

Uso de Lacasa y Tirosinasa en Estudios Taxonómicos de algunos Macromicetos

DE AGUASCALIENTES

M.C. Lidia Marisela Pardavé Díaz ¹
 Biól. Verónica L. Callejas Hernández ²

RESUMEN

Dentro de la familia Boletaceae, se encuentran los géneros *Boletus*, *Suillus*, *Xerocomus*, *Tylopilus* y *Strobilomyces* que incluye especies consideradas venenosas como *Boletus satanicus*, parásitas como *B. parasiticus*, comestibles como *B. pinicola* y varias especies micorrícicas. *Suillus* también llamado "hongo porcino" incluye varias especies micorrícicas y comestibles. *Ganoderma lucidum* y *G. tsugae* son dos Basidiomycotina que causan la pudrición blanca de la raíz de muchas especies de árboles en Norteamérica. *Ganoderma lucidum* causa la muerte o decoloración de madera dura, *G. tsugae* causa el decaimiento de coníferas. La *tirosinasa* es una enzima importante para la melanogénesis y la *lacasa* es una enzima asociada a la biodegradación de la lignina en los hongos causantes de la pudrición blanca, ambas enzimas en los últimos años han sido utilizadas en la identificación de varios grupos. Durante 2001 y 2002 se realizaron 31 colectas en quince localidades de los municipios de Aguascalientes, Calvillo y San José de Gracia, identificándose veintiséis y treinta y cinco especies el primer y segundo año respectivamente. Además de las características macroscópicas y microscópicas utilizadas comúnmente para la identificación, se realizaron pruebas macroquímicas, las cuales se empiezan a utilizar en estudios taxonómicos a nivel nacional. En el primer año de colecta cinco especies



Figura 1. *Boletus frostii*. Especie comestible que presentó tirosinasa y lacasa.

presentaron tirosinasa, una lacasa, trece tirosinasa y lacasa y siete ninguna de las dos enzimas, en el segundo, nueve especies presentaron tirosinasa, tres lacasa, trece tirosinasa y lacasa y diez ninguna de las dos enzimas. La especie más abundante en 2001 fue *Ganoderma curtisii* y en 2002 fue *G. colosum*. La mayor cantidad de especies fueron encontradas en los Alisos y Sierra El Laurel. De las especies colectadas el 69% fueron comestible, el 22% micorrícicos, el 5% no comestibles, el 2% parásitos, y el 2% tóxicos.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de identificación tradicionales se basan en aspectos macroscópicos como forma tamaño y color del píleo, estípito y anillo, así como características microscópicas de ascosporas, basidiosporas y cistidios entre otros.

¹ Profesor investigador del Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas, Tel. 01 (449) 910-84-03
 E-mail: lpardave@correo.uaa.mx

² Técnico UAA.

El uso de esos parámetros frecuentemente crea confusiones en géneros y especies, por ello es conveniente utilizar parámetros como las pruebas macroquímicas que iniciaron en 1986 en Estados Unidos y aproximadamente hace cinco años en México. Las pruebas macroquímicas basadas en la detección de las feniloxidasas como la lacasa y la tirosinasa pueden ser parámetros más precisos para mejorar la identificación mediante la creación de perfiles taxonómicos como un complemento a la identificación tradicional.

Dentro de la familia Boletaceae, podemos encontrar a *Boletus*, *Suillus*, *Xerocomus*, *Tylopilus* y *Strobilomyces*. Marr (1979) comparó la efectividad de oxidación de la lacasa y la tirosinasa para 6 reactivos usados comúnmente en pruebas macroquímicas (p-cresol, guaiaco, guaiacol, 1-naftol, fenol y pirogalol). Dicha efectividad de oxidación se determinó correlacionando los resultados de las pruebas identificadoras de las feniloxidasas (que usan siringaldacina y L-tirosina como sustrato) con otras 6 pruebas macroquímicas. La siringandazina es un sustrato ideal para lacasa por que no reacciona con la tirosinasa ni se autooxida o produce peróxidos. La L-tirosina se considera generalmente como el sustrato más específico de la tirosinasa y es usada en los ensayos estándar para esta enzima, ya que no es oxidada por la lacasa ni por peroxidasas a melaninas. De esta manera, las pruebas con siringaldacina y tirosina fueron indicadores específicos para la lacasa y la tirosinasa, y esas pruebas fueron usadas para detectar y diferenciar la oxidación por la lacasa y la tirosinasa que se llevó a cabo con los otros 6 reactivos. Las pruebas macroquímicas con pirogalol, guaiaco y guaiacol indicaron que estos reactivos no son específicos para la lacasa ni para la tirosinasa; sin embargo, el guaiaco y el guaiacol fueron más efectivamente oxidados por la lacasa que por la tirosinasa. El 1-naftol fue específico para la lacasa, pero algunos tipos de actividad de ésta no fueron detectados por dicho reactivo. El fenol y el p-cresol fueron específicos para la tirosinasa. También en dicho estudio se advirtió que para la mayoría de los reactivos la más grande diferenciación entre las dos oxidasas ocurre dentro de los primeros 15 minutos de los 30 totales que duraban las pruebas. Se constató que existen factores que influyen a la especificidad del sustrato como el pH, la existencia isoenzimas y la interferencia potencial de peroxidasas.

