Evaluación del crecimiento micelial de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH

Reyes, C.[1], Bran, M.[2], Morales, O.[2]

Departamento de Microbiología[2], Escuela de Química Biológica[1], Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Resumen

Agrocybe cylindracea es un hongo que se consume en el municipio de Tecpán Guatemala, Chimaltenango; San Juan Ostuncalco, Quetzaltenango y las aldeas Escuachil y Vista Hermosa de San Antonio Sacatepéquez, San Marcos. En la presente investigación se utilizaron cinco cepas guatemaltecas de *A. cylindracea*, determinándose la morfología colonial y el crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y pH, para obtener la mejor condición en su cultivo a nivel de laboratorio como paso previo a la obtención de biomasa fúngica, producción de inóculo y cuerpos fructíferos. Se determinó que todas las colonias de las cepas evaluadas mostraron las características morfológicas reportadas en la literatura para *A. cylindracea* (con excepción de la cantidad de micelio aéreo el cual fue abundante) en todos los medios y pH estudiados. Al evaluar el crecimiento micelial empleando como medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (EMA), y agar harina de maíz y levadura (CMYA), ajustados a pH 5, 5.5 y 6 e incubados a una temperatura de 26 °C, se determinó que el medio de cultivo EMA a pH 6 favoreció el crecimiento de la mayoría de las cepas estudiadas. Al evaluar las interacciones entre las cepas, el medio de cultivo y el pH se observó que las combinaciones con mayor crecimiento micelial se obtuvieron con las cepas 638.08 y 58.01 en los medios PDA y EMA a pH 6. Adicionalmente, la cepa 638.08 en el medio EMA puede tener buen rendimiento a pH 5 y 5.5.Se recomienda el cultivo de ambas cepas bajo las condiciones indicadas, para la producción de biomasa micelial como paso previo a la producción de inóculo y cuerpos fructíferos.

Palabras clave: Crecimiento micelial, cuerpos fructíferos.

Mycelial body growt evaluation of *Agrocybe cylindracea* native strains (DC.: Fr) Maire in different culture media and pH.

Abstract

Agrocybe cylindracea is a fungus that is consumed in the town of Tecpán Guatemala, Chimaltenango; San Juan Ostuncalco, Quetzaltenango and villages Escuachil and Vista Hermosa Sacatepéquez San Antonio, San Marcos. In the present study five strains were used of *A. cylindracea* Guatemalan, determining colonial morphology and mycelial growth in different culture media and pH, in order to stablish the best condition for cultivation in the laboratory as a preliminary step to obtaining fungal biomass, and seed production of fruiting bodies. It was determined that all colonies of the strains tested showed the morphological characteristics reported in the literature for *A. cylindracea* (except for the amount of acrial mycelium which was abundant) in all media and pH studied. In evaluating mycelial growth as culture media using potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (EMA), and cornmeal agar and yeast (CMYA), adjusted to pH 5, 5.5 and 6 and incubated at a temperature of 26 ° C, it was determined that the culture medium at pH 6 EMA favored the growth of most strains. In assessing the interactions between strain, culture medium and the pH was observed that the mycelial growth combined with greater strains were obtained with 638.08 and 58.01 in the media PDA and EMA at pH 6. Additionally, strain EMA 638.08 in the Medium EMA can have good growth at pH 5 and 5.5. As a consequence of the results, we recommend the cultivation of both strains under the conditions indicated for mycelial biomass production as a precursor to the production of inoculum and fruiting bodies.

Key words: Mycelial growth, fruiting bodies

Introducción

En Guatemala, se conocen alredededor de 83 especies de hongos comestibles, la mayoría de ellos documentados en mercados de las cabeceras departamentales y en algunos municipios como San Juan Sacatepéquez, Guatemala; Sumpango, Sacatepéquez; Todos Santos Cuchumatán y San Mateo Ixtatán, Huehuetenango y Tecpán Guatemala, Chimaltenango, entre otros (Morales, Bran, Cáceres, 2010). Dentro de este grupo de hongos se encuentra *Agrocybe cylindracea*, especie que es utilizada como alimento por personas de las etnias Mam y Kaqchikel en los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Chimaltenango. En estos lugares se le conoce como hongo del saúco, Tx'yol B'aqman, Tx'yol te chib'j (en el idioma Mam) (Hostnig y Vásquez, 1998) y Rukoxil Tunay Che' (idioma Kaqchikel) (Morales, 2001).

