

Dulce Ma. Murrieta Hernández¹

Lourdes Iglesias Andreu²

Gerardo Mata¹

¹Instituto de Ecología, Apartado Postal 63, Xalapa, Veracruz 91000, México

²Labioteca (Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada), Universidad Veracruzana
Apartado Postal 250, Xalapa, Veracruz 91001, México

Biochemical characterization of six *Pleurotus* strains

Abstract. Six strains of the *Pleurotus* genus pertaining to three species were put under electrophoretic analysis of total proteins and esterases isoenzymes, in order to characterize species and varieties from mycelia. The results respectively revealed a noticeable polymorphism in the protein composition and esterases isoenzymes of the strains in study, being observed 23 and 18 bands. The multivariate analysis of the data confirmed the taxonomic classification of strains, cradle in morphologic characteristics and tests of interbreeding. The use of the biochemical markers can constitute a fast and reliable alternative

Key words: total proteins, esterases isoenzymes, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*

Resumen. Seis cepas del género *Pleurotus* pertenecientes a tres especies fueron sometidas a análisis electroforético de proteínas totales e isoenzimas estererasas, con el propósito de caracterizar especies y variedades a partir del micelio. Los resultados revelaron un marcado polimorfismo en la composición de proteínas e isoenzimas estererasas de las cepas en estudio, observándose 23 y 18 bandas respectivamente, el análisis multivariado confirmó la clasificación taxonómica de las cepas, basada en características morfológicas y pruebas de entrecruzamiento. El empleo de los marcadores bioquímicos puede constituir una alternativa rápida y confiable.

Palabras clave: proteínas totales, isoenzimas estererasas, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*

Received 9 June 2005; accepted 18 October 2005.

Recibido 9 de junio 2005; aceptado 18 octubre 2005.

Introducción

Entre los hongos más ampliamente cultivados en el mundo se encuentran los del género *Pleurotus*. Las especies de este género se desarrollan y consumen en grandes cantidades en muchos países del sureste de Asia. Más recientemente en Europa y Norte América [21]. De acuerdo con Chang [4], la producción de *Pleurotus* spp. alcanzó en 1997, casi las novecientas mil toneladas.

La sistemática del género *Pleurotus* resulta algo confusa. Existen dificultades para la identificación taxonómica de las especies de este género. Esto se debe

*Autor para correspondencia: Dulce Ma. Murrieta Hernández,
dulcemaria_m@yahoo.com*

fundamentalmente a la gran variación y la amplia distribución que el mismo presenta [25]. Según Guzmán [10] sólo siete de las 23 especies de *Pleurotus* que han sido reportadas para México son taxa válidos, el resto son sinónimos.

Las variantes electroforéticas de proteínas totales e isoenzimas permiten caracterizar bioquímicamente las cepas analizando el patrimonio genético. Por esta vía se facilita la caracterización de las especies y variedades a partir del micelio. Esto resulta de utilidad ya que los bancos de germoplasma fúngico, conservan a los organismos en estado vegetativo [25]. Estudios genéticos en plantas han demostrado que los patrones de bandas de proteínas de reserva se heredan como características discretas [7], con un modo de expresión generalmente codominante [8, 19]. De

acuerdo a lo anterior, esta técnica puede apoyar la identificación del material bajo estudio, lo cual resulta de particular importancia en grupos taxonómicos que presentan ciertas confusiones, como ocurre con algunas especies del género *Pleurotus*. En este caso, las especies *Pleurotus pulmonarius* y *P. ostreatus* han sido separadas por distintos autores entre ellos Hilber, [14], Bresinsky *et al.* [1], Cailleux y Joly [3], Zervakis *et al.* [28], Petersen y Hughes [24], en base a un análisis conjunto de incompatibilidad y características morfológicas. Por otro lado Bunyard *et al.*, [2], lograron diferenciar molecularmente ambas especies. Otras técnicas como los análisis por RFLPs (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPD (ADN polimorfo amplificado al azar) han permitido la caracterización molecular de cepas de *Pleurotus* [17, 25]. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información sobre estudios bioquímicos en este género. Por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad potencial de los marcadores bioquímicos, específicamente proteínas totales y esterasas, para la identificación de cepas de *Pleurotus* a nivel de especie.

