

Estructuras tipo toxocistos en *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius*

Toxocyst-like structures on *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius*

Anahí Armas-Tizapantzi¹, Gerardo Mata², Laura Verónica Hernández-Cuevas³, Alba Mónica Montiel-González^{1,3}

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, Tlaxcala 90062, Tlaxcala, México.

² Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa 91073, Veracruz, México.

³ Maestría en Ciencias en Sistemas del Ambiente, Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Autopista Texmelucan-Tlaxcala Km 10.5, Ixtacuixtla 90120, Tlaxcala, México.

RESUMEN

Antecedentes: *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* producen compuestos tóxicos para nematodos y por ende potencialmente útiles para biocontrol; algunos de estos compuestos se originan en estructuras denominadas toxocistos.

Objetivo: Describir las características morfológicas de las estructuras tipo toxocisto formadas *in vitro* por *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* para contribuir al conocimiento de los caracteres morfológicos del género.

Métodos: Las cepas de *Pleurotus* se hicieron crecer en paja de trigo y en placa con agar con extracto de malta (EMA) y agar con papa y dextrosa (PDA). El micelio crecido se procesó para su observación bajo microscopía electrónica de barrido.

Resultados y conclusiones: El micelio de ambas especies, desarrollado en ambos sistemas, produce estructuras esféricas, pediceladas, morfológicamente similares. Aunque la morfología de estas estructuras es similar a las de los toxocistos descritos previamente para estas especies y para otras de *Pleurotus*; se consideran como estructuras tipo toxocistos en tanto no se corrobore la producción de compuestos nematotóxicos y sus funciones.

Palabras clave: morfología, MEB, cultivo en paja, cultivo en placa

ABSTRACT

Background: *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* produce some toxic metabolites for nematodes, and potentially useful for biocontrol. These compounds are produced in toxocysts.

Objective: To describe the morphological features of the toxocyst-like structures *in vitro* produced by *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* to contribute to the knowledge of the morphological characters of the genus.

Methods: Wheat straw, besides malt extract agar (EMA) and potato dextrose agar (PDA) media were used for *Pleurotus* strains growing. The mycelia were processed for observation through scanning electronic microscopy.

Results and conclusions: Both species mycelia, on straw and plate culture, produce abundant spherical, stalked structures. Although these structures are morphological similar and look like the toxocysts previously found on these and other species of *Pleurotus*, they are considered as toxocyst-like structures until the production nematotoxic compounds and their functions being corroborate.

Keywords: morphology, SEM, straw culture, plate culture

Los hongos destacan en el ámbito de la biotecnología debido a la gran cantidad y variedad de metabolitos como ácidos orgánicos, antibióticos y enzimas entre otros, que se obtienen de ellos (Royse y Sánchez, 2017). Como en otros organismos, la búsqueda de más y mejores metabolitos, que por la diversidad de sus propiedades muestren potencial para beneficio hu-

mano, implica someterlos a diferentes condiciones de prueba (Verma *et al.*, 2011). Si bien esta práctica busca incidir en la manifestación fenotípica de capacidades específicas, por ejemplo, una mejora en la síntesis de enzimas de importancia en biorremediación, es importante registrar los cambios morfológicos que puedan resultar o no a consecuencia de las condiciones proba-

ARTICLE HISTORY

Received 22 May 2019 / Accepted 15 July 2019

Published on line: 08 August 2019

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Alba Mónica Montiel-González, amonicamg@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-0672-8556

