VOL 19 No. 2 REVISTA CIENTÍFICA
AÑO 2010
ISSN 2070-824 ISSN-e: 2224-5545

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Revista Científica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Cultivo de una cepa guatemalteca de *Polyporus umbellatus* Fr. en medios sólidos y producción de esclerocíos *In vitro*

Rendon C. y Morales O.

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
Universidad de San Carlos de Guatemala.

DOI: https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v19i2.159

Licencia: CC-BY 4.0

Resumen

Se describen las características miceliares de cultivo *in vitro* de una cepa nativa de *Polyporus umbellaius,* así como el medio y la temperatura más adecuadas para su desarrollo. E] trabajo se inició reactivando la cepa de P. umbellaius 25. 2000 en agar PDA e incubándola a 26°C durante 22 días. Seguidamente se determinó la tasa radial de crecimiento en los medios de cultivo SAB. PDA. EMA y PDA-IM a las temperaturas de 18 y 26°C. El crecimiento más vigoroso y rápido fue observado en el medio PDA-IM a 24°C a los 10 días de incubación con un diámetro medio de 37.70 nun x una lasa radial de crecimiento de 3.77 mm/día. Para la producción de inoculo se emplearon granos de maicillo, trigo, cebada, los cuales se incubaron a 18 y 26°C. Se evaluó el crecimiento durante 50 días, periodo en el cual no se óbserxó crecimiento del micelio en ninguno de los sustratos evaluados (maicillo, cebada y trigo) a ambas temperaturas. La producción de esclerocíos se evaluó durante 4 meses, incubándose el sustrato (aserrín de encino) a 18°C. Finalizado este lapso no se observó la formación de esclerocíos a pesar de la colonización completa del sustrato, Por tal motivo, se concluyó que las condiciones evaluadas en esta investigación no fueron las adecuadas para la producción de esclerocíos.

Palabras clave: hongos medicinales, esclerocíos, inóculo.

Culture of a Guatemalan strain of Polyporus umbellatus Fr. in solid media and production of sclerotia In vitro

Abstract

The myeelia characteristics of a native strain of *Polyporus umbellaius* were described in different culture media and temperatures. The strain *(P. umbellaius* 25.2000) was reactivated in PDA agar and incubated at 26°C for 22 days. The radial grow th rate was determined in culture media SAB, PDA and PDA-IM EMA al temperatures of 18 and 26°C. The most vigorous and rapid growth was observed in the PDA medium-lM at 24 ' C at 10 days of incubation with an average diameter of 37.70 mm and a radial growth rate of 3.77 mm / day. For the inoculums production it were used grain sorghum, wheat, barley. which were incubated at 18 and 26 ° C. Growth was evaluated for 50 days, a period in which no mycelial grow th was observed in any of the evaluated substrates at both temperatures. Sclerotia production was evaluated during four months, incubating (lie substrate (oak sawdust) at 18 ° C. After this period there was no formation of sclerotia despite of the complete colonization of the substrate. Therefore, it was concluded (hat the conditions evaluated in this study were not appropriate for the production of sclerotia.

Key words: medicinal mushroom, sclerotia, inoculum.

Introducción

En Guatemala existe un gran número de especies de hongos, de las cuales se conocen unas 70 comestibles. Sin embargo, actualmente el cultivo de hongos comestibles está limitado a muy pocas especies (1).

Uno de los hongos comestibles que crecen naturalmente en Guatemala es *Polyporus umbellatus*, el cual es muy popular en otras partes del mundo no así en nuestro país. Este hongo, aparte de sus propiedades gastronómicas, tiene propiedades medicinales como antidiurético e hipotensor, pero principalmente es utilizado para el tratamiento de leucemia y cáncer de pulmón (2,3).

Debido a la importancia y propiedades medicinales que posee esta especie, se consideró oportuno ensayar el cultivo in vitro de una cepa de *P. umbellatus* aislada en Guatemala y evaluar la producción de inóculo y esclerocios, a efecto de desarrollar un procedimiento para su cultivo.

Por este motivo, se describieron las características micelíares de cultivo in vitro, para determinar el medio y la temperatura donde presenta mejor desarrollo. Además se evaluó la producción de inóculo utilizando diferentes sustratos y temperaturas y se ensayó la producción de esclerocios mediante la utilización de aserrín de encino (*Quercus* spp).

