

# Determinación de la variabilidad de respuesta de micelios de *Pleurotus* vs. *Trichoderma* en medios de cultivo con derivados solubles de lignina y pulpa de café

Dulce Salmones  
Gerardo Mata

Instituto de Ecología, A.C. Km 2.5 antigua carretera a Coatepec, Xalapa, Ver., México

## Determination of response variability of *Pleurotus* vs *Trichoderma* mycelia cultivated on soluble lignin and coffee pulp derivatives media

**Abstract.** Thirty *Pleurotus* strains (*P. djamor*, *P. ostreatus* and *P. pulmonarius*) cultivated in malt extract agar (AEM), AEM supplemented with yeast extract and soluble derivatives of lignin (AEML-DSL) and agar with coffee soluble pulp derivatives (APC), was confronted with three strains of *Trichoderma* (*T. viride* and *T. reesei*). The culture media and *Trichoderma* strains were determining factors of competitiveness of *Pleurotus*. *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* strains presented greater resistances to the antagonistic organisms, reaching averages from 58.3 to 91% in the cultures in AEML-DSL. In general, *T. viride* strains produced greater inhibition of *Pleurotus* mycelial growth than *T. reesei*.

**Key words:** mushroom strains, antagonist moulds, cultivation *in vitro*.

**Resumen.** Treinta cepas de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*) cultivadas en los medios agar con extracto de malta (AEM), AEML suplementado con derivados solubles de lignina (DSL) y agar con derivados solubles de pulpa de café (APC), fueron confrontados con tres cepas de *Trichoderma* (*T. viride* y *T. reesei*). El medio de cultivo y las cepas de *Trichoderma* fueron factores determinantes de competitividad de *Pleurotus*. Las cepas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* presentaron mayor resistencia a los contaminantes, alcanzando promedios de 58.3 a 91% en los cultivos en AEML-DSL. En general, *T. viride* produjo mayor inhibición de crecimiento micelial de *Pleurotus* que *T. reesei*.

**Palabras clave:** Cepas de hongos, mohos antagonistas, cultivos *in vitro*

Received 18 August 2007; accepted 10 December 2007.

Recibido 18 de agosto 2008; aceptado 10 diciembre 2007.

## Introducción

Uno de los problemas más importantes en el cultivo comercial de *Pleurotus* es la presencia de mohos antagonistas, los cuales avanzan rápidamente durante la colonización del sustrato, produciendo metabolitos que limitan o anulan el desarrollo del hongo comestible [12]. La relación antagónica entre los mohos y el hongo comestible está aún en estudio [18], ya que se pueden encontrar desde cepas ligeramente inofensivas hasta muy dañinas, como es el caso del biotipo 4

Th4 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* [11] que ha producido pérdidas superiores al 77% en cultivos comerciales de *P. ostreatus* [8] y severos daños en cultivos de *Agaricus bisporus* [4,7,11].

*Trichoderma* es el estado asexual del género *Hypocrea*, un ascomiceto de amplia distribución que probablemente incluya más de 100 especies [10,17]. Los hongos del género *Trichoderma* tienen la capacidad de producir sustancias antifúngicas y enzimas micolíticas que favorecen la rápida invasión del sustrato y evitan el crecimiento de otros microorganismos [6,13,19]. En años recientes se ha encontrado que diversas cepas de *Pleurotus*

*Autor para correspondencia: Dulce Salmones  
dulce.salmones@inecol.edu.mx*

spp. y *Lentinula edodes* tienen la capacidad de incrementar la secreción de lacasas como un mecanismo defensivo, especialmente ante la presencia de metabolitos de *Trichoderma* [2,13]. Esta característica se ha relacionado directamente con la presencia de pigmentos de color café oscuro en el medio, formando una línea oscura en las zonas del micelio en donde hay contacto con el antagonista o sus metabolitos [15]. Si se considera que la pigmentación del medio se debe mayoritariamente a la presencia de quinonas y otras sustancias producidas durante la acción oxidativa de la lacasa, entonces esta característica defensiva de los micelios podría ser utilizada como un factor de selección de cepas *in vitro* [3, 15].

