



PRODUCCION DE LACASAS Y GENERACION DE NUEVAS ISOFORMAS EN CULTIVO SÓLIDO DE *Pleurotus ostreatus* Y *Agaricus bisporus* INFECTADOS CON *Trichoderma* spp.

Conrado Vidal¹, Celia Flores¹, Ma. del Refugio Trejo², Enrique Galindo y Leobardo Serrano-Carreón¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. ²Centro Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO. Fax: (52) (777) 3 13 88 11, e-mail: celia@ibt.unam.mx

Palabras clave: lacasas, interacción biológica, basidiomicetos.

Introducción. Las lacasas, p-difenil:dioxígeno oxidoreductasas (EC 1.10.3.2), son capaces de realizar la oxidación de compuestos xenobióticos a partir de oxígeno. Los principales productores de lacasas son hongos ligninolíticos de los géneros *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y *Trametes*. Se ha reportado un incremento en la producción de lacasas en cultivos de hongos ligninolíticos infectados por cepas de hongos del género *Trichoderma* (1). Sin embargo, no se ha reportado si durante la interacción *Trichoderma*-hongos ligninolíticos se generan nuevas isoformas con respecto a los cultivos sin infectar.

Este trabajo consistió en evaluar tanto la producción como la generación de nuevas isoformas de lacasas, en cultivos en medio sólido de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus*, infectados con varias cepas de *Trichoderma* spp.

Metodología. Se evaluaron 9 cepas de *Trichoderma* spp. en interacción con una cepa de *P. ostreatus* y una de *A. bisporus*. Es importante mencionar que las cepas de *Trichoderma* no fueron productoras de lacasas. Los co-cultivos se realizaron en cajas de Petri con medio de extracto de malta (20 g/L) y agar (15 g/L). Previamente se evaluó la velocidad de extensión radial de cada cepa para que durante los co-cultivos, tanto el micelio de *Trichoderma* como el del hongo ligninolítico, se encontraran a la mitad de la superficie. En ese momento, se realizó un corte de 11.5 cm² en el centro de la interacción. Para obtener el extracto enzimático, la banda de interacción se lavó con 4 mL de buffer de fosfatos, pH 5 y se centrifugó. Al sobrenadante se le determinó: actividad lacasa (ABTS, DMP y siringaldazina), proteína (Bradford) y el perfil de isoformas (en geles nativos de poliacrilamida al 10 % teñidos con siringaldazina). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y las diferencias entre las medias se evaluaron mediante una prueba de t_{est} ($p = 0.05$).

Resultados y discusión. Se comparó la producción de lacasas en los cultivos control (sin infectar) con la de los co-cultivos con *Trichoderma* spp. La concentración de lacasas producidas por *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* fué función de la interacción con *Trichoderma* sp. Si bien en la mayoría de los co-cultivos se observó un incremento significativo en la actividad específica de lacasa (medida con los diferentes sustratos), éste incremento fué mayor para la interacción *Pleurotus-Trichoderma* (tabla 1). Sin embargo, las actividades específicas alcanzadas en los co-cultivos *Agaricus-Trichoderma* fueron un orden de magnitud mayores (datos no mostrados). Por otra parte, es importante mencionar que los

Tabla 1. Producción de lacasas por *P. ostreatus* y *A. bisporus* durante los cultivos infectados con *Trichoderma* spp.

Cepa	Incremento en la actividad específica (Act. específica interacción/Act. específica control)					
	<i>Pleurotus ostreatus</i>			<i>Agaricus bisporus</i>		
	ABTS	DMP	SIRINGAL- DAZINA	ABTS	DMP	SIRINGAL- DAZINA
1	3.5	5.4	3.0	1.5	1.4	1.7
2	3.5	5.1	5.2	1.2	1.3	1.5
3	3.0	4.8	2.2	1.4	1.2	1.5
4	3.3	4.0	2.2	1.1	1.5	1.7
5	2.4	4.0	2.5	1.3	1.9	2.1
6	2.1	4.5	1.3	1.1	1.7	1.7
7	2.0	2.7	2.5	1.0	1.5	1.4
8	1.8	1.8	1.1	1.0	1.2	1.1
9	0.8	3.8	0	1.2	2.3	2.1

Los resultados en negritas indican diferencias significativas ($p = 0.05$) con los cultivos sin infectar. DMP: 2, 6 Dimetoxifenol; ABTS: 2,2'-Azinobis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfonato); Siringaldazina: N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibencilideno)hidrazina

extractos obtenidos durante las interacciones *Pleurotus-Trichoderma* demuestran la producción de, al menos, una isoforma diferente a la del cultivo control, excepto para la interacción con la cepa T3 (figura 1).

En los geles nativos obtenidos de los extractos de las interacciones *Agaricus-Trichoderma* no fue posible diferenciar isoformas.



Figura 1.- Generación de isoformas en la interacción de *P. ostreatus-Trichoderma* spp.

Conclusiones. Se demostró que la interacción basidiomiceto-*Trichoderma* sp. no solo incrementa la concentración de lacasa(s) sino que también genera nuevas isoformas, diferentes a los del cultivo control. En *P. ostreatus* la generación de isoformas fue dependiente de la cepa de interacción.

Agradecimientos. Apoyo financiero de la DGAPA (IN 210107). 7 cepas de *Trichoderma*: fueron proporcionadas por el CIAD, unidad Culiacán. *A. bisporus* y una cepa de *Trichoderma* fueron donadas por el Dr. Hermilo Leal (Facultad de Química/UNAM). *P. ostreatus* fue proporcionado por el laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Bibliografía

1. Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50: 245-253.