

## INTRODUCCION

En la provincia de Misiones, una de las principales plagas que afecta el sector forestal primario, son las hormigas cortadoras de hojas. Su actividad forrajera consiste en cortar y transportar hasta su nido material vegetal fresco, sobre el cual crece el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales), que es su principal fuente de alimento. Por su parte, los hongos del género *Escovopsis* (Ascomycota: Hipocreales), se consideran parásitos especialistas de *L. gongylophorus*. Estos micoparásitos, secretan enzimas micolíticas extracelulares, principalmente quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y proteasas, las cuales son capaces de hidrolizar los componentes de las paredes celulares de su hospedador. Por tanto, *Escovopsis* se presenta como un potencial biocontrolador indirecto de las hormigas cortadoras de hojas. Un camino eficaz para su aplicación biotecnológica es inducir su actividad micolítica, lo que implica la optimización experimental de sus condiciones de fermentación, como la concentración inicial de los componentes del medio de cultivo, entre otras variables importantes

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue optimizar fuentes nitrógeno para la secreción de enzimas micolíticas, en una cepa de *Escovopsis* nativa de Misiones.

## METODOLOGIA

Se trabajó con una cepa promisoriosa de *Escovopsis primorosea* HMP9, y fuentes de carbono (paredes celulares de *L. gongylophorus*) y nitrógeno (complejo nitrogenado Mandels) previamente seleccionadas. Se procedió a la optimización de los componentes nitrogenados del medio Mandels (urea, extracto de levadura y sulfato de amonio). Se empleó un diseño de superficie de respuesta (RSM), Box-Behnken, en el cual se ensayó el efecto de tres concentraciones para cada fuente de nitrógeno. Se realizaron 17 ensayos en fermentación líquida. Para cuantificar la actividad proteasa, se utilizó el método de azocaseína; y para las actividades  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, se empleó el método del ácido dinitrosalicílico y los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico *Statgraphics centurión XVI*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó un análisis de varianza de RSM (Figura 1), en el cual se observó, un efecto positivo estadísticamente significativo por parte de todas las fuentes de nitrógeno ( $p < 0,05$ ) en la actividad proteasas. Con respecto a  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, se observó un efecto significativo positivo por parte de extracto de levadura y negativo por parte de sulfato de amonio ( $p < 0,05$ ), con un nivel de 95,0% de confianza. A partir de la optimización de múltiples respuestas se pudieron predecir las concentraciones de cada componente nitrogenado para optimizar las actividades enzimáticas (Figura 2). Estas condiciones fueron validadas experimentalmente, obteniéndose valores mayores a los predichos. Por tanto, a partir del diseño experimental RSM en fermentación líquida, fue posible optimizar la actividad de las tres enzimas micolíticas, empleando medio Mandels cuya concentración de componentes nitrogenados fue, urea (0,1 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L). La actividad proteasas se incrementó en un 59,3%,  $\beta$ -1,3-glucanasas en un 87% y quitinasas en un 86,35%.

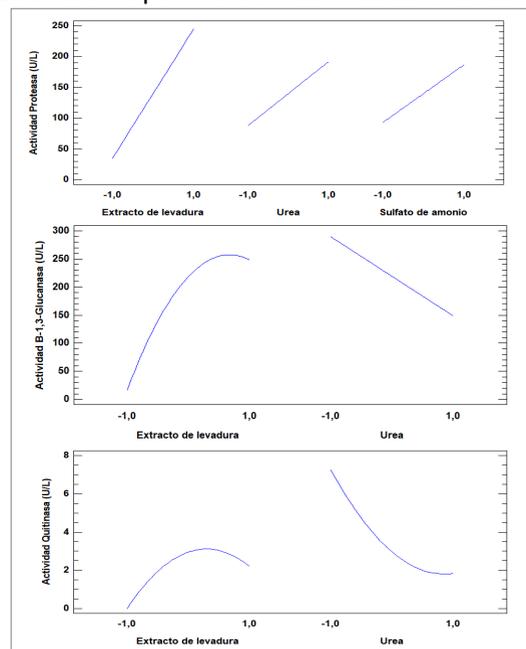


Figura 1. Gráficos de efectos principales de los niveles de las variables significativas sobre la actividad de las tres enzimas

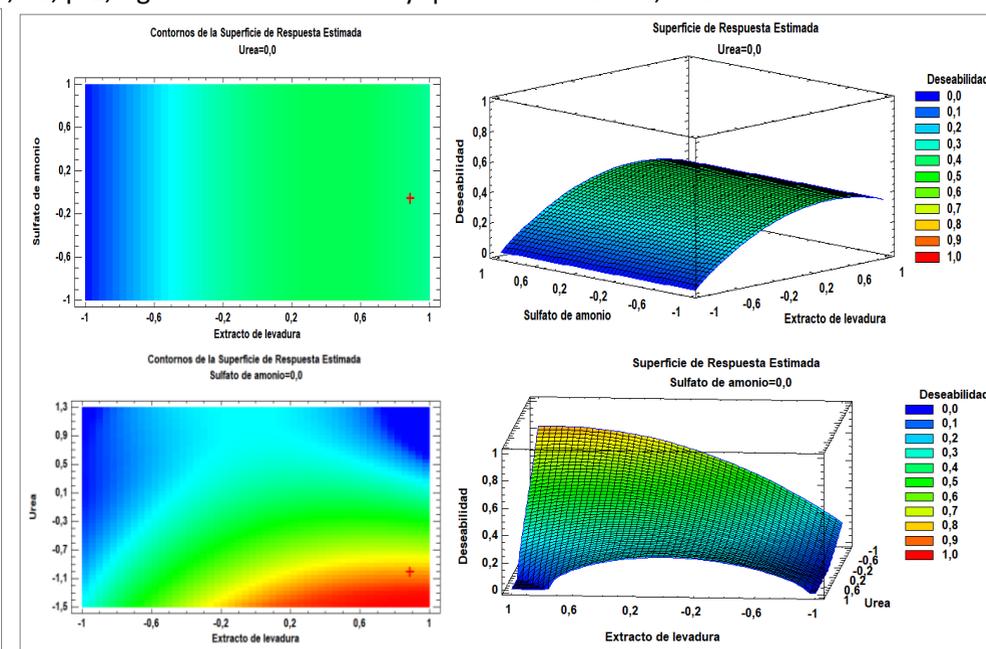


Figura 2. RSM tridimensional estimada y contorno de respuesta que muestran los puntos dentro del diseño para maximizar la función deseabilidad y optimizar de manera conjunta de las tres enzimas.

**CONCLUSIONES:** Estos resultados permitieron optimizar un medio de fermentación líquido adecuado para maximizar la secreción micolítica de la cepa *Escovopsis primorosea* HMP9 lo que permitirá sentar las bases bioquímicas en la generación de un biofungicida contra *L. gongylophorus*, que pueda ser aplicado en el control biológico indirecto de hormigas cortadoras de hojas.