



Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto

Rigoberto Gaitán-Hernández

Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México

Resumen

Se obtuvieron 15 cepas intraespecímen de *Neolentinus suffrutescens*, del entrecruzamiento de 12 aislamientos monospóricos. Los monospóricos y las cruizas, se evaluaron en agar con dextrosa y patata con infusión de *Pinus montezumae*. Se determinó el crecimiento micelial a los 12 días de incubación. Se seleccionaron ocho de las 15 cruizas y evaluaron *in vitro* en sustratos de madera de *Pinus* spp. (I) y *P. montezumae* (II). En agar, ninguna de las cruizas superó al parental, no así en el sustrato I, en donde tres lo superaron. El parental y las cruizas seleccionadas se cultivaron a nivel de planta piloto sobre los dos sustratos mencionados. La eficiencia biológica (EB) fluctuó de 4,85 a 14,60 % y la tasa de producción (TP) de 0,07 a 0,19 % en el sustrato I, y en el II de 4,41 a 14,92 % y de 0,06 a 0,23 %, respectivamente.

Palabras clave

Neolentinus suffrutescens, Cruizas, Evaluación *in vitro*, Planta piloto

Characterization and fruit-body production of *Neolentinus suffrutescens* strains obtained by crossing *in vitro* in a pilot plant

Summary

Dikaryotic strains of *Neolentinus suffrutescens* were obtained from crosses of 12 monosporous isolates. The monosporous breeding stocks and the crosses were evaluated on potato dextrose agar with a wood infusion of *Pinus montezumae* and growth rates at 12 days of incubation were determined. Eight crosses were selected and subsequently evaluated *in vitro* on *Pinus* spp. and *P. montezumae* wood chips. Crosses were not equal in performance to the original parental strain, however, on *Pinus* spp. wood, three of the crosses exceeded performance of the original parental strain. The parental strain and the selected crosses were cultivated in a pilot plant on the above mentioned substrates. The biological efficiency (BE) fluctuated between 4.85 to 14.60 % and the production rate (TP) between 0.07 to 0.19 % on the substrate I and on the substrate II, of 4.41 to 14.92 % and of 0.06 to 0.23 %, respectively.

Key words

Neolentinus suffrutescens, Crosses, *In vitro* evaluation, Pilot plant evaluation

Dirección para correspondencia:

Dr. Rigoberto Gaitán-Hernández
Instituto de Ecología
Apartado Postal 63
Xalapa, Veracruz, 91000
México
Fax: +52 28 187809
E-mail: gaytan@ecologia.edu.mx

Aceptado para publicación el 9 de febrero de 2000

©2000 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain).
1130-1406/99/5.00 Euros

Neolentinus suffrutescens (Brot. : Fr.) May & Wood [*N. lepideus* (Fr. : Fr.) Redhead & Ginns; *Lentinus lepideus* (Fr. : Fr.) Fr.; *Panus lepideus* (Fr. : Fr.) Corner] [1,2], es un hongo de pudrición parda de amplia distribución geográfica. Se le encuentra creciendo en durmientes de ferrocarril, postes de transmisión eléctrica y en maderos de pino de construcciones en algunos países de Europa [3,4]. De ahí su importancia en el estudio de la resistencia de la madera de uso económico al ataque de este hongo [5,6], en la producción de metabolitos secundarios [7-9] y en la degradación de compuestos aromáticos [10]. Sin embargo, en México es común en los bosques de coníferas y es objeto de consumo en algunas regiones, en donde se le conoce con los nombres de hongo de pino, hongo de ocote e iarín, entre otros [11]. A pesar de su factibilidad de cultivo, utilizando la gran cantidad de residuos de la

