

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Neolentinus ponderosus* (Miller) Redhead & Ginns

Bran M.¹, Morales O.^{1,2}, Cáceres R.², Blanco R.², Flores R.¹

¹Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
²Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial, Dirección General de Investigación, Universidad de
San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

Se estudiaron tres cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* evaluando su crecimiento miceliar en seis medios de cultivo y dos temperaturas de incubación. Asimismo, se describieron las características macro y microscópicas de las colonias obtenidas bajo estas condiciones. Todas las cepas obtuvieron su máximo crecimiento miceliar cuando se cultivaron en el medio EMA a 26°C. El color de las colonias fue blanco o amarillento en el anverso, mientras que en el reverso varió de blanco a amarillento y café. La textura de las colonias en todos los casos fue algodonosa. Microscópicamente se observaron hifas de entre 1.0 y 7.0 µm de diámetro y fíbulas.

INTRODUCCIÓN

Neolentinus ponderosus es una especie de hongo comestible que se distribuye desde el oeste de los Estados Unidos, México hasta el occidente de Guatemala (1,2,3). En nuestro país se desarrolla sobre madera de coníferas y es objeto de consumo y venta en varias comunidades del departamento de Huehuetenango, en donde se le conoce con los nombres de kulich (idioma Chuj) y hongo de verano (2).

Actualmente, gracias al financiamiento otorgado por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han sentado las bases para el inicio de los estudios sobre *Neolentinus* y ya se ha trabajado su conocimiento tradicional, taxonomía y aislamiento de germoplasma (cepas) (2). Sin embargo, a pesar de la factibilidad de su cultivo, esta especie ha sido poco estudiada para fines de producción en comunidades campesinas, como una alternativa alimenticia, comercial y potencialmente medicinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revitalización de las cepas: Se revitalizaron tres cepas (*N. ponderosus* 02.2002, 145.2002 y 02.2003), sembrándolas en agar PDA e incubándolas a 26°C, por 15 días. **Determinación de la velocidad de crecimiento miceliar en diferentes temperaturas y medios de cultivo (4,5):** Se prepararon los medios de cultivo agar papa

dextrosa (PDA) y agar con extracto de malta (EMA), así como los medios PDA y EMA con infusión de madera de pino triste (*Pinus pseudostrobus*) (PDA-P y EMA-P), y PDA y EMA con infusión de madera de pino rojo (*Pinus tecunumanii*) (PDA-T y EMA-T). Las infusiones se prepararon hirviendo 45 g de viruta de madera de pino en 1500 ml de agua destilada. Posteriormente los medios de cultivo se esterilizaron por 15 minutos a 121°C. Las cepas se inocularon en los medios de cultivo con un segmento de 0.5 mm del cultivo previamente revitalizado y se incubaron a 18 y 26°C. Se realizaron 20 repeticiones por medio, cepa y temperatura de incubación. El diámetro de las colonias se midió en dos planos perpendiculares cada 2 días, durante 10 días. Posteriormente se calculó la media del diámetro de las colonias.

Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias (6): Se observaron las características macro y microscópicas. Se prepararon tinciones con azul de lactofenol del micelio de las colonias obtenidas.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: A los datos del crecimiento miceliar se les aplicó un análisis de varianza unifactorial y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$), utilizando el programa estadístico SPSS 15.0[®].

RESULTADOS

A 18°C, la cepa de *N. ponderosus* 02.02 presentó su mayor crecimiento en el medio EMA, alcanzando un diámetro de 20.9 mm. A esta misma temperatura, el menor crecimiento se observó en el medio PDA-T, donde se obtuvo un diámetro de 14.3 mm. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre el crecimiento miceliar en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, así como entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Por el contrario, existió diferencia significativa entre los medios PDA y EMA ($p = 0.000$), PDA y EMA-P ($p = 0.024$), así como entre PDA y EMA-T ($p = 0.000$). Este mismo caso se observó entre los medios PDA-P y EMA ($p = 0.000$), PDA-P y EMA-P ($p = 0.032$), PDA-P y EMA-T ($p = 0.001$). También existió diferencia significativa entre el medio PDA-T y EMA ($p = 0.000$), PDA-T y EMA-P ($p = 0.007$), así como entre PDA-T y EMA-T ($p = 0.000$) (Gráfica 1).

