

ESTUDIO MACRO-MICROSCOPICO Y ENZIMATICO CUALITATIVO DE CEPAS MICELIALES DE BASIDIOCARPOS DE AGARICALES .I.

(Macro -Microscopic and qualitative enzymatic study of mycelial
strains from basidiocarps of *Agaricales* .I.)

S. Garnica¹; C. Ramírez¹ & E. Valenzuela².

¹Instituto de Botánica. Facultad de Ciencias.
Universidad Austral de Chile, Casilla 567. Valdivia, Chile.

²Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias.
Universidad Austral de Chile, Casilla 567. Valdivia, Chile.

Palabras clave: Cepas miceliales, cultivo puro, morfología, enzimas, *Agaricales*, Chile.

Key words: Mycelial strains, pure culture, morphology, enzymes, *Agaricales*, Chile.

RESUMEN

Se entrega una caracterización macro-microscópica y enzimática cualitativa de 8 cepas miceliales obtenidas en cultivo puro desde el pseudotejido de basidiocarpos de *Agaricales*. Las cepas miceliales son: UACHMAs-267, UACHMCd-403 y 443, UACHMGs-98 y 467, UACHMMr-260, UACHMPhs-428 y UACHMPsc-436. Se discute su aislamiento en cultivo puro, las características de crecimiento en los medios de cultivo PDA, AEM y CzA, los rasgos morfométricos de las hifas, estructuras de reproducción y resistencia, además de las enzimas detectadas. Se detectó una marcada presencia de enzimas implicadas en la degradación del complejo ligno-celulosa.

INTRODUCCION

Los *Agaricales*, un orden de los *Basidiomycotina*, se caracterizan por desarrollar basidiocarpos blandos, putrescibles y de corta duración (Singer 1986). Algunos géneros presentan especies que se desarrollan sobre sustratos ligno-celulósicos principalmente como saprófitos, desdoblando y obteniendo así sus nutrientes mediante la secreción de enzimas (Donoso 1968).

Los basidiocarpos de los *Agaricales* son producidos bajo ciertas condiciones ecológicas y lo que predomina en la naturaleza es el micelio, que es microscópico y permanece normalmente en el interior del sustrato. El aislamiento y

SUMMARY

A macro-microscopic and enzymatic qualitative characterization of eight mycelial strains obtained in pure culture from the pseudotissue of the basidiocarps of *Agaricales* is given. The mycelial strain are: UACHMAs-267, UACHMCd-403 and 443, UACHMGs-98 and 467, UACHMMr-260, UACHMPhs-428 and UACHMPsc-436. Their isolation in pure culture, their growth in PDA, AEM and CzA culture media, the morphometric features of the hyphae, reproduction and resistance structures, furthermore the enzymes detected are discussed. A marked presence of enzymes involved in the degradation of the ligno-cellulose complex was detected.

obtención del micelio en cultivo puro presenta grandes dificultades, esto ha repercutido en los escasos estudios realizados sobre las cepas miceliales de *Agaricales* (Pantidou et al. 1983; Singer 1986).

A nivel mundial, Nobles (1948, 1958, 1965), a realizado una caracterización macro-microscópica y enzimática sobre AEM y ácido tánico de algunas cepas miceliales de *Agaricales* que viven en la madera. Por su parte, Watling (1979) y Kendrick & Watling (1979), han estudiado la morfología, variación y significancia ecológica de los anamorfos en condiciones naturales y en cultivo puro presentes en los *Basidiomycetes*, donde incluyen algunos *Agaricales* de la madera. Sin embargo, la gran

mayoría de los estudios sobre cepas miceliales de *Agaricales* se han orientado a especies micorrizógenas, praticolas o coprófilas (Cuevas & Herrera 1971; Olmo-Fuentes & Herrera 1973; Pantidou et al. 1983)

En cuanto a caracterizaciones enzimáticas, los trabajos existentes sólo describen algunas especies de *Agaricales*, destacando el estudio de la actividad pectinólítica en *Armillaria* europeas (Wahlstrom et al. 1991) y la presencia de enzimas proteolíticas en especies de *Coprinus* (Kaliskz et al. 1989).

El presente trabajo da a conocer la caracterización macro-microscópica y enzimática cualitativa de 8 cepas miceliales obtenidas en cultivo puro a partir de basidiocarpos de *Agaricales* que fructifican sobre restos leñosos de árboles introducidos en el Centro-Sur de Chile.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas miceliales designadas como UACHMAs-267, UACHMCd-403 y 443, UACHMGs-98 y 467, UACHMMr-260, UACHMPhs-428 y UACHMPsc-436, fueron obtenidas en cultivo puro desde el pseudotejido de los basidiocarpos que se indican en la Tabla 1.

TABLA 1
Agaricales y sus correspondientes cepas miceliales obtenidas en cultivo puro.