madera de pino que se generan, como lo hicieron ver Gaitán-Hernández *et al.* [12], el hongo ha sido poco estudiado al respecto, por lo que en este trabajo, se presenta la evaluación *in vitro* y a nivel de planta piloto de cepas dicarióticas de *N. suffrutescens* obtenidas por entrecruzamiento, con la intención de caracterizar y seleccionar las más productivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa parental, monospóricas y cruvas. Se utilizó la cepa mexicana de *Neolentinus suffrutescens* IE-133 del Cepario de Hongos del Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz, aislada del ejemplar *Álvarez 41* (Herbario XAL). Dicha cepa, está depositada también en la American Type Culture Collection (ATCC 96535). Los micelios monospóricos se obtuvieron de basidiomas de la cepa parental mencionada según la técnica descrita por Gaitán-Hernández *et al.* [12]. Los píleos de los cuerpos fructíferos se colocaron sobre papel filtro estéril durante 12 h, y una vez lograda la esporada, se tomó un fragmento del mismo de aproximadamente 1 cm² y se suspendió en 100 ml de agua destilada estéril. Se depositaron 0.5 ml de la dilución en placas de Petri de 90 mm (Ø) con agar con dextrosa y patata e infusión de madera (ver medio de cultivo), esterilizado por 15 min a 121°C, posteriormente se incubaron a 27 ± 1°C en oscuridad (temperatura empleada en todo el estudio). Para obtener las cruvas, 12 micelios monospóricos se aparearon entre sí en todas las combinaciones posibles evitando las cruvas recíprocas. Los apareamientos se consideraron positivos, cuando los micelios observados microscópicamente presentaron fíbulas. Del total de apareamientos, sólo 15 resultaron positivos, a éstos se les designó como NS y se numeraron progresivamente (Tabla 1).

Sustratos. Se emplearon dos tipos de maderas como sustrato: I) aserrín de *Pinus* spp. y II) viruta de *Pinus montezumae* Lambert, las dos recolectadas de la región del Cofre de Perote del Estado de Veracruz. El tamaño de partícula del aserrín fue de 2-3 mm y de la viruta de 7-8 mm, ambos se secaron en horno a 75°C durante 72 h.

Medio de cultivo. El medio de cultivo se preparó con 39 g de agar con dextrosa y patata (BIOXON, EE.UU.) y 1000 ml de infusión de madera de *P. montezumae* (ADP-IM). La infusión se preparó hirviendo 45 g de viruta de madera en 1500 ml de agua destilada.

Medición del crecimiento micelial en ADP-IM. Los 12 monospóricos se evaluaron en cultivos en placas de Petri con 25 ml de ADP-IM. Éstas se inocularon colocando en el centro un fragmento de agar de 8 mm (Ø) de cada uno de los monospóricos, cruvas y de la cepa parental. Se consideró el diámetro micelial promedio registrado a los 12 días de incubación. Para las cruvas se determinó además, la formación de agregaciones hifales (grupos de hifas en forma de gránulos que pueden originar un primordio) y primordios. Adicionalmente se consideró cambio de color y olor del medio de cultivo, la textura de los micelios [13] y la densidad de acuerdo a cinco categorías establecidas por el autor, muy baja densidad, baja, regular, alta y muy alta densidad; diferenciándose principalmente una de otra en si las hifas se observaron a simple vista hasta su parte apical o con ayuda de un microscopio estereoscópico, si el micelio cubrió completamente el sustrato o dejó algunos huecos, si el crecimiento micelial fue escaso o abundante y si se observaron o no agregaciones hifales.

Medición del crecimiento micelial en los sustratos de pino. Cada uno de los sustratos se hidrató al 80 % y se colocaron en placas de Petri el equivalente a 7 g secos,

modificando el sistema seguido por Mata y Gaitán-Hernández [14]. Una vez esterilizadas por 90 min a 121°C, las placas se inocularon por separado con las cruvas y el parental, y se estimó el crecimiento de los micelios como en el experimento anterior. Los parámetros considerados fueron los mismos observados en la evaluación en agar, excepto la formación de primordios.

