

DL
06
+ (2658)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Cultivo de una cepa nativa de *Pleurocybella porrigens* (Pers. ex Fr.) Singer para la
producción de cuerpos fructíferos *in vitro*.

Informe de Tesis

Presentado por

Brenda Rosario Cojtí Barrientos

Para optar al Título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, marzo de 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Lilitiana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS** Mi divino creador, por la vida y la salud, por estar siempre a mi lado, en los momentos difíciles y en los momentos dichosos como el día de hoy, mis gracias infinitas por enseñarme que con perseverancia es posible realizar todo lo que nos propongamos.
- A MIS PADRES** Pablo Cojtí Chiroy †, por sus enseñanzas y su profundo amor, por ser en mi vida fuente de inspiración, por haber sido un gran ser humano y el mejor de los padres, al que amo y agradezco sus esfuerzos por hacerme una persona de bien. A mi madre Blanca Estela Barrientos, por todo su amor y sacrificios, por ser el pilar de mi familia y la fortaleza de mi corazón, por su ejemplo, sus consejos y por se la luz de mis ojos, mil gracias por que sin su apoyo no hubiera sido posible cumplir esta meta, para ella mi amor, respeto y admiración.
- A MIS HERMANAS** Blanca Liliana †, Ligia Carolina y Diana Paulina, por ser mis amigas, mi apoyo y mi consuelo en todo momento, para ellas todo mi cariño y mis mejores deseos.
- A MI SOBRINO** Christian, con todo mi amor, por ser un angelito que del cielo Dios nos mando, y a nuestra familia de alegría lleno.
- A MIS ABUELITOS** Félix Cojtí Morales †, José María Monzón †, y en especial a mis abuelitas Reyes Chiroy y Herminia Villatoro, por sus consejos y profundo amor.
- A MIS AMIGOS** Por su cariño y amistad sincera, por tantos momentos compartidos, fuera y dentro de la universidad, me llevo en el corazón el mejor recuerdo de cada uno de ustedes. En especial a Greisy Sánchez, Ana Seli Saloj, Mariela Rendón, Julia Sánchez, Helinda Letrán, Lucrecia Jallez, Carlos Villatoro, María José Aguilar y Carlos Vargas. Y a todos los que no menciono sepan que tienen mi cariño y admiración.

AGRADECIMIENTOS

Al Licenciado Osberth Morales Esquivel, por su asesoría, apoyo y amistad brindado durante la realización de esta tesis.

A MSc. Karin Herrera y Licda. María Luisa de López, mi agradecimiento sincero y especial por revisar esta tesis.

Al Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR-, de la Escuela de Química Biológica.

A Roberto Cáceres Staackmann, por su ayuda, apoyo y asistencia brindada.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, y a la Escuela de Química Biológica, así como a sus catedráticos, con respeto y cariño especial por ser mis guías y formadores para la vida personal y profesional.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Antecedentes.....	4
A. Generalidades.....	4
B. Hongos comestibles.....	4
C. Valor nutritivo de los hongos	5
D. Cultivo de hongos comestibles.....	5
E. <i>Pleurocybella porrigens</i> (Pers. ex.: Fr) Singer	7
1. Clasificación	7
2. Descripción	7
3. Hábitat natural	7
4. Distribución.....	8
5. Propiedades	8
6. Usos	8
7. Cultivo	8
IV. Justificación	11
V. Objetivos	13
VI. Hipótesis	14
VII. Materiales y métodos	15
VIII. Resultados	24
IX. Discusión	31
X. Conclusiones	34
XI. Recomendaciones	35
XII. Referencias	36
XIII. Anexos	39

I. RESUMEN

En este estudio se describieron las características miceliales de cultivo *in vitro* de una cepa nativa de *P. porrigens*, así como el medio y la temperatura más adecuadas para su desarrollo.

El trabajo se inició reactivando la cepa de *P. porrigens* 145.2003 en agar PDA e incubándola a 26°C durante 22 días. Seguidamente se determinó la tasa radial de crecimiento en los medios de cultivo SAB, PDA, EMA y PDA-IM a dos temperaturas: 24 y 26°C. Además se describieron las características macro y microscópicas de las colonias.

P. porrigens presentó colonias de color blanco, superficie algodonosa, sin exudado durante los días de incubación. A nivel microscópico, presentó fíbulas en todos los medios y en ambas temperaturas. El crecimiento más vigoroso y rápido fue observado en el medio PDA-IM a 24°C a los 17 días de incubación con un diámetro medio de 50.9 mm y una tasa radial de crecimiento de 2.9 mm/día.

A 24°C no se observó diferencia significativa en el crecimiento miceliar entre los medios PDA y EMA ($p=0.984$), PDA y PDA-IM ($p=0.070$) y entre PDA-IM y EMA (0.155). El medio SAB presentó diferencia significativa con los otros medios evaluados: PDA, EMA y PDA-IM ($p=0.000$).

A 26°C no se encontró diferencia significativa en el crecimiento miceliar evaluado entre los medios PDA y EMA ($p=0.987$). Sin embargo, si se advirtió diferencia significativa entre los medios PDA-IM y SAB ($p=0.000$), PDA-IM y PDA ($p=0.006$) y PDA-IM con el medio EMA ($p=0.017$).

Para la producción de inóculo se prepararon 50 gramos de sorgo, trigo, cebada y aserrín de pino en bolsas de polipapel. Posteriormente se inocularon con el micelio previamente propagado en agar PDA-IM. Los sustratos fueron incubados a las temperaturas de 24 y 26°C.

Se evaluó el crecimiento durante 60 días, observándose una colonización parcial (crecimiento del micelio en la superficie y no en el interior) de la cepa en tres de los sustratos evaluados (sorgo, cebada y trigo) a ambas temperaturas, mientras que en el aserrín de pino no se observó crecimiento del micelio.

Los sustratos (olote, rastrojo de maíz, pulpa de café y hojarasca de encino) inoculados con la cepa de *P. porrigens*, se incubaron durante cuarenta y cinco días a temperatura ambiente. Finalizado este lapso, no se observó la colonización completa de los sustratos (crecimiento del micelio solamente en la parte exterior).

Los sustratos fueron colocados durante 15 días en condiciones de fructificación (luz y humedad) para la obtención de cuerpos fructíferos. Sin embargo, en ninguno de los sustratos empleados se logró la formación de primordios y basidiocarpos. Por tal motivo, las condiciones de fructificación estudiadas en esta investigación no son las adecuadas para la fructificación de la cepa de *P. porrigens*.

II. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen uno de los grupos mas abundantes y diversos de los seres vivos, con mas de 46,900 especies reportadas y con la presunción de que muchas especies aún no están descritas (1).

En Guatemala existe un gran número de especies de hongos, de las cuales muchas de ellas son comestibles. Según estudios recientes se han descrito 70 especies comestibles, en 21 localidades de Guatemala (2).

Actualmente el cultivo de hongos comestibles esta limitado a pocas especies, tales como *Agaricus*, *Lentinus* y *Pleurotus*. Sin embargo, el cultivo de hongos exóticos ha tenido un gran desarrollo durante los últimos 32 años a nivel internacional, ya que la producción creció más de 17 veces, hasta llegar a las 6.158,000 toneladas en el año 1997 (3).

Uno de estos hongos exóticos que se da naturalmente en Guatemala es *P. porrigens*, el cual es comestible y popular en otras partes del mundo como Canadá y Estados Unidos de América, pero se desconoce el proceso para su cultivo a nivel de laboratorio (4).

Debido a que *P. porrigens*, es un hongo comestible en nuestro país, se procedió a determinar sus características de cultivo y adaptación a nivel de laboratorio, con el fin de identificar el mejor medio sólido para su crecimiento miceliar, el mejor sustrato para la producción de inóculo y cuerpos fructíferos, para lograr su cultivo a nivel artesanal y con ello contribuir con una alternativa alimenticia y/o de comercialización, en comunidades rurales en un futuro cercano.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades:

Los hongos constituyen un grupo taxonómico diferente a plantas y animales, al cual se le denominó Reino Fungi. Se diferencian del resto de los organismos vivos, en su estructura microscópica a base de hifas, en su carácter perenne y en sus procesos de reproducción a través de esporas sexuales y asexuales (5,6). La clasificación actual de este reino, se basa en las relaciones evolutivas de los grupos de organismos, correspondientes a linajes monofiléticos y se incluyen en cuatro *Phyla*: *Chytridiomycota*, *Zigomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (7).