<i>Agaricales</i>	Cepas miceliales
<i>Armillariella sparrei</i> Sing.	UACHMAsp-267
<i>Coprinus disseminatus</i> (Pers.:Fr.) Gray	UACHMCd-403 y 443
<i>Gymnopilus spectabilis</i> (Fr.) Smith	UACHMGsp-98 y 467
<i>Mycena rubromarginata</i> (Fr. ex Fr.) Kummer	UACHMMr-260
<i>Pholiota spumosa</i> (Fr.) Sing.	UACHMPhs-428
<i>Psathyrella candolleana</i> (Fr.) Moire	UACHMPsc-436

Los basidiocarpos se trataron de acuerdo a lo descrito por Molina & Palmer (1982). Fueron considerados cultivos puros aquellos micelios que presentaron estructuras microscópicas semejantes a las descritas por Nobles (1948, 1958, 1965) y Stalpers (1978). Para determinar las características de cultivo tales como forma de la colonia, color, crecimiento, etc., trozos de micelio de las distintas cepas fueron inoculados independientemente en el centro de placas Petri que contenían los medios de cultivo PDA, AEM y CzA al 2% y se incubaron a 23°C. Para la

caracterización morfológica y morfométrica, los cultivos desarrollados en los medios citados se examinaron a los 7 y 14 días, confeccionándose preparaciones en fresco del micelio de diferentes zonas de la colonia, se usó agua como líquido de montaje. Se aportan dibujos bajo cámara lucida de las estructuras miceliales descritas. La forma y textura de las colonias se establecieron de acuerdo a los criterios de Nobles (1965) y Stalpers (1978). La detección cualitativa de las enzimas se ejecutó a los 14 días; para las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa, peroxidasa y tirosinasa, se siguió el procedimiento descrito por Taylor (1974) y Stalpers (1978). En la acción de las enzimas amilolíticas, celulolíticas y pectinólíticas se usó una técnica modificada de Pochon & Tardieux (1965). La enzima oxidasa extracelular se detectó siguiendo lo establecido por Nobles (1958). Las enzimas proteolíticas y la ureasa, se determinaron según lo descrito por Mac Faddin (1976) y las enzimas DNasa y lipasa como indican Hankin & Anagnostakis (1975). Se utilizaron como controles las cepas miceliales (Tv) de *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilát. y (Fo) de *Fusarium oxysporum* Schlecht

Las cepas miceliales son indicadas en el texto con la sigla UACHM seguido de las iniciales de la especie correspondiente y el número de colecta.

RESULTADOS

1. Caracterización macro-microscópica de las cepas miceliales.

A) Cepa UACHMAs-267

Obtenida de basidiocarpo de *Armillariella sparrei* Sing. recolectado sobre ramas en descomposición, de *Alnus glutinosa* "aliso". Arboretum de la Univ. Austral de Chile. Valdivia 9-VI-94.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 1)

Macroscopía: colonia de 7 mm de diám., irregular; textura costrosa (igual en AEM), blanquecina-plomiza. Margen apesado a inmerso. Reverso plumizo. Olor nulo. Al mes de cultivo desarrolla pequeños rizomorfos inmersos de color crémeo.

Microscopía: - hifas de 1,4 - 4,2 µm de diám., sin fíbulas, ramificadas, hialina a café-marrón con la edad. - hifas de 2,8-4,3 µm de diám., cubiertas con pequeñas proyecciones similares a "vellos", hialina a café-marrón con la edad. - células cuticulares esféricas, subglobosas, de paredes gruesas refringentes, hialinas a café, formando una capa pseudoparenquimatosa (igual en AEM y CzA).

Medio AEM (LAM. II; FIG. 1)

Macroscopía: colonia de 8 mm de diám., irregular, de color café-oscuro, hacia el margen zonas vellosas a

ausentes, de color plumizo. Margen apresado a inmerso. Reverso negro a café. Olor nulo.

Microscopía: - hifas de 1,4-2,8 µm de diám., sin fibulas, ramificadas, onduladas, hialinas a café-marrón con la edad. - hifas de (2,1) 2,8-4,2 µm de diám., con pequeñas proyecciones similar a "vellos" (igual en PDA y CzA).

Medio CzA (LAM. III; FIG. 1)

Macroscopía: colonia de 6 mm de diám., irregular; textura costrosa-vellosa a pelicular, crémea-olivácea a blanquecina. Margen apresado. Olor nulo.

Microscopía: - hifas de 1,4-2,8 (5,6) µm de diám., hialina a café con la edad, sin fibulas. - hifas incrustadas con cristales.

B) Cepas UACHMCD-403 y 443*

Obtenidas de basidiocarpos de *Coprinus disseminatus* (Pers.: Fr.) Gray. recolectados en corteza de tronco vivo de *Betula pendula* "abedul" 25-VI-94, Jardín Botánico. * En suelo junto *Populus nigra* "álamo negro" 17-XII-94, Alameda de la Univ. Austral de Chile. Valdivia.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 2)

Macroscopía: colonia de 51-90 mm de diám., circular y zonada; textura felposa-lanosa a flocosa-pelicular, crémea con tenue tinte café. Margen apresado. Reverso amarillento-pálido. Olor nulo (igual en AEM y CzA).

Microscopía: - hifas de 1,4-8,4 µm de diám., poco ramificadas a veces onduladas, enrolladas en espiral, varicosas, moniliodes o con cortas ramificaciones, de paredes refringentes. Fibulas presente (igual en AEM). - hifas anastomosadas tabicadas y sin fibulas. - hifas de color café-amarillento (igual en AEM). - Arthroconidios de 2,8-11,2 x 1,4-2,1 µm, cilíndricos, de extremos redondeados (igual en AEM y CzA). - Cristales aciculares y hexaédricos.

Medio AEM (LAM. II; FIG. 2)

Macroscopía: colonia de 58-90 mm de diám., irregular (igual en CzA); textura algodonosa a felposa (farinácea)-ausente, amarillentas. Margen inmerso. Reverso crémeo-blanquecino.

Microscopía: - hifas aéreas de 1,4-5,6 µm de diám.

Medio CzA (LAM. III; FIG. 2)

Macroscopía: colonia de 56-66 mm de diám., de textura pelicular, hialina. Margen con hifas apresadas y distantes.

Microscopía: - hifas de 1,4-5,6 µm de diám., ramificadas a veces entrelazadas, onduladas, coraloideas, corrugadas, anastomosadas, de paredes gruesas refringentes. Fibulas presentes.

