

CULTIVO "IN VITRO" DE MICOBIONTES DE *PARMOTREMA ECILIATUM* Y *FLAVOPARMELIA EXORNATA* (PARMELIACEAE, ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS) CON PRODUCCION DE TRIGLICERIDOS

Por MARIA D. BERTONI*, MONICA T. ADLER* y MARTA S. MAIER**

Summary: *In vitro* culture of mycobionts of *Parmotrema eciliatum* and *Flavoparmelia exornata* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) with production of triglycerides. The mycobionts of *Parmotrema eciliatum* (Nyl.) Hale and *Flavoparmelia exornata* (Zahlbr.) Hale have been cultured axenically on solid medium (malt extract- yeast extract- sucrose-agar) starting from ascospores. Growth was extremely slow in both species, whose mycelia reached only 6-10 mm diam. after 10 months. The colonies were very compact, with fungal tissue constituting mostly a paraplectenchymatous lamina with revolute margins and poor development of aerial hyphae. Chemical analysis of the mycobionts by thin layer chromatography after 4, 7, and 10 months of growth did not detect accumulation of the major secondary metabolites characteristic of the natural thalli, namely atranorin and stictic acid in *Parmotrema eciliatum*, and usnic and malonprotocetraric acids in *Flavoparmelia exornata*, compounds of the acetate-polymalonate pathway. Nuclear magnetic resonance spectra taken after 10 months revealed mainly the accumulation of triglycerides (lipids of primary metabolism) by the mycobionts.

Key words Lichen mycobionts, culture, Parmeliaceae, *Parmotrema*, *Flavoparmelia*, triglycerides.

INTRODUCCION

Ahmadjian (1993) y Huneck & Yoshimura (1996), revisaron y sintetizaron la información bibliográfica referente a cultivos de micobiontes líquenicos y las sustancias mayoritarias acumuladas por los mismos. Algunos micobiontes produjeron las mismas sustancias que el líquen natural, resultados que demuestran que los genes que codifican para la síntesis de las sustancias líquénicas características del líquen, se encuentran en el genoma del micobionte; otros produjeron compuestos secundarios diferentes a los de la entidad simbiótica natural, mientras que otros micobiontes produjeron solamente una parte de los metabolitos mayoritarios del líquen o acumularon solamente metabolitos primarios.

La inconsistencia de estos resultados y la escasez de información existente no ha permitido comprender hasta el presente el papel del fotobionte en

la producción de los metabolitos secundarios. Algunos ejemplos parecen indicar que la presencia del fotobionte no es necesaria para la producción de los metabolitos secundarios, ya que éstos pueden sintetizarse si se modifican las condiciones de cultivo, por ejemplo a través de la desecación del medio (Culberson & Armaleo, 1992) o por medio de un exceso de fuente carbonada (Hamada & Miyagawa, 1995).

En las revisiones de Ahmadjian (1993) y Huneck & Yoshimura (1996) no se menciona ningún estudio experimental "in vitro" con Parmeliáceas foliosas. Anteriormente, Ahmadjian (1961) había aislado el micobionte de *Xanthoparmelia conspersa* (Ach.) Hale, cultivándolo sobre medio sólido, pero sin realizar estudios anatómicos ni químicos. Bloomer et al. (1970) cultivaron en medio líquido el micobionte de *Cetraria islandica* (L.) Ach., pero no pudieron demostrar la producción de ácido protoliqueterínico que es acumulado en estado liquenizado. Crittenden et al. (1995) aislaron los micobiontes de varias Parmeliáceas foliosas pero no estudiaron su anatomía ni la producción de metabolitos.

En el presente trabajo se informa el aislamiento de los micobiontes de *Parmotrema eciliatum* (Nyl.) Hale y *Flavoparmelia exornata* (Zahlbr.) Hale, obten-

*Departamento de Ciencias Biológicas. ** Departamento de Química Orgánica.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Piso 4, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

nidas a partir de ascosporas. Se describe la morfología y anatomía de las colonias y se caracterizan los metabolitos mayoritarios acumulados por ellas.