A. cylindracea es una especie de reconocida comestibilidad en el mundo, ya que su consumo también está documentado en China, Italia y México (Uhart & Albertó, 2007). Además, se ha encontrado que posee actividad antiinflamatoria, antitumoral, hipoglicémica, inmunoestimulante y contrarresta la diabetes e hipertensión (Poucheret, Fons & Rapior, 2006). Dada la naturaleza saprobia de este hongo, es factible de ser cultivada sobre desechos agrícolas y forestales que se generan en el país, para la producción de cuerpos fructíferos los cuales pueden utilizarse como una alternativa alimenticia y potencialmente medicinal. Mediante su cultivo se estaría dando uso a la diversidad fúngica del país, y se crearían alternativas alimenticias, económicas y medicinales, que pueden contribuir al desarrollo de comunidades campesinas.

Por tal razón, se estudiaron cinco cepas nativas de *A. cylindracea* (58.01, 59.01, 60.01, 112.02 y 638.08) para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo (EMA, PDA y CMYA) y pH (5, 5.5 y 6), como un primer paso para lograr la producción de cuerpos fructíferos a nivel de sustrato. Se efectuó análisis de varianza e intervalos múltiples de Duncan, para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento micelial en los medios de cultivo y pH.

Materiales y Métodos

Revitalización de las cepas: Se revitalizaron cinco cepas nativas de *A. cylindracea* (58.2001, 59.2001, 60.2001, 112.2002 y 638.2008), que se encuentran depositadas en el cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se sembraron en agar PDA y se incubaron a 26°C, por 30 días.

Determinación del diámetro de las colonias de cada una de las cepas, a diferentes pH y medios de cultivo: El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier, Toriello y Ulloa (2002), Stamets (1993) y Sánchez, De León y Huerta (2000). Se prepararon los medios de cultivo: Agar con extracto de malta (EMA), agar papa dextrosa (PDA) y agar harina de maíz y levadura (CMYA). Se ajustó el pH de cada medio a utilizar a 5, 5.5 y 6, con NaOH al 10% y ácido láctico al 90%. Se esterilizaron por 15 minutos a 121°C y 15 lbs/pulgada^2 de presión. Se inocularon cajas de petri de cada uno de los medios con diferentes pH, con un segmento de 0.5mm del cultivo de cada una de las cepas. 20 cajas de cada medio y pH se incubaron a 26°C, durante un máximo de 36 días. Se anotó el diámetro (cm) alcanzado por las colonias cada 2 a 3 días, midiendo el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares, para obtener el diámetro promedio.

Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias: El procedimiento se realizó de acuerdo con Nobles (1965). Las colonias se caracterizaron macroscópicamente con ayuda de un estereóscopo. Se observó el color del anverso y reverso, textura, consistencia, forma, olor, micelio aéreo, producción de exudado, formación de rizomorfos o agregaciones hifales. Se describió microscópicamente el micelio de las colonias, realizando preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales a 400 y 1000 aumentos, determinando el diámetro de las hifas (µm) así como la presencia de fíbulas, clamidosporas, hifas en espiral, apresorios y cualquier otra característica relevante.