Evaluación de las cruvas y comparación con el parental a nivel de planta piloto. El inóculo se preparó con viruta de *P. montezumae*, se hidrató al 80 % y posteriormente se colocó en bolsas de polipapel, 200 g en peso húmedo por bolsa. Las muestras se esterilizaron e inocularon con fragmentos de agar de aproximadamente 1 cm², con micelio de cada una de las cepas [12]. Una vez obtenido el inóculo, se prepararon las muestras de sustrato con las maderas I y II como principal y único ingrediente. De cada una de éstas, 200 g en peso seco se hidrataron a 80 % y se colocaron en bolsas de polipapel por separado 792 g húmedos del sustrato I y 552 g del II y se esterilizaron de la misma forma que el inóculo. A las muestras inoculadas, se les colocó un tapón de algodón previamente esterilizado para favorecer la aireación y posteriormente se incubaron. Una vez que el micelio cubrió el sustrato, las muestras se colocaron en el área de producción con iluminación natural difusa y ventilación para favorecer la fructificación. Los parámetros medioambientales que se registraron en los cinco meses de producción fueron, un intervalo mínimo de temperatura de 11,6 a 13,6 °C, máximo de 27,5 a 32,4 °C y una humedad de 74 a 91,8 %.

La producción se evaluó con base en los datos de eficiencia biológica (EB), la cual se determinó expresando en porcentaje la relación entre peso fresco de las fructificaciones de los hongos producidos y el peso seco del sustrato y con la tasa de producción (TP), la que se determinó mediante la relación de la eficiencia biológica entre el número total de días de evaluación, a partir del día de inoculación. El número y tamaño de las fructificaciones obtenidas, fue evaluado según el diámetro del píleo: grupo 1 (G1) < 5,0 cm y grupo 2 (G2) entre 5,0 y 9,9 cm.

Diseño experimental y tratamiento estadístico. Los experimentos de crecimiento micelial se realizaron por quintuplicado y los datos registrados a los 12 días de incubación se sometieron a un análisis de varianza unifactorial y/o multifactorial. El experimento de planta piloto se realizó con ocho réplicas/sustrato y a los datos de producción, se les aplicó un análisis de varianza multifactorial. A los datos de todos los experimentos, también se les aplicó un análisis de comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0,05$ %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de los micelios monospóricos. La germinación de esporas se observó entre los 4 a 6 días de incubación a 27 ± 1 °C, lo cual coincide con lo reportado por Snell [15]. El crecimiento micelial de los monospóricos registrado a los 12 días de incubación fluctuó de 4,16 a 8,54 cm.

Comportamiento de las cruvas y medición del crecimiento en ADP-IM. De acuerdo al comportamiento de los 66 apareamientos entre los 12 monospóricos probados, no se obtuvo el patrón de sexualidad de *N. suffrutescens*, debido a la ausencia de fíbulas en algunas de las cruvas. A la especie se le ha citado como heterotálica [16] y bipolar [2], pero no existe un estudio detallado al respecto. *N. suffrutescens* tiene un comportamiento nuclear astatocenocítico [16] y considerando que varios de los apareamientos tuvieron un crecimiento micelial sumergido en el agar, el poco oxígeno pudo influir en la ausencia de fíbulas. La

incompatibilidad entre los apareamientos probablemente también se debió a la presencia de un factor común A, similar a lo citado por Eugenio y Anderson [17]. De las 15 cruzas que resultaron positivas, ninguna superó al parental (96535) en el diámetro micelial (Tabla 1). Los resultados del parental concuerdan con los registrados por Gaitán-Hernández *et al.* [18], empleando la citada cepa en ADP sin infusión.

registrado a los 12 días de incubación (NS5, NS9, NS10) y en el II ninguna de las cruzas lo superó. Con base en el análisis de comparación de medias, el crecimiento de las cruzas fue significativamente diferente en ambas maderas, excepto para el parental. La densidad micelial de las cepas fue de baja a muy alta y la textura rala, lanosa y flocosa. En el sustrato II se observó una densidad muy alta sólo en una de las cruzas (NS9), con características morfológicas

Tabla 1. Diámetro promedio (cm) y características de los micelios (densidad, textura, agregaciones hifales y formación de primordios) de las cruzas obtenidas de *N. suffrutescens*, a los 12 días de incubación en ADP-IM, y comparación con el parental (96535).

