

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

(A qualitative macro-microscopic and enzymatic study of mycelial strains from
basidiocarps of *Agaricales* II.)

Garnica, S. & Valenzuela, E.

Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile, Casilla 167, Valdivia.

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

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

RESUMEN

Se estudiaron en cultivo puro las cepas miceliales de 8 especies de *Agaricales* de la madera que fructifican en el centro-sur de Chile. Las cepas miceliales: UACHMAP-480 de *Agrocybe praecox*, UACHMAd-474 de *Anthraco-phyllum discolor*, UACHMCb-442 de *Collybia butyracea*, UACHMCg-493 de *Collybia grinberg-sii*, UACHMIda-405 de *Descolea antarctica*, UACHMPI-265 de *Panellus longinquus*, UACHMPcr-280 de *Pleuro-flammula croceosanguinea* y UACHMPn-240 de *Pluteus nanus*, fueron obtenidas desde el pseudotejido de los basidiocarpos correspondientes. Se discuten algunos de los caracteres macro-microscópicos de los micelios desarrollados sobre los medios de cultivo PDA, AEM, CzA y la detección cualitativa de sus enzimas.

SUMMARY

Mycelial strains of eight species of wood-inhabiting *Agaricales* that fructify in the center-south of Chile were studied in pure culture. The following mycelial strains: UACHMAP-480 from *Agrocybe praecox*, UACHMAd-474, from *Anthraco-phyllum discolor*, UACHMCb-442, from *Collybia butyracea*, UACHMCg-493 from *Collybia grinberg-sii*, UACHMIda-405 from *Descolea antarctica*, UACHMPI-265 from *Panellus longinquus*, UACHMPcr-280 from *Pleuro-flammula croceosanguinea* and UACHMPn-240 from *Pluteus nanus* were obtained from the pseudotissue of the corresponding basidiocarps. Some of the macro-microscopic characteristic of mycelial developed in PDA, MEA, CzA culture media as well as the qualitative detection of their enzymes are discussed.

INTRODUCCION

Se aportan nuevos antecedentes sobre las características macro-microscópicas y enzimáticas cualitativas de cepas miceliales aisladas y desarrolladas en cultivo puro a partir de basidiocarpos de 8 especies de *Agaricales* que fructifican sobre diversos sustratos leñosos del centro-sur de Chile. Otras contribuciones que hemos realizado sobre la caracterización morfológica y bioquímica cualitativa de micelios de *Agaricales* que viven sobre sustratos lignocelulósicos corresponden a Garnica (1995), Garnica *et al.* (1997) y Valenzuela *et al.* (1997).

MATERIALES Y METODOS

Las 8 cepas miceliales caracterizadas en el presente estudio fueron obtenidas desde el pseudotejido de basidio-

carpos de *Agaricales* de madera, que fructifican en el centro-sur de Chile. Los basidiocarpos fueron desinfectados superficialmente con etanol al 96% y desde la zona entre pileo y estípite, se extrajeron asépticamente 10 trozos de pseudotejido de 0.3 cm² que se sembraron en placas Petri que contenían agar extracto de malta al 2%, adicionado de antibiótico y se incubaron a 23°C por 7 días (Molina & Palmer 1982).

Para determinar las características de cultivo, se extrajeron trozos de agar y micelio de 0.6 cm² de diámetro de las distintas cepas, los cuales 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 mencionados, se

examinaron a los 7 y 14 días, confeccionándose preparaciones al fresco del micelio de diferentes zonas de la colonia, usándose agua como líquido de montaje. La forma y textura de las colonias se establecieron de acuerdo a lo señalado por Nobles (1948, 1958, 1965) y Stalpers (1978). La detección cualitativa de las enzimas se ejecutó a los 14 días de cultivo; para las enzimas citocromo oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa, peroxidasa y tirosinasa se siguió el procedimiento descrito por Taylor (1974) y Stalpers (1978). En la detección de las enzimas amilolíticas, celulolíticas y pectinolíticas se usó una técnica modificada de Pochon & Tardieux (1965). La enzima oxidasa extracelular se detectó de acuerdo a Nobles (1958). Mientras que las enzimas ureasa y proteolíticas se determinaron según lo descrito por Mac Faddin (1976) y las enzimas DNasa y lipasa como indican Hankin & Anagnostakis (1975). Se utilizaron como cepas controles *Trametes versicolor* Schlecht (Tv) y *Fusarium oxysporum* Schlecht.:Fr., proporcionadas por el Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Baarn, Holanda.