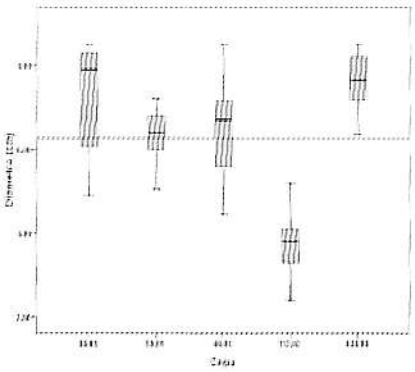
Análisis de datos: Se elaboró una base de datos en el programa EXCEL®, ordenando los datos en forma vertical con los siguientes parámetros en cada columna: Cepa (c/u de las 5 cepas), medio de cultivo (EMA, PDA, CMYA), pH (5, 5.5, 6), día de medición (día 3, 5, 7, 10, 12, 14) y diámetro de la colonia de cada una de las repeticiones (cm). Se tomó como punto de comparación el día 14. Se importó la base de datos elaborada previamente, al programa estadístico SPSS 16.0®, para su análisis. Se estimó la media del diámetro de las colonias (cm) y se realizó un análisis de varianza con una prueba de intervalos múltiples de Duncan, para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento micelial en los medios de cultivo y pH.

Resultados

Al comparar la interacción entre los medios de cultivo y las cepas, el análisis de los datos mostró que las combinaciones de la cepa 638.08 y 58.01 en el medio EMA fueron las de mayor rendimiento y no se observó diferencia significativa entre ellas, pero si con las demás cepas ($p<0.05$). Por otro lado al comparar estadísticamente la interacción entre las cepas, el pH y su efecto sobre el desarrollo micelial, se determinó que las combinaciones con mayor crecimiento significativamente diferente con las demás fueron: la cepa 58.01 a pH 5.5 y 6, la cepa 59.01 a pH 6, la cepa 60.0 a pH 6 y la cepa 638.08 a pH 5, 5.5 y 6 ($p<0.0001$).

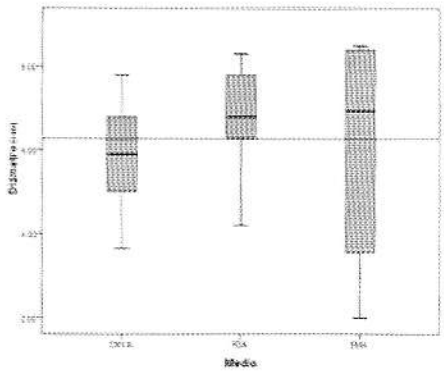
Se determinó que las cepas 638.08 y 58.01 fueron las que desarrollaron el mayor crecimiento micelial, superando en diámetro a las demás cepas evaluadas (al comparar todos los medios de cultivo y pH) (Gráfica 1).

Grafica 1. Crecimiento micelial de las cepas de *A. cylindracea* incubadas a 26°C durante 14 días, en diferentes medios de cultivo y pH.



El efecto general de los medios de cultivo evaluados sobre el crecimiento micelial (incluyendo todas las cepas y pH), mostró que el medio PDA fue significativamente mayor al medio CMYA ($p<0.0001$), pero no al medio EMA ($p=0.494$). Este último fue significativamente mayor al medio CMYA ($p<0.0001$). En resumen los medios PDA y EMA fueron en los que se presentaron los mayores diámetros de crecimiento micelial, en tanto que el medio CMYA fue el que presentó los menores diámetros (Gráfica 2).

Gráfica 2. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento micelial de las cepas de *A. cylindracea* a diferentes pH.



Al final del período de incubación, las cinco cepas presentaron un color blanco en todos los medios de cultivo y pH evaluados. La textura de todas las colonias fue algodonosa y, en algunos medios y pH, el crecimiento micelial fue zonado, con abundante micelio aéreo, a excepción de la cepa 638.08 que mostró escaso micelio aéreo en el medio CMYA. El reverso de las colonias no mostró pigmentación. Se evidenció exudado en todas las cepas y pH, con excepción de la cepa 638.08 en el medio CMYA. El color del exudado varió de traslúcido en el medio CMYA, a amarillo o ámbar en los medios EMA y PDA. Se percibió olor afrutado en todas las colonias de las cepas evaluadas sin importar el medio y pH.