C) Cepas UACHMGs-98 y 467*

Obtenidas de basidiocarpos de *Gymnopilus spectabilis*

(Fr.) Smith recolectados en tocón de *Cupressus macrocarpa* "ciprés" 20-V-94. *En raíz de *Sequoia sempervirens* "secoya" vivo, 21-III-95. Jardín Botánico de la Univ. Austral de Chile. Valdivia.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 3)

Macroscopía: colonia de 72 mm de diám., circular y zonada; textura subfelposa a lanosa-vellosa, crémeo a blanquecina. Margen con hifas levantadas y distantes. Reverso blanquecino (igual en CzA). Olor nulo (igual en CzA).

Microscopía: - hifas de 1,4-4,2 µm de diám., a veces entrelazadas, onduladas y fibuladas (igual en AEM). - hifas de 1,4-2,8 µm de diám. (igual en AEM), que dan origen a delgadas ramificaciones laterales o terminales similares a cistidios tipo tibiformes de 11,2-16,8 (63) x <1,4-1,4 (2,1) µm, en la cepa 467 miden 7-16,2 (51,8) x <1,4-1,4 µm y en AEM miden (10,5) 11,9-13,3 (16,1) x <1,4-1,4 µm. - Clamidoporas intercalares y terminales de 4,2-14 x 4,2-11,2 µm [en la cepa 467 miden 8,4-14 x (5,6) 7-11,3 µm], globosas, limoniformes, lisas, de pared gruesa y refringente, a veces con granulaciones, (igual en AEM). - Arthroconidios de 4,2-9,8 (12,6) x 1,4-2,8 µm [en la cepa 467 miden 4,2-9,8 (11,2) x 1,4-2,1 (2,8) µm], cilíndricos, de extremos redondeados, hialinos o amarillentos (igual en AEM). - Cristales hexaédricos, aciculares.

Medio AEM (LAM. II; FIG. 3)

Macroscopía: colonia de 71 mm de diám., irregular y zonada; textura subfelposa-lanosa a vellosa, crémeo-blanquecina. Margen con hifas apresadas y distantes. Reverso amarillento-pálido. Olor dulzaino.

Microscopía: - Cristales grandes, en medio de cultivo (igual en CzA).

Medio CzA (LAM. III; FIG. 3)

Macroscopía: colonia de 90 mm de diám., irregular; pelicular a plumosa-flocosa, crémeo. Margen con hifas apresadas y distantes.

Microscopía: - hifas de 1,4-4,2 µm de diám., a veces entrelazadas, onduladas, corrugadas o bien ramificadas, de paredes gruesas y refringente, fibuladas. - hifas con protuberancias intercalares y terminales de 4,2-11,2 x 4,2-8,4 µm, concolora a la hifa.

D) Cepa UACHMMr-260

Obtenida de basidiocarpo de *Mycena rubromarginata* (Fr. ex Fr.) Kummer. recolectado en restos vegetales bajo *Pseudotsuga menziesii* "pino Oregón". Arboretum de la Univ. Austral de Chile. Valdivia 9-VI-94.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 4)

Macroscopía: colonia de 36-40 mm de diám., irregular y

zonada (igual en AEM); textura subfelposa-farinácea a pelicular, el centro de la colonia con estriaciones de color blanquecino-plomizo, hacia el margen amarillento-limón. Margen apresado (igual en AEM y CzA). Reverso amarillo-verdoso. Olor fúngico (igual en AEM y CzA).

Microscopía: - hifas de 1,4-4,2 μm de diám., a veces con cortas ramificaciones digitiformes, contorneadas, corrugadas, entrelazadas de paredes refringente, fibuladas (en AEM, hasta 5,6 m de diám.). - hifas con protuberancias intercalares y terminales escasas de 5,6-9,8 x 4,2-9,8 μm concolora a la hifa (igual en AEM). - Cristales hexaédricos, puntiformes (igual en AEM).

Medio AEM (LAM. II; FIG. 4)

Macroscopía: colonia de 8-48 mm de diám., textura subfelposa-vellosa (farinácea) a pelicular, amarillenta limón a plumiza. Reverso café oscuro hacia el margen crémeo a amarillento-limón. Olor nulo

Microscopía: como en PDA.

Medio CzA (LAM. III; FIG. 4)

Macroscopía: colonia de 8 mm de diám., irregular; textura subfelposa, crémea. Reverso blanquecino.

Microscopía: - hifas de 1,4-2,8 μm de diám., a veces con cortas ramificaciones o bien corrugadas y con fibulas.

E) Cepa UACHMPHs-428

Obtenida de basidiocarpo de *Pholiota spumosa* (Fr.) Sing. recolectados en corteza de raíz de *Pinus radiata* vivo. Fundo Santa Rosa. Valdivia 29-VIII-94.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 5)

Macroscopía: colonia de 90 mm de diám., circular (igual en AEM) y zonada; subfelposa-farinácea de color café-amarillento, hacia el margen plumosa-lanosa, blanquecina. Margen apresado (igual en AEM y CzA). Reverso café-amarillento. Olor nulo (igual en AEM y CzA).

Microscopía: - hifas de 1,4-5,6 (8,4) μm de diám., a veces onduladas o con paredes refringentes, algunas pueden ser monilioides (igual en AEM). - hifas de color café-amarillento y fibuladas. - Cristales aciculares abundantes (igual en AEM).

Medio AEM (LAM. II; FIG. 5)

Macroscopía: colonia de textura subfelposa, amarillenta-limón a crémea. Reverso amarillo a blanquecino.