das. No obstante, para detectar si existen o no cambios, es indispensable contar con un conocimiento amplio sobre las características y las propiedades basales de los hongos seleccionados, es decir, previas a la experimentación; esto es de suma importancia cuando la investigación muestra posibles relaciones entre una o varias estructuras y las funciones a evaluar. Este es el caso de los hongos del género *Pleurotus*, que secretan diversas enzimas, como las lacasas, que se ha propuesto están involucradas en mecanismos de degradación de compuestos ligninocelulósicos (Royse y Sánchez, 2017; Royse et al., 2017) con diferentes aplicaciones biotecnológicas (Arora y Sharma, 2010; Viswanath et al., 2014) y relacionadas con la capacidad de defensa del hongo ante interacciones antagónicas con otros organismos que pueden ser nematodos como *Meloidogyne javanica* (Heydari et al., 2006) u otros hongos; *Trichoderma harzianum* (Velázquez-Cedeño et al., 2008), por citar un ejemplo, mediante los que pueden repeler a diferentes competidores o bien obtener recursos. Sobre este último aspecto se ha documentado que para complementar su nutrición distintas especies del género *Pleurotus*: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae* y *P. ferulae* (Barron y Thorn, 1987; Kwok et al., 1992; Stadler et al., 1994; Heydari et al., 2006; Li et al., 2007) por citar algunas, obtienen suplementos de nitrógeno a partir de nematodos, entre los que se encuentran *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne javanica* y *Bursaphelenchus xilophilus* (Kwok et al., 1992, Stadler et al., 1994; Heydari et al., 2006; Li et al., 2007). Este proceso se lleva a cabo por medio de las nematotoxinas que produce el hongo, que inmovilizan al contacto al nematodo presente y posteriormente el micelio del hongo invade con sus hifas los orificios corporales del nematodo hasta que finalmente, se alimenta de él para obtener los nutrientes (Barron y Thorn, 1987; Truong et al., 2007; Balaeş y Tănase, 2016, Royse y Sánchez, 2017), esta actividad contra nematodos tiene gran importancia desde el punto de vista agrícola y pecuario incluso en el biocontrol de plagas ya que también se menciona su acción en algunos insectos y en otros hongos (Kwok et al., 1992) rasgo biológico que los hace atractivos para el biocontrol. Entre los metabolitos secundarios responsables de dicha acción están el ácido trans-2-decenedioico (Kwok et al., 1992) producido por *P. ostreatus*; el ácido s-coriolico, el ácido linoleico, el p-anisalaldehído, el alcohol p-anisílico,

1-(4-metoxifenil)1, 2-propanediol y el 2-hidroxi-(4-metoxi propiofenona) por *P. pulmonarius* (Stadler et al., 1994) y ácidos grasos como pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico, octadecanoico y el terpeno β -sistosterol por *P. djamor* (Pineda-Alegría et al., 2017). No obstante, la importancia de estos metabolitos, sólo en unos cuantos casos se ha evidenciado que son producidos en zonas específicas de las hifas, diferenciadas morfológicamente para formar estructuras especializadas (Barron y Thorn, 1987; Kwok et al., 1992), denominadas toxocistos (Clemençon, 1994 fide Truong et al., 2007). En los estudios mencionados se reconoce una relación entre dichas estructuras con la producción de los diversos compuestos con acción nematocida, no obstante, poco se ha descrito respecto a la presencia y a la morfología de las estructuras que producen dichos compuestos en las diferentes especies de *Pleurotus*.

El propósito de este estudio es proporcionar información morfológica detallada de las estructuras producidas *in vitro* por el micelio de *P. ostreatus* y por el de *P. pulmonarius*, que sirva como base para determinar el efecto de diferentes pruebas experimentales sobre los rasgos morfológicos y funcionalidad en ellos. Estos resultados forman parte de un estudio encaminado a generar conocimientos sobre el papel de las lacasas en la diferenciación morfológica en *Pleurotus*.

Se estudiaron tres cepas del género *Pleurotus*, dos cepas de *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (cepa PoB, de la Colección del Laboratorio Institucional del Hongos, Universidad Autónoma Chapingo, México, y cepa IE 240, del Cepario de Hongos Comestibles del Instituto de Ecología, A.C.) y una cepa de *P. pulmonarius* (Fr.) Quéf. (cepa IE 115, del Cepario de Hongos Comestibles del Instituto de Ecología, A.C.). Las cepas *P. ostreatus* PoB y *P. pulmonarius* IE 115 se hicieron crecer en paja de trigo contenida en cristalizadores (10 x 5 cm; esterilizada por 20 min a 21 psi y 121 °C; incubada en oscuridad durante nueve días a 25 °C, tiempo en el que se observó la invasión completa del sustrato, mientras que las dos cepas de *P. ostreatus* se desarrollaron en placas con los medios de cultivo de agar con extracto de malta (EMA) (cepa PoB) y agar con papa y dextrosa (PDA) (cepa IE 240) (esterilizados por 15 min a 21 psi y 121 °C; incubadas en oscuridad por 15 días a 25 °C). Muestras de micelio de la parte central interna de los cristalizadores y de la zona intermedia de crecimiento de los hongos en las placas, se observaron al

