



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Determinación de la actividad enzimática  
peroxidasa y polifenoloxidasa extracelular de cinco  
cepas de hongos ectomicorrizógenos en cultivo  
*in-vitro*

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Ana Karla Terríquez Villanueva

Dra. Alba Mónica Montiel González  
M. en C. Gema Lilia Galindo Flores

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre de 2014





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Determinación de la actividad enzimática  
peroxidasa y polifenoloxidasa extracelular de cinco  
cepas de hongos ectomicorrizógenos en cultivo  
*in-vitro*

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Ana Karla Terríquez Villanueva**

### Comité Tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González

M. en C. Gema Lilia Galindo Flores

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Octavio Loera Corral

El presente estudio se realizó con el apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca con número de registro 485973.

La maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala se encuentra registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrado-CONACyT (PNPC 00-30-03).



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Ana Karla Terríquez Villanueva realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Determinación de la actividad enzimática peroxidasa y polifenoloxidasas extracelular de cinco cepas de hongos ectomicorrizógenos en cultivo *in-vitro*”.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 20 DE 2014

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

M. en C. GEMA LILIA GALINDO FLORES

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) por la oportunidad que me brindó para la realización de mis estudios de maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada. A la UAT por la beca para la culminación de este trabajo, dentro del programa estratégico: Cuerpos académicos, Calidad y Productividad para su internacionalización 2014 del cuerpo académico Ciencias Biológicas clave CACyPI-2013-UATLX-CA-26. Al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas donde se llevó a cabo este trabajo. A mis codirectoras de tesis, Dra. Alba Mónica Montiel González y M. en C. Gema Lilia Galindo Flores, por su apoyo y enseñanzas. A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Arturo Estrada Torres, Dr. Octavio Loera Corral y Dra. Estela Cuevas Romero, por aportar su experiencia para el enriquecimiento de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

A mi familia, mi madre, Esperanza Villanueva, mi padre, Carlos Terríquez y mis hermanos, José Raúl y Monserrat Terríquez, por su cariño y apoyo en todos los proyectos en los que me he embarcado.

A Gabriel Corona Cuatecontzi por su amor y por estar siempre a mi lado dándome fuerza en los momentos difíciles.

A mis directoras de tesis, la Dra. Alba Mónica Montiel González y la M. en C. Gema Lilia Galindo Flores, por su amistad y por la confianza brindada.

A mis sinodales, al Dr. Octavio Loera Corral, Dra. Estela Cuevas Romero y especialmente al Dr. Arturo Estrada Torres, por su participación activa y propositiva en este trabajo.

Al Dr. José Luis Martínez y Pérez por las asesorías ofrecidas.

A mis compañeros de laboratorio, Anahi, Carmen, Sol, Ruth, Montse, Diana, Arcadio y Luis Alberto, por su compañerismo y siempre estar dispuestos a ayudar y aprender de los demás.

A todos, ¡muchas gracias!

## RESUMEN

La ectomicorriza es la simbiosis típicamente formada entre las raíces de plantas perennes leñosas y algunos hongos especializados del suelo. Esta asociación constituye la comunidad microbiana dominante en los suelos de los ecosistemas templados y boreales, jugando un papel clave en la nutrición de los árboles forestales, por lo que el establecimiento de la asociación se convierte en un proceso central para una gran variedad de plantas en lo que se refiere a la captación de nutrientes del suelo. Es generalmente aceptado que el carácter ectomicorrizógeno evolucionó de manera convergente en varios linajes de hongos saprófitos por lo cual se considera que la capacidad de degradar compuestos orgánicos, entre ellos la lignina, mediante la producción de enzimas extracelulares como la lacasa, manganeso peroxidasa y tirosinasa, ha sido conservada.

Sin embargo, las implicaciones ecológicas que se originan de la manifestación de dichas actividades enzimáticas aún son discutidas. Considerando que se asume que los hongos ectomicorrizógenos (HEM) tienen la capacidad de desarrollarse como saprófitos facultativos, estas actividades enzimáticas les proveen la capacidad de degradar materia muerta y se ha sugerido que se encuentran relacionadas con la degradación de las paredes celulares de la raíz, durante el establecimiento de la simbiosis. En modelos fúngicos saprófitos se ha observado que la producción de dichas enzimas puede ser inducible, por lo que se sugiere que la lignina, componente estructural de las raíces, pudiera servir como agente inductor para la producción enzimática en los HEM también. Así pues, se utilizó harina de raíz adicionada al medio de cultivo para evaluar si sus componentes estructurales tienen algún efecto sobre la producción de enzimas peroxidasa y/o polifenoloxidasas en cinco cepas de HEM. La harina de raíz se obtuvo a partir de las raíces de plántulas de *Pinus hartwegii* de dos años de edad, las cuales fueron limpiadas, deshidratadas y trituradas en un mortero.

Con la finalidad de complementar la información de las cepas de estudio, se realizó su identificación molecular mediante el uso de las secuencias de la región ITS del ADNr que fueron comparadas con las depositadas en el Gene Bank. Posteriormente, en un arreglo completamente aleatorizado con dos factores se realizó una evaluación cualitativa para

determinar la presencia de actividad enzimática, considerando dos grupos experimentales un tratamiento sin raíz y uno adicionado con harina de raíz de *Pinus hartwegii* (n= 6) además de un control. Se registraron los cambios en la coloración del medio de cultivo, comparando éstos con el control experimental y con un control positivo, además del diámetro de la colonia y del halo formado (en mm). Con esta información, se calculó el índice de potencia enzimática así como la velocidad media de crecimiento de las colonias. Finalmente, la evaluación cuantitativa se llevó a cabo en cultivos en medio líquido con agitación, arreglada en un diseño trifactorial en boques al azar y considerando los dos mismos grupos experimentales, un tratamiento sin raíz y uno adicionado con harina de raíz de *Pinus hartwegii* (n= 9). Se evaluaron 4 tiempos, día cero, 10, 20 y 30 de cultivo y cada unidad experimental fue filtrada al vacío. El micelio fue recuperado para la cuantificación de biomasa, en el extracto crudo enzimático obtenido se valoró la producción de enzimas ligninolíticas, de proteínas solubles y el consumo de sustrato.

Se logró la ubicación taxonómica de las cepas estudiadas dentro de complejos de especies. Sin embargo, para precisar su identidad será necesario realizar las correspondientes filogenias. En cuanto a la evaluación cualitativa, no fue posible determinar las actividades enzimáticas evaluadas en la cepa *Suillus* KL2296. Además, ninguna de las cepas estudiadas manifestó la producción de actividad tirosinasa extracelular. Los resultados indican que bajo las condiciones evaluadas, la adición de harina de raíz al medio de cultivo no tiene un efecto significativo sobre la producción de enzimas MnP y lacasa.

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>4.</b>	<b>PREGUNTAS</b> .....	<b>10</b>
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>11</b>
<b>6.</b>	<b>PREDICCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>7.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>11</b>
7.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>8.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
8.1.	MATERIAL BIOLÓGICO .....	12
8.1.1.	Cepas de HEM .....	12
8.1.2.	Raíces de <i>Pinus hartwegii</i> .....	12
8.2.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS.....	13
8.2.1.	Extracción de ADN .....	13
8.2.2.	Amplificación de la región ITS del ADNr mediante PCR .....	13
8.2.3.	Purificación de ADN .....	14
8.2.4.	Análisis de las secuencias.....	14
8.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR EN HEM .....	15
8.3.1.	Medio de cultivo.....	15
8.3.2.	Selección de inóculo.....	15
8.3.3.	Evaluación cualitativa de la actividad enzimática extracelular .....	15
8.3.3.1.	Diseño experimental .....	15
8.3.3.2.	Condiciones de cultivo.....	15
8.3.3.3.	Análisis estadístico.....	17
8.3.4.	Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática extracelular .....	17

8.3.4.1.	Diseño experimental .....	17
8.3.4.2.	Condiciones de cultivo.....	17
8.3.4.3.	Recuperación de micelio y extracto crudo enzimático (ECE).....	17
8.3.4.4.	Análisis estadístico.....	18
8.3.4.5.	Actividad enzimática.....	18
8.3.4.5.1.	Actividad manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13).....	19
8.3.4.5.2.	Actividad lacasa (EC 1.10.3.2) .....	19
8.3.4.6.	Proteína total .....	19
8.3.4.7.	Azúcar residual .....	20
8.3.4.8.	Biomasa .....	21
8.3.4.9.	pH .....	21
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
9.1.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS.....	22
9.1.1.	<i>Boletus</i> GF2160.....	22
9.1.2.	<i>Suillus</i> GF2161 .....	22
9.1.3.	<i>Amanita</i> GF2331 .....	22
9.1.4.	<i>Tylopilus</i> GF2341 .....	22
9.2.	EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR .....	23
9.2.1.	Halos de actividad enzimática .....	23
9.2.2.	Velocidad media de crecimiento .....	24
9.3.	EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR .....	27
9.3.1.	Actividad lacasa .....	27
9.3.2.	Actividad manganeso peroxidasa .....	28
9.3.3.	Azúcar residual.....	29
9.3.4.	Biomasa.....	30
9.3.5.	pH.....	31
<b>10.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
10.1.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS.....	32
10.1.1.	<i>Boletus</i> GF2160.....	32

10.1.2.	<i>Suillus</i> GF2161 y KL2296.....	33
10.1.3.	<i>Amanita</i> GF2331 .....	34
10.1.4.	<i>Tylopilus</i> GF2341 .....	35
10.2.	EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR .....	35
10.3.	EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR .....	39
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>12.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>51</b>
<b>13.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>14.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El término micorriza describe la asociación simbiótica entre las hifas de algunos hongos especializados del suelo y las raíces de cerca del 90% de las plantas terrestres (Buscot y cols. 2000, Brundrett 2002). La asociación micorrízica no es estrictamente una simbiosis obligada, sin embargo, en la mayoría de los hábitats terrestres, posee un papel crucial en el desarrollo y estabilidad de las comunidades vegetales (Buscot y cols. 2000). Su establecimiento implica un complejo proceso que comprende múltiples eventos, lo cual requiere de cambios morfogénicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares tanto en el hongo como en la raíz (Singh 2007).

Existen distintos tipos de micorrizas, diferenciadas principalmente por su morfología y el grado de penetración del hongo simbiote en el hospedero (Nava-Gutiérrez y Hernández-Cuevas 2003). Entre éstos, uno de los más notables, desde el punto de vista ecológico y biogeográfico es la ectomicorriza (Pérez-Moreno y Read 2004), debido a que los hongos implicados en dicha asociación constituyen la comunidad microbiana dominante en los suelos de los ecosistemas templados y boreales (Tagu y cols. 2002, Courty y cols. 2010a, Pritsch y cols. 2011, Rineau y Courty 2011).

La ectomicorriza es una simbiosis típicamente formada entre las raíces conductoras terminales de plantas perennes leñosas (Taylor y Alexander 2005), sobre todo gimnospermas y dicotiledóneas, y algunos hongos especializados del suelo esencialmente de las divisiones Basidiomycota y Ascomycota (Buscot y cols. 2000, Tagu y cols. 2002). Esta asociación mejora la movilización y translocación de nitrógeno (en forma de amonio) y fósforo a la planta, jugando un papel clave en la nutrición de los árboles forestales (Cairney y Burke 1994, 1998, Corrêa y cols. 2006), por lo que el establecimiento de la asociación se convierte en un proceso central para una gran variedad de plantas en lo que se refiere a la captación de nutrimentos del suelo (Read 1997).

El establecimiento de la asociación simbiótica depende de forma sustancial del balance de dos características. Primero, la determinación genética de la capacidad para formar la asociación y segundo, las condiciones ambientales, las cuales pueden reforzar o reprimir el

establecimiento de la simbiosis (Tagu y cols. 2002). Dado que, la respuesta inicial de la planta ante la colonización micorrízica es de defensa, semejante a la que presentaría ante el ataque de un organismo patógeno (Rodríguez 2005), durante el establecimiento y desarrollo de la asociación se requiere del reconocimiento químico y molecular entre simbioses (Cairney y Burke 1994, Bending y Read 1997, Tagu y cols. 2002), además, la naturaleza inter-celular de la simbiosis ectomicorrízica dicta una estricta regulación, espacial y/o temporal, de la actividad enzimática que degrada la pared celular (Cairney y Burke 1994).

La pared es la primera estructura celular en contacto entre los dos asociados y se encuentra conectada con la membrana plasmática en donde los receptores se localizan anclados (Tagu y cols. 2002). Los exudados tanto de hongos como de plantas son quizá la señalización más fuerte y específica. Por parte de los hongos, estas señales aún no se encuentran caracterizadas, sin embargo, se sabe que las hifas de los hongos ectomicorrizógenos (HEM) sintetizan y excretan auxinas en el sustrato, lo cual estimula la formación y elongación de raíces secundarias. En cuanto a las plantas, sabemos que los exudados de la raíz estimulan la germinación de esporas y el desarrollo hifal de muchos HEM (Tagu y cols. 2002). Asimismo, otras señales son requeridas por los simbioses para lograr el encuentro entre la raíz y el hongo. Por ejemplo, la señal provocada por las raíces de las plantas al captar N de su área vecina, lo cual crea una zona carente de N, y al excretar azúcar, enriquece localmente de carbohidratos la rizósfera. El descenso en el contenido de N y aumento del C, provoca una señal trófica para las hongos del suelo de la presencia de un sistema radical, no obstante, este tipo de señalización no es específico y puede ser usada por simbioses, patógenos y saprófitos para reconocer una planta viva (Tagu y cols. 2002).

Por otra parte, el análisis filogenético de un gran número de taxa fúngicos, sugiere que la condición ectomicorrizógena evolucionó de manera convergente en varios linajes de hongos saprófitos (Bruns y cols. 1998). Aunque es extensamente asumido que no se conservó la capacidad para degradar materia muerta, cada vez existe más evidencia que sugiere que muchos taxa de HEM tienen la capacidad de degradar de forma parcial los componentes de la pared celular (Burke y Cairney 2002). Para esto, diferentes enzimas como la manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), la lacasa (EC 1.10.3.2) y la tirosinasa (EC 1.14.18.1) se encuentran

vinculadas con el proceso de biodegradación de la lignina (Mansur y cols. 2003, Papinutti y cols. 2003, Dávila y Vázquez-Duahalt 2006). También es preciso señalar que existe más de una ruta para su degradación y que la maquinaria enzimática difiere entre microorganismos (Périé y cols. 1996, Mansur y cols. 2003).

Además, se conoce que este tipo de enzimas en los hongos de pudrición blanca pueden ser constitutivas pero también inducibles en presencia de estructuras como la de la lignina (Salmones y Mata 2005, Xavier y cols. 2007, Saeki y cols. 2011, Tinoco y cols. 2011), de modo que si consideramos la naturaleza de la asociación simbiótica podemos asumir que los componentes estructurales de la raíz podrían participar como inductores de la expresión de estas enzimas en los HEM durante la colonización. Así pues, la caracterización enzimática de los HEM es necesaria para una mejor comprensión tanto del papel funcional de estos organismos en los ecosistemas como del proceso de micorrización.

## 2. ANTECEDENTES

Los hongos Basidiomycetes causantes de la pudrición blanca, han sido descritos como los principales organismos con la capacidad de degradar y mineralizar lignina (Jiménez y cols. 1999, Halaouli y cols. 2006). Éstos, poseen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidasas que catalizan las primeras reacciones que rompen las uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas, para después incorporar estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo que como producto final generan CO<sub>2</sub> (Papinutti y cols. 2003). No obstante, las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de compuestos fenólicos han sido reportadas en un amplio número de taxa de HEM.

Por un lado, se ha sugerido que las actividades enzimáticas peroxidasa y polifenoloxidasas brindan la posibilidad al simbiote fúngico de desarrollarse como saprófito cuando las condiciones ambientales y/o fisiológicas del hospedero no son las idóneas para el establecimiento de la asociación (Mosca y cols. 2007, Courty y cols. 2010a). Por otro lado, se propone que la capacidad de este grupo de organismos para degradar compuestos fenólicos, inferida por la presencia de estas actividades enzimáticas, está vinculada con el proceso de micorrización, contribuyendo a la penetración y establecimiento de las hifas en la raíz viva (Colpaert y Van Laere 1996). Además, estas actividades enzimáticas se encuentran involucradas en el proceso de movilización de nutrientes hacia la planta (Rineau y Garbaye 2009), por lo que están implicadas en aspectos fundamentales de la asociación micorrízica.

La lignina es un complejo heterogéneo que consiste fundamentalmente de unidades de fenil propano que son polimerizadas al azar en macromoléculas tridimensionales (Périé y cols. 1996), éste es el principal componente de las plantas vasculares y, después de la celulosa, el más abundante en la naturaleza (Hendel y cols. 2005). La pared de las células vegetales está compuesta principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa, variando en su proporción dependiendo de la especie de la planta (Fengel y Wegener 1983), sin embargo, se estima que la lignina conforma entre el 20-30% de las paredes celulares (Périé y cols. 1996).

La barrera física que representa la pared celular proporciona una mayor resistencia estructural, además de ayudar a evitar la desecación. En consecuencia, estas características anatómicas, pueden restringir la absorción de nutrimentos (Brundrett 2002) demandando el establecimiento de la sociedad mutualista. Así pues, para el establecimiento de dicha asociación, la degradación de la pared celular de la planta requiere de la acción de celulasas, hemicelulasas y ligninasas (Carney y Burke 1998).

Las polifenol oxidasas son enzimas con un centro dinuclear de cobre con la capacidad de insertar oxígeno en la posición *ortho*- aún en presencia de grupos hidroxilo en un anillo aromático, seguido por la oxidación de difenol a la correspondiente quinona (Mayer 2006).