Las cepas miceliales son indicadas en el texto con la sigla UACHM seguidas de las iniciales de la especie correspondiente y el número de colecta. Tanto los basidiocarpos, así como las cepas miceliales se encuentran depositados en el Herbario y cepario del Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile.

RESULTADOS

1.- Caracterización macro-microscópica de las cepas miceliales de Agaricales en cultivo puro.

A) Cepa UACHMAp-480

Obtenida de basidiocarpos de *Agrocybe praecox* (Pers.: Fr.) Fayod., recolectados desde tocón de *Nothofagus dombeyi*, «coigüe». Popoén, Osorno 27-V-95.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 56 mm de diám., circular y zonada; subfelposa-felposa a vellosa, blanquecina. Margen apresado (igual en CzA). Reverso amarillo-verdoso. Olor a «humedad» (igual en AEM).

Microscopía: Hifas de (1.4) 2.8-5.6 (-7) μm de diám., (igual en AEM), fibuladas, entrelazadas o bien terminadas en estructuras similares a gloecistidios. Hifas de 1.4-2.8 (4.2) μm de diám., de crecimiento limitado, frecuentes en el centro de la colonia, color marrón (Fig. 1).

Medio AEM

Macroscopía: Colonia de 79 mm de diám., circular y zonada; textura subfelposa-vellosa (algo farinácea), blanquecina a cremosa. Margen apresado. Reverso amarillento. Olor «ha-

rinoso».

Microscopía: Hifas aéreas algunas entrelazadas café-amarillentas. Hifas apesadas de mayor diámetro que las hifas aéreas, figuradas.

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de 81 mm de diám., circular; textura flocosa-plumosa, grisácea. Inodoras.

Microscopía: Hifas de 1.4 - 4.2 μm de diám., fibuladas, algunas anastomosadas. Arthroconidios poco frecuentes de 5.6-14 x 1.4-2.8 μm .

B) Cepa UACHMAI-474

Obtenida de basidiocarpos de *Anthracoephyllum discolor* (Mont.) Sing., recolectados desde restos de ramas en descomposición de *Myrceugenia parvifolia* «pataguilla». Arboretum de la Universidad Austral de Chile. Valdivia 30-III-95.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 16-30 mm de diám., circular; textura subfelposa, café-claro a amarillenta. Margen apresado. Reverso café a crema-amarillento. Olor frutal irritante.

Microscopía: Hifas de 1.4-2.8 (-4.2) μm de diám. Fíbulas presentes, a veces abiertas. Hifas de (2.1) 2.8-4.2 μm de diám., de paredes ramificadas algo verrucosas. Fíbulas presentes, a veces abiertas. Hifas de 2.8 mm de diám., sin septos y con estructuras similares a fíbulas, frecuentes a lo largo de la hifa. Hifas incrustadas con material similar a costras o placas, de color café a café-rojizo (igual en AEM) (Fig. 2). Hifas entrelazadas de color café-amarillento (igual en AEM). Cristales, rectangulares y otras formas, refringentes, café a café-rojizo (igual en AEM).

Medio AEM

Macroscopía: Colonia de 14 mm de diám., (otros caracteres igual que en PDA). Reverso crema-amarillento a amarillo-pálido. Inodoras.

Microscopía: Hifas con dilataciones de 7-9.8 x 5.6-7 mm, hialinas. Clamidosporas intercalares y terminales de 7-15.4 x 5.6-7 mm (Fig. 3).

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de 8 mm de diám., circular; textura escasamente farinácea a pelicular, blanquecina. Margen apresado. Inodora.