microscopio electrónico de barrido (JEOL-JSM 5600 LV), en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Ecología A.C. Todas las muestras fueron liofilizadas a bajo vacío, colocadas en un soporte fijo y recubiertas con oro-paladio como revestimiento conductor (Denton Vacuum DESK V®), obteniéndose fotografías digitales de las observaciones a diferentes aumentos. Las cepas de *P. ostreatus* (Figura 1a-b, d-f) presentaron estructuras tipo toxocisto abundantes, producidas lateralmente sobre las hifas. Las estructuras tipo toxo-

cisto son estipitadas; esféricas, de 2.4-4.75 μm de diámetro, con superficies lisas a rugosas, con base cónica; estípote subcilíndrico, de 0.5 μm de diámetro en la parte media a 0.75 μm en la base y en el ápice, ocasionalmente cónico-aplanado, de 1.4 μm en la base a 0.4 en el ápice, de 1.3-1.9 μm de largo.

La cepa de *P. pulmonarius* (Figura 1c, g) desarrolló estructuras tipo toxocisto escasas, producidas lateralmente sobre las hifas. Las estructuras tipo toxocisto son estipitadas; esféricas, de 3.2-3.5 μm de diámetro,

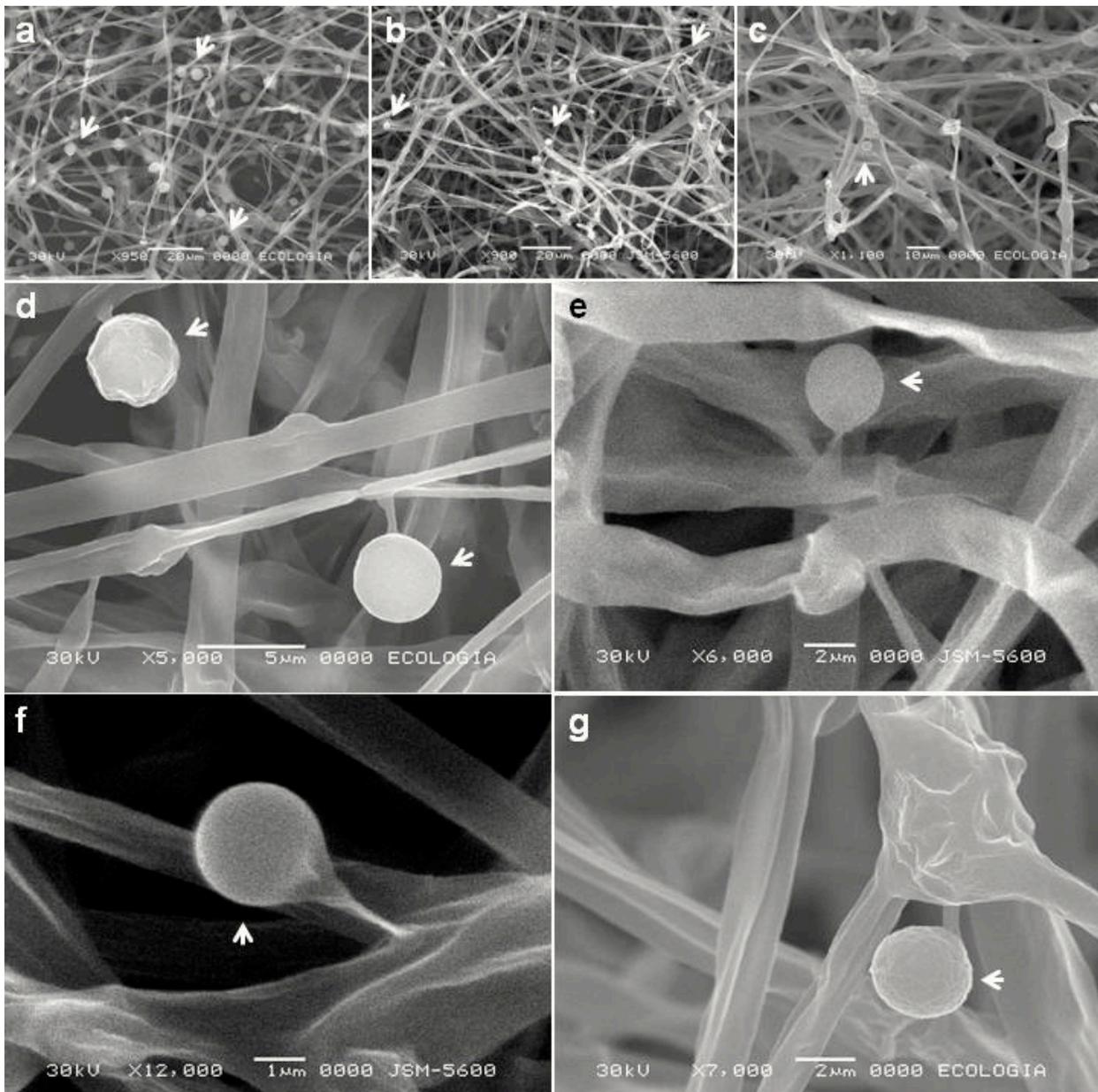


Figura 1. Estructuras tipo toxocistos en las hifas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius*. a: Cepa PoB de *P. ostreatus* cultivada en paja de trigo. b: Cepa IE 240 de *P. ostreatus* en placa con PDA. c: Cepa IE 115 de *P. pulmonarius* en paja de trigo. d: Cepa PoB de *P. ostreatus* en paja de trigo. e: Cepa PoB de *P. ostreatus* en placa con EMA. f: Cepa IE 240 de *P. ostreatus* en placa con PDA. g: Cepa IE 115 de *P. pulmonarius* en paja de trigo. Las flechas señalan las estructuras tipo toxocistos.

con superficies rugosas, con base cónica; estípites subcilíndricos, de 0.5 µm de diámetro en la parte media a 0.6 µm en la base y en el ápice, de 0.8-1 µm de largo. *P. ostreatus* produjo más estructuras tipo toxocistos en paja de trigo (Figura 1a) que en placa (Figura 1b), situación similar a la registrada por Kwok *et al.