



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

Conrado Vidal<sup>1</sup>, Celia Flores<sup>1</sup>, Ma. del Refugio Trejo<sup>2</sup>, Enrique Galindo y Leobardo Serrano-Carreón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. <sup>2</sup>Centro 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](mailto: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 cm<sup>2</sup> 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

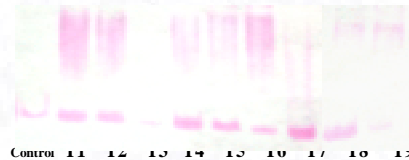
**Tabla 1.** Producción de lacasas por *P. ostreatus* y *A. bisporus* durante los cultivos infectados con *Trichoderma* spp.

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.