Microscopía: Hifas de 1.4-2.8 (4.2) μm de diám., hialinas, vacuolizadas y ramificadas. Fíbulas presentes. Hifas entrelazadas o bien coraloides. Cristales hexaédricos.

C) Cepa UACHMCb-442

Obtenida de basidiocarpos de *Collybia butyracea* (Bull.: Fr.) Kummer, recolectados desde madera en descom-

posición de *Nothofagus obliqua*, «roble». Popoén. Osorno 11-XII-94.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 90 mm de diám., (igual en AEM) circular y zonada; textura lanosa a algodonosa, blanquecina. Margen levantado. Reverso blanquecino a amarillento-pálido. Olor débilmente dulzaino.

Microscopía: Hifas aéreas de 2.8-11.2 µm de diám., algo ramificadas, de paredes gruesas refringentes. Fibulas simples y múltiples (igual en AEM) (Fig. 4). Hifas de 1.4-2.8 µm de diám., tabicadas, ramificadas, onduladas o bien enrolladas en espiral, (en AEM miden 5.6-7 µm de diám., de paredes gruesas hasta 2.8 µm), fibulas ausentes.

Medio AEM

Macroscopía: Colonia irregular y zonada, blanca-amarillenta con bandas concéntricas de distintos grados de intensidad, hacia el margen blanquecina a ligeramente grisácea; textura (igual que en PDA), hacia el margen con zonas aisladas subfelposas (farináceas). Margen levantado a apresado. Reverso cremoso con áreas irregulares de color café-amarillento. Inodoro.

Microscopía: - Hifas aéreas de 4.2-7 µm diám.

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de 66 mm de diám., circular; textura plumosa-flocosa a subfelposa-pelicular, blanquecina a grisácea. Reverso blanquecino. Olor dulzaino.

Microscopía: Hifas de 1.4-4.2 µm de diám., ramificadas, a veces de paredes gruesas, refringentes, escasamente tabicadas y ramificadas, enrolladas en espiral, con ramificaciones cortas o bien entrelazadas. Fibulas ausentes. Cristales junto a la hifa o aislados.

D) Cepa UACHMCg-493

Obtenida de basidiocarpos de *Collybia grinbergssii* Valenzuela & Moreno, recolectados desde ramas en descomposición de *Nothofagus obliqua*, «roble-hualle». Arboretum de la Universidad Austral de Chile. Valdivia 13-IV-95.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 15-26 mm de diám., irregular y zonada; textura costrosa a sedosa-subfelposa, café-claro. Margen apresado. Reverso cremoso. Inodora.

Microscopía: - Hifas de (1.4) 2.8-4.2 µm de diám., con cortas ramificaciones laterales, fibuladas (en AEM miden hasta 5.6 µm de diám.). Hifas anastomosadas en la zona sedosa de 2.8-4.2 µm de diám., de paredes refringentes, hialinas o de color café amarillento (en AEM miden 1.4-5.6 µm de diám.). Hifas con dilataciones intercalares y terminales de (5.6) 8.4-5.6 x 12.6 (14) µm. Clamidosporas intercalares y

terminales de (5.6) 9.8-14 x (4.2) 7-12.6 µm. Cristales presentes.

Medio AEM

Macroscopía: Colonia de 53 mm de diám., irregular; textura farinácea-subfelposa a sedosa, blanquecina a café-crémico. Margen apresado. Reverso café-claro a amarillo. Inodoro.

Microscopía: - Hifas esqueléticas de 1.4 (2.1) µm de diám., escasamente ramificadas. Clamidosporas intercalares y terminales de 7-15.1 x 5.6-14 µm.

Medio CzA. No hubo crecimiento.

E) Cepa UACHMDa-405.

Obtenida de basidiocarpos de *Descolea antarctica* Sing., recolectados desde restos de corteza depositada en el suelo de *Nothofagus dombeyi* «coigue». Jardín Botánico de la Universidad Austral de Chile. Valdivia 25-VI-94.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 90 mm de diám., (igual en AEM y CzA) circular; textura lanosa-subfelposa a algodonosa, blanquecina a cremosa. Margen levantado (igual en AEM). Reverso blanquecino. Olor dulzaino.

