

CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO MICELIAR DE *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton (Agaricales) EN MEDIO MMN CON DIFERENTES pH

Gurriarán, N., R. Cáceres, M. Bran, O. Morales, R. Flores

Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos, Departamento de Microbiología,
Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala

1. RESUMEN

Se caracterizó el crecimiento miceliar *in vitro* de una cepa nativa de *Laccaria bicolor* (196.1997), recolectada en Huehuetenango, Guatemala, en medio Melin-Norkrans Modificado (MMN) con cuatro niveles de pH: 4.5, 5.5, 6.5 y 7.0, incubando las placas durante 40 días a 26° centígrados. Se determinó que el mayor diámetro de las colonias se obtuvo en el pH 7.0. La morfología de las colonias varió según los tratamientos: con pH 4.5 y 5.5 la cepa produjo acúmulos hifales, mientras que con pH 6.5 y 7.0 las colonias fueron lisas y fibrilosas. Microscópicamente se observaron hifas de 2.0-4.0 μm , con hinchamientos irregulares en los septos, a modo de nódulos.

Abstract

A Guatemalan strain of *Laccaria bicolor* (*L. bicolor* 197.1997), collected in Huehuetenango, was characterized *in vitro* to determine its miceliar growth under four different pH conditions: 4.5, 5.5, 6.5 and 7.0 in Modified Melin-Norkrans medium (MMN). The plates were incubated at 26°C and studied for 40 days. The biggest diameter was obtained in pH 7.0 and variation in the morphology of the colonies was observed according to the pH level: with pH 4.5 and 5.5 hyphal tufts were formed while fibrillous and smooth colonies were observed in 6.5 and 7.0 pH cultures. The hyphae showed a 2.0-4.0 μm in diameter with irregular swollen cells, as nodules, at the septa and a notorious violet pigmentation in the acid pH cultures.

2. INTRODUCCIÓN

Laccaria Berkeley y Broome es un género micorrízico cosmopolita, algunas de sus especies son comestibles por lo que tienen un papel importante no sólo en los ecosistemas sino también en la cultura de distintas regiones (Aguirre-Acosta, 1978). En Guatemala han sido reportadas nueve especies: *L. amethystina*, *L. bicolor*, *L. gomezii*, *L. laccata*, *L. major*, *L. nobilis*, *L. ohiensis*, *L. proxima* y *L. trichodermophora*, teniendo algunas de ellas gran valor comercial en regiones del altiplano como Tecpán y Comalapa (Chimaltenango), Totonicapán y El Quiché (Morales *et al*, 2003).

Es paradójico que en nuestra región americana haya pocas investigaciones sobre conservación y caracterización de germoplasma de hongos nativos y hoy más que nunca, es fundamental el estudio con fines productivos (Sobal *et al*, 2007). En la Universidad de San Carlos se han aislado ya algunas cepas nativas de *Laccaria* y se ha logrado con éxito la síntesis de micorrizas de *L. bicolor* con *Pinus hartwegii* (Flores *et al*, 2002), *P. ayacahuite* (Berdúo 2000; Flores *et al*, 2002) y *Abies guatemalensis* (Flores *et al*, 2008).

Sin embargo es importante caracterizar el crecimiento micelial de nuevas cepas guatemaltecas para generar información acerca de los requerimientos de cultivo *in vitro* y así desarrollar posteriormente investigaciones sobre procesos de micorrización, que beneficien y garanticen el éxito de programas de reforestación con especies de plantas y hongos nativos, además de proporcionar hongos alimenticios a mediano y largo plazo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

• **Revitalización de la cepa:** Se revitalizó la cepa 196.1997 *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, la cual está depositada en el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrízicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. La cepa se sembró en medio MMN y luego fue incubada a 26° centígrados durante 30 días.

• **Caracterización del micelio:** Se preparó el medio de cultivo Melin-Norkrans Modificado (MMN) por sus siglas en inglés, y se ajustó a varios valores de pH: 4.5, 5.5, 6.5 y 7.0, corrigiéndose con HCl 1% o NaOH al 1%, según fuera necesario, mediante un potenciómetro (inoLAB level 2, WTW®). Se inocularon 20 cajas de cada uno de los tratamientos con un segmento de 0.5 mm del cultivo de *L. bicolor* 196.1997. Las cajas se sellaron con papel Parafilm® para evitar su deshidratación y se incubaron a 26°C. Se midió el diámetro de las colonias cada 2 días en dos planos perpendiculares, los cuales se sumaron y dividieron entre dos, para obtener el diámetro promedio en milímetros.

