The Plant Cell*, 21 (4), 1273–1290. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055228>.
- Oakley B. 2011. γ -Tubulin and the fungal microtubule cytoskeleton. *Canadian Journal of Botany*, 73, 352-358. [10.1139/b95-267](https://doi.org/10.1139/b95-267). www.nrcresearchpress.com.
- Pang C. N. I., Hayen A. & Wilkins M. R. 2007. Surface accessibility of protein post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*, 6 (5), 1833–1845. <https://doi.org/10.1021/pr060674u>.
- Pollard T. D. & Borisy G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments to decipher. *Cell*, 112.
- Rabilloud T., Chevallet M., Luche S. & Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 73 (11) 2064–2077. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016>.
- Rocher F., Alouane T., Philippe G., Martin M. L., Label P., Langin T. & Bonhomme, L. 2022. *Fusarium graminearum* infection strategy in wheat involves a highly conserved genetic

- program that controls the expression of a core effectome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031914>.
- Ruiz-Herrera J. & Campos-Góngora E. 2012. An Introduction to Fungal Dimorphism. *Dimorphic fungi: their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis* Ruiz-Herrera (Ed.), (1ed.) Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/978160805364311201010003>.
- Sander C. & Schneider R. 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 9 (1), 56–68. <https://doi.org/10.1002/prot.340090107>.
- Shiel A.I. 2014. The microtubule cytoskeleton of the corn smut fungus *Ustilago maydis*. University of Exeter. UK.
- Song Y.D., Hsu C.C., Lew S.Q. & Lin C.H. 2021. *Candida tropicalis* RON1 is required for hyphal formation, biofilm development, and virulence but is dispensable for N-acetylglucosamine catabolism. *Med Mycol*. 59 (4), 379–391.
- Tamanoi F., Kato-Stankiewicz J., Jiang C., Machado I. & Thapar N. 2001. Farnesylated proteins and cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 84 (37), 64–70. <https://doi.org/10.1002/jcb.10067>.
- Tanco S., Tort O., Demol H., Aviles F. X., Gevaert K., Van Damme P. & Lorenzo, J. 2015. C-terminomics screen for natural substrates of cytosolic carboxypeptidase 1 reveals processing of acidic protein C termini. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14 (1), 177–190. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040360>.
- Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Westermann S. & Weber K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4 (12), pp. 938–947. <https://doi.org/10.1038/nrm1260>.
- Wloga D., Joachimiak E. & Fabczak H. 2017. Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *Int J Mol Sci.*, 18, 2207.
- Wolff J. 2009. Plasma membrane tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1788 (7), 1415–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2009.03.013>.
- Xiang X. & Plamann M. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 6 (6) 628–633. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.009>.
- Zekert N. & Fischer R. 2009. The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 673–684. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>.

CAPÍTULO VI

CONSIDERACIONES GENERALES

El maní es un cultivo de importancia económica significativa en muchos países y, en particular para nuestro país, representa una de las economías regionales de mayor envergadura. Existe una alta demanda a nivel mundial de maní y sus productos derivados, por lo que se estima que su producción continúe en alza por varios años más. Sin embargo, este cultivo se encuentra afectado por numerosas enfermedades, entre ellas, las producidas por patógenos fúngicos, como el hongo *Thecaphora frezzii*, agente causal del Carbón del maní. Lamentablemente en nuestro país, esta enfermedad ha incrementado su prevalencia e intensidad en forma continua durante los últimos años, por lo que resulta necesario profundizar los estudios que permitan describir al patógeno y plantear estrategias de control.

Como se ha descripto anteriormente, este hongo desarrolla durante su ciclo de vida diversas estructuras, que cumplirán una función apropiada en cada etapa. Entre ellas, hemos logrado obtener hifas y basidiosporas provenientes de la germinación de teliosporas en diferentes medios de cultivo. Incluso logramos establecer que determinadas condiciones incrementan y estimulan la germinación de esporas; sin embargo, no se ha logrado definir con exactitud cuales son las condiciones necesarias para que todas las esporas germinen, si realmente tienen la capacidad de hacerlo.

Con el fin de conocer si todas las esporas se encuentran viables al momento de los ensayos de germinación, se logró establecer una relación entre la autofluorescencia de las teliosporas y su viabilidad. Para ello, se analizaron diferentes condiciones que inducían su autofluorescencia y se correlacionó con la integridad del ADN de esas esporas tratadas vs. las de control sin tratar. Así se observó que, con tratamientos más agresivos como agentes oxidantes o calor, la autofluorescencia de las esporas crecía, en paralelo a la degradación del ADN.