La enzima lacasa (EC 1.10.3.2) es una oxido-reductasa con la capacidad de oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos (Moya y cols. 2011) con simultánea reducción de O<sub>2</sub> a agua, (Thurston 1994, Rosado y cols. 2012). Se sabe que en los hongos la lacasa es la enzima clave involucrada en la degradación de la lignina (Nitheranont y cols. 2011). Peláez y cols. (1995), estudiaron la actividad de enzimas implicadas en la degradación de lignina en 68 especies pertenecientes a diferentes grupos de basidiomicetos, concluyendo que la actividad lacasa se presentaba en el 50% de los hongos estudiados, además el 29% de las especies manifestaba actividad manganeso peroxidasa (MnP). Entre los hongos estudiados por los autores se encuentran tres especies reportadas como micorrizógenas, las cuales no presentaron ninguna de las actividades enzimáticas evaluadas. No obstante, en el experimento sólo fue probada una condición de cultivo, por lo que los niveles de actividad obtenidos no necesariamente reflejan las condiciones óptimas para la expresión de alguna de las actividades enzimáticas de cada cepa.

La producción de lacasa por parte de los basidiomicetos ha sido ampliamente estudiada debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas, detectando en muchos hongos de pudrición blanca más de una isoenzima de lacasa, constitutiva o inducible. Sin embargo, las lacasas constitutivas extracelulares de basidiomicetos se producen sólo en pequeñas cantidades (Tinoco y cols. 2011) por lo que la búsqueda de métodos que permitan estimular la producción de esta enzima, con el fin de reducir los costos de producción ha sido amplia.

En los hongos, el uso de inductores influye sobre el perfil de isoenzimas producidas pero también incrementa la actividad volumétrica (Tinoco y cols. 2011). El uso de fenoles y compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con la lignina o derivados de la lignina adicionados en los medios de cultivo con el fin de incrementar la producción de lacasa ha sido recientemente reportado por diversos autores (de Souza y cols. 2004, Hou y cols. 2004, Salmenes y Mata 2005, Xavier y cols. 2007). Tinoco y cols. (2011) realizaron pruebas de inducción de actividad lacasa en la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50, observando que la adición de lignina tiene una fuerte influencia positiva sobre la producción de lacasa, siendo ésta al menos tres veces mayor que en el control en las primeras 96 horas. Sin embargo, la inducción de lacasas varía entre organismos y parece ser específica hacia ciertos compuestos aromáticos (Piscitelli y cols. 2011).

La tirosinasa (EC 1.14.8.1) es una enzima oxidasa de función mixta que cataliza dos reacciones, la hidroxilación de mono a di-fenoles, llamada cresolasa o reacción monofenolasa, y la oxidación de difenoles a *o*-quinonas conocida como catecolasa o reacción difenolasa (Mueller y cols. 1996) ambas reacciones requieren de oxígeno molecular. La tirosinasa ha sido aislada de diferentes fuentes como bacterias, hongos, plantas y animales, esta enzima se encuentra involucrada en la ruta de la melanina (Gruhn y Miller 1991, Miranda y cols. 1992, Mueller y cols. 1996) y en particular es responsable por el primer paso en la biosíntesis de melanina a partir de *L*-tirosina induciendo la formación de *L*-dopaquinona y *L*-dopacromo (Halaouli y cols. 2006).

En los hongos, la enzima tirosinasa se encuentra involucrada en el oscurecimiento de los basidiomas y su pigmentación (Halaouli y cols. 2006). Además, el proceso de infección por parte de hongos parasíticos a plantas en la mayoría de los casos es dependiente de melanina, ya que ésta es necesaria en las paredes celulares de los apresorios para permitir el desarrollo del potencial osmótico necesario para romper las paredes celulares del hospedero durante la infección (Jacobson 2000, Mayer 2006). La expresión de la enzima tirosinasa y la síntesis de melanina vía tirosinasa en un gran número de hongos está relacionada con la diferenciación reproductiva, sobrevivencia, longevidad, patogénesis y mecanismos de virulencia en las cepas (Jacobson 2000, Halaouli y cols. 2006, Zarivi y cols. 2011).

La enzima MnP (EC 1.11.1.13) es una familia de isoenzimas extracelulares hemoproteicas, que requieren de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un co-sustrato y oxidan Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup>, este último a su vez oxida varios sustratos fenólicos (Périé y cols. 1996, Dávila y Vázquez-Duahalt 2006). Se ha confirmado que la expresión de MnP extracelular, los perfiles de isoenzimas producidas y la capacidad de las cepas de mineralizar lignina dependen de la presencia de Mn<sup>2+</sup> en los medios de cultivo (Périé y cols. 1996), elemento que se encuentra de forma natural en todos los tejidos de la madera (Jiménez y cols. 1999). Otro factor importante que incide sobre la manifestación de la actividad MnP es el contenido de carbono y nitrógeno disponible. En este sentido, se conoce que en condiciones limitadas de estos dos elementos –C y N–, *Phanerochaete chrysosporium* pasa a fase de metabolismo secundario donde produce enzimas como la MnP y la lignina peroxidasa (Jiménez y cols. 1999).

Con respecto a la capacidad de los HEM para producir enzimas con actividad peroxidasa, los resultados parecen ser muy variables, ya que en algunos estudios se ha reportado la actividad peroxidasa por lo menos en alguno de los aislados, mientras otros reportan que esta actividad no es perceptible.

Entre sus funciones, los HEM movilizan nutrientes de los compuestos orgánicos por medio de la secreción de enzimas oxidativas e hidrolíticas (Rineau y Garbaye 2009, Courty y cols. 2010b), por lo que la actividad de enzimas extracelulares puede ser considerada como una característica útil para estudiar la diversidad funcional y resiliencia de comunidades de hongos ectomicorrizógenos (Cullings y Courty 2009). La diversidad funcional se define como el valor, intervalo, distribución y abundancia relativa de los caracteres funcionales de los organismos que constituyen un ecosistema (Díaz y cols. 2011, Rineau y Courty 2011). En los HEM se advierte que algunas especies muestran una amplia plasticidad fenotípica en sus perfiles enzimáticos y frecuentemente no existen relaciones dentro de géneros, ni dentro de familias o de grupos filogenéticos, e incluso el perfil de actividad de HEM dentro de la misma especie puede variar de forma significativa de acuerdo con los cambios en las condiciones ecológicas (Hutchison 1990, Rineau y Courty 2011).

La síntesis de enzimas en HEM es sostenida por el estado nutricional del micelio: este estatus se considera variable espacial y temporalmente de acuerdo con la naturaleza del sustrato encontrado por el micelio y los metabolitos provenientes del hospedero (Cairney y Burke 1994). En general, las actividades enzimáticas reportadas en HEM han sido bajas, sin embargo, cada vez existe más evidencia de la significativa capacidad que muchos HEM poseen para degradar enzimáticamente varios componentes de la pared celular de las plantas, lo cual implica la capacidad para derivar carbón y minerales a partir de materiales naturales recalcitrantes (Cairney y Burke 1994, Gramss y cols. 1998, Mosca y cols. 2007, Pritsch y Garbaye 2011).

Se ha sugerido que la penetración intercelular ocurre durante la fase final de deposición de la pared primaria del hospedero y que los hongos intervienen en el deterioro de la pared celular vía degradación enzimática. Igualmente, en la región de la red de Hartig de una ectomicorriza (EM) madura, en la que las paredes del hongo y el hospedero son indiferenciables una de la otra, se forma una interface de apariencia homogénea la cual de manera general se ha considerado como un indicio de la pérdida de la integridad de la pared celular del hospedero (Cairney y Burke 1994).

En los ecosistemas forestales los HEM responden a diferentes factores medio ambientales, como el estrés hídrico, la senescencia de los árboles y los incendios, entre otros (Rineau y Courty 2011). Una de las estrategias empleadas por estos organismos es la modificación de la expresión de ciertas actividades enzimáticas para poder adaptarse a la nueva condición del medio. Rineau y Garbaye (2009) valoraron el efecto de la aplicación de cal (Ca-Mg), una práctica común en Europa para neutralizar la acidificación del suelo, sobre la actividad enzimática de HEM, en el que entre otras, evaluaron a la enzima lacasa. Observaron un dramático aumento de la actividad en las parcelas tratadas, principalmente en la especie *Lactarius subdulcis*. Los autores refieren que el incremento del potencial de actividad lacasa del HEM *L. subdulcis* podría ser interpretado como una mejora en la capacidad para degradar lignina, no obstante, se ha sugerido que algunas lacasas extracelulares se encuentran involucradas en el desarrollo del basidioma (ej. *Agaricus bisporus*, *Pleurotus sajorcaju*, *Schizophyllum commune*), en la formación de pigmentos (ej. *Aspergillus nidulans*, *Daldinia*

*concentrica*, *Lentinus edodes*) y en mecanismos de infección en patógenos (ej. *Botrytis cinerea*, *Cryptonectria parasitica*) (Thurston 1994, Burke y Cairney 2002).

En cuanto a la capacidad de algunos HEM para degradar materia orgánica, Taylor y Alexander (2005) explican que no existe ninguna evidencia de que los HEM puedan completar su ciclo de vida en ausencia de un hospedero y que en este contexto es importante remarcar la distinción entre aquellos HEM que presentan una considerable capacidad para degradar sustratos orgánicos y los verdaderos hongos saprófitos que son totalmente dependientes del catabolismo de la materia orgánica como fuente de carbono. Sin embargo, también es cierto que los hongos facultativos tendrán una considerable ventaja sobre aquellas especies que se restringen a un solo estatus trófico.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de compuestos fenólicos en HEM han sido escasamente investigadas. Asimismo, la información existente, pareciera ser inconsistente y en ocasiones contradictoria. Por lo anterior, este trabajo contribuye con la determinación de la actividad enzimática peroxidasa y polifenoloxidasa presente en cinco cepas de HEM, aportando argumentos al debate acerca de su posible significado funcional en los ecosistemas.

Las potenciales implicaciones ecológicas que se originan de la manifestación de dichas actividades enzimáticas aún son discutidas. Considerando que se asume que los HEM tienen la capacidad de desarrollarse como saprófitos facultativos, estas actividades enzimáticas les proveen la capacidad de degradar materia muerta. Además, se ha sugerido que tales actividades enzimáticas se encuentran relacionadas con la degradación de las paredes celulares de la raíz durante el establecimiento de la red de Hartig. Así pues, la adición de harina de raíz al medio de cultivo nos permitirá evaluar si algún componente estructural de la raíz contribuye a la manifestación o incremento de la actividad enzimática peroxidasa y/o polifenoloxidasa en cinco cepas de HEM.

### **4. PREGUNTAS**

- ¿Cuáles actividades enzimáticas peroxidasa y/o polifenoloxidasa se presentan en las cepas de HEM?
- ¿En qué magnitud se presentan las actividades enzimáticas detectadas en las cepas de HEM?
- ¿La harina de raíz tendrá la capacidad de incrementar las unidades de actividad enzimática peroxidasa y/o polifenoloxidasa presentes en estas cepas de HEM?

## **5. HIPÓTESIS**

La lignina presente en la harina de raíz de *Pinus hartwegii* actuará como inductor al menos de las actividades MnP y/o lacasa.

## **6. PREDICCIÓN**

La adición de harina de raíz en el medio de cultivo incrementará de manera significativa la actividad enzimática peroxidasa (MnP) y/o polifenoloxidasas (lacasa) en las cepas de HEM en cultivo *in-vitro*.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar las actividades enzimáticas extracelulares peroxidasa (MnP) y polifenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) en cinco cepas de hongos ectomicorrizógenos (HEM) en cultivo *in-vitro*, así como el efecto inductor de la harina de raíz sobre éstas.

### **7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar molecularmente las cepas de HEM en estudio.
- Evaluar cualitativamente la producción de peroxidasas (MnP) y polifenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) en cinco cepas de HEM en cultivo *in-vitro*.
- Evaluar cuantitativamente la producción de peroxidasas (MnP) y polifenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) en cinco cepas de HEM en cultivo *in-vitro*.
- Evaluar el efecto de la harina de raíz sobre las actividades enzimáticas peroxidasa (MnP) y polifenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) en cinco cepas de HEM en cultivo *in-vitro*.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 8.1.1. Cepas de HEM

Las colonias de HEM derivan de aislamientos realizados a partir de tejido fúngico del contexto del píleo o estípite de basidiomas recolectados durante la temporada de lluvias. Las cepas *Boletus* GF2160 y *Suillus* GF2161 fueron recolectadas y aisladas en 2006 provenientes de un bosque de *Pinus hartwegii* Lindl. en la Cuenca del Río Magdalena en el Distrito Federal. Por otra parte, la cepa *Amanita* GF2331 fue recolectada en el año 2012 en un bosque de *Pinus* ubicado en el Parque Nacional La Malinche en el municipio de Teacalco, Tlaxcala, mientras que la cepa *Tylopilus* GF2341 se recolectó en un bosque de *Quercus* localizado en San Francisco Temezontla en el estado de Tlaxcala. Finalmente, la cepa *Suillus* KL2296 fue recolectada en bosque mixto de pino-encino en el cerro Tepeticpac, municipio de Totolac en el estado de Tlaxcala en 1992.

Las cepas de HEM se encuentran depositadas en la colección de HEM del Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx).

#### 8.1.2. Raíces de *Pinus hartwegii*

Para la elaboración de la harina se emplearon las raíces de plántulas de *Pinus hartwegii* de dos años de edad cultivadas en condiciones de invernadero, las cuales se deshidrataron a temperatura ambiente durante 96 horas, seguido de 24 horas en estufa a 35°C para eliminar por completo la humedad. Posteriormente, fueron trituradas en un mortero, homogenizadas y asignadas a cada tratamiento. Una muestra de la harina obtenida fue enviada al Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para la determinación del contenido de fibra. Los resultados indican que la harina de raíz empleada contiene 0.64% de hemicelulosa, 26.56% de celulosa y 46.24% de lignina (anexo 1).

## 8.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS

### 8.2.1. Extracción de ADN

En condiciones estériles, se tomó una de las colonias desarrolladas en medio de cultivo sólido, la cual se limpió de los restos de agar con ayuda de un asa bacteriológica y pinzas. La colonia se colocó después dentro de una tela de malla fina y se lavó con solución fisiológica estéril suficiente para eliminar los residuos que se encontraban adheridos. Posteriormente, se eliminó el exceso de humedad usando papel filtro. En este punto se almacenó el material dentro de un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL a -20 °C durante 24 h.

Después, el micelio se fragmentó en un mortero con pistilo hasta obtener una pasta uniforme de la cual se tomaron aproximadamente 40 mg y se adicionaron a una columna de extracción. El protocolo y los reactivos empleados fueron los correspondientes al Kit de extracción de ADN de suelo *Power Soil DNA isolation Kit* (Mo BIO Laboratories, Inc.). El volumen final de extracción fue de 100 µL los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### 8.2.2. Amplificación de la región ITS del ADNr mediante PCR

Previa descongelación de los reactivos, con excepción de la Taq polimerasa, se prepararon en baño frío las mezclas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un volumen final de 50 µL (anexo 2). Para la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) se utilizaron los *primers* ITS 1F (*Forward*) e ITS 4 (*Reverse*) (anexo 3A) a una concentración de 20 µM. El ADNr se presenta en repeticiones en tándem y está formado por tres sub unidades altamente conservadas: 18S, 5.8S y 28S, separadas por dos espaciadores llamados ITS (anexo 3B) con elevadas tasas de sustitución (Rentarúa-Alcántara 2007). El ITS es una región altamente conservada intra específicamente pero muy variable entre diferentes especies por lo que se ha aprovechado como una herramienta taxonómica (Gomes y cols. 2002).

La cantidad de ADN total añadido a la mezcla de reacción (5-10µL) dependió de la concentración de la muestra, la cual fue determinada por la intensidad de la banda obtenida mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. El protocolo de amplificación (anexo 3C) fue programado en el termociclador con gradiente de temperatura (BIO-RAD T100)

empleando una temperatura de alineamiento de 45°C. Los amplicones obtenidos mediante la técnica de PCR fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta. Se realizaron al menos tres repeticiones por muestra para reservar material suficiente para la etapa de purificación. Los productos de PCR obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### 8.2.3. Purificación de ADN

La purificación de ADN se realizó a partir de los productos de PCR empleando el Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA), con el cual se obtuvo un volumen total de 50 µL de muestra purificada. La observación de los amplicones purificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% el cual fue teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta para ser fotografiado en un foto-documentador. Las muestras purificadas fueron enviadas al Laboratorio Divisional de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa (UAM-I) para ser secuenciadas utilizando un secuenciador ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems).

### 8.2.4. Análisis de las secuencias

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el programa *BioEdit*, con el cual se seleccionó el fragmento de las secuencias en donde se observaban picos altos y se descartó del análisis posterior la parte final de las secuencias en la que no existe una buena resolución del nucleótido correspondiente. Posteriormente, fueron comparadas con otras secuencias depositadas en la base de datos mundial Gene Bank mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 8.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR EN HEM

#### 8.3.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo seleccionado para ambas evaluaciones fue el Melin y Norkrans Modificado (MNM) al cual se le ajustó el contenido de Fe a  $\approx 10 \mu\text{M}$  (MNM>Fe), según lo sugerido por Cairney y Burke (1998), (anexo 4) y el pH a 5.7 empleando KOH 1M antes de la esterilización. El medio MNM es un medio básico que ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de actividad enzimática (Santiago-Martínez 2002, Hilszczanska y cols. 2008, Bending y Read 1996) y en el aislamiento y caracterización de cepas de HEM (Garza-Ocañas y cols. 2002, Santiago-Martínez 2002, García-Rodríguez y cols. 2006).

#### 8.3.2. Selección de inóculo

Se llevó a cabo un muestreo probabilístico, completamente aleatorizado, de manera que se dispusiera de al menos 15 colonias por cada cepa, seleccionando de manera aleatoria el número de colonia y la dirección en la que se tomó la muestra (1-4) según el cuadrante trazado en la parte inferior de la caja Petri.

#### 8.3.3. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática extracelular

##### 8.3.3.1. Diseño experimental

En un arreglo completamente aleatorizado con dos factores se evaluó, en tres experimentos independientes, la presencia de actividad enzimática así como el efecto inductor de la harina de raíz sobre ésta en cinco cepas de HEM. Los grupos experimentales consisten en un control, un tratamiento sin raíz y uno al cual se le adicionaron 300 mg de harina de raíz de *Pinus hartwegii* por cada litro de medio de cultivo preparado (n= 6) equivalentes a 139 mg de lignina por litro.