Marr *et al* (1986) utilizaron una metodología mucho más precisa para la creación de perfiles taxonómicos más completos de las mismas feniloxidasas, usando controles, secciones radiales de los basidiocarpos, realizando pruebas ontológicas, utilizando reactivos específicos ya conocidos y por estimación cuantitativa de áreas reactivas por evaluación de patrones establecidos. Los resultados de las pruebas indicaron que las variaciones en el sitio o año de colecta, así como la maduración del esporocarpio no son significativas respecto al patrón de distribución de las feniloxidasas, aumentando así el potencial taxonómico de las pruebas de detección de lacasa y tirosinasa.

La lacasa y la tirosinasa están implicadas en un gran número de actividades fisiológicas y ecológicas. Estudios ecológicos de descomposición microbiana de la madera y el humus han sido llevados a cabo con sustratos fenólicos. Un nuevo uso para estas pruebas es su aplicación en estudios morfogenéticos. La localización de la lacasa y la tirosinasa varía entre las especies y durante la ontogenia dentro de algunas especies. Estas variaciones son indudablemente de importancia morfogenética asociada con muchos procesos, como la pigmentación y la fructificación.

La lacasa, por otro lado, está asociada con la biodegradación de lignina. La degradación de la lignina no ocurre predominantemente por un ataque hidrolítico que libera monómeros en solución, como la digestión de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, sino que es un proceso oxidativo con la división de anillos aromáticos que ocurre exomolecularmente antes de la destrucción de la red polimérica de la molécula de lignina. La lacasa, una fenol oxidasa exocelular, es producida en alguna cantidad por los hongos que causan pudrición blanca y juega un papel crítico en la desintegración de la lignina por estos hongos (Griffin, 1981).

El objetivo de la presente investigación fue la identificación de algunos macromicetos utilizando parámetros microscópicos y macroscópicos, así como pruebas macroquímicas para detectar lacasa y tirosinasa como una alternativa complementaria en la identificación tradicional. Los estudios sobre las pruebas macroquímicas son escasos a nivel nacional por ello se considera que los resultados derivados de esta investigación pueden ser de utilidad para otros estudios.



Figura 2. *Boletus edulis*. Especie comestible que presentó tirosinasa.



Figura 3. *Ganoderma curtisii*. Especie más abundante en el año 2001, es destructora de madera y resultó positiva a tirosinasa y lacasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre junio a octubre de 2001, se muestrearon doce localidades de los municipios de San José de Gracia y Calvillo, de julio a septiembre de 2002 se muestrearon doce localidades de los municipios de Aguascalientes, San José de Gracia y Calvillo.

Se utilizó azul de algodón en lactofenol, para resaltar la observación de esporas, fibulas, pleurocistidios, retícula del estípite, basidios, tejidos del velo, y esporadas.

La identificación se llevó a cabo con ayuda de claves y citas bibliográficas de Andrade *et al* (1986), González-

Velásquez (1993), Pardavé (1990), Pacioni (1982), Lange *et al* (1976), Gerhardt (2000).

Para las pruebas macroquímicas, se realizaron pequeños cortes del ápice del estípite y del contexto del disco pileal de 5-10 mm de diámetro y 2mm de grueso. Los cortes fueron tratados durante 0, 5, 10, y 15 minutos con agua destilada, etanol al 95 %, fenol, guaiacol, l-naftol, siringaldacina y pirogalol. Las dos primeras sustancias corresponden a los controles.

Tulloss (1996) menciona como la lacasa y tirosinasa, al oxidar algunos reactivos ocurren cambios de coloración en las pruebas positivas.