Materiales y Métodos

Se estudiaron seis cepas de *Pleurotus* [*P. djamor* (Fr.) Boedjin, *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. y *P. pulmonarius* (Fr.) Qué] que se encuentran depositadas en el cepario de hongos comestibles del Instituto de Ecología, A.C. Las cepas se mantuvieron en cajas Petri con medio de cultivo sólido de agar extracto de malta AEM (Bioxon) en condiciones asépticas. Posteriormente se incubaron a 28 °C siguiendo la metodología propuesta por Guzmán *et al.* [11].

El micelio de cada cepa de *Pleurotus* obtenido en cajas Petri, se separó del medio de cultivo con una varilla de vidrio, se maceró y homogenizó a 3 °C en tampón fosfato 0.2 M pH 7.5 propuesto por Laemmli [16]. Las muestras

obtenidas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada una de éstas se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

Los extractos obtenidos fueron sometidos a análisis electroforético en un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida (PAGE), según el procedimiento de electroforesis de disco descrito por Ornstein [22] y Davis [6] y adaptado a la técnica de lámina vertical de Chappel *et al.* [5]. Los geles de poliacrilamida fueron de 8.5% para la zona de separación y de 5% para la de compactación, en los electrodos se utilizó tampón de Tris-Glicina 0.04 M, pH 8.3 [15]. Las corridas se realizaron a 250 mA durante 5 h, para lo cual se empleó una fuente de poder marca Consort (modelo E863).

Para la caracterización de la composición de proteínas totales se utilizó el colorante azul de Coomassie R 250 y los sustratos alfa y beta naphthyl para revelar las isoenzimas esterasas (EC 3.1.1.2) [15]. En todos los casos se analizaron al menos dos repeticiones por cada sistema y especie en estudio. Los perfiles de bandas obtenidos se registraron sobre la base de número y posición relativa de cada banda (valor RF). Este se determinó al dividir la distancia de migración (centímetros) recorrido por la proteína, entre la distancia total de migración recorrida por la banda de Kolhträusch.

Los datos obtenidos fueron codificados en una matriz binaria. El valor 0, se asignó a los casos en los que no hubo presencia de bandas y el valor de 1 para denotar la presencia de bandas. Se utilizó el programa STATISTICA (versión 6) para el procesamiento estadístico multivariado de los datos obtenidos. Las variantes polimórficas detectadas fueron procesadas por Análisis Factorial de Correspondencias simple. Posteriormente se realizó un agrupamiento de las cepas sobre la base de su variación bioquímica por Análisis de Conglomerado. Con este fin se empleó distancia de Jaccard como índice de similitud y el algoritmo de ligamiento simple para realizar los agrupamientos [26].

Resultados

Variación en la composición de proteínas totales e isoenzimas esterasas

Los resultados de los análisis electroforéticos realizados a las seis cepas de *Pleurotus* en estudio permitieron detectar un total de 41 bandas. Para el sistema de proteínas totales se encontraron 23 bandas polimórficas, que mostraron valores Rf entre 0.09-0.81 (Figura 1a). El análisis de la composición esterasa de las seis cepas de *Pleurotus* en estudio (Figura 1b) reveló la presencia de 18 bandas polimórficas, en un intervalo de movilidad anódica (Rf) entre 0.09 a 0.89.

Análisis estadístico de la composición bioquímica

Los resultados del análisis de correspondencias efectuado a la matriz de datos conformados por las seis cepas y las 41 bandas