A esta temperatura de incubación, en los medios que contenían como base el agar PDA, las colonias evidenciaron textura algodonosa y color blanco en el anverso, mientras que el color del reverso fue blanco o no presentó ninguna coloración. En los medios con agar EMA como base, la textura fue algodonosa y la coloración tanto en el reverso como en el anverso fue amarillento (Figuras 1-2). Microscópicamente en todos los medios se observó la presencia de fíbulas e hifas de 2.0-5.0 μm

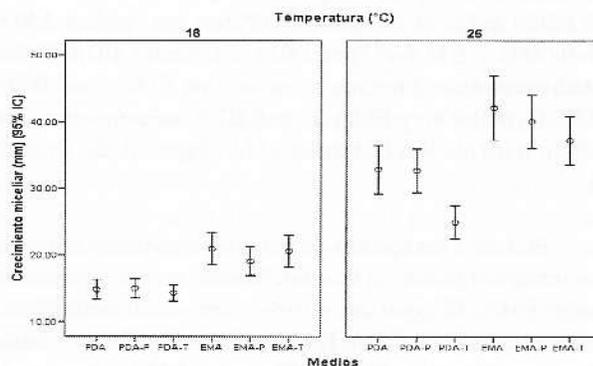
A 26°C, el mayor crecimiento miceliar de la cepa de *N. ponderosus* 02.02 se obtuvo en el medio EMA, presentando un diámetro de 42.2 mm. El menor crecimiento se observó en el medio PDA-T, en el que se alcanzó un diámetro de 24.9 mm.

El análisis estadístico en este caso, no mostró diferencia significativa entre el crecimiento en los medios PDA, PDA-P, EMA-P y EMA-T, así como entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Se encontró diferencia significativa entre el crecimiento en PDA-T con todos los otros medios evaluados: PDA ($p = 0.032$); PDA-P ($p = 0.038$); EMA ($p = 0.000$); EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$). Por otra parte, el crecimiento en el medio EMA también mostró diferencia significativa con los medios PDA ($p = 0.006$) y PDA-P ($p = 0.005$) (Gráfica 1).

Las colonias presentaron textura algodonosa y color blanco en el anverso en los medios PDA, PDA-P y PDA-T,

con reverso de color blanco o sin coloración. Las colonias en los medios EMA, EMA-P y EMA-T presentaron anversos y reversos de color amarillento (Figura 3). Microscópicamente, se observaron fíbulas e hifas de 1.0 a 5.0 μm de diámetro (Figuras 7-8).

Gráfica 1. Crecimiento miceliar de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02.



Con respecto a la cepa *N. ponderosus* 02.03 incubada a 18°C, el mayor diámetro de las colonias (26.0 mm) se observó en el medio EMA. Asimismo, se estableció que el menor diámetro fue de 15.3 mm, en el medio PDA-T.

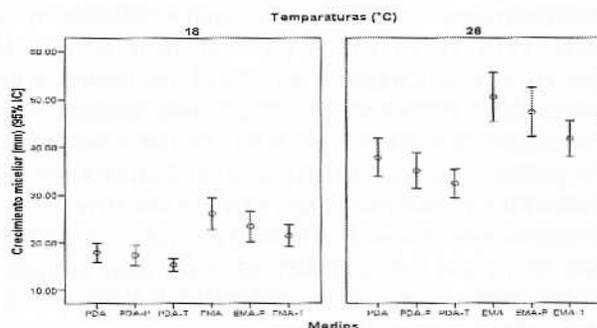
Al realizar el análisis estadístico, no existió diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en los medios PDA, PDA-P y PDA-T. Por otra parte, tampoco se observó diferencia significativa entre el crecimiento en los medios PDA, PDA-P y EMA-T, así como también entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Solamente fue posible observar diferencia significativa entre los medios PDA y EMA ($p = 0.000$) y PDA y EMA-P ($p = 0.022$). Asimismo entre los medios PDA-P con los medios EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.008$), así como entre el medio PDA-T, con los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.007$) (Gráfica 2).