##### 8.3.3.2. Condiciones de cultivo

Cada caja Petri se inoculó con un fragmento de 7 mm de diámetro de micelio procedente del borde de una de las colonias seleccionadas al azar. Las colonias se desarrollaron en medio de cultivo sólido durante 30 días en incubadora a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  en condiciones de obscuridad. Cada

tercer día se registraron los cambios en la coloración del medio de cultivo, comparando éstos con el control experimental (negativo) y un control positivo, además del diámetro de la colonia y del halo formado (en mm) utilizando un vernier.

En cada experimento el medio de cultivo MNM>Fe fue adicionado con el sustrato necesario para que la actividad de las enzimas evaluada se manifestara con una reacción colorida. Así, para evidenciar la actividad enzimática tirosinasa se adicionó L-tirosina 3 mM la cual produce una reacción café oscuro a negro. Por otra parte, para evaluar la presencia de las actividades lacasa y MnP se realizaron dos evaluaciones, para la primera se añadió 2,6-Dimetoxifenol (DMP) 4 mM y para la segunda, además del DMP, se añadió MnSO<sub>4</sub> 0.9 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al día 30, en ambas pruebas una reacción positiva produce un halo de color amarillo a anaranjado.

Por lo que se refiere al control positivo, éste consistió en cajas Petri con medio de cultivo MNM>Fe y agar que contiene la misma proporción de sustrato que las experimentales, en las cuales se perforó al centro de la caja con horador y se adicionaron 50 µL de la enzima comercial diluida, empleando una caja Petri como control positivo en cada evaluación. En el caso de la actividad MnP, se emplearon 230 UI de enzima comercial de *Naematoloma frowardii* (Sigma-Aldrich) diluida en solución amortiguadora de tartrato de sodio (pH 5.0), mientras que para la actividad lacasa se utilizaron 680 UI de la enzima comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich) diluida en solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 5.0). Finalmente, para la actividad tirosinasa se usaron 124,100 UI de la enzima comercial extraída de hongos (Sigma-Aldrich) en solución amortiguadora de fosfato de sodio (pH 6.8). Por su parte, el control experimental o negativo reside en al menos un par de cajas Petri por experimento con medio de cultivo MNM>Fe y agar pero sin el sustrato, las cuales fueron inoculadas al mismo tiempo que los grupos experimentales. Estas colonias fueron utilizadas como control en la evaluación de velocidad media de crecimiento (VMC) para descartar el efecto de la adición de los sustratos de evaluación de actividad enzimática sobre la variable y para detectar los cambios en la coloración del medio de cultivo debidos a la excreción de algunos metabolitos y no a la oxidación del sustrato. Los medios de cultivo preparados fueron esterilizados en autoclave a 121 libras de presión durante 15 min.

#### 8.3.3.3. Análisis estadístico

Para estimar las diferencias en el crecimiento radial de las colonias de cada cepa de HEM debido al tratamiento se calculó la VMC expresada en mm/día. Para lo cual fue fijado el valor de la ordenada al origen (b) en el diámetro del fragmento inoculado (7 mm) y la VMC representa la pendiente (m) de la recta. Las medias de las VMC obtenidas se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para un diseño completamente aleatorizado. Por su parte, para evaluar la magnitud de los halos obtenidos por la actividad de las enzimas se calculó el índice de potencia enzimática (IP) definido como el cociente del diámetro del halo de degradación y el diámetro de crecimiento de la colonia.

#### 8.3.4. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática extracelular

##### 8.3.4.1. Diseño experimental

Los grupos experimentales consisten en un tratamiento sin raíz y uno al que se le adicionaron 333 mg de harina de raíz de *Pinus hartwegii* por litro de medio de cultivo (n= 9) equivalentes a 154 mg/L de lignina, arreglado en un diseño trifactorial en boques al azar.

##### 8.3.4.2. Condiciones de cultivo

En matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL, se añadieron 90 mL de medio de cultivo MNM>Fe líquido. Cada matraz fue inoculado en condiciones estériles con tres fragmentos de 7 mm de diámetro procedentes del borde de una de las colonias seleccionadas de manera aleatoria. Los matraces se mantuvieron en incubadora con agitación a 190 rpm y  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  en condiciones de obscuridad.

##### 8.3.4.3. Recuperación de micelio y extracto crudo enzimático (ECE)

En los días cero, 10, 20 y 30 de cultivo, se seleccionó de manera aleatoria un matraz por tratamiento y por cepa, el cual fue filtrado empleando papel filtro Wathman No.1 estéril y bomba de vacío, en un matraz Kitasato. El micelio fue recuperado del papel filtro y depositado en papel aluminio para su posterior cuantificación de biomasa, mientras que el ECE obtenido fue almacenado en tubos *falcon* de 15 mL de capacidad a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 8.3.4.4. Análisis estadístico

Los parámetros estimados durante la evaluación cuantitativa para biomasa, pH, actividad enzimática específica y azúcar residual, fueron analizados empleando un ANOVA de tres factores ( $\alpha= 0.05$ ) para un diseño en bloques y las diferencias entre grupos valoradas mediante comparación de rangos múltiples de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) empleando el paquete estadístico SPSS (Statistics 22, 2013).

#### 8.3.4.5. Actividad enzimática

La cuantificación de la actividad enzimática se realizó en los ECE obtenidos mediante filtración evaluando los cambios en la absorbancia de luz detectados en un espectrofotómetro SmartSpect™ Plus (BIO-RAD). Los blancos de calibración fueron realizados utilizando una “muestra blanco” la cual consiste en el medio de cultivo MNM>Fe con y sin harina de raíz, filtrada y almacenada bajo las mismas condiciones que las experimentales.

La actividad enzimática fue expresada en Unidades Internacionales (UI), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{M}$  de sustrato en producto por minuto, estimada utilizando la ecuación:

$$UI/L = \frac{\Delta Abs \times Vt}{t \times \varepsilon \times \lambda \times Vm} (1000000)$$

Donde:

$\Delta$  Absorbancia = Absorbancia final - Absorbancia inicial.

t = Tiempo de reacción en minutos.

$\varepsilon$  = Valor del coeficiente de extinción molar del sustrato.

$\lambda$  = Espesor de la cubeta.

Vt = Volumen total de reacción en mL.

Vm = Volumen de la muestra en mL.

La cual se basa en la Ley de Lambert-Beer y considera que la reacción es de orden 0. Los datos analizados representan la media de tres mediciones.

#### 8.3.4.5.1. Actividad manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13)

La mezcla de reacción contiene  $\text{MnSO}_4$  0.5 mM y 500  $\mu\text{L}$  de la muestra problema en solución amortiguadora de tartrato de sodio 0.1 M (pH 5.0), la reacción se inicia con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM. Los cambios en la absorbancia de luz debidas a la formación del producto,  $\text{Mn}^{3+}$  - tartrato, fueron registrados a 238 nm durante 10 min. ( $\epsilon_{238}=6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 25°C (Ruiz-Dueñas 1998, Camarero y cols. 1999, Caramelo y cols. 1999). Los valores obtenidos representan el promedio de tres réplicas.

#### 8.3.4.5.2. Actividad lacasa (EC 1.10.3.2)

Se estimó empleando como sustrato DMP 2 mM y 500  $\mu\text{L}$  de la muestra problema en solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0). La mezcla fue incubada a 39 °C durante 1 minuto y el producto resultante de la reacción fue monitoreado a 469 nm ( $\epsilon_{469}=27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Rodríguez-Sánchez 2006, Cañas-Portilla 2009). Los resultados obtenidos representan la media de tres repeticiones.

#### 8.3.4.6. Proteína total

La cuantificación de proteína en la muestra se realizó mediante el método de Bradford, el cual es muy sensible a la presencia de contaminantes, rápido y barato. El método se basa en la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico, el azul coomasie G-250, y las proteínas. No obstante, este colorante presenta mayor afinidad con proteínas con residuos de arginina y lisina lo cual puede hacer variar los resultados dependiendo de las diferentes proteínas que contenga la muestra. La determinación de proteína total se realizó con la finalidad de calcular la actividad específica de los ECE, definida como el cociente entre la actividad enzimática volumétrica sobre la proteína total. Es decir, se refiere a la cantidad de la enzima evaluada del total de proteínas excretadas al medio. Para ello, se realizó una curva patrón (n=3) con soluciones de concentración conocida de albúmina bovina sérica (BSA) (Fermentas).

La reacción se llevó a cabo con un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la muestra a la cual se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford (BIO-RAD). La mezcla de reacción se agitó

gentilmente en vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvieron los valores de absorbancia a 595 nm por triplicado para cada muestra. Finalmente, empleando la curva patrón elaborada anteriormente (anexo 5) se calculó la cantidad de proteína en la muestra utilizando la ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

$y$  = Absorbancia a 595 nm.

$b$  = Ordenada al origen.

$m$  = Pendiente de la recta.

#### 8.3.4.7. Azúcar residual

La cantidad de azúcar residual en las muestra se estimó mediante la cuantificación de azúcares reductores totales utilizando el método DNS, el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por la glucosa y/o fructosa al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. La concentración de azúcar en la muestra se valoró empleando una curva patrón de glucosa a concentración conocida.

El análisis se efectuó en tubos de vidrio de 10 mL a los cuales se agregaron 500  $\mu$ L de la muestra, previamente diluida a razón de 1:10 y 500  $\mu$ L del reactivo DNS. Los tubos fueron colocados en baño de agua a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Una vez fríos, se añadieron 5 mL de agua destilada estéril, se agitaron en vórtex y se tomó la lectura de la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro por triplicado para cada muestra.

Finalmente, empleando la curva patrón elaborada anteriormente (anexo 6) se estimó la cantidad de azúcares reductores en la muestra utilizando la ecuación:

$$x = \left( \frac{y - b}{m} \right) \text{factor de dilución}$$

Donde:

$y$  = Absorbancia a 540 nm.

$b$  = Ordenada al origen.

$m$  = Pendiente de la recta.

La preparación del reactivo DNS se describe en el anexo 7.

#### 8.3.4.8. Biomasa

La cantidad de biomasa producida se determinó por el método de peso seco. Para ello el micelio fue recuperado del papel filtro, colocado en charolas de aluminio y secado en horno a 45°C durante 48 h, posteriormente se registró el peso en gramos utilizando una balanza analítica.

#### 8.3.4.9. pH

Una parte del volumen obtenido por filtración al vacío fue destinado para registrar el pH del ECE, empleando para ello un potenciómetro electrónico (Oaton, Eutech Instruments). Los resultados obtenidos representan el promedio de tres mediciones.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS

#### 9.1.1. *Boletus* GF2160

La secuenciación de la región ITS dio como resultado un fragmento con buena resolución de 790 pb, el análisis en BLAST nos indica que esta cepa se encuentra relacionada con las especies del complejo *B. edulis* y en particular con *B. edulis* Bull., *B. aereus* Bull., *B. mamorensis* Redeuilh y *B. reticulatus* Schaeff. [= *B. aestivalis* (Paulet) Fr.], con las cuales comparte el 95% de similitud con la región amplificada.

#### 9.1.2. *Suillus* GF2161

La secuenciación de la región analizada resultó en un fragmento de 692 pb de longitud para la cepa *Suillus* GF2161. El análisis en BLAST señala una alta similitud con especímenes determinados como *S. pungens* Thiers & A.H. Sm. (99%), *S. brevipes* (Peck) Kuntze (97%) y *S. luteus* (L.) Roussel (96%) recolectados en Estados Unidos y Canadá.

#### 9.1.3. *Amanita* GF2331

En total 679 pb fueron secuenciadas a partir de la purificación de esta cepa. Los resultados en BLAST nos indican que el ejemplar pertenece al complejo de *Amanita muscaria* (L.) Lam. con quienes comparte entre un 85 a un 95% de similitud con los caracteres evaluados, presentando los mayores porcentajes de identidad (91-95%) con aquellos aislamientos provenientes del Parque Nacional Cofre de Perote en el estado de Veracruz.

#### 9.1.4. *Tylopilus* GF2341

El fragmento amplificado para esta cepa incluye 743 pb, las cuales señalan el 99% de similitud con las especies *Tylopilus rubrobrunneus* Mazzer & A.H. Sm. y *T. felleus* (Bull.) P. Karst, ambas recolectadas en Illinois, E.U.A.

#### 9.1.5. *Suillus* KL2296

La extensión del fragmento amplificado para esta cepa fue de 550 pb y el análisis de su secuencia sugiere relación con las especies *S. pseudobrevipes* A.H. Sm. & Thiers (94%), *S. volcanalis* Thiers (93%), *S. luteus* (93%) y *S. brevipes* (92%).

## 9.2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

### 9.2.1. Halos de actividad enzimática

Con respecto a la cepa *Boletus* GF2160, los resultados indican actividad positiva tanto en el experimento con DMP solo como en el adicionado con DMP + MnSO<sub>4</sub>, presentando halos de color anaranjado en al menos cinco de las réplicas a partir del noveno día de cultivo en ambos tratamientos. Por el contrario, la cepa *Amanita* GF2331 sólo presentó halos de coloración en el tratamiento sin raíz durante la evaluación con DMP + MnSO<sub>4</sub>, los cuales se observaron a partir del tercer día de cultivo, no obstante la aparición de los halos fue muy variable llegando incluso a presentarse hasta el día 15. En cuanto a la prueba con DMP solo como sustrato, ambos tratamientos experimentales manifiestan una respuesta positiva.

Con respecto a las cepas *Suillus* GF2161 y *Tylopilus* GF2341 sólo un par de colonias por tratamiento en ambas pruebas experimentales manifestó la presencia de halos de coloración, los cuales en la mayoría de los casos se registraron en no más de tres evaluaciones (9 días). Por otra parte, en la cepa *Suillus* KL2296 no se observaron halos que revelen la actividad de estas dos enzimas bajo ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas, por consiguiente se descartó del análisis en la etapa de evaluación cuantitativa.

Por lo que se refiere a la actividad tirosinasa, la prueba no fue capaz de evidenciar la presencia de esta enzima de forma extracelular en las cepas de HEM evaluadas, por lo que se descartó del análisis cuantitativo.

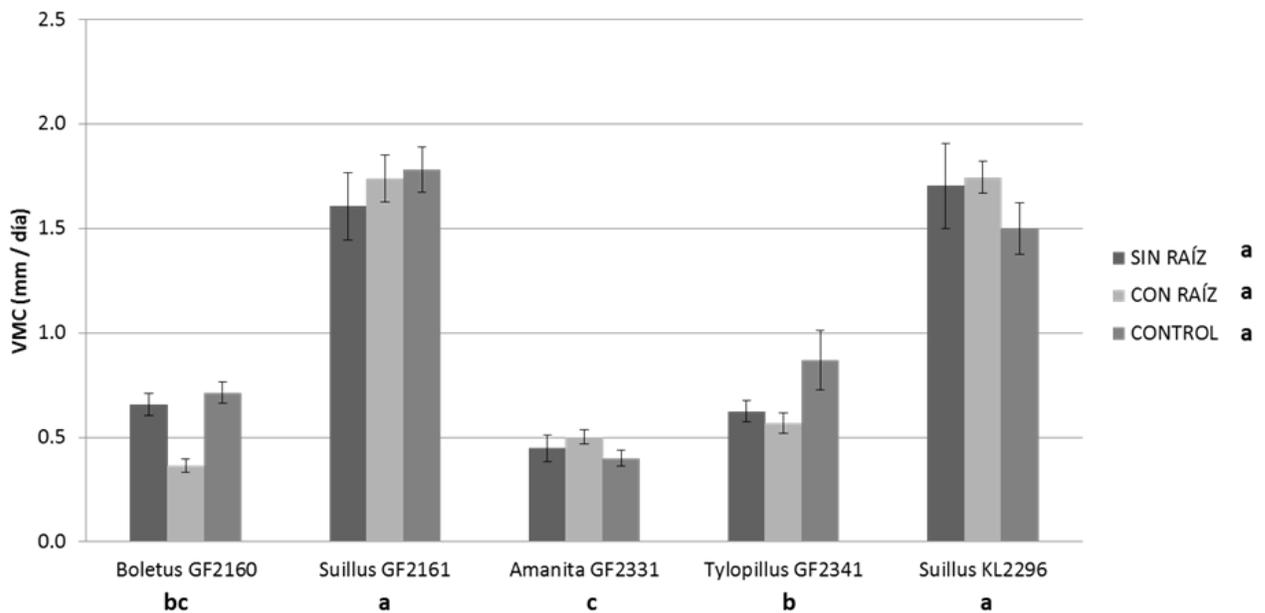
En cuanto a los valores máximos del IP, la cepa *Tylopilus* GF2341 obtuvo un índice de 8.18 en el experimento con DMP + MnSO<sub>4</sub>, para el tratamiento sin raíz, mientras que la cepa *Boletus* GF2160 obtiene 1.82 para el tratamiento con raíz, siendo los valores más altos calculados para cada tratamiento (cuadro 1). Por su parte, en la prueba con DMP solo, la cepa *Boletus* GF2160 obtuvo los mayores valores del índice para ambos tratamientos con 3.11 para el tratamiento sin raíz y 3.62 para el tratamiento con raíz.

**Cuadro1.** Máximo valor del índice de potencia enzimática obtenido para las cepas de HEM. Entre paréntesis se indica el día en que se presentó dicho valor.