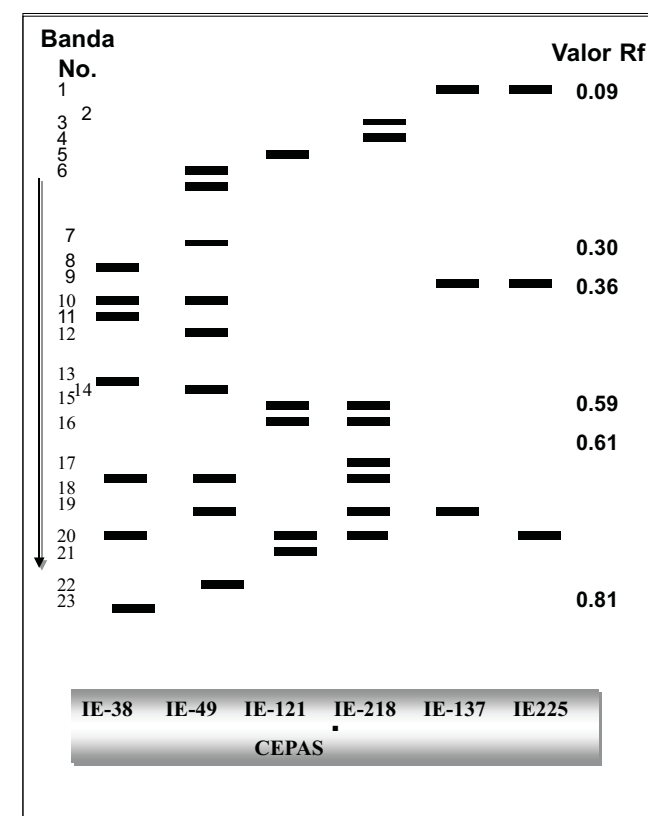


Figura 1a. Proteinograma de las seis cepas de *Pleurotus* La flecha indica la dirección de migración de las isoformas esterasas detectadas.

polimórficas detectadas, permitió constatar que los dos primeros ejes explicaron el 50.04 % de la variación detectada (Tabla 1). Esto se considera significativo si se tiene en cuenta que son variables cualitativas. Por otra parte, el análisis de los vectores propios permitió constatar que las bandas 1, 9, 15 y 16 de proteínas totales (PT) y la de Esterasa 13 (EST) fueron las que más contribuyeron a la formación de los ejes 1 y 2 respectivamente (Tabla 1). Cabe mencionar que dichas bandas sólo se observaron en 4 de las 6 cepas estudiadas.

En la Figura 2 se observa la distribución de las variantes polimórficas de proteínas totales e isoenzimas esterasas de las seis cepas de *Pleurotus* examinadas. De acuerdo con estos resultados se pudo clasificar a las cepas en tres grupos. El primero formado por las cepas IE-38 e IE-49 que pertenecen a *P. ostreatus*. El segundo conformado por las cepas IE-121 e IE-218 que corresponden a *P. djamor*. En el tercer grupo se ubicaron las cepas IE-137 e IE-225 de *P.*

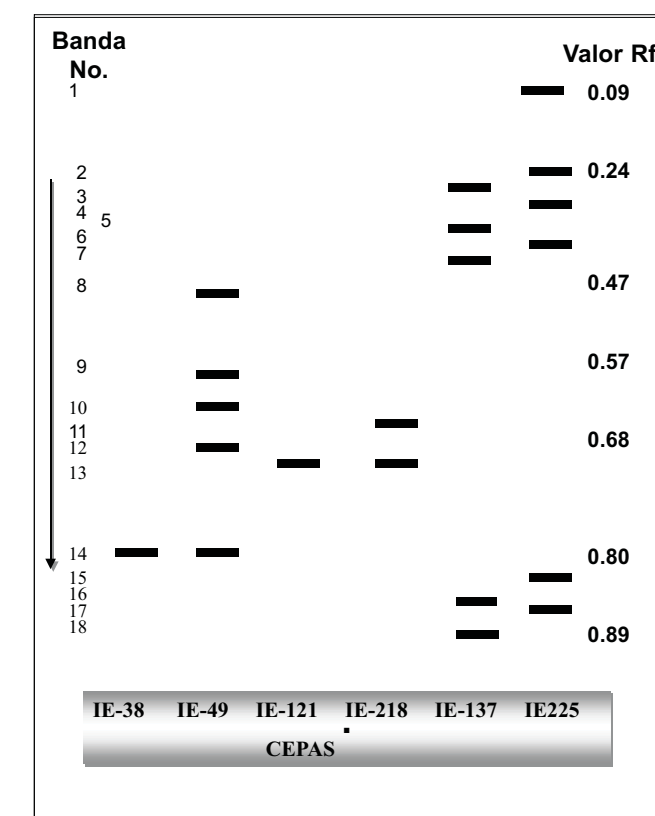


Figura 1b. Zimograma esterasa de las seis cepas de *Pleurotus* La flecha indica la dirección de migración de las isoformas esterasas detectadas.

Tabla 1. Porcentaje de la viabilidad explicada según el Análisis Factorial de Correspondencias Simple aplicado al polimorfismo isoenzimático.