Existen al menos dos componentes que tienen capacidad de fluorescer, que se conocen que forman parte de las estructuras de las paredes de los hongos. Ellos son quitina y

melanina; los tratamientos oxidativos producen en estos constituyentes modificaciones estructurales que le permiten formar, entre otras cosas, nuevos compuestos con capacidad de autofluorescer.

A través de un análisis químico de las paredes de las esporas, encontramos a melanina como uno de los componentes mayoritarios. Se demostró que el tipo de melanina encontrada es eumelanina, un polímero derivado del aminoácido tirosina, a través de la vía de L-Dopa. Existen estudios previos realizados en otras especies fúngicas, donde se demuestra que la melanina se acumula en la parte externa de las paredes fúngicas, en muchas de las cuales se ha observado que forman ornamentaciones características. Esto coincide con lo observado en *T. frezzii*, donde las micrografías de SEM demuestran que la melanina se acumula en forma de espículas sobre la superficie de las paredes externas. Por debajo de esta pared, se hallaron las endosporas, cuya pared está constituida principalmente por quitina. Ya dentro de las esporas, se realizó descripción del interior de las mismas, donde no se encontraron indicios de acumulación de pigmentos, pero si se pudo establecer la presencia de lípidos dentro de vacuolas de diferente tamaño ocupando todo el citoplasma. Si bien la localización de un núcleo formal no pudo ser determinada, se encontraron proteínas, ribosomas y restos de sistemas membranosos, como mitocondrias y retículo endoplásmico.

Dado que uno de los principales objetivos planteados para este trabajo era analizar cómo la expresión génica se modificaba para acompañar las alteraciones que ocurren durante el ciclo de vida del hongo, se planteó estudiar mediante la técnica de RNASeq cuáles fueron las principales diferencias en la expresión en cada uno de los estadios. Si bien estos resultados son cuantiosos y difíciles de acotar, se logró agruparlos en dos grupos diferentes: por un lado, aquellos genes que modificaron su expresión para proteínas que cumplen alguna función específica en los cambios estructurales del hongo; en este sentido, se lograron establecer transcritos para proteínas relacionados al metabolismo fúngico, vías de transporte y comunicación celular, procesamiento del ADN, procesos de detoxificación celular, energía, interacción para la nutrición, estrés celular, procesos de diferenciación y biogénesis, transcripción y virulencia. En relación a este grupo de modificaciones estructurales y funcionales, también se estudió la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en la vía de la quitina (síntesis y degradación) y de la síntesis de melanina. Entre las primeras, se identificaron ocho enzimas con actividad quitin-sintasa y cuatro quitinasas; además se logró evaluar la actividad *in vitro* y su expresión diferencial en

cada estructura. Respecto a la síntesis de melanina, la bibliografía destaca la importancia de las lacasas, las policétido-sintasas y las tirosinasas, involucradas en diferentes pasos de las vías de melanogénesis. En *T. frezzii* se identificaron las dos primeras clases de enzimas, no así la última, aunque el tipo de melanina identificada finalmente corresponde a la melanina que proviene de la vía de la tirosina.

Dentro del segundo grupo de estudio, se incluyeron aquellos transcritos de proteínas involucradas en los procesos de patogenicidad y virulencia. En este sentido, se analizó la presencia de enzimas con función de PCWDE, entre ellas las CAZymas, y se identificaron enzimas con función de celulasas, galactomananasas, xilanasas, xiloglucanasas, pectinasas y cutinasas; muchas de ellas presentaron expresiones diferenciales entre los diferentes estadios ontogénicos de *T. frezzii*.

Otros factores de virulencia fueron identificados en este hongo, los cuales se buscaron en función de lo descrito para otros hongos. Entre ellos, se reconocieron dos factores importantes, hallados también en organismos análogos como *U. maydis*, *A. flocculosa*, *T. thlaspeos*, *S. reilianum*, *K. brasiliensis*, *U. hordei* y *M. antarcticus*. Se realizó una comparación de los factores Snf1 (relativo a la activación de la vía de las quinasas) y de Pep1 (factor importante para la penetración al tejido vegetal) con las mismas proteínas en organismos emparentados; se obtuvieron porcentajes de homología superiores al 60% en todos los casos, con elevados niveles de identidad entre las proteínas comparadas.