Los hongos se encuentran entre los organismos más importantes del mundo, no solamente por su papel vital en el funcionamiento del ecosistema, sino también por su influencia en los humanos y en actividades relacionadas con él. Los hongos también son esenciales en la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente. Algunas especies son patógenas de plantas, animales y otras forman simbiosis mutualistas, obligadas, con diversas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales (8).

Se ha estimado que podrían existir 1.5 millones de especies en este reino y de ellas, aproximadamente 140,000 producen cuerpos fructíferos de tamaño y estructura suficiente, para ser considerados macrohongos; muchas de las cuales se cultivan o se recolectan para alimento (8,9).

B. Hongos comestibles:

La comestibilidad de los hongos se conoce desde tiempos inmemoriales. Se estima que en el mundo, cerca de 7,000 especies poseen varios grados de

comestibilidad y más de 3,000 especies de 31 géneros se consideran comestibles (9).

Hasta el año 2003, en Guatemala se han reportado 70 especies de hongos comestibles. Entre ellas se cuenta *P. porrigens*, cuyo valor culinario y comercial es aprovechado por los habitantes de Jacaltenango, Huehuetenango (10).

C. Valor nutritivo de los hongos comestibles:

El valor nutritivo de los hongos, se centra en su contenido mineral y vitamínico, similar al de las hortalizas comunes. Contienen cantidades utilizables de vitaminas del complejo B y C, así como minerales entre ellos calcio, hierro, fósforo y potasio, importantes para una dieta balanceada. Poseen un alto contenido proteico en peso seco y son bajos en calorías, carbohidratos y grasas (1).

Sus proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales para el hombre incluyendo lisina y metionina, que se encuentran en muy pequeñas cantidades en las plantas, además de ser fuente de varias vitaminas, minerales y fibra (11).

D. Cultivo de hongos comestibles:

Existen más de 3,000 especies de hongos comestibles, de las cuales solo se cultivan muy pocas de ellas. Actualmente se han estudiado para fines de cultivo alrededor de 200 especies, de las cuales aproximadamente 60 se cultivan comercialmente y cerca de 10 se cultivan a escala industrial. Las 10 especies cultivadas más populares a nivel mundial son *Agaricus bisporus/bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota nameko* y *Grifola frondosa*. En años recientes, se cultivan también varias nuevas especies de hongos comestibles, como por ejemplo *Hericium erinaceus*,

Dictyophora indusiata, *Stropharia rugoso-anulata*, *Lepista nuda*, *Agrocybe aegerita*, *A. cylindraceae*, *Pleurotus citrinopileatus* y *Cantharellus cibarius* (9).

El consumo de hongos comestibles, aumenta en todo el mundo en forma continua. En pocos años ha pasado de ser una actividad artesanal con muchísimas improvisaciones a una agroindustria altamente tecnificada y rentable. La producción mundial de hongos comestibles en la temporada de 1989-1990 resultó ser de 3.763,000 toneladas, habiéndose registrado un incremento en la producción anual promedio de un 25%. Los valores actuales de producción acercan esta cifra a los 4 o 5 millones de toneladas anuales (11).

La actividad meramente artesanal de cultivar hongos en forma casera ha ido dando lugar particularmente a pequeñas industrias primero y luego a verdaderas empresas, en donde el cultivo de hongos comestibles se ha tornado una actividad semi-industrial rentable (6).

El cultivo de hongos en América inicio en México en 1933 por medio de una tecnología simple, fue seguido por Argentina (1941), Colombia (1950), Brasil (1951), Chile (1959), Guatemala (1960), Perú (1960), Ecuador (1976), Venezuela (1968), Costa Rica (1969) y Bolivia (1989). En los Estados Unidos, los cultivos de hongos comestibles datan desde 1880 y en Canadá desde 1912 (3).

Por el momento, Guatemala produce cerca de 68,504 kg de *A. bisporus* y *A. bitorquis*, 34,020 kg de *L. edodes* y 29,580 kg de *Pleurotus*, cada año. Otros como *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Volvariella volvacea* y *Pholiota nameko* se producen experimentalmente desde 1995 (2).

E. *Pleurocybella porrigens* (Pers. ex.: Fr.) Singer.

1. Clasificación:

P. porrigens se considera una especie de forma pleurotoide, similar en morfología y hábitat a especies de hongos comestibles como *Pleurotus*, *Flammulina* y *Hohenbuehelia* (14).

Se clasifica de la manera siguiente:

Reino	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subclase	Basidiomycetes
Clase	Agaricomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurocybella</i>
Especie	<i>porrigens</i> (15).

2. Descripción:

Las características de los cuerpos fructíferos de esta especie son: Estípite ausente, píleo de 3.5 a 10.0 cm de diámetro, forma de abanico, superficie lisa y color blanco. Láminas estrechas, juntas y de color blanco (Anexo 1, Fig. 1). Sabor y olor inapreciables. Esporas de 6.0-7.0 x 5.0-6.0 μm , subglobosas a ovals de color blanco, lisas, hialinas, inamiloides (12,13).

3. Hábitat natural:

Es un hongo saprofito que crece naturalmente de manera gregaria, sobre madera de coníferas o sobre maderas duras, las que le proporcionan el hábitat (12).

4. Distribución:

P. porrigens, se ha reportado en Canadá, Estados Unidos y Guatemala. En éste último solamente se ha encontrado en bosques de la montaña de Aqoma', en Jacaltenango, Huehuetenango (1).

5. Propiedades:

Es un agradable hongo comestible, del cual no se tiene información acerca de su contenido nutricional (12).

6. Usos:

Este hongo es considerado comestible en Norteamérica, se consume y comercializa como hongo silvestre en Canadá, exportándolo a los Estados Unidos. En estos países se le conoce con el nombre de alas de ángel (angel wings) (4).

En Guatemala, *P. porrigens*, es un hongo comestible silvestre, utilizado en la región de Jacaltenango, Huehuetenango, donde se le conoce como **te' sajchiyo**, que significa carne blanca de pollo, en idioma Popti'. Este hongo en particular es uno de los menos conocidos en nuestro país (1).

7. Cultivo:

Actualmente no se cuenta con una metodología específica para el cultivo *P. porrigens* a nivel de laboratorio, pero debido a que este es un hongo similar en biología y propiedades a *Pleurotus ostreatus*, se supone que puede ser cultivado de forma similar a éste (16).

Para cultivar éste tipo de hongos, con fines comerciales, se requiere en primer lugar seleccionar una cepa de buena calidad, que esté bien adaptada a las condiciones ambientales del lugar, además que crezca muy bien sobre el sustrato sobre el cual se piensa cultivar. La tasa de producción de estos hongos no se relaciona con la velocidad de crecimiento micelial de la cepa (17).

De manera general, para el cultivo de hongos comestibles, el sustrato deberá estar preparado de tal manera, que permita el crecimiento selectivo, rápido y robusto, es decir retardando el crecimiento de sus competidores. Ésta selectividad del sustrato se facilita al dejar libre el complejo lignina-celulosa y manteniendo un pH relativamente ácido, así como al mantener concentraciones bajas en azúcares solubles y sales de amonio, además es recomendable el uso de diferentes restos o materiales lignocelulósicos, los cuales deben ser mezclados, humectados, corregidos en el pH y esterilizados en forma adecuada; algunas especies requieren un proceso previo de compostaje, al no presentar un sistema enzimático capaz de degradar la celulosa y la lignina (16).

La materia prima fundamental para el cultivo, proviene de los restos del cultivo de cereales (trigo, centeno, cebada) y además de los restos lignocelulósicos que sobran del proceso del aserrado de maderas como virutas, aserrines, cortezas, etc., los cuales pasan por una fase de humedecimiento y luego se someten a un tratamiento térmico de pasteurización (15).