* (1992) para la misma especie y sustrato de crecimiento. La morfología de las estructuras tipo toxocisto fue parecida en ambos sustratos (Figura 1d-f) con dimensiones dentro de los intervalos de tamaño reportados por Barron y Thorn (1987) para *P. ostreatus* en estructuras similares descritas como "minute spathulate secretory cells": 1.5-3.0 (5 µm) de largo, con un estípite de 0.5 µm de longitud. Por su parte, para esta misma especie, Plotnikova *et al.* (2014) registraron toxocistos redondeados, de apenas 1 µm de diámetro, muy pequeños con respecto a los encontrados en este estudio.

En el micelio de *P. pulmonarius* crecido en placa se produjeron pocas estructuras tipo toxocistos, todas con apariencia rugosa (Figura 1c, g). Para esta especie Kamzolkina *et al.* (2006) ilustraron estructuras similares a los toxocistos, a las que denominaron "head-like offshoots", pequeños (1.9-3.1 µm de diámetro), esféricos y estipitados como los encontrados, aunque no rugosos. Es probable que esta diferencia sea producto de la variación morfológica propia de la especie y que esté asociada con el origen de las cepas (americana vs. europea), ya que análisis de las regiones ITS del ADN en *P. pulmonarius* han mostrado divergencia genética entre poblaciones de diferentes continentes en el hemisferio norte (Vilgalys y Sun, 1994). No obstante, también existe la posibilidad de que sea un efecto de inmadurez, como el registrado por Truong *et al.* (2007) para los toxocistos de *P. cystidiosus* subesp. *abalonus*, los que adquieren volumen y turgencia a medida que maduran. En las tres cepas estudiadas las estructuras tipo toxocisto se detectaron en micelio aéreo. Este comportamiento fue reportado por Barron y Thorn (1987) para estructuras similares en *P. ostreatus* y por Truong *et al.* (2007) para *P. cystidiosus* subesp. *abalonus*.

La diferenciación hifal en hongos en sistemas *in vitro* es un fenómeno poco conocido; esta escasez de información ha llevado, entre otras cosas, a problemas nominales y conceptuales, los que podrían eliminarse al sumar características que describan aspectos morfológicos y funcionales bajo diferentes condiciones experimentales. Al respecto, Truong *et al.* (2007) al