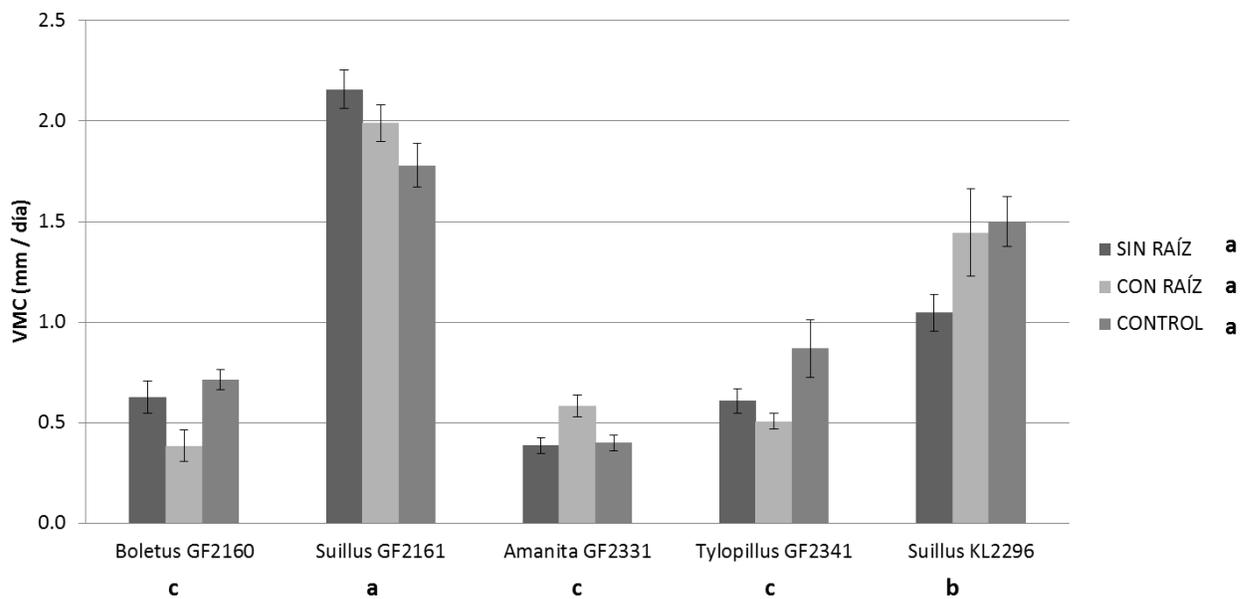
CEPA	DMP + MnSO <sub>4</sub>		DMP	
	SIN RAÍZ	CON RAÍZ	SIN RAÍZ	CON RAÍZ
<i>Boletus</i> GF2160	2.62 (24)	1.82 (27)	3.11 (15)	3.62 (27)
<i>Suillus</i> GF2161	-	1.55 (6)	1.77 (3)	1.60 (3)
<i>Amanita</i> GF2331	4.05 (9)	-	1.57 (12)	2.62 (12)
<i>Tylopilus</i> GF2341	8.18 (30)	1.60 (6)	1.94 (6)	1.22 (24)
<i>Suillus</i> KL2296	-	-	-	-

### 9.2.2. Velocidad media de crecimiento

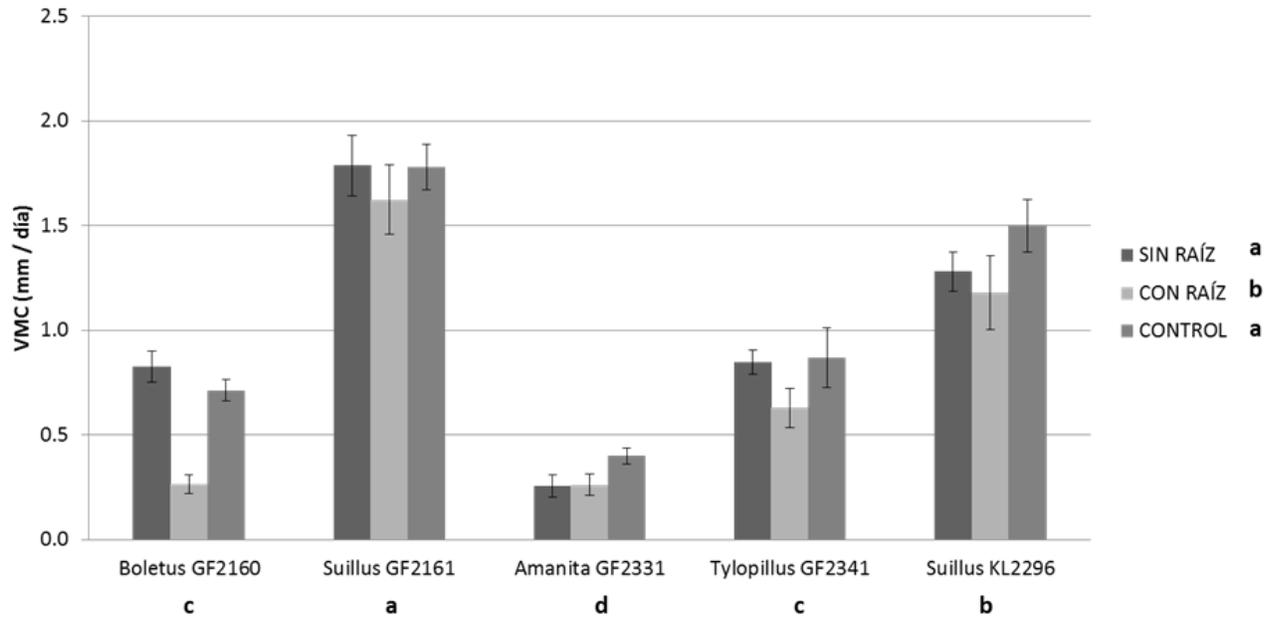
El crecimiento radial de las cepas estudiadas se ajustó de manera general a una ecuación lineal y los resultados muestran que la velocidad media de crecimiento (VMC) depende de manera significativa del factor cepa en los tres experimentos de evaluación, DMP +MnSO<sub>4</sub>:  $F_{4, 71}= 123.404$ ,  $P= 0.000$ ; DMP:  $F_{4, 71}= 131.844$ ,  $P= 0.000$ ; L-tirosina:  $F_{4, 71}= 92.061$ ,  $P= 0.000$  (figura 1, 2 y 3). Además, la interacción cepa x tratamiento en la prueba con adición de DMP solo ( $F_{8, 71}= 4.538$ ,  $P= 0.000$ ) (figura 2) y el efecto del tratamiento ( $F_{2, 71}= 8.969$ ,  $P= 0.000$ ) (figura 3) en la prueba con L-tirosina son estadísticamente significativos.



**Figura. 1.** VMC de las cinco cepas de HEM estudiadas en medio de cultivo MNM>Fe con DMP y  $MnSO_4$  como sustrato de evaluación de actividad enzimática. Cada barra representa la media de seis replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias significativas,  $\alpha = 0.05$



**Figura. 2.** VMC de las cinco cepas de HEM estudiadas en medio de cultivo MNM>Fe con DMP como sustrato de evaluación de actividad enzimática. Cada barra representa la media de seis replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias significativas,  $\alpha = 0.05$

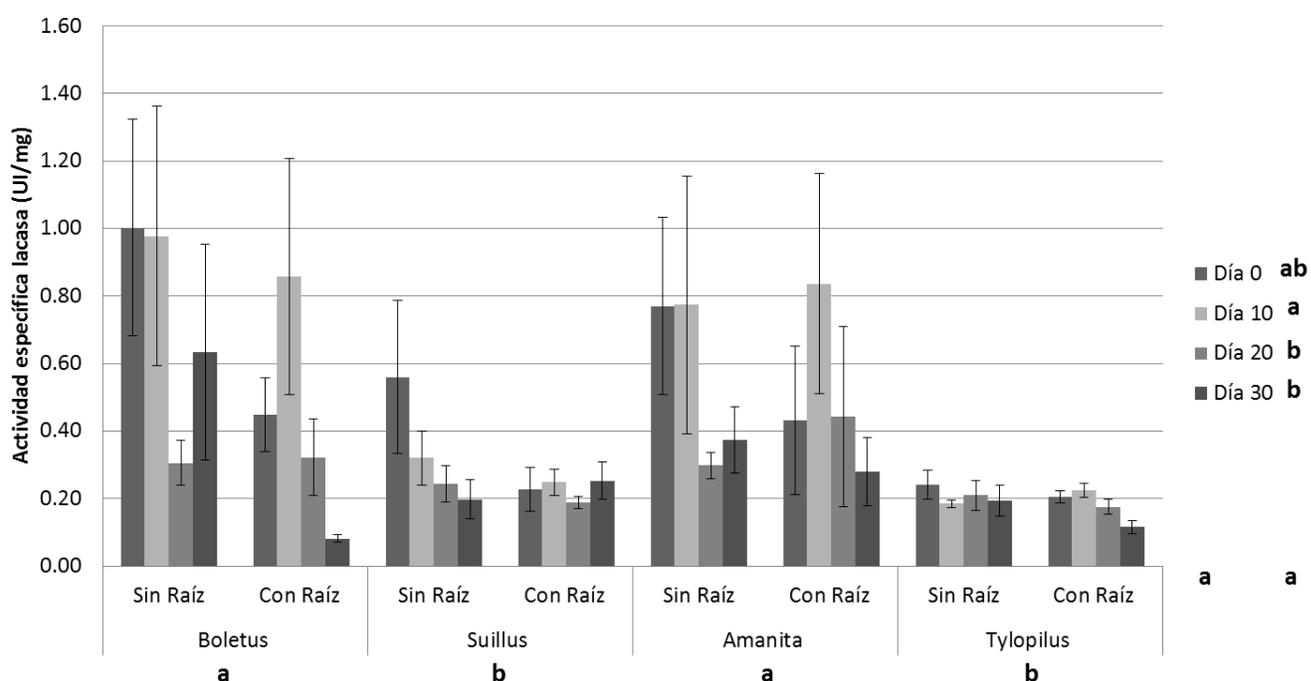


**Figura. 3.** VMC de las cinco cepas de HEM estudiadas en medio de cultivo MNM>Fe con  $L$ -Tirosina como sustrato de evaluación de actividad enzimática Tirosinasa. Cada barra representa la media de seis replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias significativas,  $\alpha = 0.05$

### 9.3. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

#### 9.3.1. Actividad lacasa

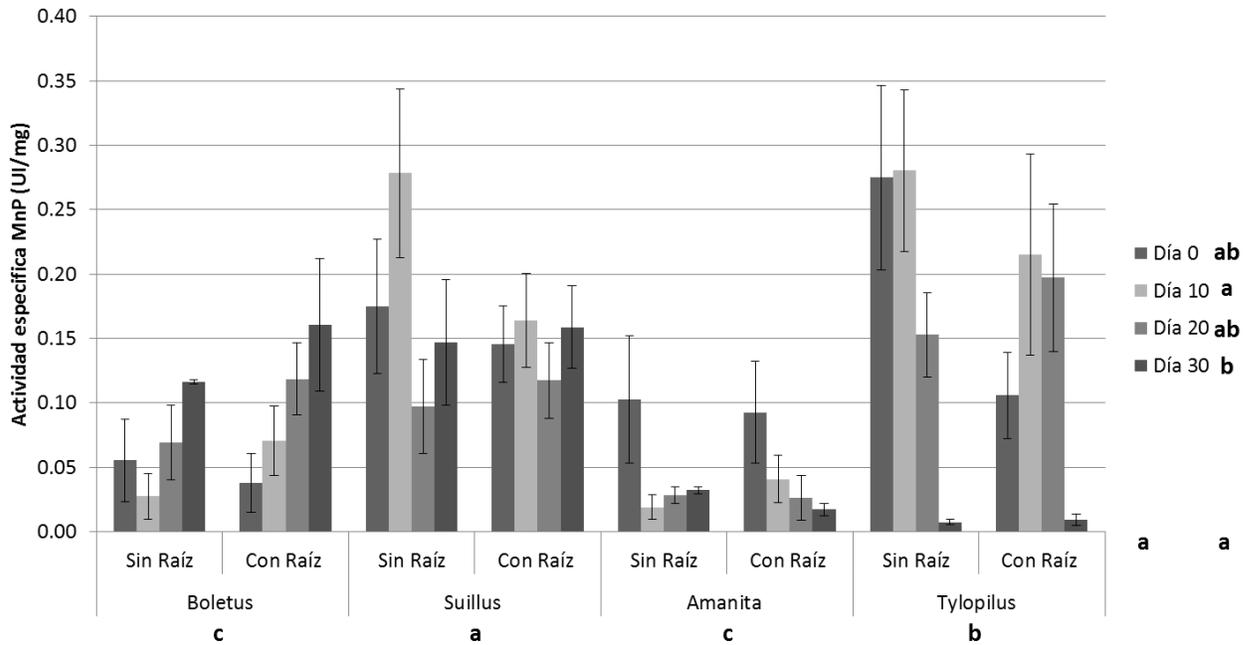
En cuanto a los resultados de actividad específica lacasa, éstos señalan que los factores que influyen de manera significativa sobre la variable analizada son el día de cultivo ( $F_{3, 256} = 5.265$ ,  $P = 0.002$ ) y la cepa ( $F_{3, 256} = 8.537$ ,  $P = 0.000$ ) (figura 4), sin presentarse algún efecto relevante de la interacción entre factores.



**Figura 4.** Actividad específica lacasa en UI/mg de proteína excretada de cuatro cepas de HEM en cultivo *in-vitro* a cuatro tiempos de evaluación y con dos tratamientos experimentales. Cada barra representa la media de nueve replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias estadísticamente significativas,  $\alpha = 0.05$

### 9.3.2. Actividad manganeso peroxidasa

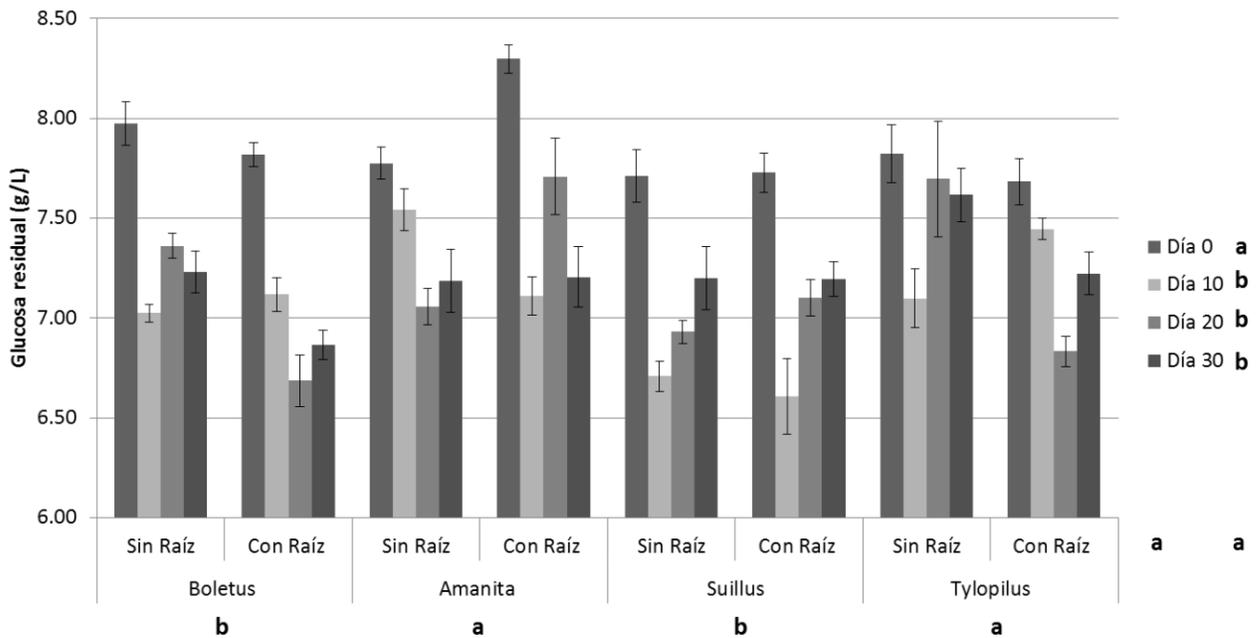
Por lo que se refiere a la actividad específica MnP, los resultados inferen que los factores que afectan significativamente dicha variable son el tiempo (día de incubación) ( $F_{3, 256} = 3.286$ ,  $P = 0.021$ ) y la cepa ( $F_{3, 256} = 38.673$ ,  $P = 0.000$ ) (figura 5). Asimismo, existe un efecto altamente significativo de la interacción día x cepa ( $F_{9, 256} = 4.35$ ,  $P = 0.000$ ).



**Figura 5.** Actividad específica MnP en UI/mg de proteína excretada de cuatro cepas de HEM en cultivo *in-vitro* a cuatro tiempos de evaluación y con dos tratamientos experimentales. Cada barra representa la media de nueve replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias estadísticamente significativas,  $\alpha = 0.05$ .

### 9.3.3. Azúcar residual

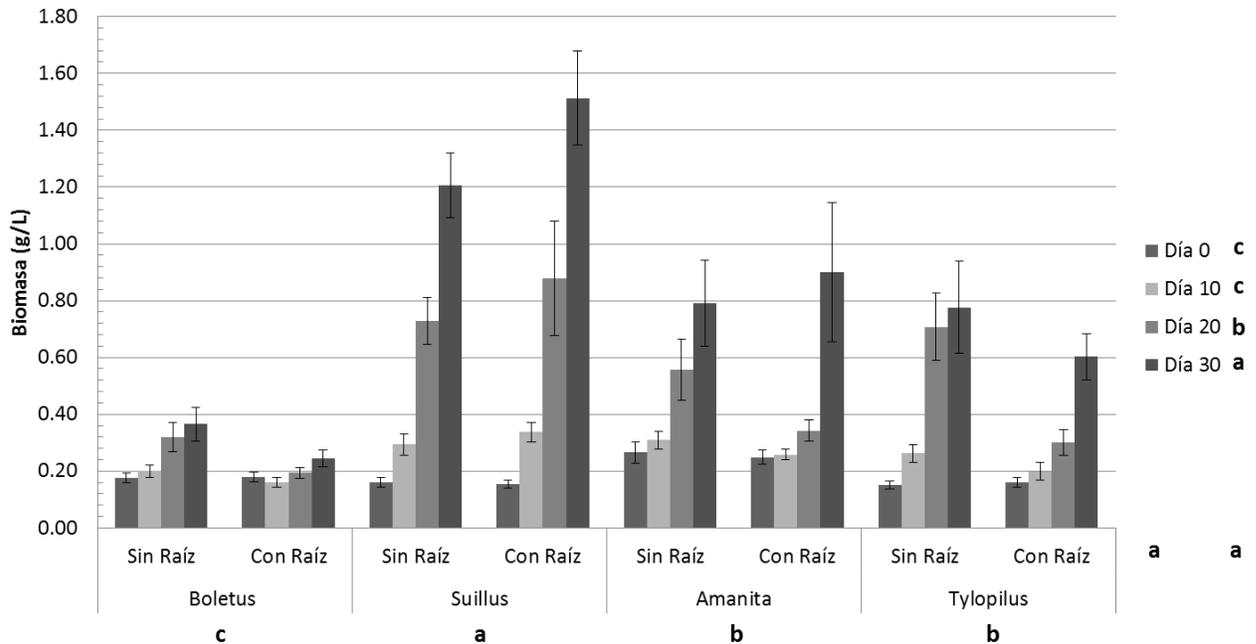
El análisis de los resultados obtenidos para la variable azúcar residual refieren que existe un efecto altamente significativo de los factores día ( $F_{3, 256}= 66.622, P= 0.000$ ) y cepa ( $F_{3, 256}=12.842, P= 0.000$ ) (figura 6), además de resultar significativas las interacciones día x cepa ( $F_{9, 256}= 3.313, P= 0.001$ ), cepa x tratamiento ( $F_{3, 256}= 6.953, P= 0.000$ ) y día x cepa x tratamiento ( $F_{9, 256}= 6.317, P= 0.000$ ).