El cultivo de los hongos que degradan sustratos lignocelulósicos comprende las siguientes actividades:

a. Pasteurización del sustrato: La finalidad es destruir insectos y microorganismos competidores, pero el realizar esto, también provoca cambios bioquímicos que afectan el hongo, ya que existen sustratos que pueden afectar positiva o negativamente su calidad.

b. Siembra: Se refiere a la mezcla, bajo condiciones asépticas del inóculo o semilla en el sustrato. Para una siembra eficiente deben tomarse en cuenta, además de la cepa y del sustrato, el estado fisiológico del organismo, la tasa de inoculación y una higiene rigurosa.

c. Incubación: Permite la colonización del sustrato por el hongo, de preferencia a temperatura y humedad óptimas, y en la oscuridad. Durante ésta etapa se debe proporcionar al hongo una temperatura constante acorde con sus requerimientos, para que la colonización se lleve a cabo con la tasa de crecimiento más alta posible.

d. Fructificación: Después de la incubación, cuando el micelio ha colonizado el sustrato de tal manera que ya no se distingue el aspecto ni la coloración del sustrato inicial, sino que al contrario, éste se ve como una masa compacta de superficie homogénea blanco-algodonosa, se deben realizar ciertos ajustes ambientales, para inducir al micelio a formar cuerpos fructíferos. Puede llevarse a cabo bajo condiciones controladas, o, cuando las condiciones lo permitan a la intemperie.

e. Cosecha: En condiciones normales dos o tres días después de haber puesto los sustratos, bajo las condiciones ambientales necesarias, para inducir la fructificación, empiezan a aparecer los primordios. De cuatro a seis días después, dichos primordios se han desarrollado normalmente, cubren la totalidad de la superficie del sustrato y están en madurez comercial, listos para ser cosechados. La cosecha se hace cortando el estípote con un cuchillo, justo a la base del tallo, en la unión con el sustrato, aunque en algunos lugares se prefiere tomar delicadamente los hongos con la mano, de tal manera de no dañarlos y sin producir hoyos en el sustrato (16).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el cultivo de hongos se visualiza como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial y se ha propuesto como una nueva alternativa de producción de alimentos de alta calidad para consumo humano, a través del reciclaje de desechos agrícolas y forestales que permite obtener de manera simultánea subproductos que se pueden destinar a la alimentación de animales o su uso como biofertilizante (1).

Guatemala es un país con alta diversidad de especies de hongos comestibles, sin embargo, la deforestación, el avance de la frontera agrícola y otros factores similares están contribuyendo al deterioro de los ecosistemas en los que éstas se desarrollan, aunado a ello, la pobreza y el aumento poblacional, hacen necesario crear alternativas que provean fuentes alimenticias y económicas que contribuyan al desarrollo de las comunidades campesinas, buscando con ello, un adecuado manejo de la diversidad fúngica nativa como estrategia de uso sostenible de los recursos naturales, en el contexto integral de los sistemas culturales (1).

P. porrigens es un hongo comestible silvestre de Guatemala y es utilizado como alimento en Jacaltenango, Huehuetenango. De ésta especie, Bran y colaboradores han aislado una cepa (145.2003), la cual no ha sido estudiada hasta el momento (1).

Por tal motivo se consideró oportuno evaluar el crecimiento de la cepa sobre varios medios de cultivo sólidos y describir sus características miceliarias, así como producir inóculo, para luego estudiar la producción de cuerpos fructíferos sobre diferentes sustratos, determinando las condiciones más adecuadas para su cultivo (1).

La tecnología generada, podrá utilizarse para el cultivo artesanal de esta especie en comunidades campesinas del país, como una alternativa alimenticia y de comercialización (1).

V. OBJETIVOS

A. General

1. Establecer las condiciones de cultivo de *P. porrigens* en medios de cultivo sólidos, producción de inóculo y cuerpos fructíferos, *in vitro*.

B. Específicos

1. Evaluar la tasa radial de crecimiento, para determinar el medio de cultivo (PDA, PDA-Infusión de madera, EMA y SAB) y la temperatura (24 y 26°C), donde la cepa presente un mejor crecimiento.
2. Describir las características miceliales de cultivo *in vitro*, macro y microscópicamente, en cuatro medios de cultivo (PDA, PDA-Infusión de madera, EMA y SAB), para documentar las características morfológicas de la colonia y los tipos de hifas que presente la cepa.
3. Evaluar la producción de inóculo de la cepa utilizando cuatro sustratos como vehículos (sorgo, cebada, trigo y aserrín de pino) a dos diferentes temperaturas (24 y 26°C), para determinar el sustrato y la temperatura donde la cepa presente un mejor crecimiento.
4. Producir cuerpos fructíferos de la cepa de *P. porrigens*, sobre cuatro sustratos (olote de maíz, pulpa de café, hojarasca de encino y rastrojo de maíz), para determinar la Eficiencia Biológica de cada uno de ellos.

VI. HIPÓTESIS

1. La cepa de *P. porrigens* 145.2003 presenta un mayor crecimiento miceliar en el medio PDA-Infusión de madera a 24°C.
2. El mejor vehículo para la producción de inóculo primario es el aserrín de pino, en ambas temperaturas.
3. La cepa de *P. porrigens* 145.2003 presenta mayor porcentaje de eficiencia biológica en pulpa de café.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO

Cepario de Hongos Saprobios y Micorrízicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

1. MUESTRA

Cepa de *P. porrigens*, recolectada en Jacaltenango Huehuetenango, en el año 2003 y almacenada en el Cepario de Hongos Saprófitos y Micorrízicos, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

2. UNIDAD MUESTRAL

⇒ Cepa de *P. porrigens* 145.2003.

3. RECURSOS HUMANOS:

- ⇒ Tesista: Profa. Brenda Rosario Cojtí Barrientos
- ⇒ Asesor: Lic. Osberth Morales Esquivel

4. RECURSOS INSTITUCIONALES:

- ⇒ Cepario de hongos Saprobios y Micorrízicos, Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

- ⇒ Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- ⇒ Micoteca de Macrohongos de Guatemala "Lic. Rubén Mayorga Peralta". Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- ⇒ Laboratorios de Microbiología, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- ⇒ Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR-, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

5. MATERIALES

a. Medios de cultivo

- ⇒ Agar Sabouraud (SAB)
- ⇒ Agar Papa Dextrosa (PDA)
- ⇒ Agar Papa Dextrosa-Infusión de madera (PDA-IM)
- ⇒ Agar Extracto de Malta (EMA)

b. Reactivos

- ⇒ Etanol al 70%
- ⇒ Azul de lactofenol al 3%

c. Otros

- ⇒ Agua desmineralizada estéril

d. Sustratos

- ⇒ Granos de cebada
- ⇒ Granos de Trigo
- ⇒ Granos de sorgo

- ⇒ Aserrín de pino
- ⇒ Olote de maíz
- ⇒ Pulpa de café
- ⇒ Rastrojo de maíz
- ⇒ Hojarasca de encino

e. Equipo

- ⇒ Balanza semianalítica
- ⇒ Balanza analítica
- ⇒ Cabina de Bioseguridad
- ⇒ Incinerador
- ⇒ Autoclave
- ⇒ Incubadoras a 24 y 26°C
- ⇒ Horno
- ⇒ Estufa
- ⇒ Asas de nicromo
- ⇒ Oradores de 5 mm de diámetro
- ⇒ Estereóscopo
- ⇒ Regla
- ⇒ Bisturí No. 20 o 22 con mango No. 4.

f. Cristalería

- ⇒ Probetas graduadas de 150, 250 y 1000 ml
- ⇒ Erlenmeyer pirex de 500 y 1000 ml
- ⇒ Cajas de Petri de 20 cc
- ⇒ Pipetas serológicas de 0.1 a 10 ml
- ⇒ Tubos de ensayo
- ⇒ Pipetas Pasteur
- ⇒ Portaobjetos y cubreobjetos

g. Otros

- ⇒ Papel filtro
- ⇒ Papel parafilm

B. PROCEDIMIENTO**1. Reactivación de la cepa:**

- ⇒ Se reactivó la cepa de *P. porrigens* 145.2003, preservada a 5°C en el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrízicos, posteriormente se sembró en agar PDA e incubó a 26°C, por 22 días.