Las colonias presentaron textura algodonosa, con anverso de color blanco en los medios PDA, PDA-P, PDA-T, EMA y EMA-T. El reverso fue de color blanco, con excepción del medio EMA, en el cual el reverso fue de color amarillento (Figuras 4-5). En el medio EMA-P, tanto el anverso como el reverso fueron de color amarillento. Microscópicamente, se observó la formación de fíbulas e hifas de 4.0 a 6.0 μm de diámetro.

A 26°C, el mayor diámetro registrado fue de 50.4 mm en el medio EMA. Por el contrario, el menor diámetro se obtuvo en el medio PDA-T (32.2 mm). Estadísticamente, no se encontró diferencia significativa entre el crecimiento miceliar registrado en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, entre los medios PDA, PDA-P y EMA-T, entre los medios EMA-P y EMA-T y entre los medios EMA y EMA-P ($p > 0.05$). Las diferencias significativas se encontraron entre los medios PDA y EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.019$), así como entre el medio PDA-P con los medios EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.001$). El medio PDA-T fue estadísticamente diferente a los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.022$), así como también lo fueron los medios EMA con EMA-T ($p = 0.042$) (Gráfica 2).

En todos los medios de cultivo presentaron colonias con textura algodonosa de color blanco, con excepción del medio EMA. El color del reverso varió desde amarillento en los medios PDA, PDA-T, EMA, EMA-P y EMA-T, hasta blanco en el medio PDA-P. El medio EMA, tanto en el reverso como en el anverso presentó color amarillento. Microscópicamente, se observaron fíbulas e hifas de 4.0-6.0 μm de diámetro (Figura 9).

Gráfica 2. Crecimiento miceliar de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03.



En la cepa de *N. ponderosus* 145.02 a 18°C, el mayor diámetro de crecimiento miceliar fue encontrado en el medio EMA-P (19.7 mm), mientras que el menor diámetro (10.5 mm), se registró en el medio PDA-T.

El crecimiento miceliar observado entre los medios PDA y PDA-T, no fue estadísticamente diferente, así como no lo fue el crecimiento encontrado entre los medios PDA y PDA-P. Tampoco se evidenció diferencia significativa entre los medios PDA-P, EMA y EMA-T, así como no se

encontró entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Existió diferencia significativa entre el medio PDA con los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$). El medio PDA-P fue estadísticamente diferente a los medios PDA-T ($p = 0.025$) y EMA-P ($p = 0.014$), mientras que el medio PDA-T fue diferente a los medios PDA-P ($p = 0.025$), EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$) (Gráfica 3).

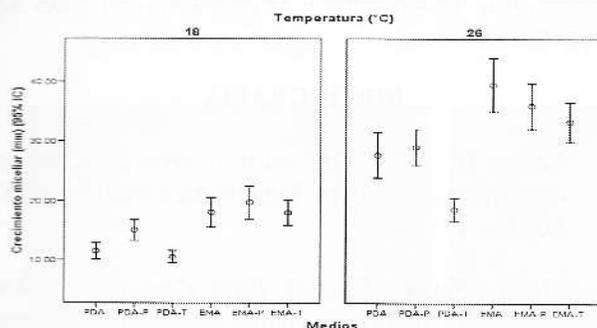
Esta cepa, en todos los medios de cultivo presentó textura algodonosa. Sin embargo, presentó una gran variación en cuanto a la coloración de las colonias. En el medio PDA y PDA-T, las colonias fueron de color blanco en el anverso, pero presentaron colores amarillento y blanco, en el reverso respectivamente. Las colonias de los medios de cultivo PDA-P, EMA, EMA-P y EMA-T, presentaron anverso de color amarillento. Sin embargo, el color del reverso varió desde amarillento en los medios PDA-P, EMA y EMA-T, hasta café en el reverso del medio EMA-P (Figura 6). Microscópicamente, se observaron fíbulas e hifas de 4.0-7.0 μm de diámetro.

En cuanto al crecimiento miceliar evaluado a 26°C, se comprobó que el mayor valor de diámetro (39.5 mm) se obtuvo en el EMA, mientras que el menor valor (18.6 mm) y se observó en el medio PDA-T (Gráfica 3).

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el medio PDA, comparado con los medios PDA-P y EMA-T. Estos dos últimos medios fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p = 0.000$), así como con los medios PDA-T, EMA y EMA-T ($p = 0.000$). Los medios PDA-T, EMA, EMA-P y EMA-T, fueron estadísticamente diferentes con todos los medios de cultivo evaluados ($p = 0.000$).