Microscopía: - Arthroconidios de 2,8-8,4 (21) x 1,4-2,8 μm , cilíndricos, de extremos redondeados, refringentes.

Medio CzA (LAM. III; FIG. 5)

Macroscopía: colonia de 15 mm de diám., irregular; textura pelicular de color blanquecino-plomizo.

Microscopía: - hifas de 1,4-5,6 μm de diám., algo corrugadas, onduladas, de paredes refringentes incrustadas con cristales. - Cristales hexaédricos y puntiformes.

F) Cepa UACHMPHc-436

Obtenida de basidiocarpo de *Psathyrella candolleana* (Fr.) Moir. recolectados en tocones de *Populus nigra* "álamo". Alameda de la Univ. Austral de Chile. Valdivia 6-X-94.

Medio PDA (LAM. I; FIG. 6)

Macroscopía: colonia de 90 mm de diám., irregular y zonada; textura algodonosa a lanosa-subfelposa, blanquecina. Margen levantado a apresado. Reverso amarillo a blanquecino (igual en AEM). Olor a "levadura".

Microscopía: - hifas de 2,8-7 μm de diám., (en AEM miden 1,4-5,6 μm de diám.), ramificadas y fibuladas (igual en AEM). - hifas anastomosadas muy tabicadas, de paredes refringentes (igual en AEM). - hifas onduladas, corrugadas. Fibulas presentes. - hifas de 4,2 μm de diám., septadas y fibuladas.

Medio AEM (LAM. II; FIG. 6)

Macroscopía: colonia de 69 mm de diám., circular y zonada; textura algodonosa, de color crémeo, luego aparece una angosta banda subfelposa a farinácea y hacia el margen vellosa, de color blanquecino. Margen levantado. Olor nulo (igual en CzA).

Microscopía: - hifas de 2,8-8,4 μm de diám., de lumen pequeño. - Arthroconidios de 2,8-9,8 x 1,4 m, cilíndricos.

Medio CzA (LAM. III; FIG. 6)

Macroscopía: colonia de 77 mm de diám., circular; textura pelicular de color grisáceo. Margen apresado.

Microscopía: - hifas de 1,4-5,6 μm de diám., a veces onduladas, tabicadas, corrugadas, entrelazadas de paredes refringentes o bien poco ramificadas y con fibulas, bastante distanciadas.

2. Determinación enzimática cualitativa.

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos en la detección cualitativa de enzimas en las cepas miceliales de *Agaricales*. Las cepas miceliales UACHMCd-403 y 443 de *Coprinus disseminatus* obtenidas de basidiocarpos de diferentes recolecciones, como se puede apreciar mostraron diferentes resultado para algunas enzimas. Por el contrario, las cepas miceliales UACHMGs-98 y 467 obtenidas a partir de basidiocarpos de *Gymnopilus spectabilis* mostraron igual resultados enzimáticos, a pesar de que los basidiocarpos provenían de diferentes sustratos. En todas las cepas miceliales estudiadas se detectaron las enzimas citocromo-oxidasa, Desoxiribo-

nucleasa, esterasa, fosfatasa, lacasa y peroxidasa. Seis cepas miceliales resultaron positivas para las enzimas amilolíticas, cinco para enzimas proteolíticas, cuatro para ureasa, tres para lipasa y en una cepa micelial se detectaron las enzimas lipasa y tirosinasa.

DISCUSION

Son muchos los factores que influyen en el aislamiento de cepas miceliales de *Agaricales* en cultivo puro a partir de pseudotejido de basidiocarpos. Un gran número de especies no se desarrollan en medios de cultivo estándares (Pantidou et al. 1983). Por otra parte, una vez sembrado el pseudotejido uno de los principales problemas es la contaminación de los cultivos por hongos *Deuteromycetes* y *Zigomycetes*, debido a que la zona de obtención

del pseudotejido en el basidiocarpo es muy pequeña y está prácticamente en contacto con el ambiente, y a veces, es el lugar donde los insectos colocan sus huevos contaminándola. Otro factor que influye en el aislamiento es el contenido de humedad de los basidiocarpos, se observó que de aquellas recolecciones realizadas en días muy lluviosos o que provenían de ambientes muy saturados generalmente no se obtuvo desarrollo de micelio (Garnica 1995).

De acuerdo a Singer (1986) y Pantidou et al. (1983), las dificultades para obtener las cepas miceliales de muchas especies de *Agaricales* en cultivo puro, ha repercutido negativamente en la realización de estudios comparativos, morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, etc., lo cual queda de manifiesto por el reducido número de

TABLA 2.
Enzimas detectadas en cepas miceliales de *Agaricales* sobre medios de cultivos sólidos.

Enzimas	Cepas	267	403	443	98	467	260	428	436	Tv	Fo
Amilolíticas		-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Celulolíticas		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Citocromo oxidasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desoxirribonucleasa		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Esterasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fosfatasa		+	+	+	d	+	+	+	+	+	-
Lacasa (-naftol)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lacasa (benzidina)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lipasa		+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Oxidasa extracelular		+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Pectinasa		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Peroxidasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Proteolíticas		-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Tirosinasa (p-cresol)		-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Tirosinasa (tirosina)		-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa		+	+	+	-	-	-	-	+	-	+

(+) = indica reacción positiva.

(d) = indica reacción débil.

(-) = indica reacción negativa.

publicaciones existentes. Por el contrario, la atención se ha centrado en los *Aphylllophorales*, ya que éstos presentan basidiocarpos perennes pudiéndose coleccionar durante todo el año y además crecen con mayor facilidad en medios de laboratorio.