• **Análisis de datos:** Se elaboró una base de datos en el programa EXCEL® con los siguientes parámetros en cada columna: cepa, tratamiento y diámetro de la colonia; además se calculó la Tasa de Extensión Radial -RER-. La base de datos obtenida se analizó con el programa estadístico SPSS 16.0® y se elaboraron gráficas de interacción para observar el crecimiento de las cepas. Con la estimación del diámetro de las colonias (mm) se realizó un Análisis de Varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

4. RESULTADOS

Se determinó que el crecimiento miceliar fue más rápido en el pH 7.0 y más lento en el pH 4.5, hecho que se evidenció en el diámetro de las colonias y en la tasa de extensión radial (RER por sus siglas en inglés –Radial Extention Rate-). Estadísticamente, el diámetro de las colonias fue significativo entre los pH 4.5 y 5.5 respecto a los pH 6.5 y 7.0 ($p=0.000$), así como entre estos dos últimos ($p=0.010$). Por el contrario, no se encontró diferencia

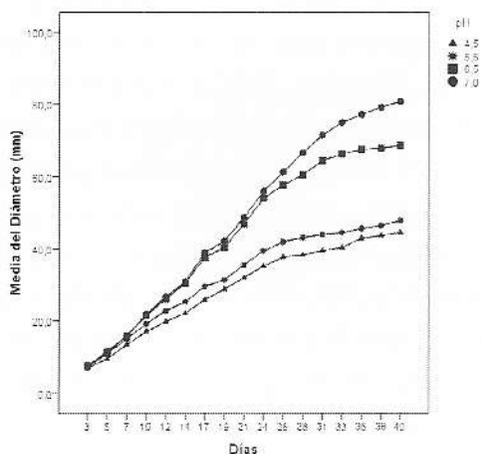
significativa entre el diámetro de las colonias en los pH 4.5 y 5.5 ($p= 0.085$) (Tabla 1).

Durante los primeros 17 días de crecimiento, las colonias en pH 6.5 y 7.0 fueron casi del mismo diámetro, comenzando a observarse una marcada diferencia a partir del día 17 al 40. En el caso de las colonias en pH 4.5 y 5.5, el crecimiento fue diferente desde el inicio del experimento y mantuvo esa misma tendencia hasta el día 40 (Gráfica 1).

Tabla 1. Diámetro de las colonias y RER de la cepa *L. bicolor* (196.1997) a los cuatro pH, durante 40 días de incubación a 26° centígrados.

pH	Diámetro de las colonias (mm)	RER (mm/día)	Mínimo	Máximo	Varianza
4.5	29.343 ± 12.147 a*	1.062	6.0	47.5	147.554
5.5	32.345 ± 13.063 a	1.112	6.0	49.5	170.654
6.5	43.773 ± 21.048 b	1.675	7.0	72.0	443.020
7.0	47.739 ± 24.718 c	1.975	7.0	84.0	610.991

* Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ($\pm=0.05$).



Gráfica 1. Diámetro de las colonias de *L. bicolor* durante 40 días en los cuatro diferentes pH a 26°C de incubación.

Se evidenciaron dos tipos morfológicos de las colonias. En los pH 4.5 y 5.5 se desarrollaron colonias de textura lisa con bordes irregulares y acúmulos miceliar en los márgenes (Figura 1, Tabla 4). En los pH 6.5 y 7.0 se desarrollaron colonias lisas con bordes regulares, sin acúmulos, con textura más bien fibrilosa y con algunas ramificaciones hifales. Este tipo de morfología se observó principalmente en las colonias en pH 7.0 (Figura 2, Tabla 4). Cabe mencionar, que en ningún tratamiento se observó micelio aéreo ni exudado en las colonias.

En cuanto a las características microscópicas, fueron muy notorias las ramificaciones dicotómicas en todos los tratamientos, así como la presencia de vacuolas, no fíbulas ni clamidosporas. El diámetro de las hifas fue más o menos similar, siendo el pH 4.5 el único en donde se encontraron hifas de hasta 4.0 μm (Tabla 4). En todos los cultivos se observaron hinchamientos muy notorios en los septos de las hifas, con formas y tamaños variados (Figura 3).