Desde el punto de vista bioquímico, se realizaron numerosos análisis para determinar la composición de las diferentes estructuras fúngicas y cómo estas se van modificando durante el ciclo de vida del hongo, acompañado de modificaciones a nivel molecular.

Por un lado, se realizó una caracterización lipídica, realizando una extracción fraccionada, para identificar los diferentes tipos de lípidos. Así, se identificaron diferencias en el largo de las cadenas carbonadas y niveles de saturación de los ácidos grasos, lo cual estaría relacionado con la organización y fluidez de la membrana y las adaptaciones en cada estadio. Respecto a los fosfolípidos de membrana, se encontró a fosfatidilcolina como componente mayoritario en todos los estadios; sin embargo, resultó llamativo el hallazgo de cardiolipinas en las tres estructuras, lo cual no se había descrito previamente en esta familia.

Otro resultado destacado en el análisis de los lípidos neutros, es que no se halló ergosterol como constituyente principal, sino que se encontraron derivados de ergosterol que producen un corrimiento en los tiempos de retención, al analizarlos por métodos cromatográficos. Si bien ya había sido descrito previamente la presencia de derivados de ergosterol en otros hongos, se decidió indagar en la capacidad de anfotericina B para reconocer a esta molécula y producir su acción fungicida. Encontramos que este antifúngico reconoció a estas moléculas derivadas de ergosterol, lo que permitió generar los poros en la membrana y producir así la muerte de las hifas.

Al analizar el nivel de genes que codifican para enzimas involucradas en las diferentes vías lipídicas, se identificaron alrededor de once transcritos relacionados a la biosíntesis de ergosterol y fosfolípidos. En concordancia con los datos del perfil de ácidos grasos, fue hallada la enzima Delta 12 Desaturasa de Ácidos grasos, en relación a la vía metabólica del ácido linoleico, uno de los ácidos grasos mayoritarios en *T. frezzii*. Además, se observó que ya se encuentran disponibles determinados productos químicos con acción sobre estas enzimas, lo cual también podría ser ponderado como una alternativa de control.

Otra perspectiva abordada se relaciona al perfil de proteínas y sus modificaciones entre los diferentes estadios del hongo. En primer lugar, debe destacarse que este es el primer trabajo que describe qué tipos de proteínas se encuentran en este hongo, además de que es muy escaso el material de estudio que describa la composición proteica de los hongos en general. Por ello, se estableció un protocolo de extracción diferencial adecuado para analizar por separado las proteínas provenientes del citosol, de aquellas que están asociadas o interactúan con el sistema de membranas. De esta manera pudieron encontrarse bandas proteicas marcadamente diferenciadas entre las estructuras, cuando los extractos fueron analizados en corridas electroforéticas.

Relacionado a este aspecto, se seleccionaron las bandas con mayor diferenciación entre las estructuras y se identificaron por técnicas de espectrometría. Principalmente, se detectaron en teliosporas, tres bandas de alto peso molecular (de 70, 90 y 110 KDa) y dos bandas de menor peso, una citosólica y una asociada a membrana, ambas de aprox. 20 KDa. Además, se observó sobreexpresada en esta estructura una banda liviana, que también fue identificada (14 KDa). Curiosamente, en todos los casos, las bandas analizadas mostraron un alto porcentaje de homología con una misma proteína, compatible con la proteína Ssp1

de *U. maydis*, de alrededor de 110 KDa, relacionada a la movilización de lípidos en las reservas de las esporas, al momento de la germinación. Este hallazgo induce a pensar que esta proteína sufriría en determinados procesos, un clivaje para pasar a cumplir una función diferente; incluso se observó que estos fragmentos más livianos de la proteína migran a la membrana, probablemente uniéndose a algún componente que la asocia a ella. Se realizó un análisis inmunohistoquímico, mediante la producción de anticuerpos, para evaluar si estos reconocen a la proteína en todos los fragmentos. El ensayo de Western Blot demuestra que los Acs, que fueron generados a partir de dos bandas por separado, solo reconocen las bandas con los que fueron generados, respectivamente. Es decir, no hay un reconocimiento cruzado, ya sea porque los anticuerpos reconocen epítopos diferentes de las proteínas porque se generan contra un epítipo único, pero común en cada banda.