Materiales y Métodos

La cepa de P. umbellatus 25.2000, preservada a 5°C en el cepario de hongos saprobios y micorrízicos del departamento de Microbiología, se sembró en agar PDA y se incubó a 26°C por 22 días.

Se prepararon los medios de cultivo PDA, PDA-IM, EMA y SAB y se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 15 minutos. El medio PDA-infusión de madera (PDA-IM) se elaboró con 39 gramos de agar papa dextrosa y 1,000 ml de infusión de *Quercus* spp. La infusión se preparó hirviendo 45 gramos de fragmentos de madera de encino en 1,500 ml agua destilada (4,5).

A partir de un cultivo joven se sembraron 10 cajas de cada uno de los medios sólidos, con una porción de micelio de 5 mm de diámetro, que se inoculó en el centro de las cajas de Petri. Los cultivos se incubaron a 18°C y a 26°C se registró la velocidad media de crecimiento radial, midiendo el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 72 horas y durante el tiempo de incubación expresándolo en mm/día. Se identificó la temperatura y el medio que presentó el mayor crecimiento de la cepa.

A las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivo y temperaturas se les observaron las características macroscópicas utilizando un estereoscopio. Para la descripción microscópica se realizaron preparaciones con azul de lactofenol, que permitieron observar las características hifales (6).

Para la producción de inóculo se prepararon granos de maicillo, cebada y trigo remojándolos por 16 horas. Se eliminó el exceso de humedad durante dos horas dejando escurrir los granos. Posteriormente se colocaron en bolsas de polipapel, pesando 50 gramos de cada uno de ellos y se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 30 minutos. Se realizaron cinco repeticiones por cada sustrato. Se cortaron cuadros de 1.0 cm2 del micelio contenido en las cajas de Petri y se inocularon los granos con 5 fragmentos del cultivo. Las bolsas se incubaron a temperaturas de 18 y 26°C. El crecimiento del micelio se observó sobre el sustrato cada 5 días, por un lapso de 50 días (7,8).

Para la producción de esclerocios se humedeció aserrín de encino por 12 horas. Luego se llenaron frascos de vidrio con tapón de rosca con 500 gramos de sustrato y se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 45 minutos. Se inoculó el sustrato con 10 fragmentos de micelio de 1 cm^2 de la colonia. Se incubó a 18°C en condiciones de oscuridad, hasta lograr la producción de esclerocios (7,8).

Microscópicamente presentaron hifas hialinas y fíbulas en regular cantidad en la mayoría de medios de cultivo evaluados, con excepción del medio SAB a 26°C, donde se encontraron fíbulas abundantes.

Respecto al crecimiento miceliar a 18°C y 10 días de incubación, el medio de cultivo que presentó el mayor crecimiento fue PDA-IM con colonias de 37.70 mm de diámetro y con tasa de crecimiento radial de 3.77 mm/día; seguido del medio EMA, donde se observó un diámetro de 37.32 y una tasa radial de crecimiento de 3.73 mm/día. El menor crecimiento fue registrado en el medio SAB, donde obtuvo un diámetro de 23.22 mm y una tasa de crecimiento radial de 2.32 mm/día (Tabla 1, Gráfica 1).

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diámetros de crecimiento miceliar, obtenidos en los medios PDA-IM, EMA y PDA ($p>0.05$). El crecimiento miceliar observado en el medio SAB fue estadísticamente diferente, con relación a los demás medios ($p>0.05$).

El crecimiento miceliar a 26°C y 10 días de incubación, mostró que el mayor crecimiento se presentó en el medio PDA-IM, con un diámetro medio de 52.02 mm y con una tasa radial de crecimiento miceliar de 5.20 mm/día, seguido del medio EMA, donde se observó un diámetro medio de 48.85 mm y una tasa radial de crecimiento miceliar de 4.88 mm/día. El medio donde se observó menor crecimiento fue SAB, con un diámetro medio de 38.80 mm y una tasa radial de crecimiento miceliar de 3.88 mm/día. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento miceliar obtenido en todos los medios de cultivo ($p<0.05$) (Tabla 1, Gráfica 1).