Respecto al crecimiento de las cepas miceliales en los medios AEM, PDA y CzA, los dos primeros permitieron un buen crecimiento de todas las cepas y además, se detectó una mayor semejanza fenotípica de las colonias desarrollada por cada especie, en tanto sobre CzA se observó un crecimiento pobre y con escasa diferenciación hifal. Esta diferencia se puede deber a la fuente de nitrógeno, que en PDA y AEM es orgánica y en CzA es inorgánica. Siendo esta última limitante en el desarrollo de muchos *Basidiomycetes* (Deacon 1988). Otro factor que puede haber influido es el pH del medio de cultivo, se sabe que los *Basidiomycetes* generalmente crecen a pH ácido (Stalpers 1978), considerando que el medio CzA tiene un pH de 7,3 lo cual podría explicar el escaso crecimiento de las cepas miceliales.

Referente a las características morfológicas, aquellos trozos de pseudotejido obtenidos de basidiocarpos cuyas hifas presentaban fibulas, éstas también se desarrollaron en las hifas de los cultivos miceliales. Por el contrario, la cepa UACHMAS-267, obtenida de basidiocarpo, en las cuales las hifas carecían de fibulas, éstas tampoco se desarrollaron en la cepa micelial. La presencia de fibulas ha sido ampliamente usada en la subdivisión de grupos taxonómicos para *Aphylllophorales* (Nobles 1948, 1958, 1965; Stalpers 1978). Es probable que también tenga un valor taxonómico similar en los *Agaricales*. Al parecer, según recientes estudios la presencia de fibulas dentro de un género no es constante, por el contrario, es de gran valor taxonómico a nivel de especie (Pantidou et al. 1983). Sin embargo, la presencia de fibulas en las colonias no siempre fue uniforme, en especial en aquellas hifas que tendían a anastomosarse como ocurrió en la cepa micelial UACHMCd-403. También se observó que los cultivos en medio CzA, las fibulas tendían a ser más escasas, lo cual hace pensar en un posible efecto de la cantidad de nutrientes del medio de cultivo en la formación de éstas estructuras. En cuanto a la cepa UACHMAS-267 obtenida de *A. sparrei*, tanto los caracteres macro y microscópicos sobre los medios PDA y AEM, resultaron similares a los cultivos obtenidos de *A. mellea* en los medios AEM y ácido tánico descrito por Nobles (1958). Las cepas UACHMGs-98 y 467 obtenidas de *G. spectabilis* desarrollaron sobre PDA y AEM una estructura semejante a cistidio tipo tibiforme, pero de menor tamaño a los cistidios presentes en el himenio de los basidiocarpos de esta especie (Moreno et al. 1986). También estas cepas

junto a UCHAMAsp-267, UACHMPHs-428, UACHMMr-260, UACHMCd-403 y 443, presentaron cristales en el medio de cultivo e incrustados en las hifas, similares a los descritos para otras cepas miceliales de *Agaricales* como la de *Clitocybe odorata* descrita por Pantidou et al. (1983).

Por otra parte, es conocida la capacidad que tienen algunas cepas miceliales de *Agaricales* de reproducirse mediante artroconidios (Watling 1979). En el presente estudio las cepas miceliales UACHMCd-403, UACHMGs-98 y 467, UACHMPHs-428, UACHMPsc-436 desarrollaron artroconidios, estos estuvieron presentes desde los primeros cultivos, lo que hace pensar en una condición genética de estos hongos en desarrollar este tipo de estructuras. Al parecer los artroconidios provenían de hifas dicarióticas, ya que en la base de éstas fue posible observar fibulas. Según Watling (1979) y Singer (1986), muchas cepas miceliales de *Agaricales* pertenecientes a las familias *Tricholomataceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Strophariaceae* y otras, pueden desarrollar artroconidios, ya sea en condiciones naturales o en cultivo puro, familias dentro de las cuales están incluidas las especies aquí estudiadas.

Algunas especies de *Agaricales*, son capaces de producir ciertas estructuras de resistencia como son las clamidosporas, que según Watling (1979) pueden estar presentes tanto en cultivo como en condiciones naturales. En las cepas UACHMGs-98 y 467, se observó la presencia de clamidosporas al cultivarlas en los medios PDA y AEM, esto al parecer, muestra que las condiciones adversas del medio de cultivo no influyen en su formación, debido a que estos son medios de cultivo más favorables para el desarrollo de los *Basidiomycotina*. Es probable que la formación de clamidosporas se deba a factores genéticos como lo señalan Cuevas & Herrera (1971).

Por otra parte, el micelio aéreo desarrollado por algunas especies de *Agaricales* puede diferenciarse y transformarse en rizomorfos, los cuales constituyen un importante mecanismo de absorción de nutrientes (Cairney, 1992) y de proliferación para algunos hongos, principalmente del género *Armillariella* (Singer, 1986). La cepa UACHMAS-267, desarrolló este tipo de estructura después del mes de cultivo sobre PDA, probablemente la formación de rizomorfos se debe a la disminución del contenido de humedad del medio de cultivo producto de la incubación, además la disminución de los nutrientes podría ser otro factor que estimule su formación. Este tipo de estructura ha sido observado por Nobles (1948) y González (1980) en cepas miceliales de *A. mellea* y *A. limonea* cuando han sido cultivadas en agar extracto de malta. Tanto los artroconidios como las clamidosporas descritas en este trabajo, pueden constituir un importante

mecanismo de diseminación y preservación de estos hongos, en especial frente a condiciones adversas en los sustratos que colonizan.