Otro aspecto considerado en este estudio, fue el análisis de los componentes del citoesqueleto y las modificaciones postraduccionales, principalmente de los diferentes tipos de tubulinas. Por la técnica de Dot-Blot y empleando Acs comerciales, se determinó la presencia de tubulina de la forma detirosinada (Glu-Tub) en todos los extractos de las diferentes estructuras fúngicas. Sin embargo, la tubulina tirosinada, solo se encontró en la fracción de membrana. Para corroborar si esta tubulina posee un carácter hidrofóbico propio de las proteínas integrales de membrana, o si, por el contrario, esta proteína podría estar asociada a otro componente de la membrana, se realizó una extracción de las membranas empleando carbonato de sodio. Luego de este tratamiento, que disocia los enlaces proteicos, pudo encontrarse que la tubulina tirosinada pasa al citosol, lo que corrobora que no es una proteína de carácter hidrofóbico, sino que estaba asociada a la membrana a través de otra proteína.

A diferencia de lo esperado, las tubulinas totales y las tubulinas acetiladas no fueron reconocidas por los Acs comerciales. Probablemente puede deberse a que los Acs fallan en reconocerlas porque el epítipo no coincide exactamente. En el epítipo reconocido por el anticuerpo para DM1A, varía marcadamente entre lo descrito en bibliografía y lo hallado en la secuencia de *T. frezzii*. En el caso de la tubulina acetilada, el motivo de la falta de reconocimiento podría deberse a la ausencia de una lisina en la posición 40, sitio clave de acetilación. Otro motivo podría ser la falta de enzimas acetilasas que intervengan en este proceso. Los estudios inmucitoquímicos concuerdan con los resultados de Dot-Blot, donde tampoco se reconocen las tubulinas totales ni acetiladas.

Al analizar los transcritos de los genes relacionados a los diferentes isotipos de tubulinas, se compararon con aquellos correspondientes a los organismos análogos *A. flocculosa*, *U. maydis* y *T. thlaspeos*. Se logró discernir en *T. frezzii* la presencia de transcritos para α -tubulina, β -tubulina y γ -tubulina, con porcentajes de homología e identidad con las proteínas de estos hongos, superiores al 90%. Para cuantificar la expresión de proteínas involucradas en los procesos de modificaciones postraduccionales, se evaluaron los niveles de expresión de las enzimas TTL, CCP1 y HDAC6 mediante PCR en tiempo real. En las tres enzimas, su expresión varió significativamente entre los estadios del hongo; sin embargo, en todos los casos, los valores más altos se observaron en las basidiosporas.

Consideraciones finales

Dado que la enfermedad del Carbón del maní ha incrementado su severidad y prevalencia en los últimos años, resulta primordial seguir generando conocimiento sobre este patosistema complejo lo que permitiría indagar en variantes para su tratamiento. Entre los principales aportes novedosos realizados por este trabajo de tesis, podemos mencionar:

- Establecimiento de condiciones de cultivo adecuadas para obtención de hifas y basidiosporas provenientes de la germinación de teliosporas de *T. frezzii*.
- Desarrollo de protocolos de conservación a largo plazo.
- Descripción del fenómeno de autofluorescencia y correlación con la viabilidad de las esporas.
- Caracterización de los compuestos responsables de la fluorescencia.
- Caracterización de los pigmentos presentes en las teliosporas.
- Descripción y caracterización de las estructuras externas (por SEM) e internas (por TEM) de teliosporas, con hallazgos de acumulación de pigmentos en la superficie y de vacuolas lipídicas en el interior.
- Identificación de variaciones en la expresión génica en los diferentes estadios del hongo.
- Reconocimiento y cuantificación de transcritos relacionados a modificaciones estructurales y a factores de patogenicidad y virulencia.
- Análisis de la diferente composición y contenidos lipídicos en las estructuras de *T. frezzii*, con relación a los niveles de fosfolípidos y ácidos grasos.
- Identificación de al menos dos nuevos derivados del ergosterol como constituyentes principales de los lípidos neutros y la confirmación de la conservación de la actividad antifúngica de anfotericina B sobre estos lípidos.
- Evaluación de la expresión génica para proteínas que intervienen en las vías lipídicas y reconocimiento de posibles inhibidores de dichas enzimas.
- Análisis de perfiles proteicos y su modificación durante el ciclo de vida del hongo.
- Identificación de los principales componentes de los microtúbulos, análisis de las modificaciones postraduccionales y cuantificación de las enzimas involucradas en estas modificaciones postraduccionales en los diferentes estadios de *T. frezzii*