MATERIAL Y METODOS

Los talos de *P. eciliatum* y *F. exornata* fueron coleccionados en una isla del Delta del Paraná (Provincia de Buenos Aires, Argentina) sobre el Arroyo Caragatá, y secados al aire a temperatura ambiente. Para la obtención de ascosporas y colonias se siguieron los procedimientos descritos por Hamada (1989). El medio de cultivo inicial fue MY: extracto de malta (10 g), extracto de levadura (4 g), sacarosa (4 g), agar (20 g), agua destilada (1 litro). Después de 4 meses de cultivo en tubos de ensayo, las pequeñas colonias de micobiontes se repicaron a cajas con medio MY10, igual al medio MY pero con 100 g/l de sacarosa (Hamada, 1989). Después de crecer en este medio durante 3 meses se realizó un repique final a MY10, donde las colonias crecieron durante otros 3 meses. Las incubaciones se realizaron en oscuridad, a una temperatura de 18-22 °C. A los 10 meses las colonias fueron cosechadas y secadas a 50 °C hasta peso constante para los análisis químicos.

Para las observaciones anatómicas, una colonia de cada especie, de 7 meses de edad, fue fijada durante 24 horas en glutaraldehído 3% (en buffer fosfato 0,13 M; pH 7,4), deshidratándola luego en una serie de alcoholes (50° hasta 100°) y acetona. La inclusión se realizó en resina Spurr. Se obtuvieron cortes de 2 µm de espesor con un ultramicrotomo Sorvall (Porter-Blum) MT2-B con cuchilla de vidrio, los cuales se tiñeron con azul de toluidina para la observación con microscopio óptico (D' Ambrogio de Argüeso, 1986).

Los talos líquénicos de *P. eciliatum* (100 mg) y *F. exornata* (100 mg) fueron secados a 50 °C hasta peso constante y extraídos con acetona (15 h) a temperatura ambiente, obteniéndose 17,1 mg y 19,1 mg de extracto, respectivamente. Cada extracto fue analizado por cromatografía en capa delgada (Culbertson & Ammann, 1979) por comparación con muestras conocidas y mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H). Los micelios de *P. eciliatum* (100 mg) y *F. exornata* (100 mg) fueron extraídos en acetona en las mismas condiciones que los talos líquénicos, obteniéndose 6,8 mg y 7,1 mg de extracto, respectivamente. Cada extracto fue purificado por cromatografía en capa delgada (sílica gél 60, F-254, Merck) utilizando tolueno: ácido acético (17:3) como solvente de desarrollo. La detección de los compuestos se realizó con luz ultravioleta (254 nm, 360 nm) y por pulverización con vainillina 2 % en

ácido sulfúrico concentrado y posterior calentamiento a 110 °C. La mezcla de triacilglicéridos eluida con cloruro de metileno : metanol (1:1) fue analizada por RMN ¹H y los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron preparados utilizando BF₃ 14 % en metanol (Metcalf & Schmitz, 1961).

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama y una columna ULTRA 2 (5 % fenil metilsiloxano entrecruzado, 25 m, d.i. 0,2 mm) con temperaturas entre 150 y 280 °C a una velocidad de 15 °C/min. Las identidades de los ácidos grasos fueron asignadas por cromatografía gas/líquido - espectrometría de masa utilizando un espectrómetro de masa TRIO-2 VG acoplado a un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los análisis por cromatografía en capa delgada y espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica, de los extractos de talos de *P. eciliatum* y *F. exornata*, revelaron la presencia de atranorina y los ácidos stictico (mayor), constictico (menor) y norstictico (menor) en *P. eciliatum*, mientras que en *F. exornata* los compuestos mayoritarios identificados fueron los ácidos úsnico y malonprotocetrárico.