Tabla 1. Crecimiento miceliar de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 durante 10 días de incubación en diferentes medios de cultivo a dos temperaturas.

A los resultados obtenidos se les efectuó un análisis de varianza de una vía.

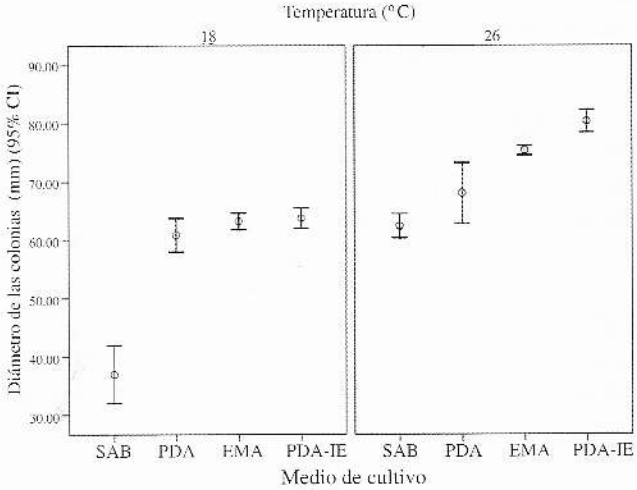
Resultados

Las colonias de la cepa de *P. umbellatus* presentaron color blanco, textura algodonosa y escaso micelio aéreo en los medios PDA y EMA. En el medio PDA-IM se evidenciaron características similares pero formó abundante micelio aéreo. En el medio SAB se presentaron colonias de color blanco y textura compacta (sin micelio aéreo). Estos detalles se observaron tanto a 18°C como a 26°C.

Temp. oC	Medio	Diámetro (mm)1	Diámetro final (mm)2	TCR (mm/día) 3	S4
18	PDA-IM	37.70 ± 20.87	63.8 ± 1.40	3.77	a
	EMA	37.32 ± 20.26	63.3 ± 1.15	3.73	a
	PDA	35.45 ± 20.30	60.9 ± 2.33	3.54	a
	SAB	23.22 ± 11.17	37.0 ± 4.00	2.32	b
26	PDA-IM	32.02 ± 5.43	80.4 ± 1.52	5.2	a
	EMA	48.85 ± 23.49	75.4 ± 0.65	4.88	b
	PDA	43.85 ± 21.63	68.1 ± 4.19	4.38	c
	SAB	38.80 ± 23.49	62.5 ± 1.69	3.88	d

1,2: Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.
3: TCR= tasa de crecimiento radial calculado a partir del diámetro medio dividido entre el número de días de incubación.
4: Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa con la prueba de comparación múltiple de Tukey (=0.05).
Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 1. Diámetro del crecimiento miceliar ± la desviación estándar, de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 en diferentes medios y temperaturas.



Al comparar el crecimiento miceliar observado en los medios de cultivo con referencia a la temperatura (18° C y 26° C) se determinó que existió diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en el medio SAB a 18° C con el medio PDA-IM a 26°C (p=0.01), con el medio PDA a 26°C (p = 0.040) y con el medio EMA a 26°C (p=0.003).

No se observó diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en el medio SAB a 18°C comparado con el observado en el medio SAB a 26°C.

La producción de inóculo se evaluó durante 50 días en los vehículos maicillo, cebada y trigo, incubados a 18° C y 26° C. Transcurrido este lapso, no se observó el crecimiento miceliar en ninguno de ellos, por lo que no fue posible producir el inóculo de la cepa *P. umbellatus* 25.2000 en ninguno de los vehículos y temperaturas evaluadas en esta investigación.

En cuanto a la producción de esclerocios, ésta se evaluó durante 4 meses incubándose el sustrato (aserrín de encino) a 18°C. Finalizado este lapso, no se observó la formación de esclerocios a pesar del prolongado tiempo de incubación y la colonización completa del sustrato.

Discusión

Se observó que la cepa *P. umbellatus* 25.2000 en todos los medios de cultivo y temperaturas estudiados, presentó colonias con características similares a las descritas para la especie, estudiadas en aislamientos de Estados Unidos y Asia (4).