2. Preparación de medios de cultivo:

- ⇒ Las manos se lavaron con abundante agua, jabón antibacterial y un cepillo y se desinfectaron con etanol al 70%.
- ⇒ Los medios de cultivo PDA, PDA-IM, EMA y SAB se prepararon y esterilizaron a 121°C y 15 psi por 15 minutos
- ⇒ El medio PDA-Infusión de madera (PDA-IM) se elaboró con 39 gramos de Agar papa dextrosa y 1,000 ml de infusión de *Quercus* spp. La infusión se preparó hirviendo 45 gramos de fragmentos de madera de encino en 1,500 ml agua destilada, según lo recomendado por Gaitán-Hernández (18).

3. Medición de la tasa de crecimiento radial en medio sólido:

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier (2002) (19):

- ⇒ A partir de un cultivo joven, sembrar 10 cajas de cada uno de los medios sólidos (PDA, PDA-IM, EMA y SAB), con una porción de micelio discoidal

de 0.5 cm de diámetro, que se inocularán en el centro de las cajas de Petri, colocando el micelio en contacto con el medio de cultivo.

- ⇒ Incubar 5 cajas de cada medio a 24°C y 5 cajas a 26°C los días necesarios hasta que el micelio llene la primera caja de cualquiera de los cuatro medios.
- ⇒ Identificar las cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de caja.
- ⇒ Sellar las cajas inoculadas con papel parafilm para evitar su deshidratación.
- ⇒ Identificar la temperatura, óptima como aquella bajo la cual se haya alcanzado la mayor velocidad de crecimiento, de igual modo el medio que presente el mayor crecimiento de la cepa.
- ⇒ Registrar la velocidad de crecimiento radial, midiendo el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 48 horas, durante el tiempo de incubación, expresándolo en mm/día (Anexo 2).
- ⇒ Expresar gráficamente el crecimiento radial del hongo, a través de la medición de dos diámetros que se transpongan perpendicularmente, calculando el diámetro medio y estimar la velocidad de crecimiento radial de la colonia con respecto al tiempo.

4. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas:

- ⇒ A las colonias que crecieron en los diferentes medios de cultivo e incubadas a diferentes temperaturas se les observó las características de macro y micro morfología preparando tinciones en fresco con azul de lactofenol.

- ⇒ Para llevar a cabo la caracterización macroscópica, se utilizó un estereoscopio para observar el color, apariencia, consistencia, pigmento en el medio, forma y crecimiento del micelio.
- ⇒ Para la descripción microscópica del micelio, se realizaron preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales (6).

5. Producción de inóculo:

- ⇒ Los sustratos (granos de cebada, trigo, sorgo y aserrín de pino) se remojaron por 24 horas.
- ⇒ Los sustratos se deshidrataron, extendiéndolos sobre papel en una superficie plana y dejándolos secar por dos horas.
- ⇒ Los sustratos secos, se colocaron en bolsas de polipapel de una libra, pesando 50 gramos de cada uno y esterilizándolas a 121°C y 15 psi por 45 minutos. Se realizaron cinco repeticiones por cada sustrato.
- ⇒ Se lavaron las manos con abundante agua, jabón antibacterial y un cepillo y desinfectaron con isopropanol al 70% previo a la inoculación.
- ⇒ Se cortaron cuadros de 1.0 cm² del micelio contenido en las cajas de Petri (teniendo el cuidado de no lastimarlo).
- ⇒ A cada bolsa de polipapel se le agregaron 5 segmentos del micelio, teniendo el cuidado de no apelmazar el sustrato y ubicar los segmentos donde permanezcan en contacto con el aire.
- ⇒ Se cerraron las bolsas, dejándolas con poca ventilación y se identificaron con nombre de la cepa, fecha de inoculación, sustrato, temperatura de incubación y número de bolsa.
- ⇒ Los sustratos se incubaron a temperaturas de 24 y 26°C.
- ⇒ El crecimiento del micelio se observó sobre el sustrato cada 5 días, hasta que el micelio cubriera totalmente el sustrato, y se anotó el número de días requeridos para dicho proceso.

- ⇒ Se anotó el sustrato y la temperatura donde la cepa presentó el mejor crecimiento (11,16).

6. Producción de cuerpos fructíferos sobre diferentes sustratos:

- ⇒ Los sustratos (olote de maíz, hojarasca de encino y rastrojo de maíz) se picaron en fragmentos de 2 a 3 cm, excepto la pulpa de café.
- ⇒ Los sustratos se hidrataron por aproximadamente 18 a 24 horas en agua corriente.
- ⇒ Los sustratos se escurrieron por aproximadamente una hora.
- ⇒ Se pesaron 1,000 gramos de cada uno de los sustratos y se colocaron en bolsas de polipapel.
- ⇒ Los sustratos se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 45 minutos.
- ⇒ Se sembraron los sustratos con el inóculo al 5%, y se realizaron cinco repeticiones por sustrato.
- ⇒ Los sustratos se incubaron a temperatura ambiente, hasta que el micelio cubriera totalmente el sustrato, y se anotó la cantidad de días requeridos para dicho proceso (11,16).

7. Determinación del porcentaje de humedad de los sustratos:

- ⇒ Se tararon 20 recipientes de metal, con sus respectivas tapaderas (5 por cada uno de los sustratos a utilizar).
- ⇒ Se pesaron 10 gramos de cada uno de los sustratos, en los recipientes previamente tarados, junto con sus tapaderas.
- ⇒ Los recipientes abiertos junto con sus tapaderas, se colocaron en un horno precalentado a 105°C por 24 horas.
- ⇒ Transcurridas las 24 horas, los recipientes se cerraron dentro del horno y se sacaron.
- ⇒ Los recipientes se dejaron enfriar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se pesaron.
- ⇒ Se calculó el porcentaje de humedad (16).

8. Fructificación en condiciones artesanales

- ⇒ Cada uno de los sustratos, se colocaron bajo condiciones de luz y humedad, regándolos tres veces por día, con aproximadamente 500 ml de agua potable (16).

C. DISEÑO EXPERIMENTAL

Objetivo 1.

Diseño factorial: 4 x 2 (4 medios, 2 temperaturas).

Réplicas: 5.

Objetivo 2:

Descriptivo.

Objetivo 3:

Diseño factorial: 4 x 2 (4 vehículos, 2 temperaturas).

Réplicas: 5.

Objetivo 4:

Diseño totalmente al azar, con cuatro tratamientos. Análisis de varianza de una vía.

Réplicas: 5.

1. Tipo de estudio:

- ⇒ Prospectivo, transversal, descriptivo.

2. Tipo de muestreo:

Se utilizó una cepa para determinar la velocidad de crecimiento, la producción de inóculo y la producción de cuerpos fructíferos.

3. Análisis estadístico de los resultados:

- ⇒ Variable dependiente:
 - Crecimiento miceliar.

- ⇒ Variables independientes:
 - Temperaturas: 24 y 26°C.
 - Medios de cultivo: agar Papa Dextrosa –PDA-, agar Papa Dextrosa con infusión de madera –PDA-IM-, agar Extracto de Malta –EMA- y agar Sabouraud –SAB-.
 - Vehículos: granos de cebada, trigo, sorgo y aserrín de pino.
 - Sustratos: olote de maíz, pulpa de café, hojarasca de encino y rastrojo de maíz.

4. Análisis de datos:

- ⇒ Para la parte experimental, se aplicó un diseño factorial de 4 X 2 con un análisis de varianza.
- ⇒ Para la parte descriptiva se elaboraron tablas y gráficas para presentar las características.

VIII. RESULTADOS

A. Crecimiento miceliar

La cepa de *P. porrigens* 145.2003 presentó características coloniales similares en todos los medios y temperaturas evaluadas. Las colonias fueron de color blanco, superficie algodonosa y reverso de color amarillento, sin observarse exudado durante los días de incubación.

Microscópicamente presentó hifas hialinas de paredes delgadas a gruesas, pocas ramificaciones, con fíbulas (Tabla 1, Figs. 1, 2 y 3).

Tabla 1. Características macro y microscópicas de *P. porrigens* en diferentes temperaturas y medios de cultivo.