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

1. María S. Díaz, Ana C. Figueroa, Valeria R. Alasino, Mauricio Turco, Andrea Fernández, Bibiana Marino, Néstor W. Soria, Dante M. Beltramo. 2022. Changes of lipids composition in different ontogenetic stages of *Thecaphora frezii*: expression of key enzymes for lipid biosynthetic pathways. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 0, 1–9.
2. Néstor W. Soria, Esteban H. Badariotti, Valeria R. Alasino, Ana C. Figueroa, María S. Díaz, Pablo Yang, Dante M. Beltramo. 2022. Elucidating potential effectors, pathogenicity and virulence factors expressed by the phytopathogenic fungus *Thecaphora frezii* through analysis of its transcriptome. *European Journal of plant pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02562-2>.
3. Ana C. Figueroa, María S. Díaz, Roxana V. Alasino, Pablo Yang, Néstor W. Soria, Dante M. Beltramo. 2022. Expression and localization of tubulin isotypes and its mRNAs during *Thecaphora frezii* developments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, 97, 1–9. DOI: 10.1093/femsec/fiac121.
4. Néstor W. Soria, Ana C. Figueroa, María S. Díaz, Valeria R. Alasino, Pablo Yang, Dante M. Beltramo. 2022. Identification and expression of some plant cell wall-degrading enzymes present in three ontogenetics stages of *Thecaphora frezii*, a peanut (*Arachis hypogaea* L.) pathogenic fungus. *American Journal of Plant Sciences*, 2022, 13, 1-22. <https://www.scirp.org/journal/ajps>.
5. Néstor W. Soria, Pablo Yang, María S. Díaz, Ana C. Figueroa, Valeria R. Alasino, Dante M. Beltramo. 2021. Identification and expression of the fungal central effector Pep1 in *Thecaphora frezii*. *Revista Methodo: Investigación Aplicada a las Ciencias Biológicas*. Universidad Católica de Córdoba; 6(4):155-161. [https://doi.org/10.22529/me.2021.6\(4\)02](https://doi.org/10.22529/me.2021.6(4)02).
6. Néstor W. Soria, María S. Díaz, Ana C. Figueroa, Valeria R. Alasino, Pablo Yang, Dante M. Beltramo. 2021. Identification of Chitin synthase and Chitinase genes in three ontogenetic stages from *Thecaphora frezii*, the causal agent of peanut

smut disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 116, 101727. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101727>.

7. María S. Díaz, Néstor W. Soria, Ana C. Figueroa, Pablo Yang, Esteban H. Badariotti, Valeria R. Alasino, Pablo Vélez, Dante M. Beltramo. 2023. Transcriptional study of genes involved in the passage from teliospore to hyphae stage in the fungus *Thecaphora frezii*, the causal agent of peanut smut. *Revista Argentina de Microbiología*. 10.1016/j.ram.2023.10.002.

FINANCIAMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

- Desarrollo de Estrategias para el Manejo Integrado del Carbón del Maní (*Thecaphora frezii*) para la obtención de materia prima de máxima calidad como alimento. Financiamiento COFECYT Resolución MINCYT N°: RESOL-2017-1000-APN-MCT. Convenio N°: CONVE-2017-30637952-APNDDYME#MCT. Director del proyecto: Dr. Dante Beltramo.
- Caracterización de parámetros asociados al estado metabólico de esporas de *T. frezii*. Financiamiento CEPROCOR. PBIO18-2. Director del proyecto: Dr. Dante Beltramo.
- Caracterización biológica y génica de *T. frezii*, evaluación *in vitro* de potenciales alternativas de control. PBIO20-2 CEPROCOR. Directores: Dr. Dante Beltramo y Dra. Roxana Alasino.
- Búsqueda de sustancias químicas y de microorganismos con potencial capacidad para ejercer control contra el hongo *Thecaphora frezii* y caracterización molecular de diversas vías metabólicas del mismo. Financiamiento FUNDACION MANI ARGENTINO. Director: Dr. Dante Beltramo.

ANEXO I

Publicación: Néstor W. Soria, Esteban H. Badariotti, Valeria R. Alasino, Ana C. Figueroa, María S. Díaz, Pablo Yang, Dante M. Beltramo. 2022. Elucidating potential effectors, pathogenicity and virulence factors expressed by the phytopathogenic fungus *Thecaphora frezii* through analysis of its transcriptome. European Journal of plant pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02562-2>.