

DESDICARIOTIZACIÓN EXCÉNTRICA DE *Lentinus* spp.

por Emir Silvestre Arteaga-Santillan,
Karina de Lachica-Giles,
Rebeca Ramírez-Carrillo y
Hermilo Leal-Lara

ECCENTRIC DEDIKARYOTIZATION OF *Lentinus* spp.

ABSTRACT

Dedikaryotization and mating of neohaplonts of *Lentinus* spp. are alternatives to improve shiitake strains by overcoming the long incubation periods and the strict requirement for oak sawdust substrates. Dedikaryotization with 7 different peptone sources was proved, showing Peptone P (Oxoid) the highest ability to split dikaryons of *Lentinus* spp., which decreased with increasing peptone concentration. Three different *Lentinus* species were dedikaryotized with Peptone P, although only one parent type was recovered in all cases.

KEY WORDS: *Lentinus*, dedikaryotization, genetic improvement.

RESUMEN

La desdicariotización y entrecruzamiento de neohaplontes de *Lentinus* spp. representan una alternativa para impulsar su cultivo, al eliminar las limitantes de sus requerimientos de sustratos con aserrín de encino así como los largos períodos de incubación. Al evaluar el efecto dedicariotizante de 7 diferentes peptonas, se encontró que la peptona de carne P (Oxoid) presentó una alta capacidad dedicariotizante, la cual disminuyó al incrementar su concentración. Con dicha peptona se dedicariotizaron 3 cepas de diferentes especies del género *Lentinus*, aunque en todos los casos se recuperó únicamente uno de los tipos parentales.

PALABRAS CLAVE: *Lentinus*, desdicariotización, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

Lentinus edodes es un hongo comestible sumamente apreciado por sus características organolépticas y farmacológicas. No obstante, que entre los hongos comestibles cultivados ocupa el segundo lugar de producción a nivel mundial con cerca de 350,000 toneladas anuales (Delpech y Olivier, 1991), su cultivo a escala comercial presenta ciertas dificultades. Con las cepas disponibles, se requieren de largos períodos de incubación y resulta indispensable usar aserrín de encino como sustrato, lo que representa una limitante para las zonas en donde puede cultivarse, así como un peligro potencial para el medio ambiente. Estos problemas serían resueltos si se contara con cepas de *L. edodes* capaces de fructificar en sustratos diferentes al aserrín de encino y en tiempos de incubación más cortos. Cepas con tales características pueden obtenerse a partir de

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Conjunto E, Lab. 324, UNAM, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F. Fax 6 22 53 09.

Recibido: 12 de diciembre, 1996. Aceptado: 12 de enero, 1997.

Solicitud de sobretiros: Rebeca Ramírez-Carrillo.

las cepas existentes de *L. edodes* por medio de un mejoramiento genético que de acuerdo al método tradicional se inicia seleccionando las cepas dicarióticas que presenten en mayor grado las características deseadas; de ellas se obtienen sus progenies monocarióticas (cultivos monospóricos) para posteriormente hibridizarlas y seleccionar los apareamientos donde las características buscadas se han incrementado. Este método es sumamente tardado y no asegura la obtención de cepas mejoradas, ya que las características presentes en el dicariote original pueden perderse en la progenie meiotica dada su variabilidad genética.