Microscopía: Hifas de 1.4-9.8 µm de diám., varicosas o entrelazadas, hialinas a café-amarillentas. Fibulas presentes. Hifas tabicadas, algunas con material refringente en su interior o bien con pequeñas placas epiparietales, sin fibulas. - Hifas con dilataciones intercalares de 11.2-18.2 x 7-11.2 µm. Estructuras hifales tipo lageniformes similar a glococistidios de 23.8-70 x 11.2-14 µm, predominantes en el centro de la colonia (Fig. 5). Artroconidios de 4.2-21 x 2.8-8.4 µm (igual en AEM y CzA) (Fig. 6).

Medio AEM

Macroscopía: Colonia irregular y zonada; textura felposa-lanosa a vellosa, cremosa a blanquecina. Reverso blanquecino a amarillento. Inodoro (igual en CzA).

Microscopía: - Hifas de 1.4-7 µm de diám., a veces entrelazadas, incrustadas con material refringente y ramificadas, fibuladas. Hifas frecuentemente tabicadas, sin fibulas. Cristales presentes (igual en CzA).

Medio CzA

Macroscopía: Colonia plumosa-flocosa, hacia el margen pelicular, hialina a grisácea. Margen apresado. Reverso grisáceo.

Microscopía: Hifas de 1.4-7 µm de diám., a veces entrelazadas, onduladas, corrugadas y fibuladas.

F) Cepa UACHMPI-265

Obtenida de basidiocarpos de *Panellus longinquus* (Berk.) Sing., recolectados desde tronco seco y en des-

composición de *Salix babylonica* «sauce». Jardín Botánico de la Universidad Austral de Chile. Valdivia 9-VI-95.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 4 mm de diám., irregular; textura vellosa, blanquecina-crémica. Margen levantado (igual en AEM). Reverso crémico. Inodoro (igual en AEM y CzA).

Microscopía: Hifas de 1.4 -4.2 μm diám., a veces anastomosadas, ramificadas, hialinas a café, fibuladas. Cristales presentes.

Medio AEM

Macroscopía: Colonia circular de 6 mm de diám., vellosa, grisácea. Reverso negruzco a grisáceo.

Microscopía: - Hifas de 1.4 -2.8 μm de diám., entrelazadas y anastomosadas.

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de 8 mm de diám., irregular; textura pelicular, blanquecina. Margen apresado.

Microscopía: Hifas de 1.4 -2.8 μm de diám., algunas incrustadas con material cristalino.

G) Cepa UACHMPcr-280

Obtenida de basidiocarpos de *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing., recolectados desde ramas en descomposición de *Nothofagus dombeyi* «coigue». Rebellín, Valdivia 30-V-94.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 90 mm de diám., circular y zonada (igual en AEM); textura felposa-farinácea a algodonosa llegando a ser subfelposa-flocosa, blanquecina a cremosa. Margen apresado y reverso blanquecino (igual en AEM). Olor a *Cyttaria* (igual en AEM).

Microscopía: Hifas generativas de 1.4 -4.2 μm de diám., a veces con cortas ramificaciones, fibulas escasas. Hifas esqueléticas de 1.4 -4.2 μm de diám., escasamente ramificadas, a veces en el micelio aéreo presentan dilataciones intercalares y terminales de 4.2-8.4 x 4.2-7 μm , hialinas (igual en AEM). Artroconidios de 2.8-9.8 x 1.4-2.8 μm .

Medio AEM

Macroscopía: Textura de la colonia hacia el centro algodonosa, hacia el margen felposa-farinácea, cremosa a blanquecina.

Microscopía: Hifas generativas de 1.4 -4.2 μm de diám., a veces corrugadas, onduladas y con cortas ramificaciones (en CzA miden hasta 5.6 μm). Fibulas escasas. Hifas esqueléticas de 1.4 -2.8 μm de diám., con dilataciones intercalares y terminales de 2.8-9.8 x 2.8-9.8 μm . (Fig. 7). Cristales presentes (igual en CzA).