**Figura 6.** Glucosa residual en el ECE de cuatro cepas de HEM en cultivo *in-vitro* a cuatro tiempos de evaluación y con dos tratamientos experimentales. Cada barra representa la media de nueve replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias estadísticamente significativas,  $\alpha = 0.05$ .

### 9.3.4. Biomasa

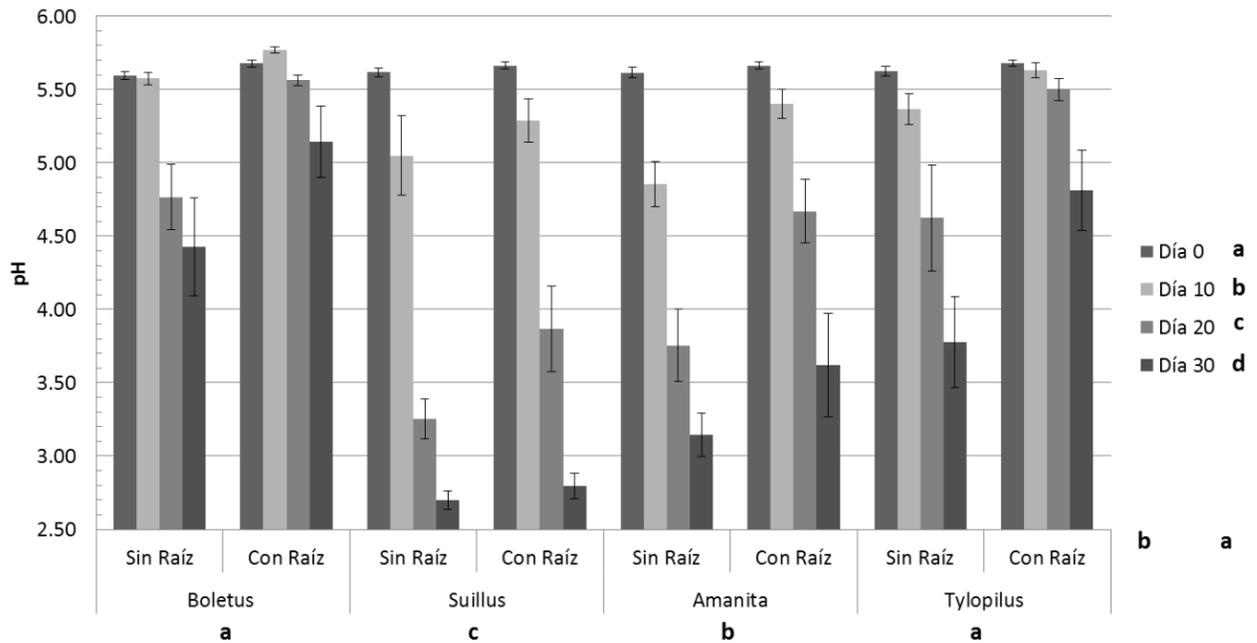
Los resultados indican que sólo los factores día de cultivo (tiempo) ( $F_{3, 255}= 78.389, P= 0.000$ ) y cepa ( $F_{3, 255}= 32.171, P= 0.000$ ) (figura 7) afectan significativamente a la biomasa producida. Además, las interacciones día x cepa ( $F_{9, 255}=10.379, P= 0.000$ ) y cepa x tratamiento ( $F_{3, 255}= 3.556, P= 0.015$ ) son estadísticamente significativas.



**Figura 7.** Biomasa producida en g/L de cuatro cepas de HEM en cultivo *in-vitro* a cuatro tiempos de evaluación y con dos tratamientos experimentales. Cada barra representa la media de nueve replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias estadísticamente significativas,  $\alpha = 0.05$ .

### 9.3.5. pH

Los resultados sugieren que los tres factores analizados: día ( $F_{3, 256}= 172.268, P= 0.000$ ), cepa ( $F_{3, 256}=55.704, P= 0.000$ ) y tratamiento ( $F_{1, 256}=46.815, P= 0.000$ ) (figura 8), influyen de manera significativa sobre la variable pH. Asimismo, las interacciones día x cepa ( $F_{9, 256}= 11.492, P= 0.000$ ) y día x tratamiento ( $F_{3, 256}= 6.387, P= 0.000$ ) resultaron estadísticamente significativas.



**Figura 8.** pH del ECE de cuatro cepas de HEM en cultivo *in-vitro* a cuatro tiempos de evaluación y con dos tratamientos experimentales. Cada barra representa la media de nueve replicas  $\pm$  ES. Letras iguales por factor no hay diferencias estadísticamente significativas,  $\alpha = 0.05$ .

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS

Considerando que en los hongos la región ITS completa tiene de manera general entre 600 y 800 pb (Gardes y Bruns 1993), se obtuvieron secuencias prácticamente completas para todas las cepas, lo cual permitió un mejor análisis de éstas.

#### 10.1.1. *Boletus* GF2160

La secuenciación de la región ITS de esta cepa nos indica que pertenece al complejo conocido como *B. edulis*, ubicado en el grupo monofilético reconocido como *Boletus* sección *Boletus*, con distribución en todo el hemisferio norte, encontrando su mayor diversidad en el este y oeste de Norteamérica (Dentinger y cols. 2010). Al interior de la sección *Boletus* el concepto de especie y su delimitación ha sido muy compleja, resultando en un gran número de taxa, incluyendo muchas variedades y subespecies (Leonardi y cols. 2005), muchas veces asignadas con base en las diferencias del hospedero micorrízico. Sin embargo, mediante el análisis filogenético de la región ITS y GAPDH de especímenes recolectados en Europa, Beugelsdijk y cols. (2008) reconocieron que la mayoría de los hongos estudiados de este grupo presentan baja especificidad y de manera general pueden asociarse con una amplia gama de árboles hospederos incluyendo deciduos y coníferas.

México ha sido reconocido como un centro de alta diversidad de géneros y especies de hongos de la familia Boletaceae (García-Jiménez y Garza-Ocañas 2001). Además, debido a que las condiciones ecológicas presentes en el país son claramente distintas a las de los países europeos e incluso a las de Estados Unidos y Canadá, muchas de las especies que aquí se desarrollan seguramente no se distribuyen en otras regiones. Sin embargo, el uso de claves taxonómicas de estas zonas del mundo para la determinación de ejemplares recolectados en México, ha forzado a encajar la micobiota propia de nuestro país con la de otras regiones geográficas. Lo anterior sumado a la variabilidad morfológica de este grupo de organismos complica una adecuada asignación de los ejemplares a una especie.

En el caso particular de la cepa aquí estudiada podemos suponer que se trata de una especie no descrita para la ciencia pero que claramente pertenece a la sección *Boletus* debido a su fuerte afinidad con organismos de este grupo taxonómico (95% de similitud con *B. edulis*, *B. aereus*, *B. mamorensis* y *B. aestivalis*; 93% con *B. barrowsii* y 92% con *B. reticulatus*). No obstante, se requiere un estudio más puntual de los caracteres morfológicos, ecológicos y moleculares de esta cepa para su correcta ubicación dentro de una especie.

#### 10.1.2. *Suillus* GF2161 y KL2296

El conjunto de especies con las cuales la cepa *Suillus* GF2161 presentó mayores porcentajes de similitud se agrupa dentro del mismo clado (Kretzer y cols. 1996) y además, la limitada variación entre la secuencia obtenida y la de *S. pungens* (99%), nos sugiere que la cepa estudiada pertenece a esta especie, cuya distribución podría ser bastante amplia, incluyendo el este y oeste de Estados Unidos e incluso en Nueva Zelanda. Sin embargo, es necesario realizar el análisis filogenético de su secuencia para confirmar que se trata de la misma especie.

Por su parte, el máximo porcentaje de similitud obtenido en el BLAST para la cepa *Suillus* KL2296 es de 94%, el cual es considerablemente bajo, a pesar de que el ejemplar determinado como *S. pseudobrevipes*, con el que se tiene la mayor afinidad de acuerdo con la información contenida en Gene Bank, proviene de San José Teacalco en el volcán La Malinche, mientras que la cepa *Suillus* KL2296 se recolectó en el cerro Tepeticpac en el municipio de Totolac, ambos en el estado de Tlaxcala. El género *Suillus* es uno de los mejor conocidos en Norteamérica y Europa, sin embargo, incluso en la regiones mejor exploradas en la actualidad se siguen encontrando especies no descritas, que muchas veces son comunes y conocidas pero que se agrupan en conceptos morfológicos demasiado amplios (Bruns y cols. 2010). Por lo anterior, la cepa aquí trabajada podría pertenecer a una especie distinta aún no descrita, pero que claramente pertenece al mismo grupo monofilético al que pertenecen *S. pseudobrevipes*, *S. brevipes* y *S. luteus* (Kretzer y cols. 1996, Bruns y cols. 2010).

### 10.1.3. *Amanita* GF2331

*Amanita muscaria sensu lato* presenta una amplia distribución, siendo nativa de las regiones templadas y boreales del hemisferio norte, sin embargo, también ha sido introducida en Australia, Nueva Zelanda, Sudamérica y Sudáfrica (Geml y cols. 2006). De manera tradicional se ha reportado como una única morfoespecie, aunque su variación morfológica ha llevado a la publicación de muchos taxa intraespecíficos (Geml y cols. 2008).

Con base en el análisis filogenético y biogeográfico de este complejo de especies Oda y cols. (2004) sugieren su división en tres grupos geográficos diferenciados de forma clara como el grupo euroasiático, el euroasiático subalpino y el norteamericano. A su vez, Geml y cols. (2008) encontraron una gran divergencia en los linajes que ocupan diferentes hábitats o regiones dentro del continente americano, a veces en una relativa proximidad geográfica y señalan que en estos casos la dispersión de las esporas no es un factor limitante y la adaptación a diferentes nichos ecológicos es una explicación más parsimoniosa. Estos autores proponen dividir el clado norteamericano en al menos cuatro subgrupos debido a que los resultados sugieren la ausencia de migración y considerable divergencia entre los organismos desarrollados en las regiones geográficas denominadas como Alaska, este de Norteamérica, oeste de Norteamérica y mexicana.

Las anteriores evidencias cuestionan la idea acerca de que *Amanita muscaria* es un hongo común, cosmopolita, fácil de identificar y con amplia plasticidad ecológica y que por el contrario, la clara divergencia entre clados y la diferencia de hábitats soportan la idea del desarrollo de endemismos eco-regionales y un nicho relativamente estrecho para cada linaje (Geml y cols. 2008). Por lo que la cepa aquí estudiada seguramente pertenece al clado mexicano y muy probablemente éste se subdivide dentro de la región (la cual abarca el estado de Texas en Estados Unidos y todo México) debido a la gran diversidad de hospederos, climas y condiciones edáficas que caracterizan a esta zona. Así pues, se requiere realizar la filogenia del complejo *A. muscaria* empleando cepas del clado mexicano que ayude a resolver la incógnita de cuantas especies de este complejo se distribuyen en el territorio nacional, y en particular, en el eje neo-volcánico transversal.

#### 10.1.4. *Tylopilus* GF2341

El análisis en BLAST indica 99% de similitud con dos especies: *Tylopilus rubrobrunneus* y *T. felleus*, ambas recolectadas en Illinois, Estados Unidos, no obstante, el trabajo en el cual se discuten las relaciones filogenéticas de estas cepas no se encuentra publicado aún. La principal diferencia morfológica entre ambas taxa radica en que *T. felleus* presenta estípite con prominente reticulación color marrón, mientras que *T. rubrobrunneus* no presenta retículo u ocasionalmente sólo tiene una fina reticulación hacia el ápice del estípite.

La ubicación taxonómica del género *Tylopilus* dentro de los boletáceos es compleja. El análisis filogenético de este grupo de hongos concluye que *Tylopilus* es un grupo polifilético, que junto con *Boletus* y *Pulveroboletus* aparece a lo largo de todo el árbol filogenético de los boletáceos (Bruns y cols. 1998, Drehmel y cols. 2008). De esta forma, la ubicación taxonómica de la cepa aquí tratada no será conclusiva hasta que no haya claridad en la delimitación genérica del género *Tylopilus* y hasta que no se realice un análisis en el que se incluya la secuencia de la cepa mexicana que indique si realmente es con-específica de alguna de las dos especies con las que guarda una alta similitud genética en la secuencia revisada.

## 10.2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

Los resultados de la evaluación cualitativa utilizando como sustrato DMP y DMP + MnSO<sub>4</sub> nos indican la presencia de al menos una enzima con capacidad de oxidar este compuesto fenólico en las cepas *Boletus* GF2160, *Suillus* GF2161, *Amanita* GF2331 y *Tylopilus* GF2341. Debido a que ambas enzimas (Lacasa y MnP) son capaces de degradar diversos sustratos (Wariishi y cols. 1992), entre ellos el DMP, determinar con exactitud cuál enzima es la responsable de la degradación del sustrato es poco preciso en una evaluación de este tipo.

En cuanto a la actividad tirosinasa, ninguna de las cepas evaluadas manifestó la liberación de ésta enzima al medio bajo las condiciones ensayadas. No obstante, en la cepa *Amanita* GF2331 se observó un obscurecimiento de las hifas postradas sobre el medio a partir

del día 12 de cultivo en ambos tratamientos, lo cual podría indicar la presencia de esta enzima de forma intracelular o intramembranal.

El cálculo de los valores máximos del IP nos indica de manera general que la cepa con mayor potencial enzimático es *Boletus* GF2160 en ambos tratamientos, con excepción de la prueba con DMP + MnSO<sub>4</sub> y sin raíz, en la cual la cepa *Tylopilus* GF2341 obtuvo los mayores valores del índice. No obstante, la cepa *Tylopilus* presentó menos del 50% de cajas positivas en la prueba. En lo que se refiere al día de evaluación en que se registraron los máximos valores del IP, los resultados son muy variables entre cepas pero consistentes entre tratamientos dentro de la misma cepa, aunque, en la cepa *Tylopilus* GF2341 se registran los valores más altos del IP hacia el final de la evaluación en el tratamiento sin raíz en la prueba con DMP + MnSO<sub>4</sub>, mientras que en el tratamiento con raíz se observa en los primeros días de cultivo, en cambio, en la prueba con DMP solo se observa un comportamiento inverso.

Sin embargo, al comparar los valores obtenidos con los reportados para las cepas de hongos saprobios, podemos darnos cuenta que la capacidad de degradación de las cepas de HEM estudiadas es muy baja. Por ejemplo, Antonio-Revuelta (2013), reportó un IP máximo a los 10 días de cultivo de 73.33 para una cepa de *Panus* sp. aislada de basidiomas recolectados en el estado de Veracruz, empleando ABTS como sustrato de evaluación de actividad lacasa. Sin embargo, en el mismo trabajo, una cepa *Schizophyllum commune* obtuvo un valor de IP máximo de 3.93 al segundo día de cultivo, por lo que aún en los hongos saprófitos los valores del IP son variables entre especies.

La evaluación de actividades enzimáticas extracelulares, entre ellas actividades ligninolíticas, de manera cualitativa en cepas de HEM fue bastante empleada durante la década de los 90s, debido a que se pretendía utilizar como un carácter de peso taxonómico, sobre todo para la determinación de cepas en cultivo *in-vitro*, por lo que fueron evaluadas un buen número de cepas. Finalmente, la amplia variabilidad intraespecífica de las actividades enzimáticas evaluadas reveló que estos caracteres no pueden emplearse para el reconocimiento de taxa particulares, pero si para inferir funcionalidad ecológica. Ahora bien, en estos trabajos, entre los que destacan los realizados por Hutchison (1990) y Gramss y cols. (1998) por el gran

número de cepas evaluadas (169 y 46, respectivamente), no hubo una verdadera estandarización en la forma de evaluar las reacciones coloridas, ya que las clasificaciones empleadas se basan en delimitaciones subjetivas del grado de intensidad del halo de degradación. Por lo anterior, a pesar de que el valor máximo del IP no es de manera estricta una evaluación cuantitativa, nos permite agrupar la información de modo que sea más fácil analizar los resultados y que éstos puedan ser comparables con los de otras investigaciones en el área.