Cepas	Código de identificación	Diámetro $\pm \sigma$	Densidad	Textura	**	***
96535	96535	7,07 \pm 0,17*	MA	F	++	p
(1-8)	NS1	6,58 \pm 0,34 ^d	MA	F	++	p
(2-8)	NS2	6,10 \pm 0,41 ^d	A	F	+	-
(3-8)	NS3	6,52 \pm 0,13 ^f	MA	F	++	-
(4-11)	NS4	6,27 \pm 0,21 ^e	MA	F	++	p
(4-12)	NS5	6,10 \pm 0,41 ^d	MA	F	++	p
(5-11)	NS6	6,09 \pm 0,65 ^d	MA	F	++	-
(5-12)	NS7	6,71 \pm 0,17 ^h	MA	F	++	p
(7-10)	NS8	6,47 \pm 0,31 ^e	B	S	-	-
(7-11)	NS9	6,37 \pm 0,26 ^e	MA	F	++	-
(7-12)	NS10	6,57 \pm 0,26 ^e	MA	F	++	-
(10-12)	NS11	5,45 \pm 0,25 ^a	MA	S	-	-
(11-9)	NS12	5,58 \pm 0,31 ^b	A	S	+	p
(11-10)	NS13	6,28 \pm 0,25 ^e	RE	S	-	-
(11-11)	NS14	5,95 \pm 0,31 ^c	A	F	+	p
(11-12)	NS15	6,43 \pm 0,45 ^e	B	S	-	-

* Los valores representan el promedio de cinco réplicas. Valores que no comparten una misma letra indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0,05\%$); ** agregaciones hifales; *** primordios; B baja; R regular; A alta; MA muy alta; F flocosa; S sedosa; - ausentes; + poco abundantes; ++ abundantes; p presentes.

En el agar los micelios presentaron una densidad de baja a muy alta, con textura sedosa y flocosa, similar en todas las cepas; en la mayoría de éstas se observaron agregaciones hifales (Tabla 1). En algunas cruzas se detectó la formación de primordios, un olor parecido a bálsamo de Perú y cambio de color en el agar, mencionado ya por Snell [15,19], Cartwright [20], Badcock [21] y Gaitán-Hernández *et al.* [18], mientras que Nobles [22] no observó cambio de color en agar con extracto de malta. Otha *et al.* [23] detectaron una coloración café en medio líquido con micelio de la especie aquí estudiada, argumentando que posiblemente se debía a la actividad de una fenol oxidasa. El olor en algunos cultivos es característico de *N. suffrutescens* y se debe a la producción de metabolitos secundarios, como el *p*-hidroxifenilpropanol, *trans*-metil *p*-metoxicinamato, *cis*-metil *p*-metoxicinamato, metil *p*-hidroxicinamato, metil isoferulato y metil *p*-metoxibenzoato [3,23,24].

Se observó la formación de cristales en cuatro de las cruzas (NS2, NS4, NS6, NS14), los cuales habían sido previamente citados [3]. Estos cristales posiblemente sean de oxalato de calcio y se han detectado en *Resinicium bicolor* (Abertini & Schwein.: Fr.) Parmasto, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach y *Gastrum saccatum* (Fr.) Fischer [25-27], entre otros. El ácido oxálico es producido por hongos de pudrición blanca y pudrición parda [28,29]; en estos últimos como la especie aquí estudiada, se ha propuesto como un importante factor precelulolítico, que posiblemente actúa como quelante para ayudar a la movilización de hierro, magnesio u otros iones metálicos que pueden ser usados durante los procesos no enzimáticos y en la reducción del pH del sustrato en su degradación [29,30].

Comportamiento de las cruzas y crecimiento en los sustratos de pino. Con base en los resultados anteriores, de crecimiento micelial, comportamiento morfológico y formación de primordios, se seleccionaron ocho de las 15 cruzas para su evaluación en los sustratos I y II (Tabla 2). En el I, tres cruzas superaron al parental en el diámetro

similares al parental. También en el mismo sustrato, la mayoría de las cruzas presentaron abundantes agregaciones hifales, no así en el I (Tabla 2).

Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos por las cruzas y el parental de *N. suffrutescens* a nivel de planta piloto. El periodo de incubación de las ocho cruzas y el parental fue de los 37 a 49 días en el sustrato I (96535 y NS1, respectivamente) y de 31 a 54 días en el II (96535 y NS7, respectivamente), semejante a lo reportado por Gaitán-Hernández *et al.* [12]. El número de cosechas obtenidas en el I fue de 1 a 3, y en el II de 1 a 4. En los dos sustratos, la primera cosecha fue siempre la más abundante, con una producción promedio mayor al 80 % en el I y mayor al 50 % en el II. En el sustrato I se observaron tres grupos de cepas bien definidos en el número y producción por cosecha. Las de tres cosechas (96535, NS6), que tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la producción de hongos por cosecha, las de dos cosechas (NS4, NS9, NS14) y las de sólo una cosecha (NS1, NS7, NS10). En el sustrato II las cepas produjeron más cosechas, excepto en algunas de ellas (NS9, NS10 y NS6). La única cruza que igualó al parental (96535) en cuanto al número de cosechas obtenidas fue la NS14. En general, las cruzas y el parental tuvieron un mejor comportamiento, en el sustrato II de *P. montezumae* que en el I de *Pinus* spp., incluso la cruza NS5 no produjo hongos en esta última.

Respecto a la producción de hongos (g) por grupos de tamaño, en ambos sustratos las cepas produjeron hongos de los dos grupos establecidos (G1: < 5,0 cm y G2: de 5,0-9,9 cm). La NS1, NS4 y NS9, no desarrollaron hongos del G2 en el sustrato I (Tabla 3). Sin embargo, en este mismo sustrato, las cepas NS4, NS7 y NS9 superaron al parental en la producción de hongos del G1, y la NS6 en la producción de hongos del G2, diferente estadísticamente al parental. La producción de hongos del G1 y G2 en el sustrato I fue significativamente diferente en todas las cepas. En el sustrato II, tres de las ocho cruzas superaron al parental en la producción de hongos desarrollados del

Tabla 2. Diámetro promedio (cm) y características de los micelios (densidad, textura y agregaciones hifales) de las cruces de *N. suffrutescens* a los 12 días de incubación, en los sustratos de pino y comparación con el parental (96535).

Sustratos	Cepas	Diámetro ± σ	Densidad	Textura	Agregaciones hifales**
<i>Pinus</i> spp. (I)	96535	8,50 ± 0,29 ^{j*}	B	R	-
	NS1	8,22 ± 0,37 ^h	A	F	+
	NS4	8,02 ± 0,45 ^g	A	F	+
	NS5	9,0 ± 0,00 ^k	A	F	+
	NS6	8,33 ± 0,20 ^h	RE	L	-
	NS7	8,20 ± 0,58 ^h	RE	L	-
	NS9	8,84 ± 0,20 ^k	A	F	+
	NS10	8,66 ± 0,38 ^j	A	F	+
	NS14	8,37 ± 0,50 ⁱ	A	F	+
	96535	8,57 ± 0,35 ^j	MA	F	++
	NS1	6,78 ± 0,56 ^b	A	L	+
	NS4	6,89 ± 0,72 ^c	A	F	++
	NS5	7,96 ± 0,27 ^g	A	F	++
	NS6	7,63 ± 0,79 ^f	A	F	++
<i>P. montezumae</i> (II)	NS7	6,41 ± 1,0 ^a	A	F	+
	NS9	7,52 ± 0,65 ^o	MA	F	++
	NS10	7,25 ± 0,41 ^d	A	F	++
	NS14	7,08 ± 0,29 ^c	A	L	+

* Los valores representan el promedio de cinco réplicas. Valores que no comparten una misma letra para todas las cepas y para ambos sustratos, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey (α=0,05 %); B baja; RE regular; A alta; MA muy alta; R rala, L lanosa; F flocosa; ** - ausentes; + poco abundantes; ++ abundantes.

Tabla 3. Peso promedio de hongos producidos (g) por las cruces de *N. suffrutescens*, por grupos de tamaño, en los dos sustratos evaluados y comparación con el parental.