De acuerdo a lo anterior y considerando el aprovechamiento potencial que representa una selección previa de cepas en el laboratorio, en este estudio se presentan los resultados de confrontación obtenidos entre micelios de diversas especies de *Pleurotus* y *Trichoderma*, con la finalidad de determinar la variabilidad de respuesta de ambos hongos, ante la presencia de derivados solubles de lignina y pulpa de café presentes en los medios.

## Materiales y métodos

Se evaluaron 30 cepas de *Pleurotus* adscritas a las especies *P. djamor* (Fr.)Boedijn (11 cepas), *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.)Kumm. (9 cepas) y *P. pulmonarius* (Fr.)Qué. (10 cepas), las cuáles se confrontaron con 3 cepas de *Trichoderma* identificadas como *T. viride* (Pers.:S.F. Gray) (denominadas en este trabajo como *T. viride* I y *T. viride* II) y *T. ressei* (E.G. Simmons). Todos los micelios se encuentran depositados en el Cepario de Hongos del Instituto de Ecología, A.C. (WDCM 782).

Se utilizaron los medios de cultivo: agar con extracto de malta (AEM, Bioxon), agar con extracto de malta y levadura suplementado con derivados solubles de lignina

(AEML-DSL) y agar con derivados solubles de pulpa de café (APC), siguiendo la técnica descrita previamente [9]. Para la elaboración de los medios con derivados solubles de lignina y pulpa de café se prepararon suspensiones de lignina alcalina (Indulin AT, Sigma) al 0.37%, 3 g en 800 ml de agua, y de pulpa de café, previamente deshidrata y pulverizada, al 2%, respectivamente. Ambas suspensiones fueron filtradas (Whatman no. 1) y ajustadas a una concentración de fenoles hidrosolubles de 2 mMol/l. En las soluciones obtenidas se disolvieron los ingredientes restantes, extracto de levadura (2%), extracto de malta (2%) y agar bacteriológico (1.5%) [3].

Las cepas de *Pleurotus* y *Trichoderma* fueron sembradas en el medio AEM e incubadas a 28°C. Después de 7 días de incubación, un fragmento de medio de cultivo AEM, de 7 mm de Ø, con micelio de cada una de las cepas de *Pleurotus* fue colocado aproximadamente a 2 cm de la parte central de una caja de Petri con 20 ml de cada medio de cultivo. Dos días después, un fragmento de medio de cultivo AEM, de 7 mm de Ø, con micelio de cada una de las cepas de *Trichoderma* (Ø 7 mm) fue colocado a 4 cm del micelio de *Pleurotus*, previamente inoculado. En total se evaluaron 270 tratamientos (30 cepas de *Pleurotus* x 3 cepas de *Trichoderma* x 3 medios de cultivo), preparados por quintuplicado, es decir 1350 muestras. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta que los micelios de ambas especies estuvieron en contacto, lo que ocurrió en aproximadamente 2 días de incubación, entonces se realizó la primera observación de las confrontaciones al microscopio estereoscópico, marcando sobre la tapa de la caja de Petri los diámetros presentados por ambos micelios. Una semana después se realizó la segunda observación, determinando la variabilidad en respuesta de las confrontaciones con base en: 1) diámetros miceliales de las cepas de *Pleurotus* y, 2) presencia de pigmentos pardos en las zonas de confrontación. Se le asignó el valor de 2 a las condiciones donde se observó incremento en los diámetros miceliales de *Pleurotus* después de la confrontación con *Trichoderma* y además, obscurecimiento del medio de cultivo

en las zonas de contacto de los micelios; el valor 1 correspondió a las condiciones de confrontación en donde se observó al menos uno de los eventos descritos anteriormente y finalmente, el valor 0 fue asignado a las condiciones en que el micelio de *Trichoderma* detuvo el desarrollo de *Pleurotus* y/o creció sobre éste. Los valores de respuesta obtenidos fueron expresados en porcentaje. Además, se aplicó un análisis estadístico de conglomerados con la finalidad de determinar las similitudes de respuesta entre las diferentes condiciones estudiadas, empleando como índice de similitud el algoritmo de ligamiento completo.