Tabla 4. Características macroscópicas de *L. bicolor* (196.1997) al final del período de incubación a 26°C.

pH	Color		Textura	
	Anverso	Reverso		
	Centro	Margen*		
4.5	Amarillento	Amarillento con acúmulos	Amarillento	Usa
5.5	Amarillento	Amarillento con acúmulos	Amarillento	Usa
6.5	Amarillento	Pardo claro/ Isofilibroso	Amarillento	Usa
7.0	Amarillento	Pardo claro/ Isofilibroso	Amarillento	Usa

*Presentaron pigmentación púrpura en el margen de las colonias 1. a los 10 días, 2. a los 14 días, mientras que 3. y 4. desarrollaron una pigmentación violeta claro a los 21 y 38 días respectivamente. estas coloraciones desaparecieron alrededor de los 40 días de incubación.

Tabla 5. Características microscópicas de *L. bicolor* (196.1997) a los 40 días de incubación.

pH	Diámetro de hifas (μm)	Fíbulas	Nódulos	Clamidosporas	Ramificaciones
4.5	2.0 - 4.0	Ausentes	Presentes	Ausentes	Regular
5.5	2.0 - 3.0	Ausentes	Presentes	Ausentes	Regular
6.5	2.0 - 3.0	Ausentes	Presentes	Ausentes	Escasa
7.0	2.0 - 3.0	Ausentes	Presentes	Ausentes	Escasa

5. DISCUSIÓN

Las diferencias observadas durante el crecimiento de las colonias de *Laccaria bicolor* (196.1997) sugieren que el crecimiento miceliar, con diferentes niveles de pH, debe efectuarse durante un tiempo prolongado para evaluar con mayor exactitud el comportamiento de la cepa.

Por otra parte, se ha reportado que *Laccaria bicolor* es un hongo amónico de fase tardía (sus enzimas celulolíticas tienen un pH óptimo de 5.5 a 6.8), lo que lo hace tolerante a diferentes valores de pH durante su crecimiento (Yamanaka, 2003). Los resultados observados en este estudio confirman que la cepa *Laccaria bicolor* 196.1997, es capaz de absorber de mejor manera los nutrientes del medio de cultivo a medida que se incrementan los valores de pH. Esto se traduce en un mejor y mayor crecimiento miceliar en el pH más alto utilizado (pH 6.5 y 7.0). Los resultados visibles de crecimiento son totalmente coherentes con los resultados de la tasa de extensión radial (RER), donde el pH jugó un papel fundamental en el crecimiento de las colonias.

Respecto a las características morfológicas, los dos tipos de colonias concuerdan con lo descrito en la literatura (Mueller, 1992). Sin embargo, debe añadirse también que el pH influye directamente en la aparición temprana o tardía de la pigmentación de las colonias, ya que en los cultivos con mayor crecimiento miceliar (pH cercano al neutro) la pigmentación fue más tardía. Stamets (1993) menciona que la pigmentación de las colonias fúngicas es un indicador de la formación de metabolitos secundarios, lo que disminuye el desarrollo del hongo de las mismas. En este estudio, las colonias pigmentadas aparecieron en pH ácido (4.5-5.5) y fueron a su vez las de menor crecimiento.

La morfología microscópica de las hifas también coinciden con lo reportado para la especie (Mueller, 1992) y el hecho de no encontrar clamidosporas (estructuras de resistencia) en ninguna muestra de los cuatro tratamientos, es un buen indicador del buen manejo y condiciones del cultivo de la cepa. Finalmente, ya que se ha reportado a *Laccaria bicolor* como una especie capaz de fructificar en condiciones de invernadero y su aprecio como hongo comestible (Flores *et al.* 2008), se recomienda continuar los estudios con este género y sus especies para la micorrización con árboles nativos y así contribuir eficientemente a programas de reforestación que se llevan a cabo en el país.

6. REFERENCIAS

1. Aguirre-Acosta, E. y Pérez-Silva, E. 1978. Descripción de algunas especies del género *Laccaria* (Agaricales) de México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12:33-35.
2. Morales, O. *et al.* 2003. Las especies del género *Laccaria* (Agaricales) en Guatemala. *Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* 16:89-93.
3. Flores, R. *et al.* 2008. Mycorrhizal synthesis and basidioma primordium formation between *Abies guatemalensis* y *Laccaria bicolor*. *Nova Hedwigia* 87 (1-2):153-160.
4. Sobal, M. *et al.* 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19 (1):15-23.
5. Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 95 (4): 584-589.
6. Mueller, G. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany* 30:1-158.
7. Stamets, P. 1993. Growing gourmet & medicinal mushrooms. Ten Speed Press & Mycomedia. Olympia, WA, USA. 554ptt. Pág. 220-223.
8. Berdúo, P. 2000. Evaluación de la eficiencia micorrícica de dos cepas de hongos, *Laccaria* aff. *bicolor* y *Suillus* aff. *brevipes*, aisladas en Guatemala, sobre plantas de *Pinus ayacahuite* Ehr., *Pinus rudis* Endl., y *Pinus hartwegii* Lindl. (Tesis de graduación de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala). 45p.
9. Flores, R. *et al.* 2002. Hongos micorrícicos de bosques de pino y pinabete. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación. Guatemala. 50p.