Temp. °C	Medio	Características Macroscópicas			Características Microscópicas		
		Color	Textura	Exudado	Hifas	Fíbulas	Diámetro
24	SAB	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes delgadas	++	1.0-2.0 µm
	EMA	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes gruesas	+++	2.0-3.0 µm
	PDA	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes delgadas	++	1.0-2.0 µm
	PDA-IM	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes gruesas	++	2.0-3.0 µm
26	SAB	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes delgadas	++	1.0-3.0 µm
	EMA	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes delgadas	++	1.0-4.0 µm
	PDA	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes gruesas	++	2.0-3.0 µm
	PDA-IM	Blanco	Algodonosa	Ausente	Hialinas de paredes delgadas	++	1.0-3.0 µm

++ Regular cantidad

+++ Abundante

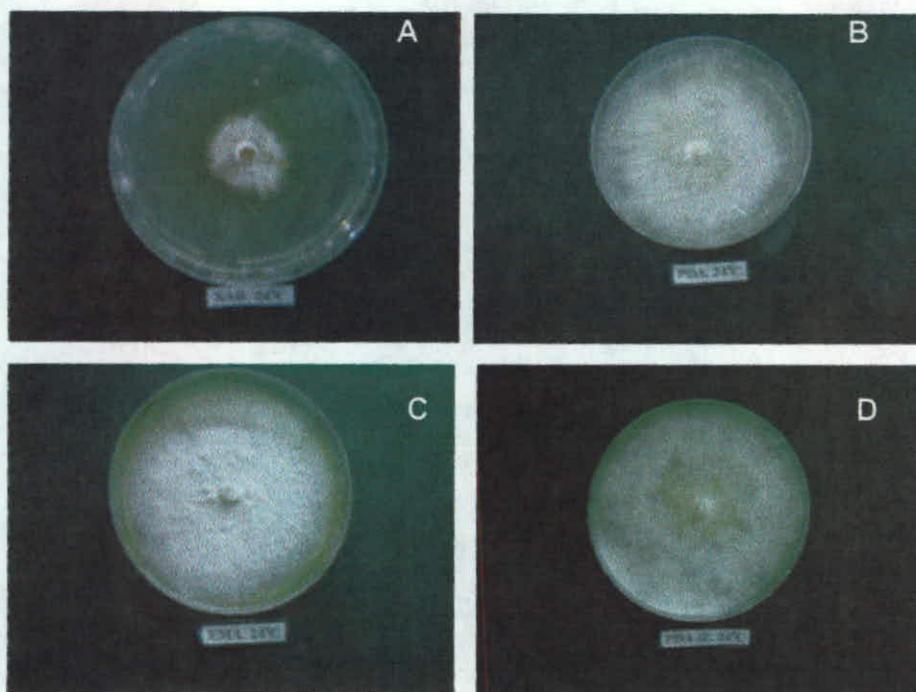


Figura 1. Características macroscópicas y crecimiento micelial de la cepa de *P. porrigens* 145.2003, a 24°C después de 17 días de incubación. A. Crecimiento en agar SAB. B. Crecimiento en agar PDA. C. Crecimiento en agar EMA. D. Crecimiento en agar PDA-IM.

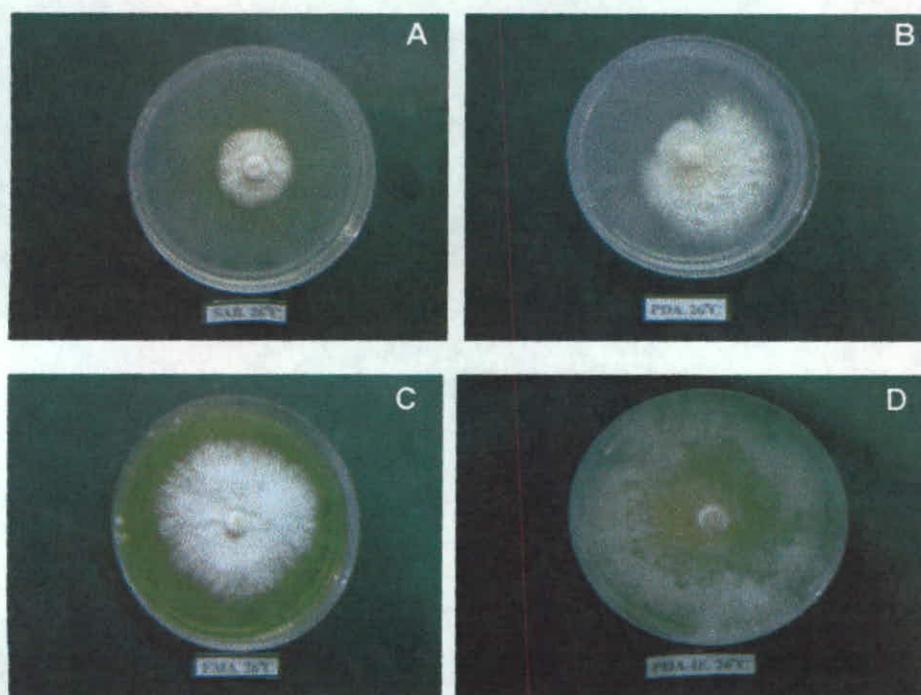


Figura 2. Características macroscópicas y crecimiento micelial de la cepa de *P. porrigens* 145.2003, a 26°C después de 17 días de incubación. A. Crecimiento en agar SAB. B. Crecimiento en agar PDA. C. Crecimiento en agar EMA. D. Crecimiento en agar PDA-IM.

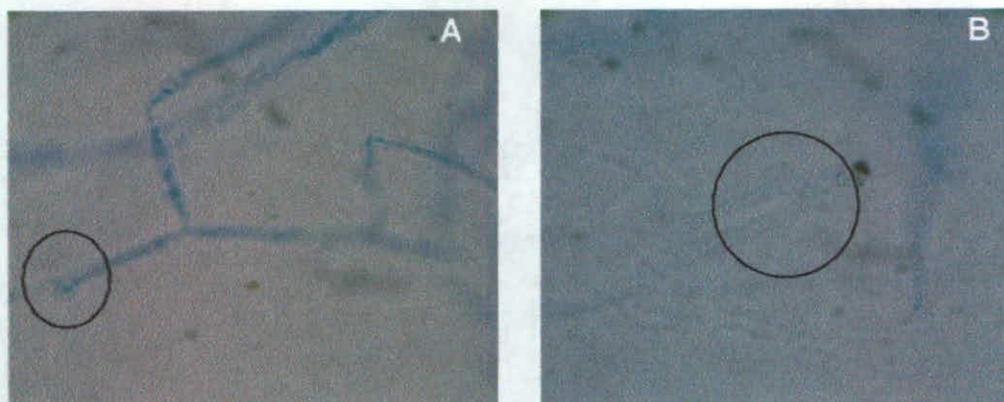


Figura 3. Características microscópicas de *P. porrigens* cepa 145.2003. A. Fibulas en agar EMA a 24°C (señalada con círculo). B. Fibulas en agar PDA-IE a 26°C (señalada con círculo).

El mejor crecimiento miceliar a los 17 días de incubación y a 24°C se observó en el medio PDA-IM, donde la cepa alcanzó un diámetro medio de 50.9 mm y una tasa radial de crecimiento de 2.9 mm/día. El menor crecimiento se observó en el medio SAB, con 17.7 mm de diámetro medio y una tasa radial de crecimiento de 1.0 mm/día (Fig. 1). Estadísticamente, el medio SAB presentó diferencia significativa con los medios PDA ($p=0.000$), EMA ($p=0.000$) y PDA-IM ($p=0.000$). Los medios PDA, EMA y PDA-IM, no presentaron diferencia significativa entre sí (Tabla 2, Gráfica 1).

A 26°C y 17 días de incubación, el mejor crecimiento miceliar se obtuvo en el medio PDA-IM, con un diámetro medio de 47.0 mm y una tasa radial de crecimiento de 2.7 mm/día. El menor crecimiento se observó en el medio SAB con 17.3 mm y una tasa radial de crecimiento de 1.0 mm/día (Fig. 2). El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre el crecimiento en el medio PDA-IM con el medio SAB ($p=0.000$), con el medio EMA ($p=0.017$) y el medio PDA ($p=0.000$). El medio de cultivo SAB presentó diferencia significativa con los medios PDA ($p=0.000$), EMA ($p=0.000$) y PDA-IM ($p=0.000$). No existió diferencia significativa entre el crecimiento evaluado en los medios PDA y EMA (Tabla 2, Gráfica 1).