En todos los medios, la textura de las colonias fue algodonosa y el color de las colonias fue amarillento. El color del reverso varió desde amarillento en los medios PDA, PDA-P, PDA-T y EMA, hasta color café en los medios EMA-P y EMA-T. Microscópicamente se observaron fíbulas e hifas de 4.0-5.0 μm de diámetro.

Gráfica 3. Crecimiento miceliar de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.



DISCUSIÓN

El comportamiento general de las cepas de *Neolentinus* evaluadas, demostró que el crecimiento miceliar fue mayor en todos los medios de cultivo que contenían agar EMA como base, comparado con los que contenían agar PDA. Este comportamiento colectivo de las cepas puede atribuirse a la mayor cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo EMA. Este medio consiste en extracto concentrado de malta, hexosas (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa y sucrosa), trisacáridos (maltotriosa) y dextrinas, así como sustancias nitrogenadas, tales como proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas (7), los cuales contribuyen a mejorar el crecimiento miceliar. Comparativamente, el medio PDA, consiste en básicamente en almidón de papa y glucosa, lo que hace de él un medio notoriamente menos enriquecido que el EMA (8).

Otro aspecto a destacar es que el crecimiento miceliar fue menor cuando las cepas y medios de cultivo se incubaron a 18°C que cuando se incubaron a 26°C. Esta particularidad puede obedecer a que todas las cepas evaluadas en este estudio han sido adaptadas a condiciones de laboratorio (26°C) durante varios años, por lo que no es de extrañar que expresaran mejor crecimiento a esta temperatura.

Debido a que el mayor crecimiento de la cepa *N. ponderosus* 02.02 en el agar EMA a 26°C, se recomienda su cultivo bajo estas condiciones. Sin embargo, ya que no existió diferencia significativa entre este medio de cultivo y los medios EMA-P y EMA-T, éstos también podrían ser utilizados, puesto que el crecimiento fue similar.

Por otra parte, se indica que la suplementación de los medios de cultivo con infusión de dos distintas clases de madera que constituyen el hábitat natural de la especie (*Pinus pseudostrabus* y *P. tecunumanii*), no mostró evidencia de estimulación del crecimiento miceliar; por el contrario, el crecimiento decreció debido probablemente a una mayor cantidad de sustancias de difícil degradación (como celulosa y lignina), adicionados al medio.

La cepa en mención, en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, tanto a 18 como a 26°C, en el anverso de las colonias el micelio fue de color blanco, mientras que el color del reverso fue fundamentalmente sin coloración o blanco. En contraste, en los medios EMA, EMA-P y EMA-T a ambas temperaturas, el anverso y reverso de las colonias fue de color amarillento, lo cual podría no ser una característica deseable, ya que el apareamiento de esta coloración en colonias de otras especies de hongos, como las de *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp, puede indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios (no necesarios para el crecimiento y reproducción) o alguna anomalía en el crecimiento (7,8).

Para esta misma cepa, la presencia de fíbulas garantiza la condición dicariótica del micelio, la cual es de vital importancia en la formación de los cuerpos fructíferos (9). Por otra parte, los medios que contenían infusiones de maderas de pino, promovieron la formación de hifas de diámetros mayores a 4.0 µm, debido a que muchas especies de hongos degradadores de madera, forman las denominadas hifas fibrosas, para poder penetrar dentro de la estructura leñosa de los árboles (6). La ausencia de clamidosporas es favorable para los cultivos si se considera la pigmentación amarillenta observada en algunos medios de cultivo, debido a que estas estructuras de resistencia se forman ante condiciones ambientales adversas (9).

En el caso de la cepa *N. ponderosus* 02.03, también obtuvo el mayor crecimiento en los medios EMA a las dos temperaturas de incubación. Sin embargo, si se desea cultivar la cepa a 18°C, se recomiendan los medios EMA y EMA-P, ya que no existió diferencia significativa entre ellos. Si la cepa se trabaja a 26°C, debe ser inoculada en el medio EMA o en EMA-P, puesto que en ellos se obtuvieron los mayores crecimientos, además de existir diferencia significativa con respecto a los otros medios de cultivo evaluados. La importancia de estudiar el medio de cultivo y temperatura donde las cepas logren su mayor crecimiento

miceliar reside en que se reduce el ciclo de cultivo del hongo, cuando se estudia con fines de productividad (10).