E	λ_i	% Acumulado	χ^2
1	.941553	26.1115	48.75874*
2	.901469	50.0471	44.69551*

AUTOVECTORES	CALIDAD REPRESENTACIÓN	EJE 1	EJE2
PT 1	.996622	.082940	.009706
PT 9	.996622	.082940	.009706
PT 15	.910360	.001890	.106568
PT 16	.910360	.001890	.106568
EST 13	.910360	.001890	.106568

E1 y E2 : Ejes Principales. λ_i : Valor propio del i-ésimo eje. % Acumulado: Porcentaje acumulado de la variabilidad total representado en los componentes considerados. χ^2 : Valor de Chi cuadrado. (*): Significativo. Autovectores: bandas Proteínas totales (PT) isoformas esterasas (Est). Sólo se muestran los datos con calidad de representación superior a 0.90.

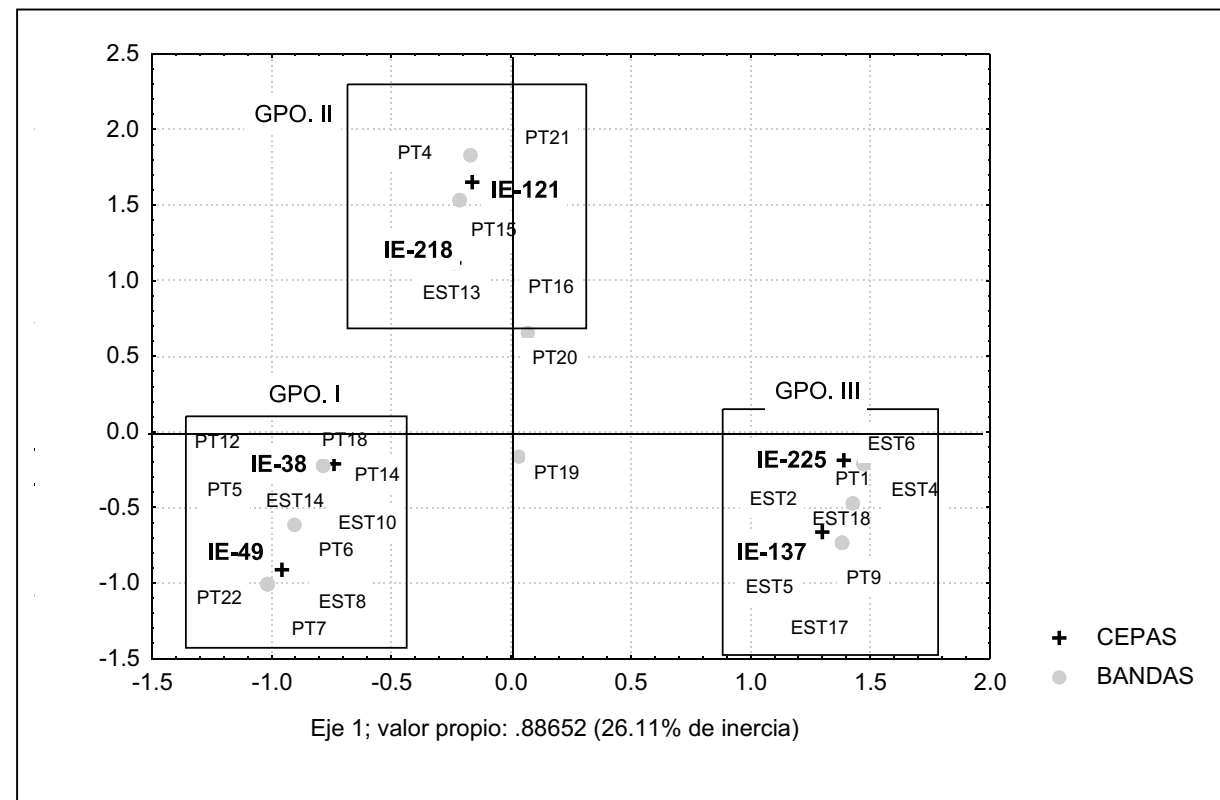


Figura 2. Representación gráfica de la distribución de las variantes de proteínas totales (PT) y esterasas (EST) de las seis cepas de *Pleurotus*.

λ_i : Valor propio del i-ésimo eje.

pulmonarius. La clasificación de las cepas de *Pleurotus*, fue confirmada mediante un Análisis de Conglomerado (Figura 3) en la que se formaron 3 grupos con 2 cepas cada uno. Se observó una mayor similitud entre las cepas IE-121 e IE-218 de *P. djamor*, las que a su vez estuvieron mas relacionadas con las cepas del grupo de *P. ostreatus*.