Tabla 2. Crecimiento micelial de *P. porrigens* durante 17 días de incubación en diferentes medios de cultivo a dos temperaturas.

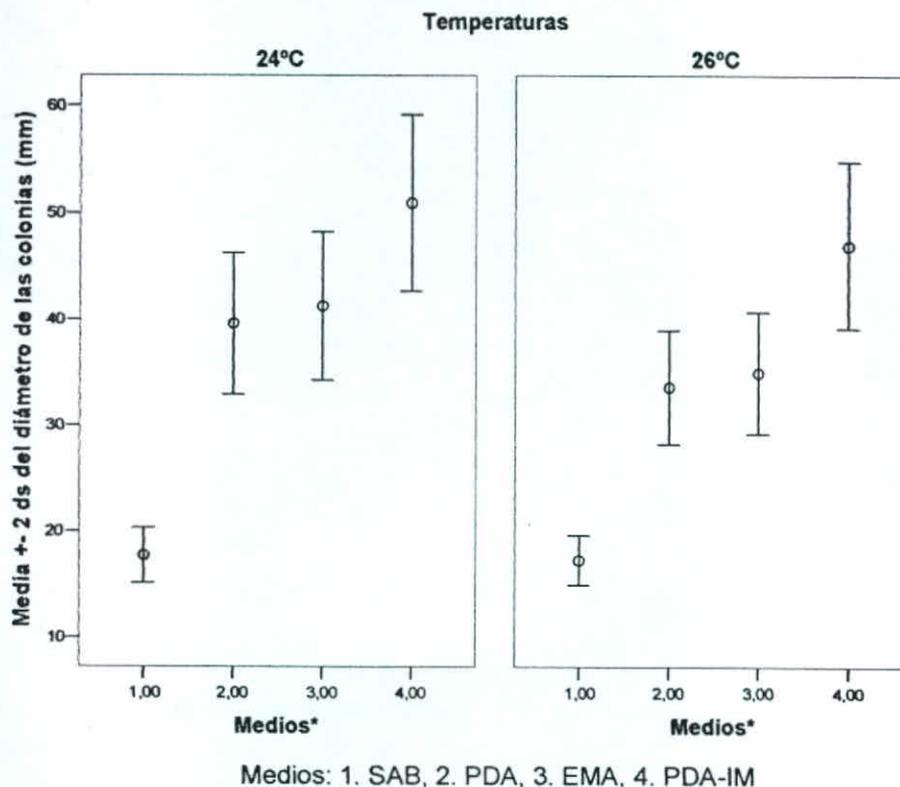
Temp. °C	Medio	Diámetro medio (mm) ¹	Diámetro final (mm) ²	TCR (mm/día) ³	S ⁴
24	SAB	17.7	30	1.0	a
	PDA	39.6	67.7	2.3	b
	EMA	41.3	71.8	2.4	b
	PDA-IM	50.9	83.0	2.9	b
26	SAB	17.3	28.5	1.0	a
	PDA	33.6	54.5	1.9	b
	EMA	34.9	60.2	2.0	b
	PDA-IM	47.0	79.0	2.7	c

1,2: Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.

3: TCR= tasa de crecimiento radial calculado a partir del diámetro medio dividido entre el número de días de incubación.

4: Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa con la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Gráfica 1. Diámetro de la colonia de *P. porrigens* durante 17 días de incubación en diferentes medios y a diferentes temperaturas.

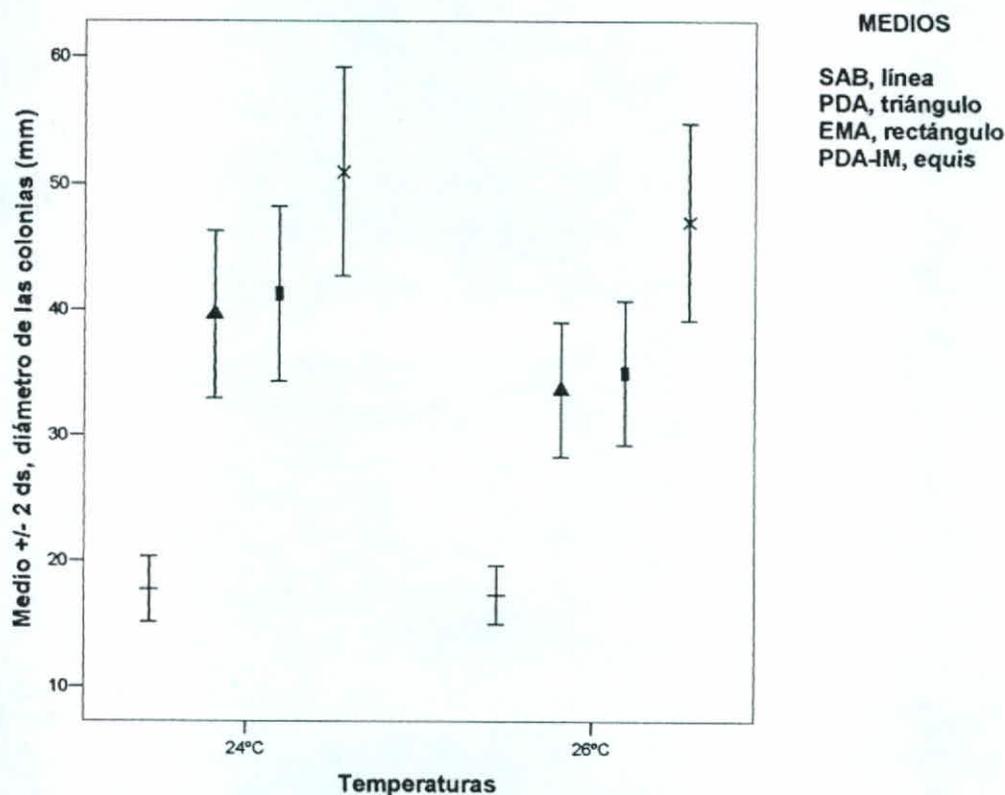


Al comparar la interacción de la temperatura en el crecimiento micelial obtenido en los diferentes medios de cultivo, se observó que existió diferencia significativa entre el crecimiento observado en el medio SAB a 24°C y 26°C, comparado con el crecimiento de los medios PDA, EMA y PDA-IM tanto a 24 como a 26°C. No existió diferencia significativa entre el SAB a 24°C y el SAB a 26°C (Gráfica 2).

No existió diferencia significativa en el crecimiento observado entre el medio PDA a 24 y 26°C y los medios EMA a 24 y 26°C, sin embargo se observó diferencia significativa entre el medio PDA a 26°C y el PDA-IM a 26°C (Gráfica 2).

El medio PDA-IM a 24°C presentó diferencia significativa comparada con PDA y EMA a 26°C, pero no presentó diferencia significativa con el crecimiento observado en el medio PDA-IM a 26°C (Gráfica 2).

Gráfica 2. Interacción entre la temperatura y los medios de cultivo, en el crecimiento micelial de la cepa de *P. porrigens* durante 17 días de incubación.



B. Producción de inóculo

El crecimiento de *P. porrigens* fue evaluado durante 60 días de incubación. Tanto a 24°C como a 26°C, se observó una colonización parcial (crecimiento del micelio en la superficie y no en el interior) de la cepa en tres de los sustratos evaluados (sorgo, cebada y trigo), mientras que en el aserrín de pino no se observó crecimiento del micelio (Figura 4, Tabla 3).