Respecto a las características microscópicas, solamente en el medio SAB en ambas temperaturas se observó abundante cantidad de fíbulas, lo que es indicativo de la condición dicariótica del micelio, el cual es capaz de formar cuerpos fructíferos bajo condiciones adecuadas (4,9). Además, dado que esta característica se observó solo en este medio de cultivo, se puede suponer que alguno de los nutrientes presentes en el medio SAB promueve la formación de fíbulas.

Asimismo, se comprobó que la cepa formó hifas de menor diámetro en el medio PDA-IM. Esta característica probablemente fue inducida por la infusión de madera de encino contenida en el medio, ya que se ha reportado que las hifas de menor diámetro son más eficientes para colonizar la madera, simulando la respuesta observada en su hábitat natural (9,10). Además, dado que en el medio PDA sin infusión de madera de encino no se observó esta cualidad, se deduce que el hongo necesita la presencia de los compuestos de la madera de encino para producir hifas de menor diámetro. Por otra parte, ya que en este medio se producen regular cantidad de fíbulas, se puede recomendar su uso para futuros cultivos de la cepa, con fines de productividad (11).

Con respecto al crecimiento miceliar, la suplementación del medio PDA con infusión de encino estimuló el crecimiento del hongo tanto a 18°C como a 26°C, lo cual puede deberse a que *P. umbellatus* crece naturalmente en madera de encino y probablemente al haber adicionado la infusión de madera de encino al medio PDA, se introdujeron factores que estimularon el crecimiento miceliar (10), sin embargo, esta observación deberá ser corroborada en estudios posteriores, ya que el crecimiento miceliar no mostró diferencia significativa con los medios PDA y EMA. Por tal razón, se rechaza la primera hipótesis planteada, debido a que el mayor crecimiento no se observó en el medio de cultivo PDA a 26°C.

En general, los mayores valores de crecimiento miceliar (diámetro medio y tasa radial de crecimiento) se obtuvieron a 26° C y los menores a 18°C. Esto se debió a que la temperatura afecta el metabolismo de la célula e influye tanto en la capacidad enzimática del microorganismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular (6).

En particular, en el medio SAB a ambas temperaturas la cepa de *P. umbellatus* obtuvo el menor crecimiento miceliar, por lo cual no se recomienda la utilización de este medio para el cultivo de dicho hongo, a pesar de que en él se formó la mayor cantidad de fíbulas, lo que sería una característica aceptable con fines de productividad (15). Por otra parte, se ha reportado que *P. umbellatus* produce importantes enzimas antioxidantes y citoprotectoras, lo cual sugiere un considerable potencial terapéutico como protector contra el daño neurodegenetivo que producen radicales libres (18) por lo que es de suma importancia continuar con los estudios de esta cepa en otros medios de cultivo.

Con respecto a la producción de inóculo en las semillas de maicillo, cebada y trigo, no se obtuvo crecimiento alguno después de 50 días de incubación a ambas temperaturas. Se piensa que la principal razón que puede explicar este hecho es que, si bien *P. umbellatus* es un hongo de pudrición blanca (degrada

primero lignina, luego la celulosa y de ultimo la hemicelulosa), no se ha reportado que degrade también almidón (19) el cual es el principal componente presente en las granos utilizados (16). Por tal razón, es razonable que el micelio no se haya desarrollado en ninguno de los granos evaluados. Consecuentemente, se rechaza la segunda hipótesis que indicaba que el maicillo era el mejor sustrato para producir inoculo.

En la fase de producción de csclerocios se observó un crecimiento miccliar muy lento en el aserrín de encino, llegando a colonizar completamente el sustrato en un periodo de 3 meses. La colonización de la madera de encino por parte de *R iimbellaliis* es natural, ya que es un hongo de pudrición blanca que degrada primero la lignina, luego la celulosa y por último la hemicelulosa (19). de manera que este hongo es capaz de degradar este tipo de madera en condiciones de laboratorio.

Sin embargo, una vez colonizado el sustrato, se incubó por mi mes más, no obteniéndose la producción de esclerocios a 18“ C. rechazándose así la tercera hipótesis. Según la literatura los esclerocios se forman entre 10° C y 18° C. en un periodo de tiempo entre 60 y 90 días y en condiciones de oscuridad (4,17), condiciones que .se le proporcionaron al sustrato y sin embargo no se produjeron los esclerocios.