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de 66-76 mm de diám., circular; textura pelicular a flocosa-plumosa, blanquecina. Margen con hifas apresadas y distantes. Olor dulzaino.

Microscopía: - Hifas esqueléticas de 1.4-2.8 μm de diám.

H) Cepa UACHMPn-240.

Obtenida de basidiocarpos de *Pluteus nanus* (Pers.: Fr.) Kummer ss Ortón, recolectados desde corteza de tronco de *Nothofagus obliqua*, «hualle» vivo. Rebellín, Valdivia, 30-V-94.

Medio PDA

Macroscopía: Colonia de 10 mm de diám., irregular (igual en AEM y CzA); textura vellosa, blanquecina a café-crémica. Margen apresado (igual en AEM y CzA). Alrededor de la colonia el medio de cultivo se torna café-tenue. Por el reverso el centro café y hacia el margen blanquecino-amarillento, luego marrón. Inodoro (igual en AEM). Al mes de cultivo aparecen escasas y pequeñas rizomorfas, inmersas en el agar de color café.

Microscopía: Hifas de 1.4 -4.2 μm de diám., a veces con dilataciones intercalares y terminales de 7-16.8 x 4.2-11.2 μm , sin fibulas (igual en AEM). Al mes de cultivo se observaron células cuticulares, ovoides, globosas, hialina a café. Hifas incrustadas con material cristalino epiparietal y con diminutas proyecciones similares a «vellos», hialinas a café.

Medio AEM

Macroscopía: Colonia de textura costrosa a vellosa, blanquecina. Reverso café-blanquecino.

Microscopía: Como en PDA.

Medio CzA

Macroscopía: Colonia de textura costrosa a pelicular. El inóculo se torna de color grisáceo a café, micelio pelicular, grisáceo. Reverso negruzco.

Microscopía: Hifas varicosas a moniloides de 2.8 -4.2 μm de diám., tabicadas, con dilataciones de 5.6-14 x 5.6-12.6 μm (Fig. 8). Fibulas ausentes. Cristales presentes.

2.- Determinación enzimática cualitativa.

De los datos indicados en la Tabla 1, bajo las condiciones ensayadas, se puede observar que todas las cepas miceliales presentan la capacidad de producir un gran número de enzimas o grupos de enzimas. En todas las cepas se detectaron las enzimas celulolíticas, citocromo oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa, y peroxidasa. Por el contrario, los mayores números de cepas negativas se presentaron en las enzimas tirosinasa (6 cepas), pectinasa (4 cepas), desoxirribonucleasa, lipasa, ureasa (3 cepas), amilolíticas, oxidasa extracelular y proteolíticas (1 cepa).

DISCUSION

Los **Agaricales**, a diferencia de otros grupos de hongos, han sido escasamente estudiados en su estado micelial, ya sea desde el punto de vista morfológico, así como bioquímico. El estudio de su fase micelial constituye un nuevo enfoque escasamente conocido a pesar de que permite un trabajo más permanente, sin la necesidad de esperar que el hongo fructifique.

El aislamiento de cepas miceliales en cultivo puro de **Agaricales**, puede realizarse a partir de los sustratos colonizados, de estructuras vegetativas y propagativas, o bien a partir de basidiocarpos jóvenes y en buen estado, disminuyendo con esto posibles contaminantes. Este último método presenta la ventaja de conocer ciertas estructuras de la especie en aislamiento. De acuerdo a nuestros resultados, algunos de los caracteres presentes en los basidiocarpos también se desarrollaron en cultivo. Así por ejemplo, aquellos cuyas hifas presentaban fibulas, los cultivos obtenidos de ellos las desarrollaron. Pantidou *et al.* (1983) indican la importancia taxonómica de este carácter a nivel de especie y que en nuestro caso fue utilizado para determinar la pureza de los aislamientos. En algunos **Agaricales**, las hifas de los basidiocarpos no presentan fibulas como ocurre con *Pluteus nanus*, carácter que tampoco se desarrolló en la cepa micelial. A su vez, la cepa aislada de *Anthracophyllum discolor* desarrolló hifas pigmentadas, similares a las que se encuentran constituyendo la trama del basidiocarpo (Singer, 1986).