Cepas	<i>Pinus</i> spp. (I)		<i>P. montezumae</i> (II)	
	G1	G2	G1	G2
96535	13,17 ^{g*}	6,22 ^c	16,71 ⁱ	5,32 ^b
NS1	9,70 ⁱ	-	12,78 ^h	5,17 ^b
NS4	19,91 ^k	-	19,82 ^k	8,93 ^o
NS5	-	-	7,93 ^d	6,76 ^c
NS6	12,06 ^f	17,15 ⁱ	9,02 ^e	19,05 ^j
NS7	14,20 ^h	2,50 ^a	7,80 ^d	11,70 ^g
NS9	18,50 ^j	-	23,73 ⁱ	2,86 ^a
NS10	11,42 ^f	2,12 ^a	7,16 ^d	1,66 ^a
NS14	7,88 ^d	5,57 ^b	19,37 ^k	10,47 ^f
Prom./grupo	G1= 12,84 ^b		G2= 5,86 ^a	

* Los valores representan el promedio de ocho réplicas. Valores que no comparten una misma letra para los grupos de tamaño de las cepas, de un mismo sustrato, así como entre el promedio/grupo, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey (α= 0,05 %).

G1 (NS4, NS9 y NS14) y 5 en la producción de hongos del G2 (NS4, NS5, NS6, NS7 y NS14). El G1 fue el más representativo (promedio/grupo), con 12,84 g en promedio, mientras que el G2 produjo 5,86 g de fructificaciones, con diferencia estadística entre ambos grupos (Tabla 3).

La eficiencia biológica (EB) alcanzada por las cruces y el parental en los sustratos I y II, fluctuó de 4,85 a 14,60 % y de 4,41 a 14,92 %, respectivamente (Tabla 4). En el I, 2 de las cruces superaron a la cepa parental, la NS4 y la NS6, con una EB de 9,95 y 14,60 %, respectivamente, sin diferencia estadística de la primera con el parental. En el sustrato II, estas mismas cepas y las NS9 y NS14 fueron superiores, con diferencias estadísticas entre ellas, excepto entre la NS4 y NS6. En esta última, la EB fue estadísticamente similar entre los dos sustratos. Con los valores promedio obtenidos por cepa en ambos sustratos (EB promedio/cepa), se observó que las cruces NS4, NS6, NS9 y NS14 superaron al parental, aunque la última de éstas no fue estadísticamente diferente al mismo. También, con los valores promedio de las cepas para cada uno de los sustratos (EB promedio/sustrato), la mayor EB fue en el II y significativamente diferente al I (Tabla 4). Gaitán-Hernández *et al.* [12], reportaron una EB de 7,9 a 27,55 %, empleando la misma cepa de este estudio (96535), en sustratos a base de madera de pino, lo cual coincide con los valores aquí obtenidos, sin embargo, éstos no superan a la EB máxima reportada (27,55 %).

Tabla 4. Eficiencia biológica promedio (%) obtenida por las cruces de *N. suffrutescens* y comparación con la cepa parental.

Cepas	<i>Pinus</i> spp. (I)	<i>P. montezumae</i> (II)	EB prom./cepa
96535	9,70 ^{f*}	11,01 ^g	10,35 ^e
NS1	4,85 ^a	8,98 ^d	6,91 ^c
NS4	9,95 ^f	14,38 ⁱ	12,16 ^g
NS5	-	7,35 ^c	3,67 ^a
NS6	14,60 ^j	14,03 ⁱ	14,31 ^h
NS7	8,35 ^d	9,75 ^f	9,05 ^d
NS9	9,12 ^e	13,30 ^h	11,21 ^f
NS10	6,77 ^b	4,41 ^a	5,59 ^b
NS14	6,72 ^b	14,92 ⁱ	10,48 ^e
EB prom./grupo	7,78 ^a	10,90 ^b	

* Los valores representan el promedio de ocho réplicas. Valores que no comparten una misma letra para los grupos de tamaño de las cepas, de un mismo sustrato, así como entre el promedio/grupo, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey (α= 0,05 %).