La prueba positiva de guaiacol es de color rojo, rosa o café rojizo, el l-naftol es de color violeta a púrpura oscuro, el fenol de rojo a café violeta, el pirogalol de amarillo hasta café anaranjado, l-tirosina de rojo oxidado a café rojizo y la siringaldacina de rosa a violeta rojizo

RESULTADOS

Se identificaron 40 ejemplares a nivel específico y 3 a nivel genérico; 36 especies pertenecen al orden Agaricales, 5 a Ganodermatales y 2 a Hymenochaetales (Cuadro 1).

Durante el primer año se colectaron 26 especies en 12 localidades de los municipios de Calvillo y San José de Gracia. (Cuadro 1).

De las 26 especies colectadas en 2001, 9 correspondieron a *Boletus*, 4 a *Ganoderma*, 3 a *Tylopilus*, 2 a *Xerocomus*, 2 a *Porphyrellus*, 1 a *Boletellus*, 1 a *Leccinum*, 1 a *Gyrodon*, 1 a *Strobilomyces*, 1 a *Suillus* y 1 a *Phellinus*. (Fig. 1,2,4)

Durante el segundo año se colectaron 35 especies en 11 localidades de los municipios de Aguascalientes, Calvillo y San José de Gracia. (Cuadro 1).

CUADRO 1. Resultados de las pruebas macroquímicas en especies colectadas durante 2001 y 2002.

	2001	2002
CLASE HOLOBASIDIOMYCETES		
Subclase Hymenomycetidae		
Orden Agaricales		
Familia Boletaceae		
<i>Boletellus ananas</i>	—	TL
<i>B. betula</i>	NC	—
<i>B. russelii</i>	T	NC
<i>Boletus Atkinsonianus</i>	T	TL
<i>B. aestivalis</i>	T	TL
<i>B. calopus</i>	NC	TL
<i>B. edulis</i>	T	—
<i>B. erythropus</i>	T	NC
<i>B. flammans</i>	L	—
<i>B. frostii</i>	TL	NC
<i>B. griseus</i>	NC	T
<i>B. impolitus</i>	NC	L
<i>B. luridus</i>	NC	TL
<i>B. parasiticus</i>	NC	T
<i>B. pinicola</i>	TL	NC
<i>B. regius</i>	—	TL
<i>B. sp</i>	NC	TL
<i>Gyrodon merulioides</i>	TL	NC
<i>G. monticola</i>	NC	TL
<i>Gyroporus castaneus</i>	NC	T
<i>Leccinum quercinum</i>	TL	TL
<i>L. scabrum</i>	NC	TL
<i>Porphyrellus gracilis</i>	TL	NC
<i>P. porphyrosporus</i>	TL	NC
<i>Strobilomyces floccopus</i>	NC	T
<i>Strobilomyces strobylaceus</i>	—	—
<i>Suillus brevipes</i>	—	NC
<i>S. granulatus</i>	NC	T
<i>S. tomentosus</i>	NC	L
<i>S. variegates</i>	NC	—
<i>Tylopilus balouii</i>	TL	TL
<i>T. eximius</i>	TL	TL
<i>T. felleus</i>	TL	T
<i>T. sp</i>	NC	T
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	—	—
<i>X. spadiceus</i>	TL	—
Orden: Ganodermatales		
Familia: Ganodermataceae		
<i>Amauroderma</i>	NC	—
<i>Ganoderma colosum</i>	—	L
<i>G. curtisii</i>	TL	TL
<i>G. lucidum</i>	—	T
<i>G. sessile</i>	TL	—
Orden : Hymenochaetales		
Familia: Hymenochaetaceae		
<i>Phellinus gilvus</i>	TL	—
<i>P. pomaceus</i>	NC	T
POSITIVA A TIROSINASA (T)	NO COLECTADO	(NC)
POSITIVA A LACAS (L)	NO HAY TIROSINASA NI LACASA	(—)



Figura 4. *Gyrodon merulioides*. Especie comestible que resultó positiva a tirosinasa y lacasa

De las 35 especies colectadas en 2002 11 pertenecieron a *Boletus*, 4 a *Tylopilus*, 4 a *Ganoderma*, 3 a *Suillus*, 2 a *Boletellus*, 2 a *Strobilomyces*, 2 a *Leccinum*, 2 a *Xerocomus*, 1 a *Gyroporus*, 1 a *Phellinus*, 1 a *Amauroderma*, y 1 a *Gyrodon*.

De las especies colectadas el primer año 5 especies presentaron tirosinasa, una lacasa, trece tirosinasa y lacasa y siete ninguna de las dos enzimas. Mientras que el segundo año nueve especies presentaron tirosinasa, tres lacasa, trece tirosinasa y lacasa y diez ninguna de las dos enzimas. (Cuadro 1).