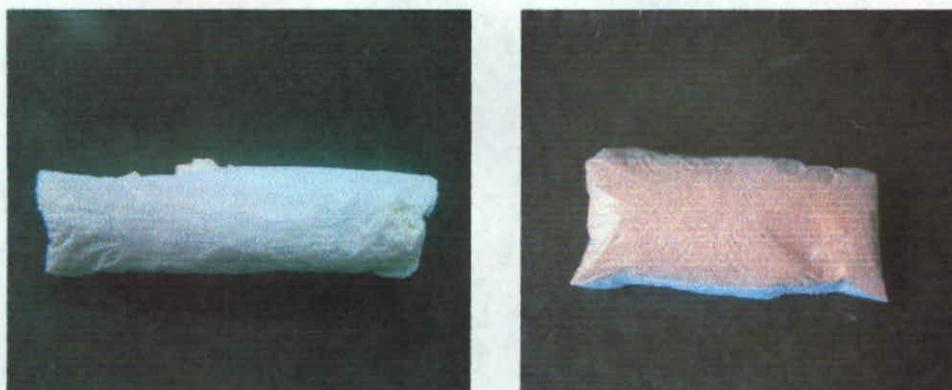


Figura 4. A. Producción de inóculo en sorgo a 24°C. (Obsérvese crecimiento incompleto). B. Producción de inóculo en aserrín de pino a 26°C (obsérvese ausencia de crecimiento).

Tabla 3. Producción de inóculo de *P. porrigens* sobre diferentes sustratos.

Temperatura	24°C		26°C	
	Días *	Colonización**	Días *	Colonización**
Sustrato				
Sorgo	60	Incompleta	60	Incompleta
Cebada	60	Incompleta	60	Incompleta
Trigo	60	Incompleta	60	Incompleta
Aserrín de pino	60	Ausente	60	Ausente

*Días evaluados

**Observaciones tomadas a partir de 5 repeticiones por cada sustrato

C. Producción de cuerpos fructíferos

Al evaluar la fructificación de la cepa de *P. porrigens*, no se observó la colonización completa (crecimiento del micelio solamente en la parte exterior) de los sustratos al incubarlos durante 45 días a temperatura ambiente y posteriormente no se logró la obtención de cuerpos fructíferos, en ninguno de los sustratos empleados (Figura 5, Tabla 4).

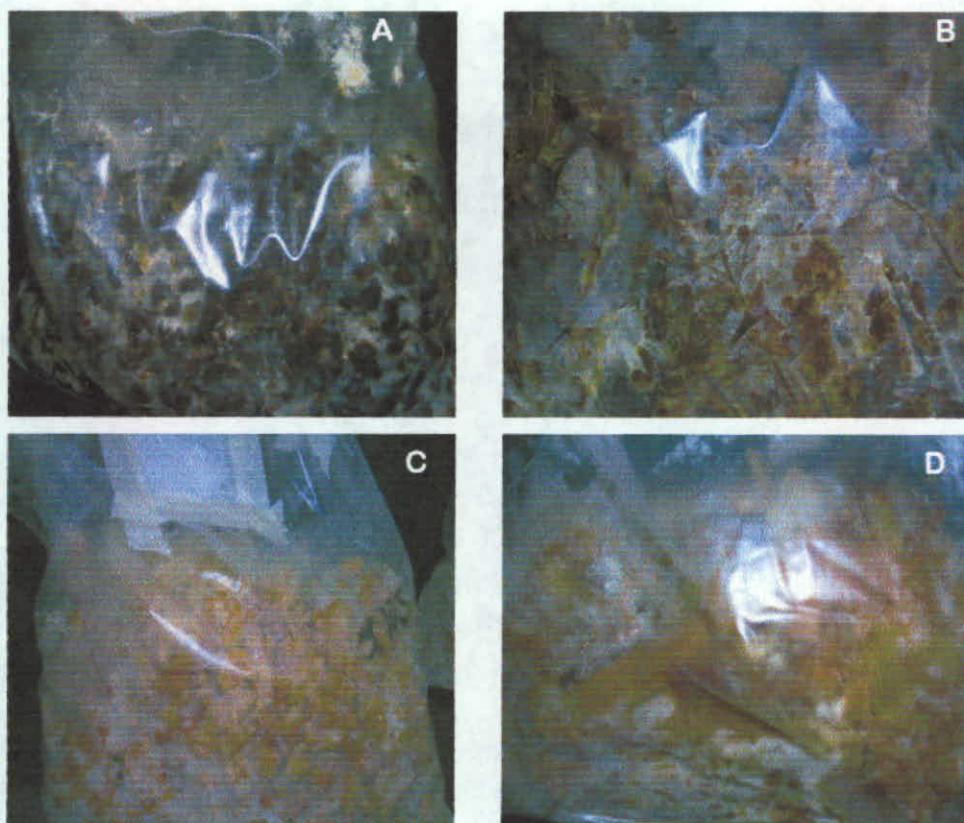


Figura 5. Crecimiento miceliar sobre: A. Pulpa de café B. Hojarasca de encino. C. Olote de maíz. D. Rastrojo de maíz (obsérvese crecimiento incompleto en todos los sustratos).

IX. DISCUSIÓN

La cepa de *P. porrigens* 145.2003 presentó colonias de color blanco en todos los medios y temperaturas evaluadas, por lo que se considera que la coloración es una característica poco variable para esta cepa bajo las condiciones evaluadas. Además, la ausencia de exudado representa una cualidad beneficiosa, ya que la aparición de éste indica condiciones no adecuadas del medio de cultivo, para el crecimiento miceliar (20).

A nivel microscópico se observó la presencia de fíbulas en los cuatro medios de cultivo, lo cual se considera favorable porque garantiza el estado dicariótico de la cepa cuando ésta se utiliza para fines de productividad (20).

Respecto al crecimiento miceliar, se considera que el mejor medio para la cepa de *P. porrigens* 145.2003, es el PDA-IM a 24°C, debido a que en este medio presentó el mayor diámetro medio y la mayor tasa de crecimiento radial, comparado con los otros medios evaluados. Por tal razón, se recomiendan estas condiciones para realizar posteriores cultivos de esta cepa.

También se recomienda el medio PDA-IM para el cultivo de la cepa a 26°C. Sin embargo, a esta temperatura de incubación es necesario tomar en cuenta que, si bien, en este medio se observó también un diámetro medio alto, no existe diferencia significativa entre el crecimiento miceliar observado en los medios EMA y PDA.

Se considera que el medio PDA-IM incubado a 24 y 26°C es adecuado para el cultivo de esta cepa, debido a que no existió diferencia significativa entre los crecimientos miceliares en ambas temperaturas.

El medio SAB no es apropiado para el cultivo de la cepa de *P. porrigens* en los medios de cultivo y temperaturas evaluadas en este estudio, debido a que

en este medio se observó el menor crecimiento miceliar y también presentó diferencia significativa con respecto a los otros medios y temperaturas.

Dado a que la cepa de *P. porrigens* 145.2003 mostró un mayor crecimiento miceliar en el medio de cultivo PDA-IM a 24°C, se acepta la hipótesis referente al crecimiento miceliar.

En la producción de inóculo, los sustratos evaluados: Sorgo, cebada y trigo presentaron una colonización parcial de la cepa en un tiempo de 60 días de incubación, observándose crecimiento miceliar únicamente en la superficie y no así en el interior de dichos sustratos. Se considera que este tiempo es muy prolongado, ya que los sustratos para la producción de inóculo deben ser colonizados entre 14 a 28 días después de la inoculación, para garantizar la viabilidad del micelio. Además, otro factor que pudo haber influido es, que dichos sustratos son ricos en almidón y la cepa de *P. porrigens* dada su naturaleza saprobia, podría no contar con las enzimas apropiadas para degradar este polisacárido. Por otra parte al emplear aserrín como sustrato, no fue posible producir inóculo, debido probablemente a la gran cantidad de taninos presentes en esta madera (9, 21).

Debido a que no se produjo el inóculo en forma adecuada en ninguno de los sustratos evaluados, no se recomienda su producción en ninguno de ellos, por lo tanto, no se acepta la hipótesis planteada, la cual indica, que el aserrín de pino es el mejor vehículo en ambas temperaturas evaluadas.

Respecto a la producción de cuerpos fructíferos, los sustratos inoculados se incubaron durante cuarenta y cinco días. Transcurrido este lapso, se observó un crecimiento lento e incompleto del micelio en los cuatro sustratos evaluados. Al final de la etapa de fructificación (15 días), no se produjeron cuerpos fructíferos.

Lo que probablemente se debe a que la mayoría de los sustratos, con excepción de la hojarasca de encino, son ricos en celulosa y posiblemente la cepa utilizada sea más eficiente en degradar lignina que celulosa y por tal motivo, la cepa estudiada no se considera promisoría para su cultivo artesanal (21, 22).