En relación a la caracterización enzimática cualitativa de las cepas miceliales, la gran mayoría resultaron positivas para aquellas enzimas de interés ligno-celulolítico, en especial para las implicadas en la pudrición blanca (Tabla 2). Las cepas UACHMGs-98 y 467 obtenidas de diferentes recolecciones de basidiocarpos de *G. spectabilis* mostraron similar comportamiento enzimático, contrario a lo sucedido con las cepas UACHMCd-403 y 443 obtenidas de *C. disseminatus* las cuales resultaron diferentes para las enzimas amilolíticas, lipasa y oxidasas extracelulares. De acuerdo a Garrido (1985), esta especie puede crecer también sobre suelo, lo cual podría explicar las diferencias enzimáticas detectadas. Por lo tanto, es necesario realizar un mayor número de aislamientos de cepas miceliales a fin de poder dilucidar estas diferencias entre cepas obtenidas de una misma especie de hongo y de un distinto sustrato. En cuanto a la cepa micelial UACHMAS-267 obtenida de *Armillariella sparrei* resultó positiva para las enzimas pectinolíticas, resultados similares obtuvieron Wahlstrom et al. (1991) con *Armillaria* europeas. Además, se detectó la presencia de la enzima lacasa, igual reacción fue obtenida por González (1980) y Nobles (1948), en cepas miceliales obtenidas de *A. limonea* y *A. mellea*, respectivamente.

En general los sustratos lignocelulósicos se caracterizan por presentar bajo contenido de nitrógeno,

factor que limita el crecimiento de los hongos ligno-celulolíticos y con ello la degradación de estos materiales (Micales 1992). Por lo tanto, la presencia de enzimas que permitan desdoblar compuestos nitrogenados es vital para estos hongos (Tabla 2). Las cepas UACHMCd-403 y 443 obtenidas de *C. disseminatus* resultaron positivas para las enzimas proteolíticas. Kaliskz et al. (1989) también detectaron la presencia de este tipo de enzimas en otra especie de *Coprinus*.

La información proporcionada en el presente trabajo no nos permite realizar conclusiones taxonómicas sólidas, ya que es necesario estudiar una mayor cantidad de especies de *Agaricales*. En el futuro, cuando exista mayor información, estos caracteres podrían permitir la distinción a nivel de micelio entre diferentes taxas. Descripciones detalladas de micelios de varias especies de *Agaricales* podrían ayudar en la identificación de *Basidiomycotina* no conocidos aislados de diferentes materiales lignocelulósicos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la DID, proyecto S-94-01 y S-94-31 Universidad Austral de Chile, por el financiamiento para el estudio de los *Agaricales* de la zona valdiviana.

REFERENCIAS

- Cairney, J.W. (1992). Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycol. Res.* 96: 135-141
- Cuevas, F. J. & Herrera, T. (1971). Variaciones morfológicas de los micelios de *Psilocybe muliercola* y *Psilocybe zapotecorum* en diversos medios de cultivo. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 5: 37-46
- Deacon, J. W. (1988). Introducción a la Micología Moderna. Noriega Editores, Editorial Limusa, S.A. de C.V., México
- Donoso, J. (1968). *Agaricales* lamelados lignícolas frecuentes en Chile especialmente en la zona Sur. Tesis, Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, Santiago
- Garnica, S. (1995). Caracterización morfológica y bioquímica de micelios obtenidos en cultivo puro de basidiocarpos de *Agaricales sensu lato* lignocelulolíticos. Tesis de Magister, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia
- Garrido, N. (1985). Index Agaricalium Chilensium. Biblioteca Mycologica, Cramer, Alemania.
- González, A. (1980). Las pudriciones de la madera denominadas "Huempe" o "palo podrido" de los bosques del Sur de Chile y su etiología. Tesis, Escuela de Licenciatura en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Hankin, L. & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607
- Kaliskz, H.M.; Wood, D.A. & Moore, D. (1989). Some characteristics of extracellular proteinases from *Coprinus conereus*. *Mycol. Res.* 92:278-285
- Kendrick, B. & Watling, R. (1979). Mitosporas in *Basidiomycetes*. In: "The Whole Fungus". Editor Kendrick, B. National Museum of Canada for the Kananaskis Foundation Vol II pp. 453-473
- Mac Faddin, J.F. (1976). Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Molina, R. & Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance and pure manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: SCHENK, N. C. (Ed.) "Methods and principles of mycorrhizal research". The American Phytopathological Society, Florida.

LAMINA I.

Estructuras hifales de las cepas miceliales de *Agaricales* desarrolladas sobre el medio PDA