La especie más abundante en 2001 fue *Ganoderma curtisii* (Fig 3) y en 2002 fue *G. colosum*.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden de manera general con lo reportado en la literatura.

Boletus betula, *Strobilomyces strobilaceus*, *Suillus brevipes*, *S. granulatus*, *S. variegatus*, *Xerocomus chrysenteron* y *Amauroderma* corresponden al grupo I negativo sin lacasa, ni tirosinasa como menciona Tulloss.

Boletus edulis, *B. flammans*, *Tylopilus eximius*, *T. felleus* y *Leccinum scabrum* corresponden al grupo II tirosinasa dominante en el que la reacción es tres veces más grande que la de la lacasa. La

presencia de basidiocarpos coloreados indica que la tirosinasa es una enzima relacionada con la melanogénesis según Tulloss y Marr.

La tirosinasa y la lacasa tienen una distribución amplia en diferentes familias de los *Basidiomycotina* estudiados en la presente investigación. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Marr.

La reacción positiva con la siringaldazina detecta la presencia de lacasa, enzima implicada en la degradación de la lignina. Algunas especies lignícolas como *Ganoderma colosum*, *G. curtisii* y *G. sessile* presentaron lacasa coincidiendo con lo mencionado por Marr y colaboradores.

Otras especies no pudieron ser comparadas por que los patrones de distribución de las enzimas no se encuentran completos. Lo anterior resalta la importancia de realizar estudios en los cuales se completen los patrones mediante pruebas macroquímicas.

Una variedad de condiciones interfieren en la interpretación de resultados como son la omisión de controles, la auto-oxidación, usar ejemplares secos, reactivos viejos y la pigmentación oscura de los basidiocarpos. Por lo anteriormente mencionado se evitaron esas variantes que repercuten en el resultado de las investigaciones.

La mayor cantidad de especies fueron colectadas en bosque de encino.

De las especies colectadas el 69% fue comestible, el 22% micorrícico, el 5% no comestible, el 2% parásito, y el 2% tóxico.

CONCLUSIONES

- Se realizó la identificación de 43 especies, 36 especies de la familia Boletaceae 5 Ganodermataceae y 2 Hymenochaetaceae
- En el primer año cinco especies presentaron

tirosinasa, una lacasa, trece tirosinasa y lacasa y siete ninguna de las dos enzimas.

- En el segundo año nueve especies presentaron tirosinasa, tres lacasa, trece tirosinasa y lacasa y diez ninguna de las dos enzimas.
- Cinco especies correspondieron al grupo tirosinasa dominante.
- Siete especies son del grupo negativo.
- La lacasa fue encontrada en la mayoría de las especies lignícolas del género Ganoderma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade, R. H. , S. Chacon y J. E. Sánchez-Vázquez 1996. Estudio sobre hongos (Macromicetos) en las plantaciones de café en el municipio de Tapachula, Chiapas (México) Rev. Mex. Mic. 12 : 79 - 88
2. Gerhardt, E. et al. 2000. Manual de Identificación de Hongos de España y de Europa. Ed . Omega, Barcelona , España .957pp.
3. González- Velásquez, A. y R. Valenzuela. 1993. Boletáceos y Gonfidiáceos el Edo.- México I. Discusiones sobre su distribución en diferentes tipos de vegetación, asociaciones ectomicorrizógenas, fenología y comestibilidad. Rev. Mex. Mic. 9: 35- 46
4. Griffin, D. H. 1981. Fungal physiology. John Wiley & Sons. E.U.A. 383 pp.
5. Lange, J.E. et al. 1976. Guía de Campo de los Hongos de Europa. 2da ed. Ed . Omega. España. 291 pp
6. Marr, C.D., D.W. Graund. 1986. The taxonomic potential of laccase and tyrosinase spot tests. Mycologia. 78(2):169-184.
7. Marr, C. D. 1979. Laccase and tyrosinase oxidation of spot test reagents. Mycotaxon 9: 244-276.
8. Pacioni, G. 1982. Guía de hongos. Ed. Grijalvo. Barcelona, España. 523pp.
9. Pardavé, D.L.M 1990. Contribución al inventario de hongos lignícolas de Aguascalientes. Investigación y Ciencia 2:6 - 7
10. Ulloa, M y T. Herrera. 1994. Etimología e Iconografía de géneros de hongos. UNAM. 300pp.
11. Tulloss R. E. 1996. Seminario sobre Amanita. 3ª Ed. Sociedad Mexicana de Micología., Fac. Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México.