Tabla 5. Tasa de producción promedio (%) obtenida por las cruces de *N. suffrutescens* y comparación con la cepa parental

Cepas	<i>Pinus</i> spp. (I)	<i>P. montezumae</i> (II)	TP prom./cepa
96535	0,17 ^{d*}	0,11 ^{b*}	0,14 ^d
NS1	0,07 ^a	0,13 ^c	0,10 ^c
NS4	0,13 ^c	0,21 ^e	0,17 ^e
NS5	-	0,13 ^c	0,06 ^a
NS6	0,18 ^d	0,23 ^f	0,20 ^f
NS7	0,16 ^d	0,13 ^c	0,14 ^d
NS9	0,19 ^d	0,18 ^d	0,18 ^e
NS10	0,11 ^b	0,06 ^a	0,08 ^b
NS14	0,10 ^b	0,17 ^d	0,13 ^d
TP prom./sustrato	0,12 ^a	0,15 ^a	

* Los valores representan el promedio de cinco réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cepas, para ambos sustratos, así como entre la TP promedio/cepa y TP promedio/sustrato, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey (α= 0,05 %).

La tasa de producción (TP) lograda por las cruces y su parental en el sustrato I fluctuó de 0,07 a 0,19 % y de 0,06 a 0,23 % en el II. En el I, dos de las cruces superaron al parental (NS6, NS9) y fueron estadísticamente similares al mismo, así también la NS7. En el sustrato II el parental fue estadísticamente diferente a todas las cruces y la mayoría de éstas lo superaron, excepto la NS10. Los valores promedio por cepa para los dos sustratos (TP promedio/cepa) indicaron que tres de las ocho cruces fueron superiores y estadísticamente diferentes a la cepa parental (NS4, NS6, NS9), pero ésta fue significativamente seme-

jante a la NS7 y NS14. Además al obtener el promedio de cada una de los sustratos (TP promedio/sustrato), el de *P. montezumae* presentó la mayor TP, aunque no fue significativamente diferente a *Pinus* spp. (Tabla 5).

CONCLUSIONES

De las evaluaciones *in vitro*, el crecimiento micelial de las cruzas fue mayor en los sustratos de pino que en medio de cultivo. Lo anterior justificado por el hecho de que el primero es el sustrato natural en el que este hongo crece. Sin embargo, la textura y formación de agregaciones hifales fue notable en el agar. La variación observada del crecimiento de las cruzas, es reflejo principalmente de

la recombinación de alelos presentes en el proceso de selección. Los resultados indicaron que el crecimiento micelial *in vitro* no estuvo relacionado con la productividad de las cepas.

A nivel de planta piloto, la TP obtenida refleja más que otro valor, el comportamiento real de las cepas, dado que está en estrecha relación a la EB, y de acuerdo a los resultados de TP obtenidos, se determinó que los procesos de manipulación y selección repercutieron en la obtención de cepas más productivas que la cepa de la cual se originaron.

El autor agradece a las siguientes personas del Instituto de Ecología de Xalapa su amable colaboración; especialmente al Dr. Gastón Guzmán por las observaciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo y por la revisión crítica del manuscrito. A la M. en C. Dulce Salmenes por su apoyo brindado en la realización de esta investigación y a la Bióloga Isabel Lara-Herrera por su ayuda constante en labores de laboratorio y planta piloto. Al Dr. Daniel J. Roysse del Mushroom Research Center de Pennsylvania State University por sus valiosos comentarios al escrito. También del Instituto de Ecología, al Dr. Gerardo Mata por sus correcciones al texto y a las Biólogas Rosalía Pérez y Verónica Álvarez y Técnico Juan Lara por su ayuda en diversas tareas técnicas. Se agradece también el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Bibliografía