Por tal motivo, se sugiere que en investigaciones posteriores se tome en cuenta que la producción de csclerocios es un proceso sumamente complejo y depende de múltiples factores (como pH, temperatura, humedad. CO2, nutrientes, luz, entre otros) (4), para lograr su producción in vitro.

Agradecimientos

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC y al Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAM1R- LLSAC.

Referencias

Deschamps, J. R. Producción y comercialización de hongos comestibles. Buenos Aires, Argentina: Editorial Gráfics S.R.L., 1999., contraportada.

Bran M., et al. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Edición Especial, Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC 2003; Vol 1. No. 1: l-24De León. R. Cultivation of edible and medical mushrooms in Guatemala, Central America. Micol Apl Int 2003; 15(1): 31-35.
https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.EdicionEspecial2003.232

Statmets, P. Growing Gourmet y Medicinal Mushrooms. Hong Kong: Teen Speed Press MycomediaTM Productions.,1999. (p.380- 383).

Bran M. C. et al. Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula, fase I. Informe final técnico. Dirección General de Investigación. Guatemala, 2001.

Sánchez. J. Til Crecimiento y Fructificación. En: Sánchez. J., Royse. D. La biología y el Cultivo de Pleurotus. Iª edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 2002. 294p. p 59.

Guzmán. G. Los Hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción de la microbiota tropical de México. México: INEL y CONABIO, 2003. (p.9).
https://doi.org/10.1590/S0036-46652004000500017

Alexopoulos. C. J. Introductory mycology. 4ª ed. U.S.A.: John Wiley y Sons. Inc., 1996. (p.3-5).

Shu-Ting Chang, Philip G Miles. Mushrooms cultivation, Nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2a edición. U.S.A. CRC Press. 2004. (p. 64:451).

Morales O., et al. Estudio cmomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC. Guatemala 2002; 15: 10-20.
https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v15i1.252

López, A. Hongos Comestibles. Programa Nacional de Promoción de cultivo de los hongos comestibles. Univ. Ver. México 2002. Disponible en: www.icidca.cu/Productos/Hongos.htm.

Guzmán G. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos de México. (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). En; Halffer G. (Comp). La Diversidad Biológica Iberoamericana II. Volumen especial. Acta Zoológica Mexicana. Nueva Serie. 1998. (p.113-114), https://doi.org/10.1590/S0036-46652004000500017

Subhuti D. Institute for Traditional Medicine. Sen-traditional Chinese medicine ítem). Disponible en: Polyporus www.senhealth.com/…/page/xmlcontent/0,11740,4822-129036-130344-19164-68168-xmlcontent-item,00.html

Chang. S.-, Miles, E Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact., CRC Press., USA 2004: 375 - 380.

Chung, H. 1., Chich. H. T.. *Polyp orus umbellalus.* Mycosoc. 1991 Apr;l 1 (4):225-226, Disponible en: www.mycosoc.dk/lssues/vol39/polyumbell.htm

Salmones, D., er al Estudios sobre el género *PleurotusNili.* Interacción cmre el crecimiento micelial v productividad. Rcv Iberoam Micol 1997; 14:173-176.

Labarére. I., Bois, F. La conservación y el uso de los recursos enéticos de *Pleurotus* spp. En: Sánchez, J.. Royse, D (Eds). Editorial L1MUSA, México. 2001. Pag. 83-124.

Cornelius C., et al. Comparative enzime analysis of *Polyporus umbellatus, Agaricus blezel, Pleurotus osteratus* and Hericium *erinaceus.* Clinical Journal of Mycology. Aneid Press. 2009: 3:5-7.

Blanchette, R. A., et al Detection of Lignin peroxidase and xilanase by immunocytochemical labeling in wood decaved bv Basidiomycetes. Appl and Enviro Microbiol. 1989: 55:1457-1460, https://doi.org/10.1128/aem.55.6.1457-1465.1989

Copyright (c) 2010 C. Rendon y O. Morales

Este texto está protegido por una licencia *CreativeCommons 4.0*.

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, , incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

Resumen delicencia - *Textocompletodelalicencia*