Respecto a las características macroscópicas de las colonias, en este caso se observó que fueron de color blanco en casi todos los medios de cultivo y temperaturas de incubación, con excepción de los medios EMA-P a 18°C y EMA a 26°C. Los reversos de las colonias fueron de color amarillento principalmente a 26°C que a 18°C, sin embargo, puesto que en el anverso casi no se presentó dicha coloración, podría interpretarse como una característica provechosa por la poca producción de metabolitos secundarios como se indicara anteriormente.

La cepa *N. ponderosus* 145.02 obtuvo su mayor crecimiento en el medio EMA-P a 18°C, mientras que a 26°C, el mejor crecimiento se observó en el medio EMA, por lo que se sugiere que se utilicen estas condiciones en futuros cultivos de esta cepa. Respecto a las características de las colonias de esta cepa, en su mayoría presentaron color amarillento en el anverso y reverso, e incluso en los medios EMA-P a 18°C y EMA-P y EMA-T a 26°C el reverso fue de color café. Solamente el medio PDA-T a 18°C no presentó coloración amarillenta en el anverso y reverso de las colonias. Como se indicó con antelación, este tipo de pigmentación no es deseable en el crecimiento miceliar de las colonias, puesto que puede ser indicativo de anomalías (8).

En general, las tres cepas de *N. ponderosus* (02.02, 02.03 y 145.02), obtuvieron sus máximos crecimientos en el medio EMA a 26°C y los menores valores de crecimiento se observaron en el medio PDA-T a 18°C. De las tres cepas, *N. ponderosus* 02.03 fue la más vigorosa en su desarrollo (50.4 mm), seguida de la 02.02 (42.1 mm) y 145.02 (39.5mm). Estos resultados fueron inferiores a lo reportado para esta especie (colonias de entre 78 y 89 mm de diámetro a los 14 días de incubación), en el medio EMA (11).

Es importante resaltar que la presencia de coloración amarillenta o café indistintamente en el anverso o reverso de las colonias influyó en el crecimiento miceliar de las cepas, puesto que esta característica estuvo más acentuada en la cepa 145.02 y como se indicó anteriormente fue la que presentó el menor crecimiento.

Finalmente, se recomienda que el crecimiento miceliar se efectúe en el medio EMA a 26°C, para las tres

cepas de *Neolentinus ponderosus* estudiadas y además es importante que las cepas que presentaron colonias de color amarillento o café, se evalúen para la producción de metabolitos secundarios o se estudien con fines de biorremediación.