## Resultados y discusión

Los resultados mostraron variabilidad de respuesta entre las especies de *Pleurotus* estudiadas. En promedio, las cepas de *P. djamor* presentaron los porcentajes más bajos de resistencia a la presencia de los mohos antagonistas, especialmente cuando se cultivaron en el medio AEM (0-50%), ya que bajo condiciones similares de cultivo las cepas de *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* alcanzaron valores de 33.3 a 58.3% y de 25 a 83.3%, respectivamente. En APC los porcentajes obtenidos

fluctuaron de 16.6 a 83.3% para las cepas de *P. djamor*, de 33.3 a 75% para *P. pulmonarius* y de 33.3 a 91.6% para *P. ostreatus*. En el medio de AEML-DSL, las especies de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* alcanzaron intervalos similares de resistencia, 58.3 a 91%, siendo estos valores más altos que los presentados, bajo las mismas condiciones de cultivo, por las cepas de *P. djamor* (33.3 a 58.3%).

En cuanto a las variaciones observadas entre las especies de *Trichoderma*, los cultivos de *T. ressei* fueron menos competitivos que *T. viride*, especialmente para las confrontaciones con *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* en los medios de AEML-DSL y APC (Figura 1).

De acuerdo al dendograma obtenido del análisis de conglomerados, las condiciones de respuesta más cercanas entre sí correspondieron a las cultivos de *P. pulmonarius* y *P. djamor* en el medio APC, y a las especies *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* en el medio AEML-DSL. Por el contrario, las confrontaciones de *P. djamor* realizadas en el medio AEM, presentaron las mayores distancias con el resto de las condiciones estudiadas. Realizando cuatro conglomerados, uno de ellos contuvo a las confrontaciones de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* en AEM, el segundo grupo estuvo conformado por las condiciones *P. djamor* en APC y AEML-DSL y *P.*

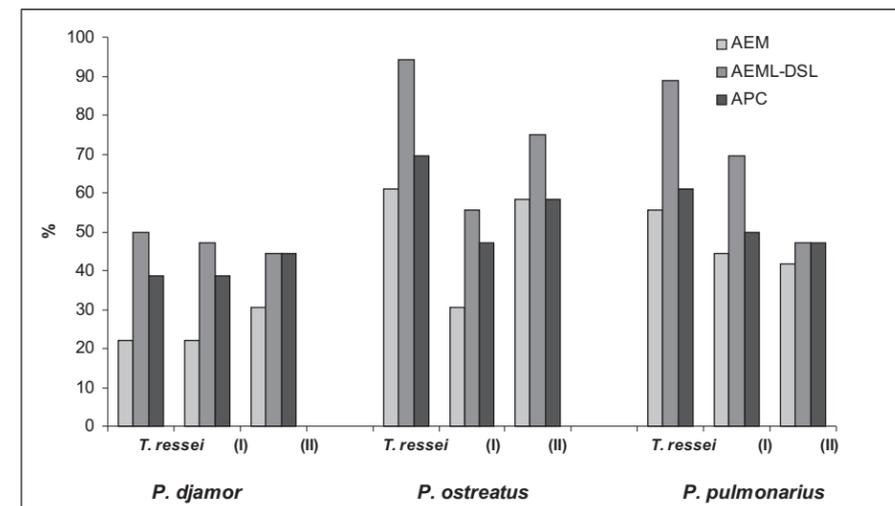


Figura 1. Porcentaje de resistencia alcanzada por las cepas de *Pleurotus* al ser confrontadas con las cepas de *Trichoderma ressei* y *T. viride* (I y II), en los diferentes medios de cultivo empleados.

*pulmonarius* en APC, el tercer grupo incluyó los cultivos de *P. ostreatus* en APC y en AEML-DSL, así como las confrontaciones de *P. pulmonarius* en AEML-DSL. Finalmente el cuarto grupo correspondió a la condición de *P. djamor* en AEM (Figura 2).