Un método alternativo de mejoramiento genético consiste en recuperar los dos componentes monocarióticos del dicariote original para hibridizarlos con monocariotes de otras cepas seleccionadas y así programar de cierta manera las características de la cepa resultante. La separación artificial de un dicariote en sus componentes monocarióticos, también conocida como desdicariorización, ha sido intentada por varios métodos mecánicos y químicos. Al micelio sin fibulas recuperado después de la desdicariorización se le denomina neohaplonte, término introducido por Fries y Aschan para designar al micelio monocariótico producido sin intervención de la cariogamia y división reductora. El primer método empleado para desdicariorizar fue la operación microquirúrgica (Harder, 1927), procedimiento de baja reproducibilidad y muy escasa recuperación de neohaplontes. A pesar de que la frecuencia de recuperación de neohaplontes más alta se obtuvo con *Schizophyllum commune* (20%), los estudios realizados por Harder (1927) y Fries y Aschan (1952) indicaron que la desdicariorización quirúrgica de cepas de *Pholiota mutabilis*, *Schizophyllum commune*, *Polyporus abietinus* y *Collybia velutipes* no fue satisfactoria. La desdicariorización química inicialmente se realizó utilizando sustancias altamente tóxicas como deoxicolato de sodio o ácido cólico (Milles y Raper, 1956), las cuales al inhibir el desarrollo micelial requieren de periodos de incubación muy largos (6 a 16 semanas) para lograr la desdicariorización y por lo general sólo se obtenía un solo núcleo del dicariote. En 1980 se reportó la desdicariorización simétrica de cepas de *Pleurotus* spp. y *Coprinus* spp. en soluciones de peptona (Leal Lara, 1980). A la fecha se han desdicariorizado cepas de *L. edodes* únicamente con taurocolato de sodio, reportándose la recuperación de un sólo núcleo (Nishibori y Kinugawa, 1978). Resulta por lo tanto interesante evaluar el procedimiento de desdicariorización como una alternativa para recuperar los componentes monocarióticos de cepas dicarióticas de *Lentinus*, que podrían servir como material de partida para obtener cepas mejoradas de este hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.- Se utilizaron 5 cepas de *L. edodes* (Berk.) Singer y una cepa de las siguientes especies: *L. dactyloides* Cleland, *L. ponderosus* Miller, *L. tigrinus* (Bull.: Fr.) Fr. y *Lentinus* sp., encontrándose la totalidad en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. Para el mantenimiento de las cepas y la propagación micelial se empleó medio con 1.5% de extracto de malta y 2% de agar, esterilizado en autoclave (121°C y 15 libras de presión por 15 minutos).

Solución desdicariorizadora.- De acuerdo al método desdicariorizante empleado con cepas de *Pleurotus* spp. y *Coprinus* spp. (Leal Lara, 1980), se preparó una solución desdicariorizadora básica con 20 g de glucosa anhidra y 20 g de peptona, disueltas en un litro de agua destilada; 50

ml de esta solución se vaciaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml y se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión por 30 minutos.

Fragmentación y desdicariorización de los cultivos fúngicos.- La solución desdicariorizadora se inoculó con 20 µl de una suspensión de micelio fragmentado de cada una de las cepas en estudio. Esta suspensión se preparó tomando 3 colonias de 4 cm de diámetro de crecimiento, propagadas en agar extracto de malta, que se colocaron en un vaso estéril de un homogeneizador de laboratorio (waring blender) con 50 ml de agua destilada estéril y fría. El homogeneizador se operó por dos minutos y medio a la velocidad más alta. Los matraces inoculados se incubaron a 24°C hasta la aparición de micelio.

Determinación de la desdicariorización de una cepa.- Al detectarse visualmente desarrollo micelial en los matraces, se homogeneizó su contenido durante dos minutos y medio a alta velocidad en condiciones estériles. Muestras de 20 µl de este homogeneizado se distribuyeron sobre placas de agar extracto de malta y se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Se examinó al microscopio el micelio procedente de dichas colonias para determinar la presencia de fibulas. Aquellas que presentaron hifas sin fibulas fueron sembradas en agar extracto de malta para verificar la ausencia de fibulas al desarrollarse nuevamente.

RESULTADOS

En un experimento inicial se evaluó el efecto desdicariorizante de diferentes peptonas a dos temperaturas de incubación sobre una cepa de *L. tigrinus*, la cual se seleccionó por su vigoroso crecimiento micelial. Se realizaron 6 repeticiones para cada peptona. Con la peptona de carne JVC no se presentó desarrollo micelial a las dos temperaturas probadas (Tabla 1). Con las peptonas de carne, caseína y soya de la marca Bioxón, a ambas temperaturas y con la peptona de soya Merck a 24°C si se presentó desarrollo micelial, pero en ninguna de las seis réplicas se detectó micelio monocariótico. Sólo se obtuvo micelio monocariótico con las peptonas de carne P (Oxoid) y de caseína (Merck) a las dos temperaturas, así como con la de soya (Merck) a 28°C. Sin embargo, el micelio monocariótico fue predominante (75%) en los medios con peptona de carne P (Oxoid) a 24°C.

Las 9 cepas de *Lentinus* spp. fueron entonces probadas en peptona de carne P (Oxoid) a 24°C, lográndose la desdicariorización de las cepas de *L. tigrinus* y *L. ponderosus* después de tres días de incubación (Tabla 2). Las cepas 3, 4 y 5 de *L. edodes* presentaron micelio de tipo dicariótico a los 30 días de incubación, mientras que las 4 cepas restantes no presentaron desarrollo micelial a los 45 días de incubación. Ya que en términos generales las cepas 3, 4 y 5 de *L. edodes* presentaron un crecimiento micelial muy lento, para inducir su desdicariorización se decidió variar la concentración de peptona empleando 1, 2 y 3% y utilizar mayores volúmenes de inoculación (0.1, 0.3, 0.4, 0.5, 1 y 2 ml). En la tabla 3 se observa que estas tres cepas presentaron desarrollo micelial únicamente a las concentraciones bajas de peptona (1%), el cual fue de tipo dicariótico a excepción de la cepa de *Lentinus edodes* 3 que con inóculo de 0.3 ml presenta una mayor abundancia de crecimiento monocariótico.