Posteriormente, Santiago-Martínez (2002) retoma la metodología de Hutchison (1990) para evaluar la presencia de actividad lacasa y tirosinasa de 22 cepas de HEM recolectas en el estado de Tlaxcala, pertenecientes a los géneros *Amanita* (siete) y *Suillus* (15). Los resultados obtenidos indican actividad lacasa positiva en tres de las cuatro cepas de *Amanita muscaria* evaluadas con distintos grados de reacción colorida, desde muy débil a fuerte. Asimismo, para la actividad tirosinas las cuatro cepas evaluadas presentaron reacción positiva siendo ésta de muy débil a intensa. Nuevamente podemos observar la amplia variabilidad de la respuesta que presentan las cepas de HEM. Por otra parte, vale la pena destacar que entre las cepas del género *Suillus* evaluadas por Santiago-Martínez (2002) se encuentra la cepa *Suillus* KL2296 estudiada en el presente trabajo. Mientras que en la presente evaluación la cepa no manifestó respuesta positiva a ninguno de los sustratos de evaluación empleados, durante las pruebas realizadas por Santiago-Martínez (2002) la reacción debida a la actividad enzimática lacasa varió de sin cambio de color, indicando ausencia de la actividad, a coloración moderada, dependiendo del medio de cultivo en el que se desarrollaba la cepa. De manera particular, en el medio MNM se observó la reacción más intensa (coloración moderada). En cuanto a la actividad tirosinasa la reacción de esta cepa varió de muy débil a débil. Por tanto, la variabilidad en la respuesta de estos organismos no sólo se encuentra en función de la cepa estudiada sino también de los sustratos de evaluación, debido a que puede existir una mayor afinidad de las enzimas a degradar ciertos sustratos y a las condiciones de cultivo.

Una de las dificultades observadas en la prueba cualitativa está relacionada con la coloración del medio de cultivo, el cual era más oscuro en las placas del tratamiento con raíz, por lo que los cambios de coloración debidos a la oxidación del sustrato fueron menos

evidentes que en el tratamiento sin raíz. No obstante, esta prueba permitió hacer una selección de las actividades enzimáticas que potencialmente se manifiestan de forma extracelular y de las cepas de HEM en que se presentan. Es decir, funcionó como un filtro para el posterior análisis cuantitativo, en donde es más sencillo determinar la acción de diferentes enzimas ya que no sólo es posible detectar la formación de un producto, sino también la generación de algunos complejos intermediarios característicos de una ruta específica de degradación.

En lo que se refiere a la VMC, las cepas con crecimiento más rápido son las del género *Suillus*, siendo *Suillus* GF2160 significativamente más veloz que *Suillus* KL2296 en dos de las tres evaluaciones (figura 1, 2 3). Mientras que para el resto de las cepas los resultados difieren en cada prueba. Sin embargo, de manera general podemos observar que la cepa *Amanita* GF2331 es quien tiene un menor crecimiento radial.

En cuanto al efecto del tratamiento, este resultó estadísticamente significativo sólo en la prueba con L-tirosina e indica que no hay diferencias entre el tratamiento sin raíz, que contiene el sustrato para la evaluación de actividad enzimática, y el control, el cual no está adicionado con el sustrato, por lo que las diferencias observadas entre tratamientos se deben al efecto de la adición de la harina de raíz.

Asimismo, si realizamos un análisis puntual de cada una de las cepas en las tres evaluaciones podemos advertir que la cepa *Boletus* presenta menor VMC en el tratamiento con raíz, comparado con el tratamiento sin raíz y el control los cuales no son distintos entre sí, en todas las pruebas, y que esta diferencia es más notoria en la prueba con L-tirosina. Esta tendencia nos indica que algún componente estructural de la raíz afecta el crecimiento de la cepa *Boletus* lo que podría estar relacionado con los resultados del valor de IP, en los que observamos que los máximos valores del IP para esta cepa se presentaron en un mayor número de días en las colonias del tratamiento con raíz (cuadro 1). Así, en la prueba con DMP + MnSO<sub>4</sub> en el tratamiento con raíz se presentaron al día 27 de cultivo mientras que en el tratamiento sin raíz se obtuvieron 3 días antes, lo mismo sucedió en la prueba con DMP solo en el que nuevamente en el tratamiento con raíz apareció al día 27, mientras que en el tratamiento sin raíz se presentó al día 15 de evaluación. La tendencia antes descrita, al menos

en la prueba con DMP solo, no es común para el resto de las cepas con actividad positiva ya que el día al cual se obtuvo el máximo valor del IP es el mismo en ambos tratamientos.

Por otra parte en la cepa *Tylopilus* parecería haber un efecto negativo de la presencia de DMP en el medio de cultivo. Esto puede suponerse debido a que en la prueba con L-tirosina los errores estándar del tratamiento sin raíz y el control se sobreponen mientras que en las pruebas con DMP + MnSO<sub>4</sub> y DMP solo no es así (figura 1, 2 y 3).

En cuanto a la interacción cepa x tratamiento, que resultó significativa en la evaluación con DMP solo, podemos decir que el efecto del tratamiento sobre la variable VMC depende en gran medida de la cepa de HEM. En particular, en la cepa *Boletus* y *Tylopilus* hay una reducción en la VMC de las colonias en el tratamiento con raíz. En cambio, en las cepas *Amanita* y *Suillus* KL2296 hay un incremento en la VMC. Por su parte, en la cepa *Suillus* GF2161 no hay diferencias entre tratamientos. La misma tendencia podemos apreciar en la prueba con DMP + MnSO<sub>4</sub> sin embargo, aquí las diferencias no son tan marcadas.

### 10.3.EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

La biomasa producida fue afectada significativamente por el tiempo de incubación y la identidad de la cepa con la que fue inoculada la unidad experimental. Por lo cual, la biomasa incrementó conforme transcurrieron los días de incubación independientemente del tratamiento experimental al que fueron sometidos. No obstante, los días 0 y 10 no fueron estadísticamente diferentes. Esto puede deberse a que durante el periodo señalado las cepas se encontraban en una etapa de adaptación conocida como fase Lag. Esta fase ocurre después de la inoculación y se caracteriza porque durante este periodo los microorganismos se adaptan al nuevo medio, tomando los nutrientes necesarios para iniciar el proceso de división celular, es decir, los microorganismos se encuentran metabólicamente muy activos pero la biomasa se mantiene temporalmente sin aumentar.

Asimismo, las características morfológicas propias de cada cepa también afectaron la producción de biomasa. En la figura 7 se muestra que la cepa *Suillus* presentó el mayor promedio en producción de biomasa, seguida de las cepas *Amanita* y *Tylopilus*, las cuales no son estadísticamente diferentes, y finalmente, la cepa *Boletus* produjo la menor cantidad de biomasa. Así pues, si consideramos los resultados obtenidos para VMC durante la evaluación cualitativa (figura 1, 2 y 3) podemos apreciar que las cepas del género *Suillus* se desarrollaron a una mayor velocidad que el resto de las cepas en cultivo en placa. En cambio, la VMC de la cepa *Amanita* fue de manera general menor incluso que la de *Boletus*. Esto se debe probablemente a que el micelio de la cepa *Amanita* es más compacto que el de *Boletus*, por lo que la extensión radial fue menor pero la producción de biomasa fue mayor.

Además, la interacción entre ambos factores –día x cepa– influyó significativamente en la producción de biomasa. Lo cual puede explicarse debido a las diferencias morfológicas y en el desarrollo del micelio propio de cada cepa y su consecuente variación en los periodos de adaptación al nuevo medio.

Por el contrario, la adición de la raíz en el medio de cultivo no tuvo un efecto significativo sobre la producción de biomasa. Lo que sugiere que bajo las condiciones evaluadas la presencia de los componentes estructurales de la raíz no afectaron el desarrollo normal del micelio pero tampoco favorecieron su proliferación. Ahora bien, la interacción cepa x tratamiento resultó significativa, lo cual indica que el efecto de la presencia de los componentes de la raíz varió dependiendo de la cepa. Por ejemplo, en las cepas *Boletus* y *Tylopilus* en las que se observó una menor producción de biomasa en el tratamiento con raíz comparado con el sin raíz en las dos últimas evaluaciones, mientras que en las cepas *Suillus* y *Amanita* el efecto es inverso, esto es, la adición de la raíz en el medio de cultivo aparentemente incrementó la producción de biomasa, nuevamente, hacia el final de la prueba (figura 7). Asimismo, los resultados obtenidos durante la evaluación cualitativa indicaron un decremento en la VMC de la cepa *Boletus* en las tres pruebas de evaluación y de la cepa *Tylopilus* en la prueba con L-tirosina, sin embargo, el efecto inverso sólo se observó en la cepa *Amanita* en la evaluación con DMP solo. Debemos considerar que las condiciones de cultivo

en ambas pruebas de evaluación son muy distintas, por tanto, el desarrollo del micelio varía en respuesta a las condiciones del ambiente de cultivo.

Por su parte, Salmones y Mata (2005) observaron en tres cepas del género *Pleurotus*, las cuales se desarrollaron en medio de cultivo sólido suplementado con derivados solubles de lignina (DSL), incrementos significativos de hasta dos veces más producción de biomasa en la primera y segunda resiembra con respecto al control. Sin embargo, en el tratamiento suplementado con derivados solubles de pulpa de café (APC) observaron una disminución de la biomasa producida, los autores señalan que los hongos fueron capaces de utilizar los nutrientes presentes en este medio, pero inicialmente debieron neutralizar los efectos tóxicos de algunos monómeros presentes, lo que repercutió en la baja formación de células fúngicas. Algo similar pudo presentarse en nuestras cepas, ya que particularmente en las cepas *Amanita* y *Tylopilus* (figura 7) observamos que durante las tres primeras evaluaciones la media de la biomasa producida fue menor en el tratamiento con raíz, pero en la última evaluación (día 30) alcanzó los valores promedio del tratamiento sin raíz.

Con referencia al pH del ECE, de manera general, se advirtió el descenso de esta variable conforme transcurren los días de cultivo, siendo todos estadísticamente distintos entre sí. Con relación a la influencia del factor cepa, *Suillus* acidificó más el ECE, seguido de *Amanita* y finalmente, las cepas *Boletus* y *Tylopilus*. Las diferencias dadas por la acidificación del medio podrían estar relacionadas con características fisiológicas de las cepas, las cuales excretan diferentes productos (Díaz y cols. 2009), como por ejemplo ácidos orgánicos y otros subproductos metabólicos. Es decir, la producción diferenciada de metabolitos de carácter ácido aunado al tiempo de incubación afectó de manera significativa las propiedades del ECE.

Por su parte el factor tratamiento también explicó la variación de los datos. En este sentido los ECE fueron significativamente menos ácidos en el tratamiento con raíz. Así pues, durante el transcurso de los días de incubación la presencia de algún componente de la raíz pudo inhibir o reducir la producción de metabolitos ácidos liberados al medio, por lo que el descenso del pH fue menor, lo cual explicaría la significancia de la interacción día x tratamiento.

Con relación a la variable azúcar residual, los resultados indican que el factor días de cultivo influyó de manera significativa. Sin embargo, los días 10, 20 y 30 no son estadísticamente diferentes entre sí, a pesar de eso existió un claro incremento en la biomasa producida conforme transcurre el tiempo de incubación. Así pues, es posible que la composición del medio de cultivo afectara las mediciones, ya que al analizar con la técnica empleada los medios de cultivos iniciales sólo fueron detectados en promedio 8 g/L de los 10 g/L agregados al medio. Además, debido a que los resultados indican que el consumo de sustrato es mínimo, la técnica empleada pudo no ser suficientemente sensible a la variación. Por lo que, se sugiere que si se desea analizar la producción de biomasa con relación al consumo de sustrato en HEM se utilicen técnicas más sofisticadas y por lo tanto costosas, como la tecnología del sensor, que se fundamenta en el uso de membranas con glucosa oxidasa, o la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que es muy sensible y provee determinaciones cuantitativas exactas.

Asimismo, las cepas explotaron la fuente de carbono de manera diferente. En particular, las cepas *Suillus* y *Boletus* tuvieron un mayor consumo de glucosa, inferido por la menor cantidad de azúcar residual en el ECE, comparado con el resto de las cepas. Por un lado, *Suillus* fue la cepa con mayor producción de biomasa, lo que justifica que su consumo de glucosa sea elevado. Por otro lado, *Boletus* obtuvo la menor producción de biomasa, por lo que el recurso energético pudo ser desviado hacia otras prioridades. En cuanto a las interacciones cepa x día, cepa x tratamiento y día x cepa x tratamiento, resultaron significativas debido a que la cinética de crecimiento de cada cepa fue diferente, por lo que la explotación del sustrato varió en el tiempo dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encontraba el hongo (Olsson 1995).

En cuanto a las actividades específicas lacasa y MnP, sólo los factores día de cultivo y cepa influyeron de manera significativa en la variación de los datos. Así pues el día 10 de incubación resultó ser estadísticamente diferente, obteniendo los promedios más altos de actividad específica de ambas enzimas independientemente del tratamiento al cual fueron sometidos. Es importante destacar que, durante este periodo la cantidad de biomasa fue menor comparada con los siguientes días de evaluación, lo cual nos indica, primero, que la

producción de estas enzimas no está relacionada con el crecimiento celular (Xavier y cols. 2007) y segundo, que las enzimas evaluadas podrían estar involucradas en el proceso de establecimiento en un nuevo medio. En particular, se ha asociado a la enzima lacasa con la rápida adaptación al nuevo sustrato (Salmones y Mata, 2005).

Las cepas *Boletus* y *Amanita* presentaron las medias más altas de actividad específica lacasa. Por el contrario, la máxima producción de MnP la presentó la cepa *Suillus*. Puesto que, a las cepas de los géneros *Boletus* y *Amanita* se les ha considerado como de asociación tardía, es decir, que se asocian con árboles maduros, mientras que a las cepas del género *Suillus* se le conoce como de asociación temprana, es decir, se asocian con plántulas, las diferencias en la producción de enzimas podría variar en relación a este carácter. Sin embargo, en este sentido la información es prácticamente nula. Por otra parte se ha observado que la inducción de la enzima lacasa suprime la producción de MnP (Saeki y col. 2011) por lo que los resultados podrían reflejar la preferencia de cada cepa a activar uno u otro sistema degradativo.

En lo que se refiere al efecto del tratamiento, no existieron diferencias estadísticamente significativas sobre alguna de las actividades enzimáticas. Sin duda, en los hongos saprófitos la presencia de componentes estructuralmente relacionados con la lignina tiene la capacidad de inducir la actividad de estas enzimas. Por ejemplo, los resultados de Tinoco y cols. (2011) indican que la adición de 0.5 g/L de lignina tiene un fuerte efecto inductor sobre la producción de enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, con  $\approx 5$  UI/ml después de 132 horas con respecto al control que obtuvo  $\approx 1$  UI/ml después de 96 horas. Por su parte, Xavier y cols. (2007) también reportan inducción positiva de la lignina en *Trametes versicolor* obteniendo casi veinte veces más actividad lacasa ( $1240 \pm 62$  UI/L) que en el control ( $65 \pm 5$  UI/L). Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas no parece tener el mismo efecto en las cepas de estudio.

Ahora bien, en ambos estudios se adicionó la lignina entre 60 (*P. ostreatus*) y 72 (*T. versicolor*) horas después de la inoculación, durante una fase intermedia del desarrollo, ya que, al menos en la cepa *P. ostreatus* CP-50, la adición de inductores al inicio del cultivo reduce drásticamente el crecimiento y la producción de lacasa (Tinoco y cols. 2011), lo cual pudo

haber afectado la producción de enzimas en las cepas estudiadas. Sin embargo, en otras cepas de *P. ostreatus* y en *Botryosphaeria rhodina* se ha evaluado que la inducción resulta más eficiente cuando se adiciona el inductor al mismo tiempo que el inóculo (Piscitelli 2011). En este sentido se dice que altas concentraciones de compuestos aromáticos (>1 mM) en los medios de cultivo pueden afectar el crecimiento fúngico si el estado fisiológico del micelio no se encuentra adaptado a los cambios en las condiciones de crecimiento (Piscitelli 2011) por lo que sería conveniente en futuros estudios realizar una etapa de adaptación al medio de cultivo con harina de raíz para lograr activar más eficientemente la maquinaria enzimática.

En cambio, Saeki y cols. (2011) evaluaron el efecto inductor de un extracto preparado con aserrín de *Castanopsis cuspidata* a una concentración de 33 g/L con el que suplementaron el medio de cultivo desde la inoculación para inducir la actividad MnP. Sus resultados mostraron que en fermentación líquida estática *Lentinula edodes* sólo produce la enzima MnP en presencia del extracto, mientras que bajo las mismas condiciones la enzima lacasa prácticamente no es detectable. De modo que sugieren que la inducción de una de las enzimas reprime la producción de la otra.

Por su parte, Shlosser y cols. (1997) evaluaron en cultivo líquido estático la influencia de tres fuentes de carbono sobre la producción de enzimas ligninolíticas en *T. versicolor*, empleando glucosa, paja de trigo y madera de *Fagus sylvatica* (ambos en fragmentos de cerca de 0.25 cm) a una concentración final de 10 g/L. Los autores refieren una fuerte inducción de la producción de actividad enzimática lacasa de hasta 16 veces en el tratamiento con paja de trigo y de 3.6 veces en el de madera de *Fagus sylvatica* (evaluados con ABTS) comparados con el tratamiento con glucosa. Por su parte, la actividad MnP no fue detectada en el tratamiento con glucosa y la inducción de esta actividad fue 1.3 veces superior en el tratamiento con madera comparado con el tratamiento con paja de trigo. Sus resultados indican que existen diferencias en la inducción de estas actividades enzimáticas dependiendo del material ligno-celulósico empleado y la enzima evaluada, si consideramos que la inducción de la producción de actividad lacasa fue mayor utilizando paja de trigo, mientras que para la inducción de la producción de MnP resultó mejor la madera, es evidente que la producción de

enzimas ligninolíticas se relaciona con la proporción de lignina/celulosa y la presencia de algunos otros elementos, como el Mn, en los tejidos del material inductor.

Ahora bien, con la metodología empleada en el presente trabajo sólo podemos valorar el efecto del inductor sobre la producción de enzimas totales –lacasa y MnP– y no el efecto sobre la inducción de alguna isoenzima en particular. Puesto que, la inducción por parte de compuestos aromáticos ocurre a nivel transcripcional la expresión de isoenzimas es variable. Por ejemplo, se ha observado que la transcripción de el gen *lcc1* de *T. villosa* es inducido por la adición de 2,5-xylidina al medio de cultivo y en la cepa *Trametes* sp. I62 se ha encontrado que los tres genes de lacasa que presenta se expresan de manera diferencial en respuesta a diferentes compuestos aromáticos lo que refiere una inducción específica (Piscitelli 2011).