Discusión

Los resultados revelaron la existencia de un marcado polimorfismo en la composición proteica e isoenzimática de las seis cepas de *Pleurotus* en estudio. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Levanon *et al.*, [20], quienes al realizar un estudio similar para la selección de cepas comerciales de *Lentinula edodes*, encontraron que las

isoenzimas esterasas constituían un buen indicador de la variabilidad genética, existente entre las cepas estudiadas. Aunque desde el punto de vista molecular se han logrado notables avances en la caracterización molecular, los resultados bioquímicos obtenidos este género resultan de utilidad práctica en el cultivo de hongos comestibles. La utilización de marcadores bioquímicos como los empleados en este trabajo puede constituir una alternativa rápida, económica y confiable en relación con otras tecnologías moleculares ya establecidas.

Con estos resultados se confirma lo planteado por Zervakis y Labarère [27], Labarère y Bois [18], en relación con la utilidad de incluir a los marcadores bioquímicos para la identificación taxonómica y registro de las cepas comerciales de *Pleurotus*. Se debe destacar que entre las principales características de las isoenzimas se encuentran: su

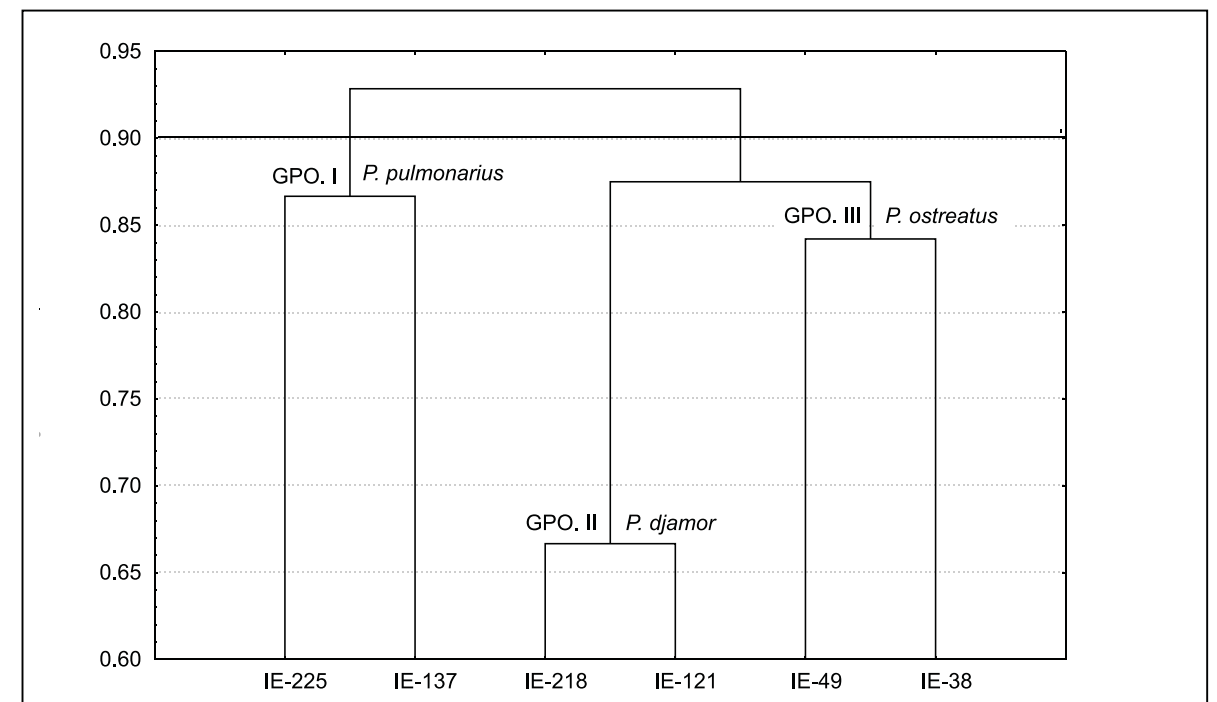


Figura 3. Dendrograma del análisis de conglomerado efectuado a los datos bioquímicos obtenidos.

simplicidad, mínima cantidad de material requerido, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 loci por especie, lo que facilita su empleo, en estudios taxonómicos, evolutivos y de mejoramiento [23].