Los ensayos de germinación de las ascosporas en agar-agua 2 % mostraron que la tasa de germinación es de 40 % en *P. eciliatum* y de 4 % en *F. exornata*, a los 15 días de disparadas sobre la superficie del agar. El desarrollo de las colonias fue extremadamente lento en ambas especies. La observación de las mismas con el ojo desnudo fue posible recién a los 4 meses de crecimiento en medio MY. Los micelios de ambas especies eran muy compactos, color gris (los más pequeños) o castaño oscuro (los más desarrollados) y de 1-2 mm diám. para *P. eciliatum* (Fig. 1A), y color crema a gris-castaño y 0,5-1,5 mm diám. para *F. exornata*. Los de mayor tamaño mostraban gotas de exudado castaño. Al séptimo mes de cultivo (luego de 3 meses en medio MY10) las colonias de ambas especies tenían un diámetro de 2-4 mm para *F. exornata* y de 4-6 mm para *P. eciliatum*. Las colonias más desarrolladas (de 7-10 meses) eran morfológicamente similares en ambas especies: redondas, muy compactas, color castaño oscuro, frecuentemente con gotas castañas exudadas en la superficie, y con escaso desarrollo de hifas aéreas (cortas y en mechones de varias hifas pegadas); los rangos de tamaños eran de 4-8 mm diám. en *F. exornata* y de 6-10 mm en *P. eciliatum*. Las presentes observaciones coinciden en gran parte con la descripción de Ahmadjian (1961) del micobionte de *Xanthoparmelia conspersa* (Ach.) Hale.

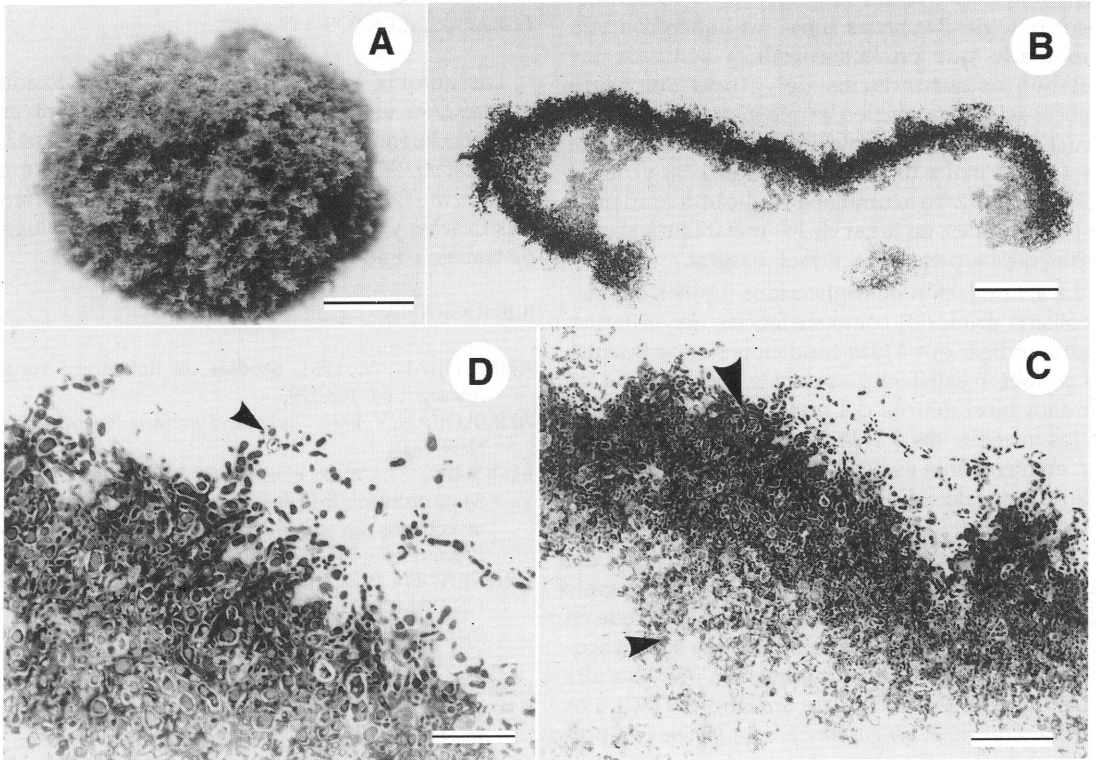


Fig. 1.- Cultivo de micobiontes de Parmeliáceas. A. Colonia de *Parmotrema eciliatum* después de 4 meses sobre medio MY; escala, 0,5 mm. B. Sección de una colonia de *Flavoparmelia exornata* de 7 meses de edad (4 meses sobre MY y 3 meses sobre MY10); escala 0,5 mm. C. Detalle de B, la lámina paraplectenquimática está diferenciada en dos zonas, una externa (flecha grande) que toma más la tinción y una interna más tenue y menos coloreada (flecha pequeña); escala 100 μ m. D. Detalle de C, la flecha señala un mechón de hifas aéreas; escala 50 μ m.