Las colonias monocarióticas (neohaplontes) recuperadas de las 3 cepas desdicariorizadas (*L. tigrinus*, *L. ponderosus* y *L. edodes* 3) fueron apareadas entre sí para identificar los tipos de neohaplontes recuperados para cada cepa. Se observó que con las tres cepas sólo se recuperaron

neohaplontes de un tipo, ya que de estos apareamientos no se obtuvieron dicariotes en ningún caso (Tabla 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se confirmó el efecto desdicarizante de la peptona de carne P (Oxoid) que en estudios previos había resultado ser la más efectiva para la desdicarización de cepas del género *Pleurotus*. Con cepas de *Lentinus* spp. resultó nuevamente ser la más eficaz de los diferentes tipos de peptonas probados. Se observó que la temperatura representa un factor importante para el proceso de desdicarización, es decir a temperaturas más bajas (24°C) en donde el metabolismo es desacelerado se logra más fácilmente la ruptura de la unión dicariótica. Los resultados obtenidos indican que la susceptibilidad a la desdicarización es diferente para cada especie e incluso para cada cepa, observándose que las cepas de *Lentinus* spp. fueron por lo general menos susceptibles al efecto desdicarizante en comparación con las cepas de *Pleurotus* spp. Se confirmó que el efecto desdicarizante de la peptona es mejor a bajas concentraciones (10 g/l).

Los resultados de la tabla 3 indicaron que para cada cepa deben identificarse las condiciones necesarias para lograr que se produzca la desdicarización, ya que para la cepa de *L. edodes* 3 se requirió disminuir la concentración de peptona de 20 a 10 g/l y aumentar el volumen de inoculación de 20 a 300 ml en comparación con las condiciones normalmente exitosas con cepas de *Pleurotus* spp., y que resultaron favorables con las cepas de *Lentinus* spp. desdicarizadas inicialmente (Tabla 2).

El agente químico utilizado por Nishibori y Kinugawa (1978) (taurocolato de sodio) para la desdicarización de *Lentinus edodes* es una sustancia fungistática que desdicariza a la cepa a concentraciones que inhiben seriamente el crecimiento micelial, suponiendo que a esto se debía la recuperación de un sólo núcleo. Al utilizar peptona de carne P (Leal Lara, 1980) se observó por otro lado que el crecimiento micelial no se inhibía siendo posible la recuperación de los dos componentes monocarióticos de diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Sin embargo, al aplicar este método a cepas de *Lentinus* spp. el desarrollo micelial para las cepas que no fueron desdicarizadas fue muy lento e inclusive hubo casos en donde a los 45 días de incubación no se observó micelio en las soluciones desdicarizadoras. El hecho de que las cepas del género *Lentinus* presentan por lo general un muy lento desarrollo micelial puede estar posiblemente relacionado a que uno de los monocariotes de la cepa dicariótica es mucho más débil y al separarlos éste no logra sobrevivir. Los resultados aquí reportados sugieren, asimismo, la posibilidad de que la desdicarización producida por la peptona P se deba a la presencia de sales biliares o algún otro tóxico presente en la peptona, ya que al emplear mayores concentraciones de peptona no se observa crecimiento micelial, ni aun con volúmenes de inoculación muy altos (1 a 2 ml), lo cual sugeriría la existencia de condiciones inhibitorias al desarrollo vegetativo que no pueden ser contrarrestadas con altas densidades iniciales de micelio. A pesar de que las fuentes de peptona empleadas son fabricadas para usarse como fuente de nitrógeno en medios microbiológicos, existe la posibilidad de la presencia de tal tipo de sustancias tóxicas en ella, como resultado de una purificación ineficiente.