Por el contrario, los cultivos de algunas de las cepas miceliales desarrollaron estructuras no observadas en los basidiocarpos. Las hifas de la cepa obtenida de *Collybia butyracea* presentaron fibulación múltiple, este carácter ha sido descrito en cultivo de ciertas especies de **Aphyllphorales** por Stalpers (1978). Los cultivos de *Collybia grinbergii* y *Pleuroflamula croceosanguinea* desarrollaron hifas esqueléticas. De acuerdo a Cuevas & Herrera (1971), la formación de hifas esqueléticas sería inducida por la concentración de ciertos nutrientes presentes en el medio de cultivo, tales como la dextrosa.

En relación al desarrollo de los micelios en cultivo puro, los medios PDA y AEM permitieron un buen crecimiento de las cepas miceliales de *Agrocybe praecox*, *C. butyracea*, *Descolea antarctica* y *P. croceosanguinea*, mientras que *Panellus longinquus* y *P. nanus* presentaron un escaso crecimiento. Sobre CzA todos las cepas miceliales mostraron un escaso crecimiento. Algunos de los factores que podrían limitar el desarrollo de los micelios de **Agaricales** en cultivo, han sido comentados con anterioridad por Peláez *et al.* (1992), Garnica (1995), Garnica *et al.* (1997) y Valenzuela *et al.* (1997).

Con respecto a la presencia de estructuras de reproducción y resistencia, destaca el desarrollo de artroconidios

en los micelios de las cepas de: *A. praecox*, *D. antarctica* y *P. croceosanguinea*, y de clamidosporas en *C. grinbergii*. Según Watling (1979) y Kendrick & Watling (1979), este tipo de estructuras son frecuentes en cultivos de **Agaricales**. A su vez, la cepa micelial de *Pnanus* desarrolló rizomorfos en cultivo, además presentó caracteres macro-microscópicos semejantes a los descritos para cepas miceliales pertenecientes al género *Armillariella* (Nobles, 1948; Garnica, 1995; Garnica *et al.* 1997).

En cuanto a la caracterización enzimática cualitativa, la Tabla 1 muestra la capacidad que presentan algunos de los micelios de producir enzimas sobre medio sólido. Los resultados indican la presencia de aquellas enzimas implicadas en la degradación de la lignina como son la lacasa y peroxidasa, en todas las cepas miceliales de los hongos estudiados y sólo la cepa de *A. praecox* resultó negativa para oxidasa extracelular. Al respecto, Silva *et al.* (1990), indican que algunos hongos producen cantidades de polifenoloxidasas no detectables por este test. Dentro de las cepas que produjeron enzimas lignolíticas se encuentra la obtenida a partir de basidiocarpos de *D. antarctica*, este agarical ha sido también descrito como ectomicorrízico en varias especies de *Nothofagus* (Garri-do, 1988; Singer, 1986).

Por otra parte, se observó la diferente capacidad que tienen las cepas miceliales en utilizar las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas en el ensayo. La producción de enzimas capaces de degradar compuestos nitrogenados como son ácidos nucleicos, proteínas y urea, son importantes en los hongos de la madera, ya que los sustratos lignocelulósicos generalmente presentan bajos contenidos en nitrógeno (Micales, 1992).

El aislamiento de cepas miceliales de varias especies de **Agaricales**, y su posterior caracterización podría permitir su uso no sólo con fines taxonómicos, sino también como importantes fuentes de metabolitos.