Microscópicamente, en los tres medios de cultivo y pH la mayoría de las cepas presentaron hifas con un diámetro de 2.0-4.0 •m, con excepción de las cepas 59.01 y 638.08 en el medio PDA, las cuales presentaron un diámetro de 2.0-3.0 •m. Asimismo, evidenciaron fíbulas en regular cantidad, excepto en las cepas 60.01 y 112.02 donde fueron escasas. Todas las cepas exhibieron la formación de clamidosporas.

Discusión

El pH tuvo una influencia significativa en el crecimiento de las cepas evaluadas, cuando se utilizan los medios PDA, EMA y CMYA, por lo que los resultados de los ensayos *in vitro* probaron que sí existe un efecto del pH en el crecimiento del hongo.

Debido a que las cepas 638.08 y 58.01 a pH 6 presentaron la mejor combinación por su mejor crecimiento, a diferencia del resto de las cepas y pH evaluados, se recomienda utilizar estas condiciones para futuros cultivos de las cepas. Por otra parte, no se recomienda utilizar un pH $\leq$ 5 en los medios

CMYA, PDA y EMA para el cultivo de cepas, debido a que el pH bajo afecta la actividad de las enzimas extracelulares (celulasas, pectinasas y otras), lo cual se traduce en un menor crecimiento (Dudchenko & Semichaevsky, 1989).
Hay que considerar también que el pH ajustado inicialmente en el medio de cultivo a evaluar, puede declinar incluso cuando se observe que existe o no un adecuado crecimiento micelial, debido a que el dióxido de carbono se hace más soluble y la cantidad de iones de carbonato en solución se incrementan, lo cual resulta en una disminución del pH del medio (Yamanaka, 2003).

Se ha establecido que la concentración de H+ presentes en el medio tiene poco efecto directo sobre el metabolismo de hongos, debido al sistema buffer (amortiguador) presentes en las hifas, pero puede influir en la ionización de las sales en solución y en la permeabilidad de la membrana plasmática de las hifas. Además, la actividad de las enzimas se ve afectada por la concentración de H+ presentes en el medio (Dix & Webster, 1995).

Aunque las condiciones favorables para el crecimiento vegetativo no están estrechamente relacionadas con las condiciones necesarias para la formación del cuerpo fructífero, se sugiere que el valor del pH del hábitat podría ser un factor determinante para predecir el patrón de desarrollo de los hongos (Yamanaka, 2003). Por lo tanto, para evaluar el crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y pH, cobra importancia el tener conocimiento sobre el pH del medio en el cual se recolecta el hongo de estudio. En este caso, dicha información no se pudo obtener debido a que las cepas de *A. cylindracea* almacenadas en el cepario de Hongos Saprobios y Micorrícicos, no contaban con información sobre el análisis químico de la madera donde se encontraron los hongos que dieron origen a la obtención de las distintas cepas En el presente trabajo de investigación, la cepa 112.02 fue la que mostró el menor crecimiento micelial, en los tres medios de cultivo y pH evaluados. Un factor que pudo haber influido fue que las cepas se almacenan en refrigeración a 4°C, la cual es una metodología no recomendada para conservación de cepas (Bueno & Gallardo, 1998).

En relación con lo anterior, se ha reportado que el micelio de *A. cylindracea, F. velutipes* y *P. ostreatus*, criopreservado utilizando nitrógeno líquido, era viable luego de su almacenaje por un mes (Maekawa, Fukuda, Arita & Komatsu, 1990). Para cada especie, la morfología y la tasa de crecimiento micelial fueron observadas y calculadas, utilizando el medio EMA (Nobles, 1965) a 25°C antes y después de este procedimiento y no se encontró algún cambio significativo en la morfología y el crecimiento micelial, con excepción de *A. cylindracea*, que redujo significativamente su crecimiento micelial (Maekawa, *et al.*, 1990). Estos resultados muestran que el micelio de *A. cylindracea* puede afectarse luego de períodos prolongados de almacenamiento a bajas temperaturas.