Este análisis mostró que el medio de cultivo fue un factor importante para el desarrollo de los micelios de *Pleurotus*, ya que en general las cepas de *Pleurotus* cultivadas en AEM mostraron menor resistencia que en los medios de AEML-DSL y APC. Además, en estas dos últimas condiciones, se observó más definida la línea oscura en las zonas de contacto de los micelios (Figura 3).

Como previamente se ha citado, los hongos del género *Trichoderma* presentan índices de crecimiento micelial más rápidos que las cepas de *Pleurotus* [5,20], lo que representa ya una gran desventaja para la resistencia de estos hongos y un serio problema para la industria del cultivo. En los citados trabajos, se demostró que las especies de *Trichoderma* cultivadas en AEM no pueden producir compuestos volátiles o antibióticos, por lo que la competencia sólo es por los nutrientes, afectando favorablemente el crecimiento de *Pleurotus*. Lo anterior no coincide con los resultados del presente estudio, ya que los porcentajes de

resistencia de las cepas de *Pleurotus* en AEM fueron los más bajos, con favorable crecimiento de los mohos antagonistas. Sin embargo, cuando las confrontaciones se realizaron en medios de AEML-DSL y APC, la respuesta defensiva promedio de *Pleurotus* se incrementó. Este comportamiento probablemente está relacionado con una mayor actividad enzimática de los micelios, especialmente lacasas, debido a la presencia de los derivados solubles de lignina y pulpa de café, como previamente fue reportado [5].

Consecuentemente, la producción de lacasas estaría directamente relacionada con la cantidad de quinonas presentes en el medio, así como otras sustancias con importante función en los cambios de hidrofobicidad de la pared celular [6], y en la formación de pigmentos pardos [1]. A su vez la pigmentación indicaría la presencia de compuestos de melanina involucrados en la protección de las estructuras hifales por las enzimas hidrolíticas y organismos antagónicos [13]. Es por ello que estudios recientes sugieren que las especies del género *Pleurotus*, entre otros grupos de hongos, producen lacasa como parte de un mecanismo

defensivo contra la invasión micelial ante la presencia de organismos antagonistas [14], además de colaborar en la adaptación del hongo a las condiciones desfavorables presentes en el medio ambiente [16].

Finalmente, la variabilidad en la respuesta a las diferentes condiciones evaluadas, tanto de *Pleurotus* como de *Trichoderma*, muestran una alta especialización en las estrategias defensivas de las especies involucradas, que compiten por espacio y nutrientes. Los resultados de este estudio mostraron diferencias entre las cepas y sus habilidades a adaptarse a las diferentes condiciones de cultivo estudiadas, por lo que esta información podría ser aplicada como un sistema de selección de cepas previo a la determinación de sus índices de productividad. Sin embargo, el aprovechamiento de la pulpa de café y otros substratos alternativos para el cultivo de *Pleurotus*, deberá estar fundamentado no sólo en la selección de cepas, sino además, en la optimización del tratamiento del substrato, con la finalidad de ofrecer ventajas al hongo en el proceso de colonización y aprovechamiento de los nutrientes presentes.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a las M. en C. Rosalía Pérez y Dulce Ma. Murrieta, su apoyo técnico en diferentes etapas del estudio. Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero de las autoridades del Instituto de Ecología y del CONACYT (28530-N).

## Literatura citada

1. Kaviyarasan, V., K. Natarajan, 1997. Changes in extracellular enzyme

activities during growth and fruiting of *Pleurotus cornucopidae* var. *citrinopileatus*. In: Advances in mushroom biology and production. National Research Centre for Mushroom, Solan, pp. 309-320.