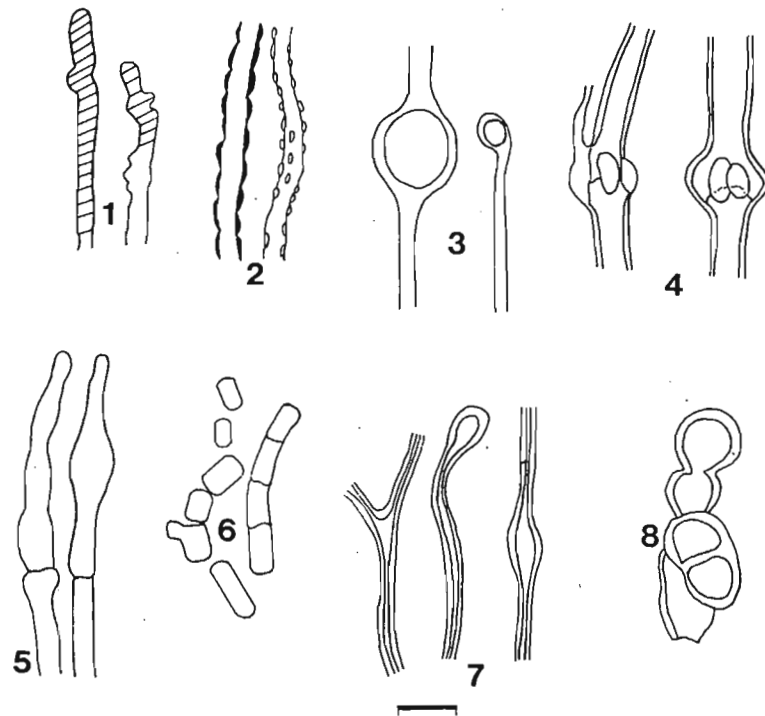
Con respecto a la presencia de estructuras de reproducción y resistencia, destaca el desarrollo de artrosporas en los micelios de las cepas de: *A. praecox*, *D. antarctica* y *P. croceosanguinea*, y de clamidosporas en *C. grinbergii*. Según Watling (1979) y Kendrick & Watling (1979) este tipo de estructuras son frecuentes en cultivos de **Agaricales**. A su vez, la cepa micelial de *Pnanus* desarrolló rizomorfos en cultivo, además presentó caracteres macro-microscópicos semejantes a los descritos para cepas miceliales pertenecientes al género *Armillariella* (Nobles, 1948; Garnica, 1995; Garnica *et al.* 1997).

En cuanto a la caracterización enzimática cualitativa, la Tabla 1 muestra la capacidad que presentan algunos de los micelios de producir enzimas sobre medio sólido. Los resultados indican la presencia de aquellas enzimas

TABLA 1
Detección cualitativa de enzimas en cepas miceliales de *Agaricales* sobre medios de cultivos sólidos.

Enzimas / Cepas	480	474	442	493	405	265	280	240	Tv	Fo
Amilolíticas	+	+	+	-	+	d	+	+	-	+
Celulolíticas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citocromo oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desoribonucleasa	+	+	-	-	+	-	+	d	-	+
Esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fosfatasa	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lacasa (p-cresol)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lacasa(benzidina)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lipasa	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Oxidasa ext.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pectinasa	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Peroxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Proteolíticas	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Tirosinasa(p-cresol)	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-
Tirosinasa(tirosina)	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-
Ureasa	+	-	-	-	d	+	+	+	-	+

(+) = indica reacción positiva, (d) = indica reacción débil, (-) = indica reacción negativa.



Figuras. 1.- Hifas pigmentadas, 2.- Hifas incrustadas, 3.- Clamidosporas, 4.- Fibulación múltiple, 5.- Gloeocistidios, 6.- Arthroconidios, 7.- Hifas esqueléticas, 8.- Hifa monilioide. Escala barra = 10 µm

implicadas en la degradación de la lignina como son la lacasa y peroxidasa, en todas las cepas miceliales de los hongos estudiados y sólo la cepa obtenida de *A. praecox* resultó negativa para oxidasa extracelular. Al respecto, Silva *et al.* (1990) indican que algunos hongos producen cantidades de polifenoloxidasas no detectables por este test. Dentro de las cepas que produjeron enzimas lignolíticas se encuentra la obtenida a partir de basidiocarpos de *D. antarctica*, este agarical ha sido también descrito como ectomicorrízico con varias especies de *Nothofagus* (Garrido, 1988; Singer, 1986).