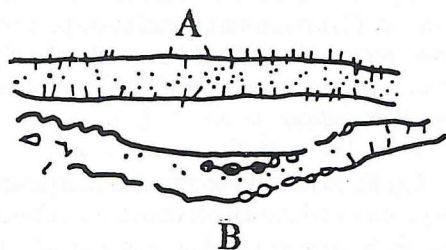


Fig. 1

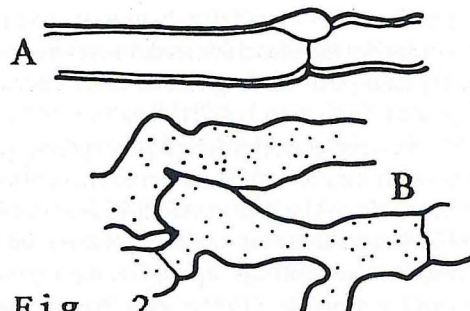


Fig. 2

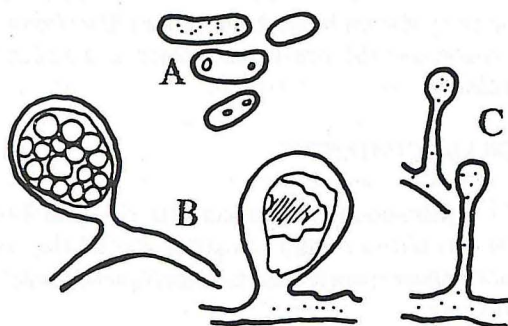


Fig. 3

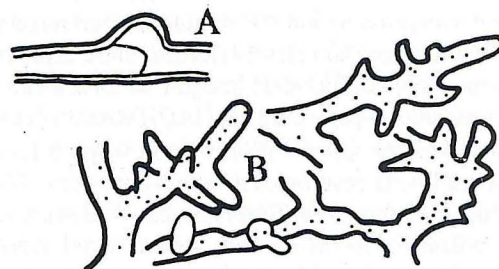


Fig. 4

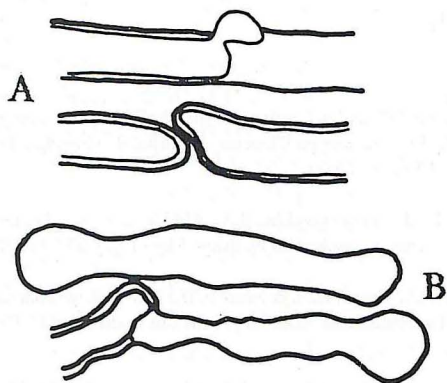


Fig. 5

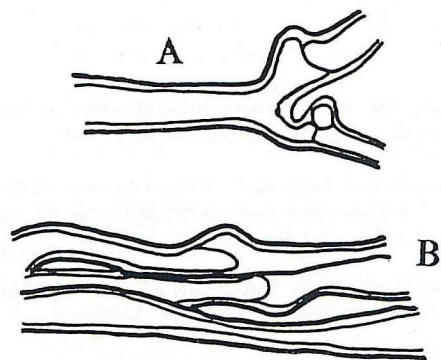


Fig. 6



Figura 1. (a) hifa con proyecciones, (b) hifa incrustada; **Figura 2.** (a) hifa fibulada, (b) hifa apresada; **Figura 3.** (a) arthroconidios, (b) clamidosporas, (c) cistidio; **Figura 4.** (a) hifa fibulada, (b) hifa digitiforme; **Figura 5.** (a) hifas fibuladas, (b) hifa monilioide; **Figura 6.** (a) hifas fibuladas, (b) hifas anastomosadas. (Barra= 10 μm)

LAMINA II

Estructuras hifales de las cepas miceliales de *Agaricales* desarrolladas sobre el medio AEM.

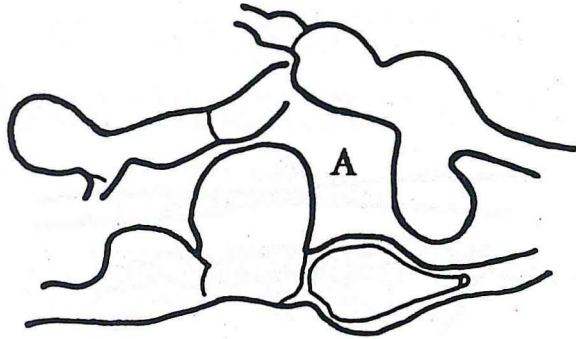


Fig. 1

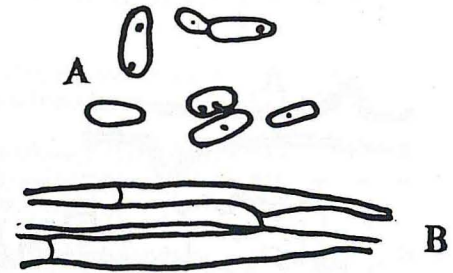


Fig. 2

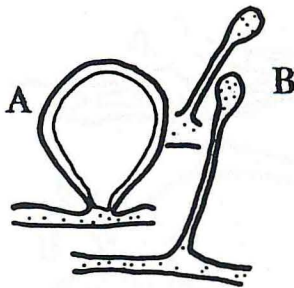


Fig. 3

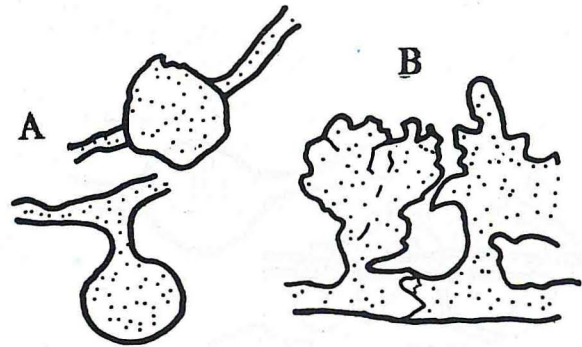


Fig. 4

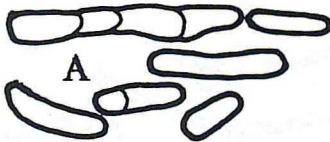


Fig. 5

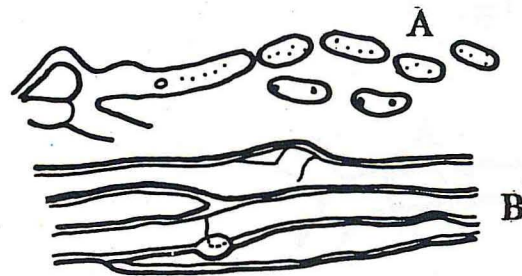


Fig. 6



Figura 1. (a) células cuticulares; **Figura 2.** (a) artroconidios, (b) hifas anastomosadas; **Figura 3.** (a) artroconidios, (b) clamidosporas, (c) cistidio; **Figura 4.** (a) protuberancias hifal, (b) hifa digitiforme; **Figura 5.** (a) artroconidios; **Figura 6.** (a) hifa fibulada, (b) artroconidios. (Barra= 10 μ m)

LAMINA III

Estructuras hifales de las cepas miceliales de *Agaricales* desarrolladas sobre el medio CzA.