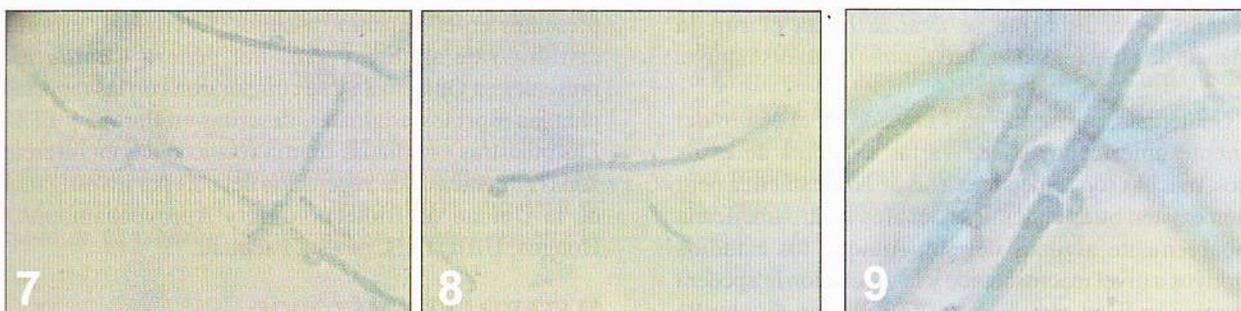
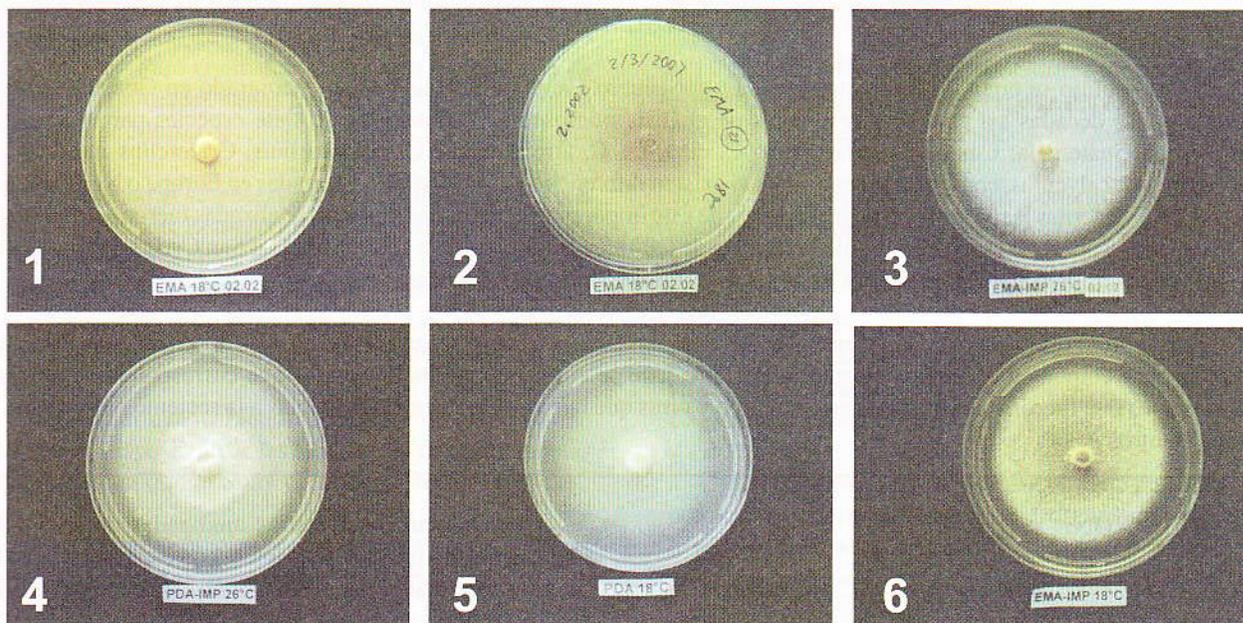
BIBLIOGRAFÍA

1. Pegler D. 1983. The genus *Lentinus*: A world monograph. 1ª. ed. Kew Bulletin Additional Series X. London, 1738p.
2. Moreno-Fuentes A. *et al.* 1996. Kuté-mo'kó-a: Un hongo comestible de los indios Rarámuri de México. *Rev. Mex. Mic.* 12:31-39.
3. Bran M.C., *et al.* 2003. Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala.
4. Gaitán-Hernández R. 2000. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:20-24.
5. Mier T., Toriello C., Ulloa M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México p34.
6. Nobles, M. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43: 1097-1139.
7. Crueger, W., Crueger, A. 1984. *Biotechnology. A text book of industrial microbiology.* Sunderland & Sinauer Associates, Madison, Wisconsin, USA. 308p. p50-51.
8. Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms.* Ten Speed Press & Mycomedica. Olympia, WA, USA. 554p. p90, 113.
9. Alexopoulos C. *et al.* 1996. *Introductory Mycology.* 4ª. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América; 880p. p50, 221.

10. Salmones, D., *et al*, 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 173-176.
11. Miller, O. K. Jr. 1965. Three new species of lignicolous agarics in the *Tricholomataceae*. *Mycologia* 57: 933-945.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de San Carlos de Guatemala el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo, a través del proyecto 6.47 del Programa PUIDI de la Dirección General de Investigación.



Figuras 7-9. Características microscópicas de las cepas de *N. ponderosus*. 7-8. Hifas de 1.0 a 5.0 µm con fibulas en la cepa *N. ponderosus* 02.02 (x400). 9. Hifas de 4.0 a 6.0 µm de diámetro con fibulas en la cepa *N. ponderosus* 02.03 (x400).