Tanto en *P. eciliatum* como en *F. exornata* las secciones de las colonias de 7 meses de edad, mostraron que eran casi huecas, aproximadamente con forma de boina (Fig. 1B). Las mismas estaban constituidas por una lámina de tejido paraplectenquimático de células cortas, orientadas al azar y muy conglutinadas. En ella se podían diferenciar dos zonas, una externa más compacta y de células con paredes gruesas y una interna más tenue, formada por células de paredes más delgadas (Fig. 1C y D). La mayor parte de la masa de la colonia correspondía al tejido paraplectenquimático, mientras que el desarrollo de hifas aéreas era muy escaso (Fig. 1 C y D). El paraplecténquima es muy frecuente en los talos naturales, especialmente en representantes de las familias Parmeliaceae, Hypogymniaceae y Anziaceae (Hale, 1976).

Los análisis químicos por cromatografía en capa delgada de los micobiontes de 4, 7 y 10 meses de edad, no detectaron la acumulación de los metabolitos secundarios característicos de las res-

pectivas especies; así como ninguno de los metabolitos secundarios de la vía metabólica del acetato-polimalonato ni de otra vía secundaria. El análisis de los espectros de RMN ^1H de los extractos de micobiontes de 10 meses de edad, tampoco detectó la presencia de los productos secundarios característicos del líquen, revelando en cambio en ambas especies, la acumulación de triglicéridos (0,5 % en peso en *P. eciliatum* y 2 % en peso en *F. exornata*), no detectados en los talos naturales. El análisis por cromatografía gas-líquido de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos de los triglicéridos de *P. eciliatum* y *F. exornata* reveló la presencia de los ácidos palmítico, esteárico y oleico como componentes mayoritarios, comprendiendo los mismos el 85% de la mezcla en *P. eciliatum* y un 55% en *F. exornata*. Se identificó, además, la presencia de los ácidos palmítico insaturado (Δ^7), linoleico, docosanoico y tetracosanoico.

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Renner & Gerstner (1982) con el

micobionte de *Baeomyces rufus*, un líquen con talo combinado que en la naturaleza acumula los metabolitos secundarios del grupo del ácido stictico: ácidos constictico, criptostictico, norstictico y stictico. Este último micobionte, cultivado sobre extracto de malta (0,2 %), glucosa (0,2 %) y ribitol (0,2 %), agar (2 %) acumulaba triglicéridos, además de carotenoides, en lugar de los metabolitos secundarios característicos del líquen natural.

La acumulación de triglicéridos (lípidos del metabolismo primario) como sustancias mayoritarias, podría indicar que 1) las condiciones experimentales no fueron satisfactorias para la inducción de los caminos biosintéticos del metabolismo secundario en los micobiontes ó 2) la asociación del fotobionte con el micobionte es necesaria para la expresión en este último, de los procesos del metabolismo secundario.

En el presente trabajo la alta relación C/N del medio de cultivo fue aparentemente responsable de la acumulación de triglicéridos, como sucede en hongos oleaginosos no simbióticos, que suelen acumular triacilgliceroles en medios con una tasa alta de C/N en el medio (Weete & Gandhi, 1992). Los micobiontes de *P. eciliatum* y *F. exornata* se comportaron como hongos oleaginosos en lugar de sintetizar metabolitos secundarios, al contrario de lo que suele suceder con las bacterias, donde el metabolismo secundario frecuentemente es estimulado por elevadas concentraciones de carbono en el medio (Fahsel, 1994).

Los resultados obtenidos con los micobiontes de *P. eciliatum* y *F. exornata* no coincidieron como se esperaba, con los de Hamada & Miyagawa (1995) donde el micobionte de *Ramalina siliquosa* pudo sintetizar ácido salacínico, característico del líquen natural, en el medio MY10, con muy alta concentración de sacarosa. Los resultados del presente trabajo también difieren de los obtenidos por Hamada (1996) quien logró la producción de los metabolitos secundarios característicos de *Buellia stellulata* (atranorina y ácido norstictico) por el micobionte en medio MY10.