- Mata, G., Murrieta Hernández, D., L. G. Iglesias Andreu, 2005. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21:143-150.
- Mata, G., Savoie, J.M., P. Delpech, 1997. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in presence of soluble lignin derivatives in solid media. Material and Organismen 31:102-122.
- Ospina-Giraldo, M.D., D.J. Royle, X. Chen, P. Romaine, 1999. Molecular phylogenetic analysis of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. Phytopathology 89:308-313.
- Pandey, M., R.P. Tewari, 1990. Antagonism of *Pleurotus sajor-caju* by some weeds fungi. Mushroom Journal for the Tropics 10:52-58.
- Rayner, A.D.M., G.S. Griffith, H. G. Wildman, 1994. Elicitors in plant and microbial metabolism-induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions: among species of higher fungi. Biochemistry Society Transactions 22:389-394.
- Royle, D.J., K. Boomer, Y. Du, M. Handcock, P. S. Coñes, C. P. Romaine, 1999. Spatial distribution of green mold foci in 30 commercial mushroom crops. Plant Disease 83:71-76.
- Royle, D.J., M.D. Ospina-Giraldo, M.R. Thon, X. Chen, P. Romaine, 1998. Potential threat of *Pleurotus* spp. production from *Trichoderma harzianum* (Th4), cause of mushroom green mold in *Agaricus bisporus*. Mushroom News 46(2):20-24.
- Salmones, D., G. Mata, 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. Revista Mexicana de Micología 21:63-69.
- Samuels, G.S., 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100:923-935.
- Samuels, G.S., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury, O. Petrini, 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94:146-170.
- Sánchez, J.E., D.J. Royle, 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus*. Limusa, México, D.F., 290 p.
- Savoie, J.M., G. Mata, 1999. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15:369-373.
- Savoie, J.M., G. Mata, C. Billete, 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and shiitake, *Lentinula edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology 49:589-597.
- Savoie, J.M., G. Mata, M. Mamoun, 2001. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot basidiomycetes and *Trichoderma harzianum* biotype Th2. Mycologia 93:243-248.
- Score, A.J., J.W. Palfreyman, N.A. White, 1997. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. International Biodeterioration and Biodegradation 39:225-233.
- Seaby, D. A., 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. Plant Pathology 45:905-912.
- Singh, S.K., V.P. Sharma, S.R. Sharma, Kumar, S., M. Tiwari, 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing green mould disease in edible mushrooms. Current Science 90:427-431.
- Velázquez-Cedeño, M.A., A.M. Farnet, E. Ferré, J.M. Savoie, 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. Mycologia 96:712-719.
- Vijay, B., H.S. Sohi, 1989. Fungal competitors of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. Mushroom Journal for the Tropics 9:29-35.

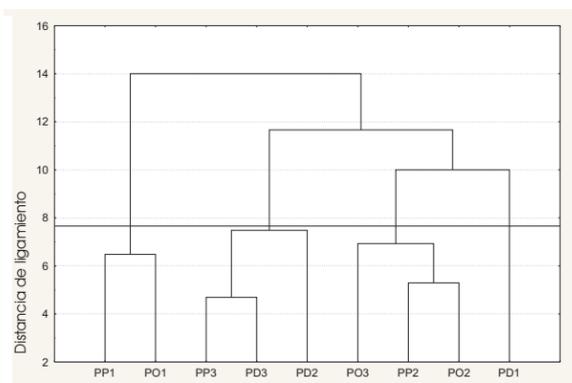


Figura 2. Dendrograma del análisis de conglomerados aplicado a las respuestas de confrontación obtenidas en las diferentes condiciones estudiadas. PD1-3: *P. djamor* creciendo en AEM, AEML-DSL y APC; PO1-3: *P. ostreatus* en AEM, AEML-DSL y APC; PP1-3: *P. pulmonarius* en AEM, AEML-DSL y APC.

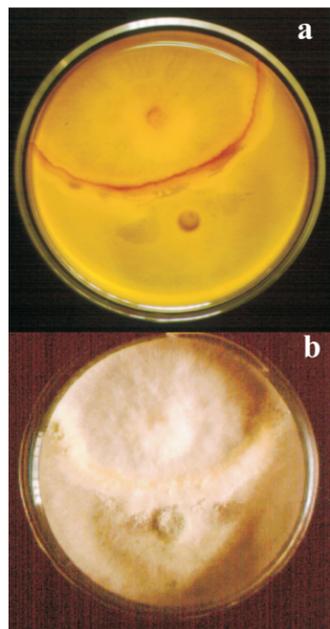


Figura 3. Formación de líneas oscuras observados en las zonas de contacto de los micelios de *Pleurotus* y *Trichoderma*, en los medios de AEML-DSL (a) y AEM (b).