Otros factores a considerar son la cantidad de inductor y la concentración de macro y micro nutrientes en el medio de cultivo. En cuanto a la proporción del inductor, como se mencionó anteriormente en los hongos saprófitos una concentración entre 0.4 y 0.5 g/L de lignina es suficiente para inducir significativamente la actividad lacasa, de modo que, la cantidad empleada en el presente estudio (0.15 g/L) pudo haber sido insuficiente para lograr un efecto significativo sobre la variable evaluada.

En relación a la composición del medio de cultivo, sabemos que las células varían su metabolismo de acuerdo a las condiciones físicas y químicas del entorno en el que se desarrollan, entre las que destacan las limitaciones nutricionales. Sobre este tema se conoce que en medios no limitantes los hongos realizan metabolismo primario asociado a síntesis de proteínas con producción de enzimas y otros metabolitos esenciales para el crecimiento celular y reproducción. Pero, en medios limitantes cambian las rutas metabólicas activando el metabolismo secundario que les proporcionará los mecanismos específicos de producción de proteínas, entre estas las enzimas, necesarias para sobrevivir bajo esas condiciones. Como, por ejemplo, *T. versicolor* el cual no produce concentraciones detectables de enzima lacasa cuando se le cultiva en medios no limitantes y en condiciones óptimas de pH y temperatura (Xavier y cols. 2007) además en éste y otros hongos se ha evidenciado que la producción de enzima lacasa es reprimida en medios con gran cantidad de azúcar (Shlosser y cols. 1997). Asimismo,

en el HEM *Amanita muscaria* se ha observado que la concentración de glucosa afecta significativamente la expresión de muchos genes, de 600 genes evaluados, 101 se sobre expresan y 110 se reprimen en medios adicionados con 25 mM glucosa ( $\approx 4.5$  g/L), esto a pesar de que muchos de los genes estudiados ni siquiera se relacionan con la obtención de carbono (Nehls y cols 2007). Es decir, un tercio de los genes evaluados son afectados por la adición de glucosa, lo que revela la gran importancia de la fuente de carbono en la fisiología fúngica.

A pesar de que el medio seleccionado para la evaluación resulta ser limitado en el contenido de glucosa y otros elementos comparado con otros medios empleados en el cultivo de HEM (ejm. BAF, EMA, PDA) los resultados indican que, al menos en las cepas estudiadas, el consumo de sustrato es muy reducido (de no más de 2 g/L aproximadamente) por lo que se sugiere para futuros estudios en este campo una mayor limitación de glucosa para favorecer la producción de enzimas ligninolíticas.

Así pues, la proporción de macro y micro elementos en los medios de cultivo también afectan la producción de las enzimas estudiadas. En particular, el nitrógeno tiene un fuerte efecto regulador sobre la maquinaria ligninolíticas. Se ha observado que en cultivos con alto contenido de N se favorece la presencia de actividad lacasa en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, sin embargo, un alto contenido de nitrógeno también favorece la aparición de proteasas extracelulares las cuales inactivan a las peroxidasa y por lo tanto un aumento en el N reprime a enzimas como la lignino peroxidasa (LiP) y la MnP (Jiménez y cols. 1999, Quintero y cols. 2006).

En lo que se refiere a micro elementos, se ha demostrado que la presencia de  $Mn^{+2}$  en altos niveles (40-190 ppm) es necesaria para la producción de la enzima MnP (Jiménez y cols. 1999, Périé y cols. 1996). No obstante, este elemento también está involucrado en la síntesis de lacasa de diferentes microorganismos ligninolíticos, por lo que la presencia de ambas enzimas en el mismo cultivo se puede atribuir a cambios en la relación nitrógeno/manganeso ya que estos dos nutrientes afectan notablemente la actividad de las enzimas ligninolíticas (Jimenez y cols. 1999).

En los HEM la distribución (cobertura del micelio extra-radical en el suelo) y diferenciación del micelio (la organización de rizomorfos) pueden variar enormemente, de tal modo que pueden ser usados para distinguir distintos tipos de exploración del micelio, cada uno de los cuales representa distintas estrategias de forrajeo (Agerer 2001).

Rineau y Garbaye (2009) encontraron que la mayoría de las tipos de ectomicorrizas (EM) son capaces de secretar una amplia variedad de enzimas, entre ellas a la lacasa, pero sólo en pequeñas cantidades. Sin embargo, en cada tipo de EM parece haber especialización en la producción de una enzima particular y con ello diferencias en la explotación de los recursos del suelo (Tedersoo y cols. 2012). Así, las cepas de géneros como *Lactarius* y *Russula*, caracterizados por presentar micelio de contacto, secretan altas cantidades de enzimas ligninolíticas, como la lacasa, lo cual es necesario para acceder a las fuentes de nitrógeno del área vecina y sugiere un papel importante en la degradación de compuestos fenólicos (Agerer 2001, Agerer 2006, Rineau y Garbaye 2009, Tedersoo y cols. 2012, Burke y cols. 2014). Mientras que la mayoría de los miembros del orden *Boletales* al presentar exploración a larga distancia y tener una mayor área de cobertura pueden prescindir de la capacidad para degradar lignina y especializarse en la secreción de otra enzimas como la leucina aminopeptidasa, involucrada en la degradación de proteínas (Agerer 2001, Agerer 2006, Rineau y Garbaye 2009).

No obstante, esta relación no siempre se cumple y al parecer existen diferencias entre géneros e incluso entre cepas de la misma especie (Agerer, 2001) por lo que las características propias del ambiente de procedencia de las cepa podrían influir en la regulación de estas enzimas degradadoras (Talbot y cols. 2013), particularmente de las lacasas las cuales pueden ser constitutivas o inducibles (Rineau y Garbaye 2009). Es decir, las diferencias en los tipos de exploración y sus capacidades fisiológicas pueden indicar especializaciones ecológicas y son rasgos biológicos que influyen directamente en la nutrición de la planta (Agerer, 2001).

En lo que se refiere a la inducción de actividades enzimáticas extracelulares en HEM, Burke y cols. (2014) evaluaron el efecto de la adición de hojarasca molida sobre la producción de cuatro enzimas extracelulares, entre ellas las fenol oxidasas, en seis cepas de HEM y en

cuatro de hongos saprófitos recolectados en bosques maduros de Estados Unidos. Sus resultados indican que la producción de las enzimas extracelulares evaluadas está significativamente afectada no sólo por la identidad del hongo sino también por la adición de la hojarasca, la cual manifiesta efectos negativos y neutrales en las cepas HEM. Además, reportan que algunos HEM son capaces de producir enzimas extracelulares en cultivo *in-vitro* en niveles comparables a los de los hongos saprófitos estudiados, especialmente en producción de ácido fosfatasa y polifenol oxidasas. Esto sugiere que muchos HEM juegan un papel importante en el ciclo del carbono y fósforo en los bosques maduros y la falta de correlación entre la producción de enzimas y los grupos filogenéticos sugiere que la capacidad de producir enzimas extracelulares es un reflejo de las adaptaciones individuales a los hábitats.

Se ha postulado que los HEM pueden actuar como organismos saprófitos facultativos adquiriendo C del suelo. Esta teoría se basa en el incremento de la actividad enzimática durante periodos de baja actividad fotosintética del hospedero ayudando a cubrir la demanda fisiológica de C del hongo (Courty y cols. 2006, Baldrian 2009, Cullings y cols. 2009). En este sentido el significado funcional de la expresión de estas enzimas es muy debatido (Cullings y cols. 2009, Talbot y cols. 2013, Phillips y cols. 2014). Por un lado, debido a que en muchos de los estudios las evaluaciones se realizan directamente sobre la punta micorrizada, los resultados obtenidos son la combinación entre la actividad potencial del tejido de la raíz, el hongo simbiótico y/o las bacterias asociadas a la EM (Courty y cols. 2006, Tedersoo y cols. 2012, Talbot y cols. 2013). Por otro lado, la expresión y actividad enzimática en cultivo *in-vitro* depende en gran parte de las condiciones de cultivo. Por lo que para poder estimar la contribución de los HEM en el ciclo terrestre del carbono y su potencial para degradar la materia orgánica del suelo vía enzimática es necesario evaluar *in-situ* el potencial enzimático de las comunidades de HEM (Tedersoo y cols. 2012, Talbot y cols. 2013, Phillips y cols. 2014) que revelen la distribución espacial y temporal de estas enzimas y su relación con la diversidad de EMs (Courty y cols. 2006).

Asimismo, el resto de las hipótesis acerca del papel funcional de las enzimas polifenol oxidasas y peroxidasas poco han sido exploradas. En cuanto a su participación durante el proceso de micorrización, Tagu y Martin (1996) observaron en la interacción *Eucalyptus-*

*Pisolithus tinctorius* que durante la fase de penetración de las capas externas de la raíz había presencia de proteínas quitinasas y peroxidases, no obstante durante la fase de formación de la red de hartig no fueron detectadas estas actividades. En lo que se refiere a movilización de nutrientes, Courty y cols. (2006) refieren que la lacasa se encuentra involucrada en la movilización de nitrógeno a partir de la materia orgánica por lo que juegan un papel importante durante la primavera cuando la actividad de los árboles en el sitio estudiado es activada para producir nuevos órganos vegetativos.

Finalmente, es necesario enfatizar que se requieren más estudios en genómica y transcripción génica en HEM en condiciones naturales. Además, se requiere incrementar el conocimiento sobre las actividades enzimáticas involucradas en la degradación de sustratos fenólicos por parte de los HEM y cuando se tenga un avance sólido en este tema será necesario el estudio de los tres componentes de las EMs (micelio extraradical, manto y red de hartig) para proporcionar una visión real sobre las funciones ecológicas de estas actividades (Baldrian 2009, Cullings y cols. 2009).

En relación a la precisión de las mediciones de actividad enzimática, podemos observar (figura 4 y 5) que las barras de error son considerablemente grandes, lo que interfiere con una clara apreciación de las diferencias entre los factores. El mismo problema se aprecia en otros estudios donde se ha evaluado la actividad enzimática en HEM (Tedersoo y cols. 2012, Burke y cols. 2014). En este sentido podemos sugerir dos cosas. Primero, utilizar entre 500 y 800  $\mu\text{L}$  de ECE por mezcla de reacción. Durante las pruebas piloto realizadas para este trabajo, pudimos advertir que al aumentar la cantidad de ECE a las mezclas de reacción se logró reducir el error en la medición. Segundo, contar con una muestra blanco para realizar la calibración del equipo. La muestra blanco empleada en el presente estudio consistió en una alícuota de los medios de cultivo preparados para la evaluación cuantitativa, con y sin raíz, la cual fue esterilizada, filtrada y almacenada en las mismas condiciones que las muestras problema. Esta muestra blanco fue adicionada a la mezcla de reacción preparada para el blanco de calibración en la misma proporción que el ECE en las mezclas problema. Sin embargo, se sugiere obtener una muestra blanco por cada día de evaluación, es decir, habría que someter la muestra blanco a las mismas condiciones de incubación que los experimentales

para evitar que factores como la agitación, la temperatura y la evaporación afecten la mezcla y con ello reducir aún más la variación de los datos lo cual resulta indispensable, dada la mínima producción de estas enzimas en los HEM. También, en este sentido podría considerarse un método de filtración más eficaz que permita reducir la cantidad de componentes no proteicos en las muestras.

En cuanto a la forma de evaluar la producción de actividad MnP, consideramos que el método directo, empleado en este estudio, es mejor comparado con los métodos indirectos, los cuales utilizan algún sustrato fenólico y se reporta la absorbancia de luz en relación a la formación de un producto oxidado. Si consideramos que enzimas como la lacasa y MnP presentan baja especificidad y por lo tanto actúan en una amplia variedad de compuestos fenólicos, como DMP, ABTS o *o*-dianisina (Baldrian 2009) y además, muchas cepas producen ambas actividades enzimáticas, determinar cuál enzima es la responsable de la oxidación del sustrato es complicado. Algunos autores (Saeki y cols. 2011) han planteado protocolos en los cuales en la misma mezcla de reacción, en la que se utiliza un sustrato fenólico, por ejemplo DMP, primero se mide la actividad lacasa y posteriormente se adicionan peróxido y  $\text{MnSO}_4$  y se mide nuevamente a la misma longitud de luz. Por lo que la actividad MnP se obtiene al restar el primer  $\Delta$  absorbancia (lacasa) al segundo  $\Delta$  absorbancia. Nosotros evaluamos mediante este método la actividad MnP (datos no mostrados) y observamos que los patrones son idénticos a los obtenidos para la evaluación de actividad lacasa y que al realizar la resta, debido a la magnitud de los errores y a la cantidad tan pequeña de las enzimas, en la mayoría de los casos obteníamos valores negativos.

## 11. CONCLUSIÓN

- Se logró ubicar taxonómicamente a las cepas estudiadas dentro de complejos de especies.
- Durante la evaluación cualitativa no fue posible determinar la presencia de alguna de las actividades enzimáticas evaluadas en la cepa *Suillus* KL2296. Además, ninguna de las cepas estudiadas manifestó la producción de actividad tirosinasa de manera extracelular.
- Bajo las condiciones evaluadas, la adición de harina de raíz en el medio de cultivo no tiene un efecto significativo sobre la producción de enzimas MnP y lacasa.

## 12. PERSPECTIVAS

Este trabajo provee un marco de referencia para estudios posteriores sobre las actividades enzimáticas ligninolíticas en HEM y su significado funcional en los ecosistemas. Se sugiere para futuros trabajos de investigación en esta línea:

Primero, se determine el número de isoenzimas de lacasa y MnP que producen las cepas de HEM estudiadas. Segundo, se defina si la presencia de alguno de los componentes estructurales de la raíz en realidad tiene un efecto inductor probando con una concentración más alta de harina de raíz de *Pinus hartwegii*. Tercero, se evalúe *in-vitro* la expresión de las enzimas en diferentes etapas del proceso de micorrización, sobre todo durante el periodo de formación de la red de Hartig. Cuarto, se determine la actividad de otras enzimas ligninolíticas, como la lignino peroxidasa y peroxidasa versátil, no estudiadas en el presente trabajo. Quinto, se identifiquen cuántos genes de lacasa y MnP posee cada cepa y de qué tipo son sus promotores con el fin de precisar si éstos son inducibles. Finalmente, se produzcan cepas mutantes con distintos grados de silenciamiento del (los) gen (es) con el objetivo de definir su participación durante el establecimiento de la asociación micorrízica.

### 13. REFERENCIAS

- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Agerer R. 2006. Fungal relationship and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67-107.
- Antonio-Revuelta B. 2013. Evaluación del potencial enzimático de macromicetos lignícolas del centro del estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana.
- Baldrian P. 2009. Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their role as facultative soil saprotrophs? *Oecologia* 161: 657-660.
- Bello-Gil D, Carrera-Bocourt E y Díaz-Maqueira Y. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA* 40(2): 45-50.
- Bending G y Read D. 1996. Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 28(12): 1595-1602.
- Bending GD. y Read DJ. 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 101(11): 1348-1354.
- Beugelsdijk DCM, van der Lide S, Zuccarello GC, den Makker HC, Draisma SGA y Noordeloos ME. 2008. A phylogenetic study of *Boletus* section *Boletus* in Europe. *Persoonia* 20: 1-7.
- Brundrett M. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phyt* 154: 275-304.
- Bruns TD, Grubisha LC, Trappe JM, Kerekes JF y Vellinga EC. 2010. *Suillus quiescens*, a new species commonly found in the spore bank in California and Oregon. *Mycologia* 102(2): 438-446.
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings K.W, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M y Li Y. 1998. A sequence database for identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol Ecol* 7: 257-272.

- Burke DJ, Smemo KA y Hewins CR. 2014. Ectomycorrhizal fungi isolated from old-growth northern hardwood forest display variability in extracellular enzyme activity in the presence of plant litter. *Soil Biol Biochem* 68: 219-222.
- Burke RM. y Cairney JWG. 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12: 105-116.
- Buscot, F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U y Hampp R.. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 24: 601-614.
- Cairney JWG y Burke RM. 1994. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycol Res* 98(12): 1345-1356.
- Cairney JWG y Burke RM. 1998. Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidase activity? *Mycorrhiza* 8:61-65.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ y Martínez ÁT. 1999. Description of Versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both Manganese peroxidase and Lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274(15): 10324-10330.
- Cañas-Portilla AI. 2009. Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Memoria de Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad de Alcalá.
- Caramelo L, Martínez MJ y Martínez ÁT. 1999. A search for Ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -Thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Appl Environ Microbiol* 65(3): 916-922.
- Colpaert JV y Van Laere A. 1996. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter. *New Phyt* 133: 133-141.
- Corrêa A, Strasser RJ y Martins-Loução MA. 2006. Are mycorrhiza always beneficial? *Plant Soil* 279: 65-73.