estudiar la morfogénesis de los toxocistos en *P. cystidiosus* subgen. *abalonus* observaron la ausencia de celularidad y la frecuente carencia de núcleos, por lo que propusieron que son estructuras del tipo de los blastoconidios, pero no blastoconidios, aunque al mismo tiempo señalaron que la presencia de núcleos en algunos toxocistos podría indicar que son blastoconidios vestigiales. Aunque los resultados de este trabajo conducen a proponer que las estructuras formadas *in vitro* por las cepas de *P. ostreatus* y de *P. pulmonarius*, podrían corresponder con los toxocistos descritos por otros autores dada su gran similitud, se considera imprescindible determinar su capacidad de producción de uno o de varios de los compuestos nematotóxicos que se producen en las estructuras reconocidas como toxocistos y su papel en fenómenos de antagonismo y de nutrición. La información generada con este estudio servirá de base para determinar cómo, cuánto y en dónde la modificación de diferentes condiciones de crecimiento puede incidir en la expresión fenotípica de los hongos del género *Pleurotus*, así como a un mejor y más claro entendimiento de estos hongos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el fondo para Ciencia Básica SEP-CONACYT con el proyecto "Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono" No. 167759. Así mismo Anahí Armas Tizapantzi recibió una beca de posgrado de CONACYT (208531).

LITERATURA CITADA

- Arora, D.S., R.K. Sharma, 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760-1788. DOI 10.1007/s12010-009-8676-y
- Balaş, T., C. Tânase, 2016. Basidiomycetes as potential biocontrol agents against nematodes. *Romanian Biotechnology Letters* 21: 11185-11193.
- Barron, G.L., R.G. Thorn, 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany* 65: 774-778. DOI 10.1139/b87-103
- Heydari, R., E. Pourjam, E.M. Goltapeh, 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica in vitro*. *Plant Pathology Journal* 5(2): 173-177.
- Li, G., X. Wang, L. Zheng, L. Li, R. Huang, K. Zhang, 2007. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. *Annals of Microbiology* 57(4): 527-529.
- Kamzolkina, O.V., A.N. Grishanina, E.V. Pancheva, V.N. Pancheva, M.V. Kozlova, 2006. Micromorphological features of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. and *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. strains in pure and binary culture with yeast. *Tsitologija* 48(2): 153-160.

- Kwok, O.C.H., R. Plattner, D. Weisleder, D.T. Wicklow, 1992. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology* 18(2): 127-136. DOI 10.1007/BF00993748
- Nath, A., S.K. Patyal, V.P. Sharma, 1999. Nematicidal principle from the fungus *Pleurotus sajor caju*. *Current Science* 76(7): 870.
- Pineda-Alegría, J.A., J.E. Sánchez-Vázquez, M. González-Cortazar, A. Zamilpa, M.E. López-Arellano, E.J. Cuevas-Padilla, P. Mendoza-de-Gives, L. Aguilar-Marcelino, 2017. The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food* 20: 1184-1192. DOI 10.1089/jmf.2017.0031
- Plotnikova, J., O.V. Kamzolkina, F.M. Ausubel, 2014. A new model system for the study of the animal innate immune response to fungal infections. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 69(2): 45-69. DOI 10.3103/S0096392514020114
- Royse, D.J., J.E. Sánchez, 2017. Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. In: Sánchez, J.E., Royse, D.J. (eds.). *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, México. Pp. 17-25.
- Royse, D.J., J. Baars, Q. Tan, 2017. Current overview of mushroom production in the world. In: Cunha, Z.D., Pardo-Giménez, A. (eds.), *Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications.* Wiley Blackwell, West Sussex, England. Pp. 5-13. DOI 10.1002/9781119149446.ch2
- Stadler, M., A. Mayer, O. Sterner, 1994. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes. *Planta Medica* 60(2): 128-132. DOI 10.1055/s-2006-959433
- Truong, B.-N., A. Suzuki, B.-N. Truong, K. Okazaki, T. Fukiharu, Y. Takeuchi, K. Futai, X.-T. Le, A. Suzuki, 2007. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. *Mycoscience* 48: 222-230. DOI 10.1007/S10267-007-0358-4
- Velázquez-Cedeño, M., A.M. Farnet, G. Mata, J.-M. Savoie, 2008. Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates. *Bioresource Technology* 99: 6966-6973. DOI 10.1016/j.biortech.2008.01.022
- Verma, A.S., S. Agrahari, S. Rastogi, A. Singh, 2011. Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 3: 321-323. DOI 10.4103/0975-7406.84430
- Vilgalys, R., B.L. Sun, 1994. Ancient and recent patterns of geographical speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 91: 4599-4603. DOI 10.1073/pnas.91.10.4599
- Viswanath, B., B. Rajesh, A. Janardhan, A.P. Kumar, G. Narasimha, 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research Volume 2014, Article ID 163242.* DOI 10.1155/2014/163242