Es posible que las condiciones óptimas de cultivo para la producción de determinados metabolitos secundarios característicos, varíen según el sistema líquénico en estudio, como sugieren los resultados de Honegger & Kutasi (1990) al estudiar los micobiontes de *Xanthoria*. Mientras en *X. elegans* la síntesis de antraquinonas es estimulada en medios muy nutritivos, en *X. parietina* la acumulación de dichas sustancias disminuye notoriamente en las mismas condiciones. Esto podría explicar la inconsistencia de los resultados obtenidos por distintos autores al trabajar con distintos sistemas líquénicos.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al CONICET (subsido PIP 4492/96, el apoyo del PRHIDEB) y a la Universidad de Buenos Aires (subsidos UBACYT EX047/95 y EX059/98), que financiaron parcialmente este trabajo. M. T. Adler agradece a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por brindarle lugar de trabajo como Investigadora del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- AHMADJIAN, V. 1961. Studies on lichenized fungi. *Bryologist* 64: 168-179.
- AHMADJIAN, V. 1993. *The Lichen Symbiosis*. 264 pp. Wiley. New York.
- BLOOMER, J. L., W. R. EDER & W. F. HOFFMAN. 1970. Some problems in lichen metabolism: Studies with the mycobionts *Cetraria islandica* and *Cladonia papillaria*. *Bryologist* 73: 586-591.
- CRITTENDEN, P. D., J. C. DAVID, D. L. HAWSWORTH & F. S. CAMPBELL. 1995. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. *New Phytol.* 130: 267-297.
- CULBERSON, C. F. & K. AMMANN. 1979. Standard methode für Dünnschicht-chromatographie von Flechtensubstanzen. *Herzogia* 5: 1-24.
- CULBERSON, C. F. & D. ARMALEO. 1992. Induction of a complete secondary-product pathway in a cultured lichen fungus. *Exptl. Mycology* 16: 52-63.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO. 1992. *Manual de Técnicas en Histología vegetal*. 83 pp. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- FAHSELT, D. 1994. Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* 16: 117-165.
- HALE, M.E. 1976. Lichen structure viewed with the scanning electron microscope. Capítulo 1, pp. 1-15. En *Lichenology: Progress and problems*. Eds. D. H. Brown, D. L. Hawksworth & R. H. Bailey. Academic Press Inc., Nueva York.
- HAMADA, N. 1989. The effect of various culture conditions on depside production by an isolated lichen mycobiont. *Bryologist* 92:310-313.
- 1996. Induction of the production of lichen substances by nonmetabolites. *Bryologist* 99(1): 68-70.
- & H. MIYAGAWA. 1995. Secondary metabolites from isolated lichen mycobionts cultured under different osmotic conditions. *Lichenologist* 27 (3): 201-205.
- HONEGGER, R. & V. KUTASI. 1990. Anthraquinone production in three aposymbiotically cultured telochistalean lichen mycobionts: The role of the carbon source. pp. 175-178. En *Endocytobiology*. IV. Eds. P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Grenier, L. Margulis, and D.C. Smith. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- HUNECK, S. & I. YOSHIMURA. 1996. *Identification of Lichen Substances*. 493 pp. Springer, Berlín.
- METCALFE, L. D. & A. A. SCHMITZ. 1961. The rapid preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography analysis. *J. Anal. Chem.* 33: 363-364.
- RENNER, B. & E. GERSTNER. 1982. Stoffwechse-

Unterschiede zwischen dem lichenisierten und dem isolierten Mycosymbionten von *Baeomyces rufus* (Huds.) Rebert. *Z. Pflanzenphysiol.* 107: 47-57.
WEETE, J. D. & S. GANDHI. 1992. Potential for fungal

lipids in biotechnology. Cap. 15, *Handbook of Applied Mycology*. Vol 4. (Fungal Biotechnology) pp. 377-400. Eds. Arora, D. K., R. P. Elander & K. G. Mukerji. Marcel Dekker. Nueva York.