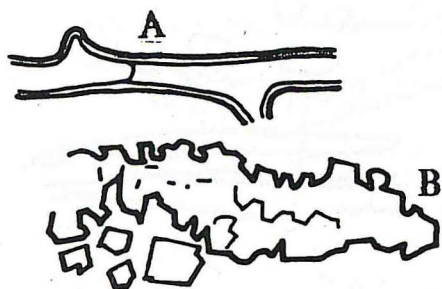


Fig. 1

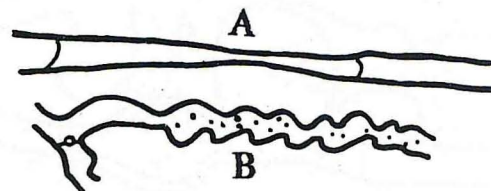


Fig. 2

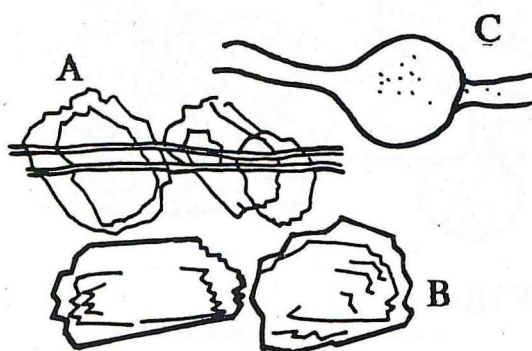


Fig. 3

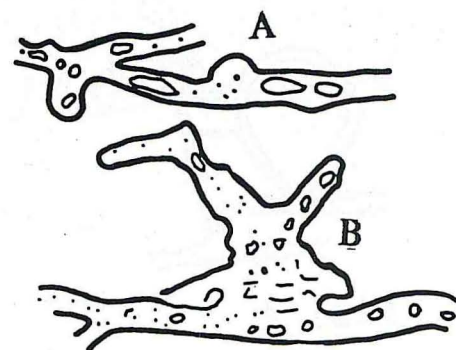


Fig. 4

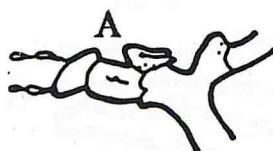


Fig. 5

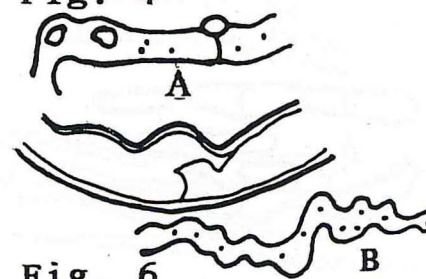


Fig. 6



Figura 1. (a) hifa sin fibula, (b) hifa incrustada; **Figura 2.** (a) hifa tabicada, (b) hifa ondulada; **Figura 3.** (a) hifa incrustada, (b) cristales, (c) protuberancia; **Figura 4.** (a) hifa fibulada, (b) hifa de cortas ramificaciones; **Figura 5.** (a) hifa incrustada; **Figura 6.** (a) hifas fibuladas, (b) hifa delgada ondulada. (Barra= 10 μm)

- Moreno, G.; Garcia-Manjon, J. L. & Zugaza, A.** (1986). La guía de INCAFO de los hongos de la Península Ibérica. INCAFO S. A., Madrid.
- Micales, J.A.** (1992). Proteinases of the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Mycologia* 84:815-822
- Nobles, K. M.** (1948). Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res., sect. C*, 26: 281-431
- Nobles, K.M.** (1958). Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the *Polyporaceae*. *Can. J. Bot.* 36: 883-926
- Nobles, K. M.** (1965). Identification of cultures of wood-inhibiting *Hymenomycetes*. *Can. J. Bot.* 43:1097-1139
- Olmos-Fuentes, C. & Herrera, T.** (1973). Comportamiento de micelios de los géneros *Agrocybe*, *Panus* y *Psilocybe* (*Agaricales*) en diferentes medios de cultivo. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 7:151-159
- Pantidou, M.; Watling, R. & Racharoula, G.** (1983). Mycelial characters, anamorphs, and teleomorphs in genera and species of various families of *Agaricales* in culture. *Mycotaxon* 17: 409-432
- Pochon, J. & Tardieux, P.** (1965). Técnicas de análisis en microbiología del suelo. Editorial T. E. I. (Técnica e Investigación), Burgos.
- Singer, R.** (1986). The *Agaricales* in modern taxonomy. Koeltz Scientific Books, Chicago.
- Stalpers, J.A.** (1978). Identification of wood-inhibiting *Aphylllophorales* in pure culture. Centraalbureau voor schimmel cultues Baarn. *Stud. in Mycol.* 16:1-248
- Taylor, T. B.** (1974). Biochemical tests for identification of mycelial cultures of *Basidiomycetes*. *Ann. Appl. Biol.* 78:113-123
- Wahlstrom, K.; Karlsson, F.O.; Holdennder, O. & Stenlid, J.** (1991). Pectinolytic activity and isozymes in European *Armillaria* species. *Can. J. Bot.* 69:2732-2739
- Watling, R.** (1979). The morphology, variation and ecological significance of anamorphs in the *Agaricales*. In: Kendrick, B. (Ed.) "The Whole Fungus". National Museum of Canada for the Kananaskis Foundation II:453-473