7. ANEXOS

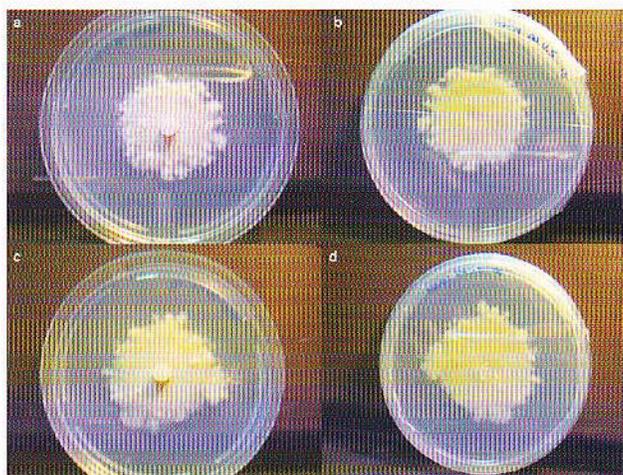


Figura 1. a-d. Cultivos de *L. bicolor* (196.1997) en medio MMN a 26°C a los 40 días de incubación. a-b. Anverso y reverso en pH 4.5, c-d. Anverso y reverso en el pH 5.5. Los dos tratamientos presentan coloración amarillenta en ambos lados, textura plana y márgenes con acúmulos hifales.

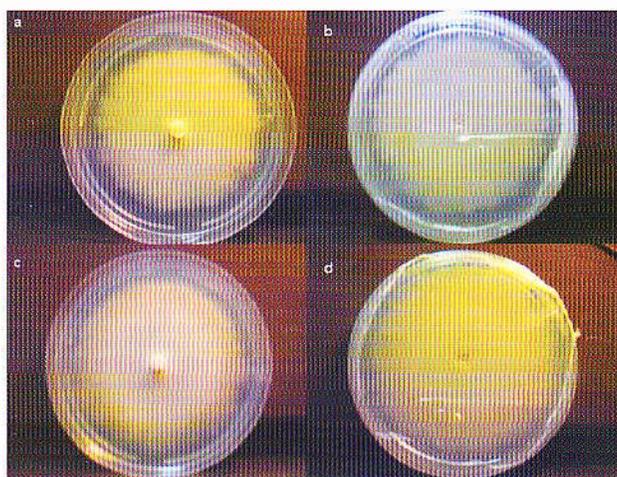


Figura 2. a-d. Cultivos de *L. bicolor* (196.1997) en medio MMN a 26°C a los 40 días de incubación. A-b. Anverso y reverso en pH 6.5, c-d. Anverso y reverso en el pH 7.0; los dos tratamientos presentan coloración amarillenta en ambos lados, textura plana y márgenes color pardo claro, lisos, fibrilosos.

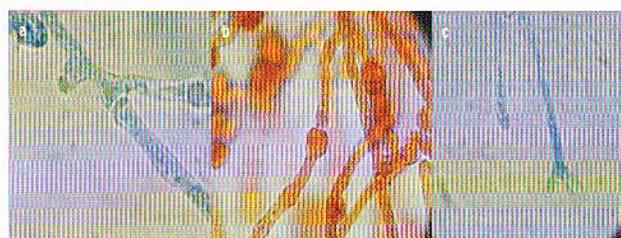


Figura 3. a-c. Características microscópicas de *L. bicolor* (196.1997) a 26°C en diferentes pH. a. septo hifal con hinchamiento irregular en cultivo a pH 6.5 (tinción con azul de lactofenol) x1000. b. nódulos en los septos de las hifas a pH 4.5 (tinción con rojo congo) x1000. c. hifa terminal con ramificación dicotómica (tinción con azul de lactofenol) x1000.