Por otra parte, se observó la diferente capacidad que tienen las cepas miceliales en utilizar las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas en el ensayo. La producción de enzimas capaces de degradar compuestos nitrogenados como son ácidos nucleicos, proteínas y urea, son importantes en los hongos de madera, ya que los sustratos

lignocelulósicos generalmente presentan bajos contenidos en nitrógeno (Micales, 1992).

El aislamiento de cepas miceliales de varias especies de **Agaricales**, y su posterior caracterización podría permitir su uso no sólo con fines taxonómicos, sino que además, los micelios de muchos de estos hongos podrían ser im

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los proyectos DID S-98-28 Universidad Austral de Chile y FONDECYT 1970707 por el financiamiento para el estudio de los **Agaricales** de la zona valdiviana. S. Garnica desea agradecer al Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), la beca concedida para la realización del doctorado en la Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Alemania).

REFERENCIAS

- 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
- 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.
- Garnica, S.; Ramírez, C. & Valenzuela, E. (1997). Estudio macro-microscópico y enzimático cualitativo de cepas miceliales de basidiocarpos de **Agaricales** I. Bol. Micol. 12:63-73
- Garrido, N. (1988). *Agaricales s.l. und ihre mykorrhizen in den Nothofagus-Waldern Mittelehiles*. J. Cramer, Berlin-Stuttgart.
- Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67: 597-607
- Kendrick, B. & Watling, R. (1979). Mitosporas in **Basidiomycetes**. In: «The Whole Fungus». Kendrick, B. (Edit.) 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.
- Micales, J.A. (1992). Proteinases of the brown-rot fungus *Postia placenta*. Mycologia 84:815-822
- Molina, R. & Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance and pure manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: «Methods and principles of mycorrhizal research». Schenck, N. C. (Edit.) The American Phytopathological Society, Florida pp. 115-129
- Nobles, K.M. (1948). Studies in forests pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. Can. J. Res., sect. C, 26:281-431
- (1958). Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the **Polyporaceae**. Can. J. Bot. 36:883-926
- (1965). Identification of cultures of wood-inhibiting **Hymenomycetes**. Can. J. Bot. 43:1097-1139
- Pantidou, M.; Watling, R. & Gonou, R. (1983). Mycelial characters, anamorphs, and teleomorphs in genera and species of various families of **Agaricales** in culture. Mycotaxon Vol XVII: 409-432
- Peláez, F.; Díez, M.T. & Calonge, F.D. (1992). Obtención de cultivos puros de **Basidiomycotina** a partir de carpóforos recogidos en España. Bol. Soc. Micol. Madrid. 17:153-165
- Pochon, J. & Tardieux, P. (1965). Técnicas de análisis en microbiología del suelo. Editorial T. E. I. (Técnica e Investigación), Burgos.
- Silva, H., Landa, A. & Agosin, E. (1990). Aislamiento, selección y caracterización de hongos lignolíticos chilenos. Arch. Biol. Med. Exp. 23:41-43
- Singer, R. (1986). The **Agaricales** in modern taxonomy. Koeltz Scientific Books, Chicago.
- Stalpers, J.A. (1978). Identification of wood-inhibiting **Aphyllorales** in pure culture. Centraalbureau voor Schimmel Cultures 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
- Valenzuela, E., Ramírez, C. & Garnica, S. (1997). Macro-microscopic and qualitative enzymatic characterization of mycelial strains obtained from basidiocarps of *Mycena* species (**Agaricales**) in Chile. Rev. Hist. Nat. 70:521-530
- Watling, R. (1979). The morphology, variation and ecological significance of anamorphs in the **Agaricales**. In: «The Whole Fungus». Kendrick, B. (Edit.) National Museum of Canada for the Kananaskis Foundation II pp.453-473