Por otro lado Nishibori y Kinugawa (1978) que también únicamente recuperaron uno de los tipos parentales de varias cruces de *L. edodes*, postulan que en ese caso se debía a la diferente

sensibilidad de los micelios parentales a la homogeneización más que al propio efecto del taurocolato de sodio empleado como agente desdicarizante. Consecuentemente, se hace necesaria experimentación adicional para aclarar el fenómeno de la desdicarización y así elucidar los mecanismos que controlan el crecimiento vegetativo de la unidad dicariótica. Es de importancia identificar si este fenómeno se presenta como una alteración del proceso de reproducción del material nuclear del protoplasma o de la pared de la célula dicariótica, o bien como resultado de la influencia de sustancias tóxicas, a las cuales los componentes monocarióticos de una cepa presentan diferente susceptibilidad. Desde el punto de vista práctico, la elucidación del proceso de desdicarización permitirá en el futuro la recuperación controlada de los componentes monocarióticos de cepas de interés comercial, tanto de *Lentinus* spp. como de otros basidiomicetos.

LITERATURA CITADA

- Delpech, P. y J.M. Olivier, 1991. Cultivation of Shiitake on straw based pasteurized substrates. *Mushroom Science* 13: 523-528.
- Fries, N. y K. Aschan, 1952. The physiological heterogeneity of the dikaryotic mycelium of *Polyporus abietinus* investigated with the aid of the microsurgical technique. *Svensk. Bot. Tidskr.* 46: 429-445.
- Harder, R., 1927. Über mikrochirurgische Operationen an Hymenomyzeten. *Z. Wiss. Mikrosk. Tech.* 44: 173-182.
- Leal-Lara, H., 1980. Sporelessness in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. A Genetical Study by means of a new dedikaryotization method. Tesis Doctoral. Universidad de Phillips, Alemania.
- Milles, P.G. y J.R. Raper, 1956. Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia. *Mycologia* 48: 484-494.
- Nishibori, K. y K. Kinugawa, 1978. Eccentric recovery of parental monokaryons in the chemical dedikaryotization of *Lentinus edodes*. *Mushroom Science* 10: 201-210.

Tabla 1. Desdicariorización de *Lentinus tigrinus* con diferentes peptonas.

Tipo de peptona	Frecuencia de micelio monocariótico (%)	
	Temperatura de incubación (°C)	
	24	28
Carne (Bioxón)	0	0
Carne (JVC)	sc	sc
Carne P (Oxoid)	75 ± 0	38 ± 14
Caseína (Bioxón)	0	0
Caseína (Merck)	25 ± 0	38 ± 21
Soya (Bioxón)	0	0
Soya (Merck)	0	8 ± 13

sc sin crecimiento.
0 sólo se presentó micelio dicariótico.

Tabla 2. Efecto de la peptona de carne P (Oxoid) sobre la desdicariorización de diferentes cepas de *Lentinus* spp.

Cepas	Tipo de micelio	Tempo de incubación (días)*	
		en que se observó crecimiento micelial	
<i>L. edodes</i>	1	sc	-
	2	sc	-
	3	d	30
	4	d	30
	5	d	30
<i>L. dactyloides</i>	sc	-	
<i>L. ponderosus</i>	m	3	
<i>L. sp.</i>	sc	-	
<i>L. tigrinus</i>	m	3	

sc sin crecimiento.

d micelio dicariótico.

m micelio monocariótico.

* Los medios fueron incubados hasta 45 días, realizándose observaciones microscópicas periódicas para detectar el tipo de crecimiento micelial.

Tabla 3. Evaluación de la concentración de peptona de carne P (Oxoid) y el volumen de inoculación sobre la desdicariorización de diferentes cepas de *Lentinus edodes*.

Cepa	Peptona (g/l)	Inoculo (ml)	Incubación (días)	Tipo de micelio	
3	10	0.1	24	d	
		0.2	30	sc	
		0.3	24	m>d	
	20	0.1	30	sc	
		0.2	30	sc	
		0.3	30	sc	
		30	0.1	30	sc
			0.2	30	sc
			0.3	30	sc
4	10	0.4	11	d	
		1.0	11	d	
		2.0	11	d	
	20	0.4	30	sc	
		1.0	30	sc	
		2.0	30	sc	
		30	0.4	30	sc
			1.0	30	sc
			2.0	30	sc
	5	10	0.4	53	sc
			0.5	53	sc
			1.0	53	d
20		0.4	53	sc	
		0.5	53	sc	
		1.0	53	sc	
		30	0.4	53	sc
			0.5	53	sc
			1.0	53	sc

sc sin crecimiento.

d micelio dicariótico.

m>d predomina el micelio monocariótico.

Tabla 4. Tipos parentales (neohaplontes) recuperados de las cepas de *Lentinus* spp.

Cepas	Monocariotes aislados	Tipos parentales (neohaplontes)
<i>L. edodes</i> 3	21	1
<i>L. ponderosus</i>	29	1
<i>L. tigrinus</i>	56	1