Debido a que no se produjeron cuerpos fructíferos, no fue posible determinar el porcentaje de eficiencia biológica en ninguno de los sustratos, y tampoco se pudo evaluar la hipótesis planteada con respecto a esta característica; por lo que se recomienda realizar un proceso previo de compostaje que permita previamente degradar la celulosa y la lignina presente en los sustratos y posteriormente inocular la cepa de *P. porrigens* (16). Por otra parte, se deben evaluar otros desechos como el aserrín de encino y/o ciprés, ya que dicho hongo habita en forma natural principalmente en madera de coníferas o sobre maderas duras (12).

X. CONCLUSIONES

1. Las colonias de *P. porrigens* fueron de color blanco, superficie algodonosa y reverso de color amarillento, sin observarse exudado durante los días de incubación en todos los medios y temperaturas.
2. La cepa de *P. porrigens* 145.2003 presentó fíbulas a nivel microscópico en todos los medios y temperaturas, lo cual garantiza su estado dicariótico cuando ésta se utiliza para fines de productividad.
3. Las condiciones adecuadas para obtener el mejor crecimiento miceliar *in vitro* de *P. porrigens* son: PDA-IM a 24 y 26°C, no existiendo diferencia significativa bajo estas condiciones.
4. El menor crecimiento miceliar de *P. porrigens* se presentó en el medio SAB a 24 y 26°C, observándose diferencia significativa entre el crecimiento miceliar con los otros medios y temperaturas evaluadas.
5. No se observó diferencia significativa en el crecimiento miceliar, entre los medios PDA, EMA y PDA-IM a 24°C.
6. Se observó diferencia significativa en el crecimiento miceliar, entre el medio PDA-IM a 26°C y los medios EMA y PDA a 26°C.
7. Tanto a 24°C como a 26°C se observó una colonización parcial de la cepa en sorgo, cebada y trigo, mientras que en el aserrín de pino no se observó crecimiento del micelio.
8. No se logró la obtención de cuerpos fructíferos sobre hojarasca de encino, olote de maíz, pulpa de café y rastrojo de maíz, debido a una colonización incompleta, por lo tanto la cepa de *P. porrigens* usada en este estudio no es rentable, debido a su lento crecimiento miceliar sobre estos sustratos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar el medio PDA-IM a 24 y 26°C cuando se realicen nuevos estudios sobre esta cepa, debido a su rápida velocidad de crecimiento.
2. Evaluar la producción de inóculo de *P. porrigens* 145.2003, bajo nuevas condiciones y sobre nuevos sustratos que permitan un mejor desarrollo miceliar de dicha cepa.
3. Evaluar la producción de cuerpos fructíferos sobre sustratos diferentes, que permitan el desarrollo de *P. porrigens* y su descripción macroscópica en forma completa.
4. Se recomienda realizar un proceso previo de compostaje, para degradar la celulosa y la lignina presente en los sustratos, y posteriormente inocular la cepa de *P. porrigens* para lograr la producción de cuerpos fructíferos.

XII. REFERENCIAS

1. Bran M. C., *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula, (Fase III). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. 2003; 1-3, 15, 16, 21.
2. Morales O., Flores R., Samayoa B., Bran M. C. Estudio Etnomicológico de la Cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. R.C.F.CCQQ. USAC. Guatemala. 2002; 10-20.
3. Medina Lama, Ruben. Producción mundial de Hongos Comestibles. *Mycoscience* 2004; 11(4): 1-4.
4. Berch Sh & Cocksedge W. Commercially Important wild Mushrooms and Fungi of British Columbia. Technical Report 006. Ministry of Forests Science. Program 2002; 789.
5. Alexopoulos C. *et al.* Introductory Micology. 4^a. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América. 1996; 26-30.
6. Guzmán G. Los Hongos de El Edén Quintana Roo, Introducción a la micobiota tropical de México. INECOL y CONABIO, Xalapa, Veracruz, México. 2003; 7-10, 22-25
7. Guarro J., Gené J., Stchigel A. Developments in fungal Taxonomy. *Clin Microbiol. Rev.* 1999; 12(3); 454.
8. Mueller G. *et al.* Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. USA. 2004; 777.

9. Chang S., & Milles P. Mushrooms Cultivation, Nutritional, Value, Medicinal, Effect and Environmental Impact. 2^a Ed. CRC Press. USA. 2004; 318-319.
10. Bran M., Morales O., Cáceres R., Flores R. Contribución al Conocimiento de Los Hongos Comestibles de Guatemala. Edición Especial, R.C.F.CCQQ. USAC 2003; Vol 1. No. 1: 1-24.
11. Deschanps, Jorge R. Producción y Comercialización de Hongos comestibles. Primera Ed. Buenos Aires, Argentina. Orientación gráfica, Editorial S.R.L. Marzo. 2003; 93, 98-103.
12. By Dorothy E. Brown, Spokane Mushroom Club. Llave del ensayo de campo a la especie de *Pleurotus* en el Noroeste Pacífico. *Pleurocybella Porrigens*.
www.svims.ca/council/Pleuro.htm.
13. Béssette Alan E., Béssette Arlen R., Fisher David w. Mushrooms of Northeastern North America. First Edition S.U Syracuse University Press. Printed In Hong Kong. 1997; 231.
14. Herrera T, Ulloa M. El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada. 2da Ed. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México. 1999; 89.
15. Index fungorum. Classification Taxonomica *P. porrigens*. CABI Bioscience Databases Information. Noviembre. 22: 2004; 81-82.
<http://www.indexfungorum/names/fundic.asp>.
16. Sánchez J. E., Royse D. La Biología y el Cultivo de *Pleurotus spp.* 1^a Ed. México 2002; 189-203.

17. Salmones D., Gaitán-Hernández R., Pérez R. y Guzmán G. Estudios sobre el Género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. Rev. Iberoam Micol. 1997; 14:176.
18. Gaitán-Hernández R. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens*, por entrecruzamiento, su caracterización *in Vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. Rev. Iberoam Micol. 2000; 17:21.
19. Mier T., Toriello C., Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México 2002; 34.
20. Labarére, J., Bois, F. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: Sánchez, J., Royse, D. (Eds). Editorial LIMUSA, México. 2001; 83.
21. Quimio T. Preparación de la semilla. En: Sánchez, J., Royse, D. (Eds). La biología y el cultivo *Pleurotus* spp. UTEA. México. 2002; 145-146, 152-166.
22. De León R. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. Micol Apl Int 2003; 15 (1): 31.

XIII. ANEXOS

Anexo 1.



Figura. 1. Cuerpos fructíferos de *P. porrigens* (11).

Anexo 2.

Hoja de recolección de datos para determinar la tasa de crecimiento radial de
P. porrigens.

Cepa: _____ Fecha de inóculo: _____

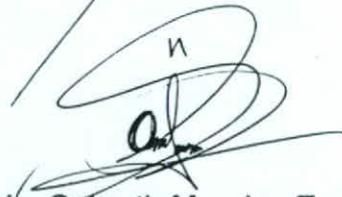
Total días de crecimiento: _____ Fecha punto de cohorte: _____

Caja	T°C	MEDIO	L	M	V	L	M	V	Crecimiento promedio (mm)
1	24								
2	24								
3	24								
4	24								
5	24								
Caja	T°C	MEDIO	L	M	V	L	M	V	Crecimiento promedio (mm)
1	26								
2	26								
3	26								
4	26								
5	26								

L=lunes, M=miércoles, V=viernes.



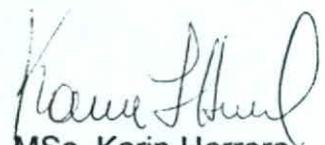
Brenda Rosario Cojti Barrientos
Autora



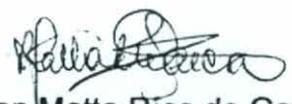
Lic. Osberth Morales Esquivel
Asesor



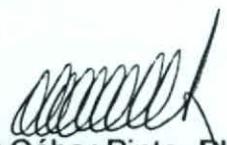
Licda. Maria Luisa de Lopez
Revisora



MSc. Karin Herrera
Revisora



MSc. Vivian Matta Rios de Garcia
Directora de Escuela



Oscar Cobar Pinto, Ph. D.
Decano