Por otro lado los resultados de los análisis multivariados efectuados coinciden con la clasificación taxonómica de las cepas de *Pleurotus* examinadas establecida a partir de características morfológicas y entrecruzamiento [12] [13]. De igual forma coincide con lo reportado por González y Labarère [9], al analizar la secuencia de la estructura secundaria de la subunidad de RNA mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran la factibilidad de determinación de proteínas totales e isoenzimas esterasas, como apoyo para la identificación taxonómica, sin embargo, se sugiere aplicar la técnica a mayor número de cepas.

Literatura citada

- Bresinsky, A., M. Fischer, B. Meixner, W. Paulus, 1987. Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia* 79: 234-245.
- Bunyard, B. A., S. Chaichuchote, M.S. Nicholson, D.J. Royse, 1996. Ribosomal DNA analysis for revolution of genotypic classes of *Pleurotus*. *Mycological Research* 100: 143-150.
- Cailleux, R., P. Joly, 1993. Etude de quelques station epidemiques de *Pleurotus pulmonarius*. *Bulletin Societé Micologique de France* 109: 199-221.
- Chang, S. T., P.G. Miles, 2004. Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. CRC Press, Boca Ratón, pp: 203-207.
- Chappel, T., L. Iglesias, A. Barreto, F. Baisre, J.P. Simon, 1974. A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gel. *Laboratory Practice* 23: 311-312.
- Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals New York Academic Science*. 121: 321-349.
- Gepts, P., 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: Brown, H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler, B. S. Weir (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sutherland, Massachusetts. pp. 64-82.
- Gayler, K. R., G. E. Sykes, 1985. Effect of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiology*. 78: 582-585.
- González, P., J. Labarère, 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 domains. *Microbiology* 146: 209-221.
- Guzmán, G., 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetideae): diversity, taxonomic and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2: 95-123.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Vélazco, L. Guzmán-Dávalos, 1993. El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. IPN México, D. F.
- Guzmán, G., L. Montoya, D. Salmones, V.M. Bandala, 1993. Studies of the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina) II. *P. djamor* in México and in other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semindustrial culture. *Cryptogamic Botany* 3: 213-220.
- Guzmán, G., L. Montoya, G. Mata, D. Salmones, 1994. Studies in the Genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. *Micotaxon* 50: 365-368.
- Hilber, O., 1982. Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer. *Bibl. Mycol.* 87, Cramer, Vaduz.
- Iglesias, L., 1986. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis de Doctorado. Ministerio de Educación Superior. La Habana, Cuba, 232 p.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larraya, L. M., G. Pérez, M. M. Peñas, J. J. P. Baars, T. S. P. Mikosch, A. G. Pisabarro, L. Ramírez, 1999. Molecular kariotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3413-3417.
- Labarère, J., F. Bois, 2001. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. In: Sánchez, J. E., D. Royse (eds.), *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* UTHEA, México, D. F.
- Leonard, A., C. Damerval, D. De Vienne, 1988. Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimensional electrophoresis. *Genetic Research* 52: 97-103.
- Levanon, D., N. Rothschild, O. Danai, F. Masaphy, 1993. Strain selection for cultivation of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on straw. *Bioresource Technology* 45: 9-12.
- Lo, S. C., Y. S. Ho, J. A. Buswell, 2001. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia* 93: 413-421.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. background and theory. *Annals New York Academic. Science* 121: 321-349.
- Paredes, M., P. Gepts, 1995. Extensive introgression of Middle American germoplasm into Chilean common bean. *Genetic Research. and Crop Evolution* 42 :29-41
- Petersen, R. H., K. W. Hughes, 1993. Intercontinental interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and others especies. *Sydowia* 45:139-152.
- Rapamà, P., O. Dombrowska, B. Laddomada, T. De Gioia, E. Galli, U. Tomati, 2000. Approccio molecolare alla caratterizzazione di specie ed isolati del genere *Pleurotus*. *Micologia Italiana* 29: 3-12.
- Sneath, P.H.A., R.R. Sokal, 1973. *Numerical taxonomy*. Ed. Freeman & Co. San Francisco.
- Zervakis, G., J. Labarère, 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *Journal of General Microbiology* 138: 635-645.
- Zervakis, G., J. Sourdeis, C. Balis, 1994. Genetic variability and systematic of eleven *Pleurotus species* based on isozyme analysis. *Mycological Research* 98: 329-341.