La elección de los métodos para conservación de cepas, deben tener en cuenta varios factores, según sea el objetivo de la colección, en este caso la capacidad de conservar las características micro y macroscópicas del hongo, así mismo las características genéticas y celulares propias de cada género y especie. Por tal motivo el método recomendado para la preservación de cepas es la congelación a -70°C en criotubos sin solución crioprotectora, con miniblocks de agar conteniendo la cepa fúngica de interés.

Un lento y denso crecimiento micelial puede ser atribuido a condiciones desfavorables y explotación de los recursos nutritivos del medio de cultivo por el hongo. Una óptima temperatura de incubación para el crecimiento micelial, una alta tasa de colonización del micelio, no sólo permite establecer el modelo competitivo menos probable para su uso, sino también puede contribuir a un mejor cultivo del hongo con mayores porcentajes de eficiencia biológica (Zervakis, Philippoussis, Ioannidou & Diamantopoulou, 2001).

En relación con las características microscópicas de las cepas, debe ser evaluada la presencia de fíbulas; por ser este un indicativo de la capacidad que poseen las mismas de llegar a formar los basidiomas (Chang & Miles, 2004), cuando se estudien con fines de producción (Huitz, 2009). Se ha concluido que la presencia de fíbulas en las distintas cepas ya sea en escasa, regular o abundante cantidad en todos los medios y pH, indica un estado dicariótico del micelio y garantiza el mantenimiento del mismo en las puntas de las hifas, como un paso previo a la fructificación en todos los basidiomicetes (Chang & Miles, 2004).

El desarrollo de clamidosporas en las cepas evaluadas de *A. cylindracea*, fue proporcional al tiempo de incubación, de manera que períodos de incubación prolongados generan una mayor cantidad, lo cual puede indicar que las condiciones son desfavorables para el desarrollo del micelio (Huitz, 2009), ya que estas estructuras de resistencia se forman cuando las condiciones ambientales son adversas (Chang & Miles, 2004).

La presencia de exudado puede significar la producción de metabolitos secundarios (Stamets, 1993). Asimismo, el olor que se reporta para las colonias de *A. cylindracea* es afrutado, el cual fue percibido en todas las cepas, medios y pH evaluados. Con respecto a presencia de pigmentos, en esta investigación pudo observarse que las cepas de *A. cylindracea* evaluadas mostraron pigmentación tanto en el micelio, como en el medio de cultivo luego de un período prolongado de incubación (>20 días aproximadamente). La presencia de coloración en el reverso del medio en cajas de petri con colonias de otras especies de hongos como *Lentinula edodes* y especies de Pleurotus pueden indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios, no necesarios para el crecimiento micelial y producción de basidiomas, o alguna anormalidad en el crecimiento (Stamets, 1993), por este motivo puede ser una características no deseable en los cultivos de *A. cylindracea*.

Sin embargo es necesario estudiar la cantidad y composición bioquímica del exudado producido por el micelio sobre los diferentes medios de cultivo y pH, debido a que todas las cepas evaluadas presentaron su mayor crecimiento micelial en EMA o PDA a pH 6. En general, los hongos crecen bien en condiciones ácidas, pero en algunas especies se ve favorecido su crecimiento a pH neutro o en condiciones ligeramente alcalinas (Fries, 1956), por lo que el efecto del pH sobre el crecimiento fúngico es bastante complejo, ya que inicialmente el pH afecta el crecimiento y subsecuentemente el crecimiento afectará el pH a través de la acumulación de metabolitos en el medio (Cantrell & Dowler, 1971). Por tal motivo es importante establecer y registrar el pH óptimo de crecimiento micelial de *Agrocybe cylindracea*.

Debido a que el crecimiento micelial no está siempre relacionado con la productividad (Salmones, Gaitán, Pérez & Guzmán, 1997), es necesario realizar un estudio de todas las cepas del hongo de interés, para evaluar las que presentan mayores rendimientos de crecimiento micelial, mejor producción de inóculo y mayor producción de cuerpos fructíferos sobre diferentes medios de cultivo y substratos, con fines alimenticios y medicinales.