- Courty PE, Buée M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, Uroz S y Garbaye J. 2010b. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biol Biochem* 42: 679-698.
- Courty PE, Franc A y Garbaye J. 2010a. Temporal and functional pattern of secreted enzyme activities in an ectomycorrhizal community. *Soil Biol Biochem* 42: 2022-2025.
- Courty PE, Pouysegur R, Buée M y Garbaye J. 2006. Laccase and phosphatase activities of the dominant ectomycorrhizal types in a lowland oak forest. *Soil Biol Biochem* 38: 1219-1222.
- Cullings K. y Courty PE. 2009. Saprotrophic capabilities as functional traits to study functional diversity and resilience of ectomycorrhizal community. *Oecologia* 161: 661-664.
- Dávila G y Vázquez-Duahalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. En: Mensaje Bioquímico. Vol. 30. Flores-Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez-López I y Oriahernández J (eds.) Universidad Autónoma de México. México, DF. pp. 29-55.
- de Souza CGM, Tychanowicz GK, de Souza DF y Perlata RM. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol* 44: 129-136.
- Dentinger B, Ammirati JF, Both EE, Desjardin DE, Halling RE, Henkel TW, Moreau PA, Nagasawa E, Soyong K, Taylor AF, Watling R, Moncalvo JM y McLaughlin DJ. 2010. Molecular phylogenetics of porcini mushrooms (*Boletus* section *Boletus*). *Mol Phylogenet Evol* 57: 1276-1292.
- Díaz G, Flores R, Honrubia M. 2009. Descripción de cultivos miceliarios de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Rev Mex Mic* 30: 1-7.
- Díaz S, Di Rienzo JA, Pla L, Casanoves F. 2011. Introducción. En: Valoración y análisis de la diversidad funcional y su relación con los servicios ecosistémicos. Casanoves F, Pla L y Di Rienzo JA (eds.) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. pp. 1-4.
- Drehmel D, James T y Vilgalys R. 2008. Molecular Phylogeny and Biodiversity of the Boletes. *FUNGI* 1(4): 17-23.

- Fengel D y Wegener G. 1983. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. University of Munich, Institute for Wood Research, Berlin.
- García-Jimenez J y Garza-Ocañas F. 2001. Conocimiento de los hongos de la familia Boletaceae de México. *Ciencia UANL* 4(3): 336-343.
- García-Rodríguez JL, Pérez-Moreno J, Aldrete A, Cetina-Alcalá VM y Vaquera-Huerta H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40: 665-676.
- Gardes M y Bruns D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.
- Garza-Ocañas F, García-Jiménez J, Estrada-Castillón E y Villalón-Mendoza H. 2002. Macromicetos, ectomicorrizas y cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *CIENCIA UANL* 5(2): 204-210.
- Geml J, Laursen GA, O’neill K, Nusbaum HC y Taylor DL. 2006. Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Mol Ecol* 15: 225-239.
- Geml J, Tulloss RE, Laursen GA, Sazanava NA y Taylor DL. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Mol Phylogenet Evol* 48: 694-701.
- Gomes EA, Kasuya MCM, de Barros EG, Borges AC, Araújo EF. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genet Mol Biol* 25(4): 477-483.
- Gramss G, Günther TH y Fritsche W. 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. *Mycol Res* 102: 67-72.
- Gruhn CM y Miler OK. 1991. Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. *Mycol Res* 95(3): 268-272.
- Halaouli S, Asther M, Sigoillot JC, Hamdi M y Lomascolo A. 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J Appl Microbiol* 100: 219-232.

- Hendel B, Sinsabaugh RL y Marxsen J. 2005. Lignin-degrading enzymes: Phenoloxidase y peroxidase. En: Methods to Study Litter decomposition: A practical guide. Graça, MAS, Bärlocher F y Gessner MO (eds.) Springer. Netherlands. pp. 273-277.
- Hilszczanska D, Ciesielska A y Sierota Z. 2008. Enzymatic activity of *Thelephora terrestres* and *Hebeloma crustuliforme* in cultures and mycorrhizal association with scots pine seedlings. Polish J of Environ Stud 17(6): 881-886.
- Hou H, Wang J, Du C y Yan B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Process Biochem 39: 1415-1419.
- Hutchison LJ. 1990. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. III. Patterns of polyphenol oxidase activity. Mycologia 82(4): 424-435.
- Jacobson ES. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev 12(4): 708-117.
- Jiménez GA, Mejía AI y López BL. 1999. Actividad de las enzimas lignolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn<sup>+2</sup>. Rev Acad Colomb Cienc 23(89): 587-584.
- Kretzer A, Li Y, Szaro T, Bruns TD. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus sensu lato*: Phylogenetic and taxonomic implications. Mycologia 88(5): 776-785.
- Leonardi M, Paolocci F, Rubini A, Simonini G y Pacioni G. 2005. Assessment of inter- and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. FEMS Microbiol Lett 243: 411-416.
- Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, Flärdh M y González AE. 2003. The White-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. Mycologia 95(6): 1013-1020.
- Mayer AM. 2006. Polyphenol oxidases in plant and fungi: Going places? A review. Phytochemistry 67: 2318-2331.
- Miranda M, Bonfigli A, Zarivi O, Ragnelli AM, Pacioni G y Botti D. 1992. Truffle tyrosinase: Properties and activity. Plant Science 81: 175-182.

- Molina R y Palmer JG. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En: Methods and principles of mycorrhizal research. Schenk NC (eds.) Am Phytopath Soc, St Paul. Pp. 115-129.
- Mosca E, Montecchio L, Scattolin L y Garbaye J. 2007. Enzymatic activities of three ectomycorrhizal types of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning. Soil Biol Biochem 39: 2897-2904.
- Moya R, Saastamoinen P, Hernández M, Suurnäkki A, Arias E y Mattinen ML. 2011. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. Bior Tech 102: 10006-10012.
- Mueller LA, Hinz U y Zrýd JP. 1996. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. Phytochemistry 42(6): 1511-1515.
- Nava-Gutiérrez Y, y Hernández-Cuevas L. 2003. Aspectos generales de la asociación micorrízica. En: Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala. Estrada-Torres A y Santiago-Martínez MG (eds.) Sistema de Investigación Ignacio Zaragoza, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fundación Produce Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala México. Ixtacuixtla. pp. 1-10.
- Nehls U, Grunze N, Willman M, Reich M y Küster H. 2007. Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. Phytochemistry 68: 82-91.
- Nitheranont T, Watanabe A y Asada Y. 2011. Extracellular laccase produced by an edible Basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. Biosci Biotechnol Biochem 75(3): 538-543.
- Oda, T, Tanaka C y Tsuda M. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. Mycol Res 108(8): 885-896.
- Olsson S. 1995. Mycelial density profiles of fungi on heterogeneous media and their interpretation in terms of nutrient reallocation patterns. Mycol Res 99(2): 143-155.
- Papinutti VL, Diorio LA y Forchiassin F. 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas lignolíticas en aserrín de álamo y cedro. Rev Iberoam Micol 20: 16-20.

- Peláez F, Martínez MJ y Martínez AT. 1995. Screening of 68 species of basidiomicetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* 99(1): 37-42.
- Pérez-Moreno J. y Read DJ. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29(5): 239-247.
- Péirié F, Sheng D, Gold MH. 1996. Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Biochim Biophys Acta* 1297: 139-148.
- Phillips LA, Ward V y Jones MD. 2014. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forest. *The ISME Journal* 8: 699-713.
- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G y Faraco V. 2011. Induction and transcriptional regulation of Laccases in fungi. *Curr Genomics* 12: 104-112.
- Pritsch K y Garbaye J. 2011. Enzyme secretion by ECM fungus and exploitation of mineral nutrients from soil organic matter. *Ann For Science* 68: 25-32.
- Pritsch K, Courty PE, Churin JL, Cloutier-Hurteau B, Arif-Ali M, Damon C, Duchemin M, Egli S, Ernst J, Fraissinet-Tachet L, Kuhar F, Legname E, Marmeisse R, Müller A, Nikolova P, Peter M, Plassard C, Richard F, Schloter M, Selosse MA, Franc A y Garbaye J. 2011. Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 21: 589-600.
- Quintero JC, Feijoo G y Lema JM. 2006. Producción de enzimas lignolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae* 13(2): 61-67.
- Read D. 1997. The ties that bind. *Nature* 388: 517-518.
- Rentaría-Alcántara M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X (comp.) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. pp. 541-565.
- Rineau F y Courty PE. 2011. Secreted enzymatic activities of ectomycorrhizal fungi as a case study of functional diversity and functional redundancy. *Ann For Science* 68: 69-80.

- Rineau F y Garbaye J. 2009. Does forest liming impact the enzymatic profiles of ectomycorrhizal communities through specialized fungal symbionts? *Mycorrhiza* 19: 493-500.
- Rodríguez Y. 2005. Aspectos relacionados con las bases bioquímicas de la simbiosis micorrízica arbuscular. *Cultivos Tropicales* 26(1): 11-19.
- Rodríguez-Sánchez E. 2006. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: Expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
- Rosado T, Bernardo P, Koci K, Coelho AV, Robalo MP y Martins LO. 2012. Methyl syringate: An efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. *Bioresource Technol* 124: 371-378.
- Ruiz-Dueñas FJ. 1998. Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
- Saeki N, Takeda H, Tanesaka E, Yoshida M. 2011. Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native –PAGE. *Mycoscience*. 52: 132-136.
- Salmones D y Mata G. 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus spp.* *Rev Mex Mic* 21: 63-69.
- Santiago-Martínez MG. 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación controlada con esporas. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schlosser D, Grey R y Fritsche W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 412-418.
- Singh S. 2007. Biochemical changes in mycorrhizal synthesis. *Mycorrhiza News* 19(3): 2-10.
- Tagu D, Lapeyrie F y Martin F. 2002. The ectomycorrhizal symbiosis: genetic and development. *Plant Soil* 244: 97-105.

- Talbot JM, Bruns TD, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlanson S, Vilgalys R y Peay K. 2013. Independent roles of ectomycorrhizal and saprotrophic communities in soil organic matter decomposition. *Soil Biol Biochem* 57:282-291.
- Taylor AFS y Alexander I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19(3): 102-112.
- Tedersoo L, Naadel T, Bahram M, Pritsch K, Buegger F, Leal M, Kõljalg U y Põldmaa K. 2012. Enzymatic activities and stable isotope patterns of ectomycorrhizal fungi in relation to phylogeny and exploration types in an afro-tropical rain forest. *New Phyt* 195:832-843.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Tinoco R, Acevedo A, Galindo E y Serrano-Carreón L. 2011. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 531-540.
- Wariishi H, Valli K y Gold MH. 1992. Manganese (II) Oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 267(33): 23688-23695.
- Xavier A, Mora A, Ferreira R, Amado F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electron J Biotechnol* 10: 444-451.
- Zarivi O, Bonfigli A, Colafarina S, Aimola P, Ragnelli AM, Pacioni G y Miranda M. 2011. Tyrosinase expression during black truffle development: From free living mycelium to ripe fruit body. *Phytochemistry* 72: 2317-2324.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1.



## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Hoja 01/01

**GEMA LILIA GALINDO FLORES**

**Muestra.: 265I (INVESTIGACIÓN)  
P. harteegli Etapa I**

**Fecha de recepción: 14.06.14**

### **Análisis de Fracciones de la Fibra (Van Soest):**

<b>Fibra Neutro Detergente</b>	74.68%
<b>Contenido Celular</b>	25.32%
<b>Fibra Ácido Detergente</b>	74.04%
<b>Hemicelulosa</b>	0.64%
<b>Celulosa</b>	26.56%
<b>Lignina</b>	46.24%

Atentamente.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria a 20 de junio de 2014

  
Q.A. Águeda García Pérez  
Responsable del Laboratorio

  
Dra. Aurora Hilda Ramírez Pérez  
Jefa del Depto. de Nutrición Animal y  
Bioquímica

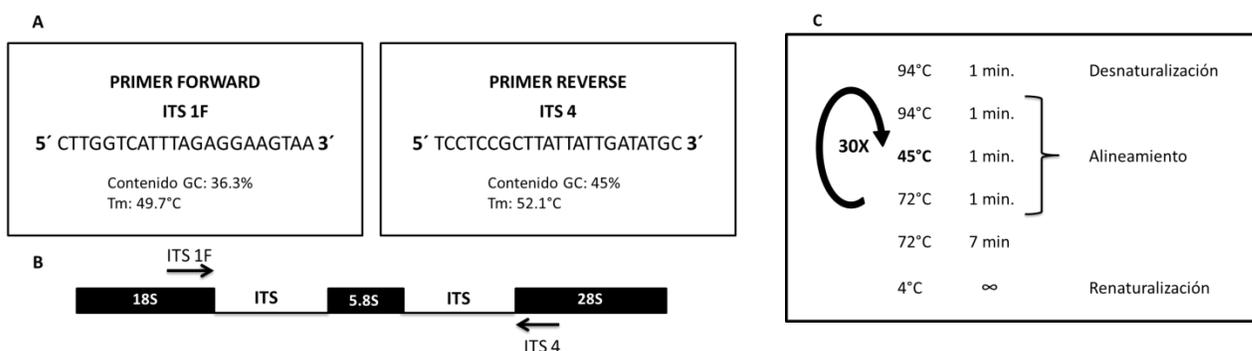
Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizada para fines legales.

**Anexo 2.** Mezcla utilizada para la reacción de PCR.

5 µL	10X Taq Buffer
4 µL	MgCl
1 µL	Primer F
1 µL	Primer R
1 µL	dNTP's
5-10 µL	Muestra de ADN total
0.5 µL	Taq DNA polimerasa
Aforar a 50 µL con H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	

**Anexo 3.** A. Secuencias de los *primers* utilizados. B. Esquema de la región amplificada. C.

Protocolo de PCR utilizado.

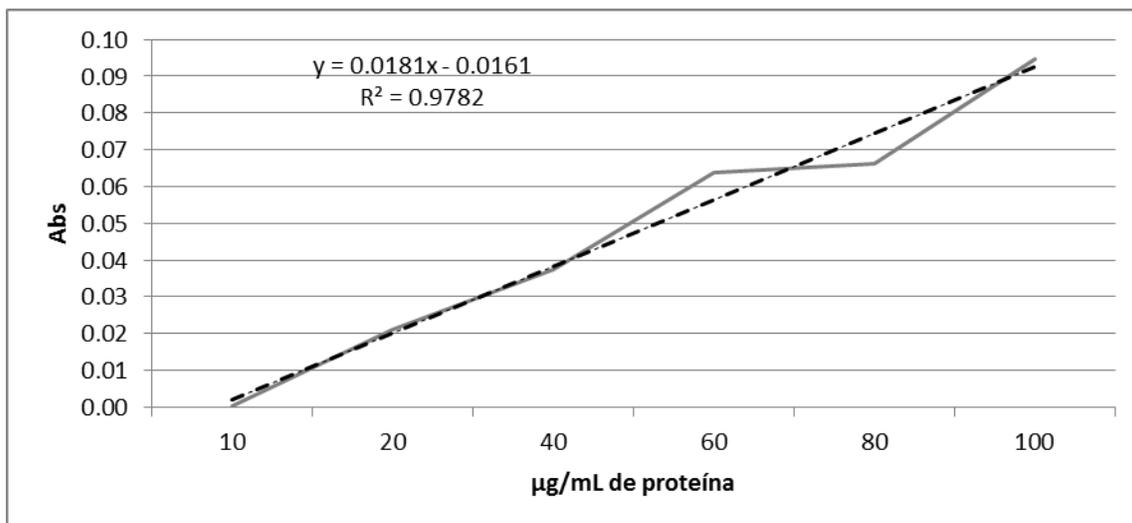


**Anexo 4.** Composición del Medio de cultivo Melin y Norkrans modificado con bajo contenido de Fe\* (MNM>Fe) (Molina y Palmer, 1982)

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05 g	Extracto de malta	3 g
NaCl	0.025 g	Glucosa	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	Tiamina	0.0005 g
(NH <sub>4</sub> ) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	Agar	15 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15 g	Agua destilada	1L
*FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0016 g		

\* La concentración final de Fe en el medio de cultivo MNM preparado de forma convencional, se encuentra alrededor de los 44 µM.

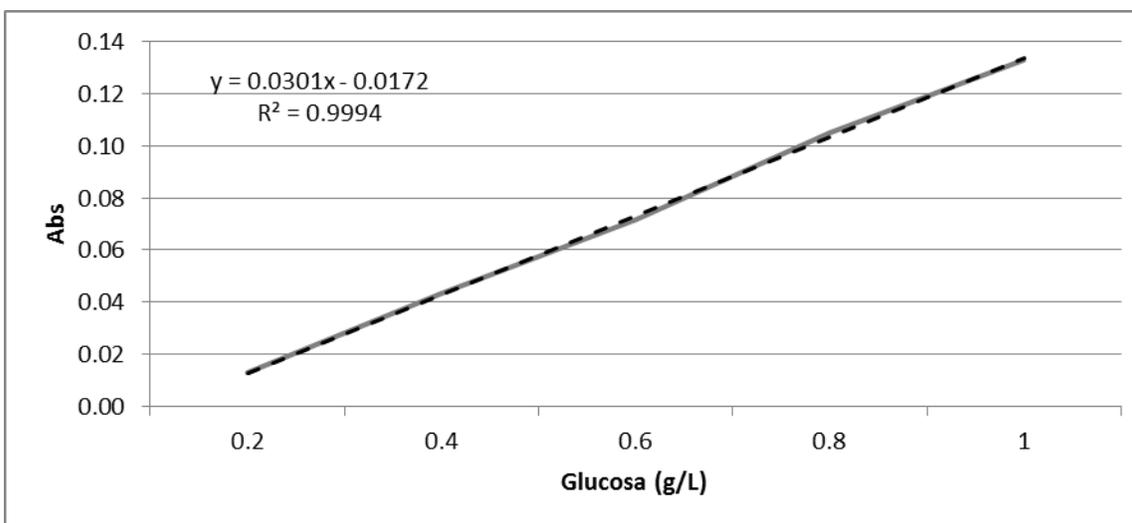
### Anexo 5. Curva Patrón de BSA



La línea continua representa el promedio de tres mediciones realizadas a las disoluciones de concentración conocida de BSA. La línea discontinua representa la línea de tendencia calculada.

Nota. Cuando se utiliza BSA es necesario ajustar los resultados de concentración de proteína multiplicando por 2.1 para obtener una mejor aproximación.

### Anexo 6. Curva patrón de glucosa



La línea continua representa el promedio de tres mediciones realizadas a las disoluciones de concentración conocida de glucosa. La línea discontinua representa la línea de tendencia calculada.

**Anexo 7.** Preparación del reactivo DNS (Bello-Gil y cols. 2006).

5 g	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
150 g	Tartrato de sodio potasio
8 g	NaOH
500 mL	Agua destilada

- 1) Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua destilada estéril y se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente.
- 2) Se añade agua hasta 400 mL y se comienza a agregar lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche.
- 3) Se afora a 500mL y se filtra.