- May TW, Wood AE. Nomenclatural notes on Australian macrofungi. *Mycotaxon* 1995; 54: 147-150.
- Redhead S, Ginns JH. A reappraisal of agaric genera associated with brown rots of wood. *Trans Mycol Soc Jap* 1985; 26: 349-381.
- Birkinshaw JH, Findlay WPK. Biochemistry of the wood-rotting fungi. Metabolic products of *Lentinus lepideus* Fr. *Biochemical J* 1940; 34: 82-88.
- Suominen J. On the occurrence of the fungus *Lentinus lepideus* Fr. on railway sleepers in Finland. *Karstenia* 1973; 13: 40-43.
- Duncan CG, Lombard FF. Fungi associated with principal decays in wood products in the United States. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1965.
- Dickinson DJ. The decay of commercial timber. En: Frankland JC, Hedger JN, Swift MS (Eds.) *Decomposer basidiomycetes: their biology and ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1982: 179-190.
- Hanssen HP. Sesquiterpene alcohols from *Lentinus lepideus*. *Phytochemistry* 1985; 24: 1293-1294.
- Abraham WR, Hanssen HP, Möhringer C. Novel sesquiterpene ethers from liquid cultures of the wood-rotting fungus *Lentinus lepideus*. *Z Naturforsch* 1988; 43: 24-28.
- Otha A, Shimada M, Higuchi T, Takahashi M. A new type of O-Methyltransferase involved in the biosynthesis of secondary metabolites of a brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mukozai Gakkaishi* 1991; 37: 275-280.
- Collett O. Aromatic compounds as growth substrates for isolates of the brown-rot fungus *Lentinus lepideus* (Fr. ex Fr.)Fr. *Material und Organismen* 1992; 27: 67-77.
- Guzmán G. Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina. CONABIO e Instituto de Ecología, Xalapa, 1997.
- Gaitán-Hernández R, Mata G, Guzmán G. Cultivation of *Lentinus lepideus* in Mexico. Production of fruiting bodies on coniferous wood shavings. *Mushroom Res* 1993; 2: 79-82.
- Stalpers JA. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud Mycol* 1978; 16: 1-248.
- Mata G, Gaitán-Hernández R. Utilización de pulpa de café mezclada con viruta de madera para el crecimiento micelial de *Lentinus boryanus* y *Lentinus edodes*. *Rev Mex Micol* 1992; 8: 125-129.
- Snell W. Studies of certain fungi of economic importance in the decay of building timbers. *Bull US Dept Agric* 1922; 1053: 1-47.
- Lamoure D. Répertoire des données utiles pour effectuer les test d'intercompatibilité chez les basidiomycetes V.-Agaricales *sensu lato*. *Crypt Mycol* 1989; 10: 41-80.
- Eugenio CP, Anderson NA. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 1968; 60: 627-634.
- Gaitán-Hernández R, Mata G, Guzmán G. Behavior of a Mexican strain of *Lentinus lepideus* on three solid media. *Rev Mex Micol* 1995; 11: 23-27.
- Snell W. Occurrence and identity of cotton mill fungi. *Mycologia* 1923; 15: 153-165.
- Cartwright KG. The relation between field and laboratory work in mycology. *Trans Brit Myc Soc* 1938; 22: 222-238.
- Badcock, EC. Preliminary account of the odour of wood-destroying fungi in culture. *Trans Brit Mycol Soc* 1939; 23: 188-198.
- Nobles M. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can J Bot* 1965; 43: 1097-1139.
- Otha A, Shimada M, Hattori T, Higuchi T, Takahashi M. Production of secondary metabolites including a new metabolite *p*-methoxyphenylpropanol by the brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mukozai Gakkaishi* 1990; 36: 225-231.
- Otha A, Shimada M, Higuchi T, Takahashi M. Effects of carbon and nitrogen nutrients on production of secondary metabolites by a brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mukozai Gakkaishi* 1990; 36: 565-572.
- Connolly JH, Jellison J. Calcium translocation, calcium oxalate accumulation, and hyphal sheath morphology in the white-rot fungus *Resinicium bicolor*. *Can J Bot* 1995; 73: 927-936.
- Whitney KD, Arnott HJ. Calcium oxalate crystals and basidiocarp dehiscence in *Gastrum saccatum* (Gasteromycetes). *Mycologia* 1986; 78: 649-656.
- Whitney KD, Arnott HJ. Calcium oxalate crystals morphology and development in *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 1987; 79: 180-187.
- Dutton MV, Evans CS, Atkey PT, Wood DA. Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-root species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993; 39: 5-10.
- Espejo E, Agosin E. Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 1980-1986.
- Goodell B, Jellison J, Liu J *et al*. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J Biotechnol* 1997; 53: 133-162.