Entre las consideraciones importantes que debe tomarse en cuenta para evaluar posteriormente la producción de cuerpos fructíferos de *A. cylindracea*, es la de mantener una rápida velocidad de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo, lo que indudablemente favorece la reducción de los ciclos de cultivo del hongo (Salmones, *et al.*, 1997). La cepa utilizada en el cultivo de hongos comestibles es crucial para el éxito en la producción y comercialización, pues una cepa con una alta capacidad de invadir el sustrato y con una mayor velocidad de crecimiento micelial disminuye el tiempo de incubación.

Agradecimientos

Agradezco la asesoría y colaboración de la Licda. María del Carmen Bran González y del Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel. También al personal de laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de de Ciencias Químicas y Farmacia y la Micoteca de Macrohongos de Guatemala "Lic. Rubén Mayorga Peralta". En especial a la directora de escuela y revisora de esta investigación, Msc. Vivian Matta por el tiempo y comentarios efectuados.

Referencias

Bran, M., Morales, O., Cáceres, R. y Flores, R. (2003). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Rev. Cient. Guat. 1(1):3-24.

Bueno, L. y Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev. Iberoam. Micol. 15:166-168.

Cantrell, H. & Dowler, W. (1971). Effects of temperature and pH on growth and composition of Pythium irregulare and *P. vexans*. Mycol. 63:31-37.

Chang, S. & Miles, P. (2004). Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2a. ed. USA: CRP. Press. 451p. p.2, 6, 193.

Dix, N. & Webster, J. (1995). Fungal ecology. London: Chapman & Hall. 549p. p.186-188.

Dudchenko, L. & Semichaevsky, G. (1989). Effect of pH of the medium on the production of extracellular enzymes by wood-destroying Basidomycetes. Rev. Plant. Pathol. 22(2):135-141.

Fries, L. (1956). Studies in the physiology of Coprinus. II. Influence of pH, metal factors and temperature. Sven. Bot. Tidskr. 50:47-96.

Hostnig, R. Hostnig, V. & Vásquez, L. (1998). Etnobotánica Mam. Guatemala: GTZ-Helvetas. 366p. 90p.

Huitz, P. (2009). Crecimiento miceliar y caracterización macro y microscópica de cepas nativas del hongo comestible Asam (Schizophyllum commune Fr.). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Trabajo de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 58p.

Maekawa, N., Fukuda, M., Arita, T. & Komatsu, M. (1990). Effects of liquid-nitrogen cryopreservation on stock cultures of three cultivated basidiomycetous fungi. Rept. Tottori. Mycol. Inst. 28:227-232.

Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. (2002). Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 34p.

Morales, O. (2001). Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 92p.

Morales, O., Bran, M., Cáceres, R. (2010). Los hongos comestibles de uso tradicional en Guatemala. En: D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. (Eds.). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles. p.437-464.

Nobles, M. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. Can. J. Bot. 43:1097-1139.

Poucheret, P., Fons, F. & Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective análisis. Cryp. Mycol. 27(4): 311-333.

Salmones, D., Gaitán, R., Pérez, R. y Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género Pleurotus. VII. Interacción entre el crecimiento miceliar y la productividad. Rev. Iberoam. Micol. 14:173-176. 17de substrato sobre el crecimiento micelial de Ganoderma lucidum. Rev. Mex. Mic. 16:37-40.

Stamets, P. (1993). Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms. WA, USA: Ten Speed Press & Mycomedia. Olympia, WA, USA. 554p. p.30, 113, 126, 220.

Fries, L. (1956). Studies in the physiology of Coprinus. II. Influence of pH, metal factors and temperature. Sven. Bot. Tidskr. 50:47-96.

Uhart, M. & Albertó, E. (2007). Morphologic characterization of Agrocybe cylindracea (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europa and Asia. Rev. Mex. Mic. 24:9-18.

Yamanaka, T. (2003). The effect of pH on the growth of saprotrophic and 21. ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. Mycologia 95(4):584-589.

Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S. & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia. Microbiol. 46(3): 231-234.