

## I. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad describir por primera vez, a nivel microscópico, especímenes de Guatemala e identificados como *Boletus pinophilus* Pilát & Dermek. Esto se hizo a partir de muestras recolectadas en Quetzaltenango, Chichicastenango, Momostenango y Sierra de Las Minas (El Progreso), todas depositadas en la Micoteca Rubén Mayorga Peralta, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

El proceso consistió en hacer cortes de la cutícula del píleo, en el himenio, en el ápice, parte media y base del estípite de cada muestra (basidioma). Cada porción de muestra se rehidrató con agua desmineralizada y KOH al 5%, se tiñó con colorante Rojo Congo y se midió la longitud y ancho de esporas, basidios, esterigmas, basidiolos y cistidios (20 mediciones de cada estructura). También se observó la morfología, disposición y dimensión de las hifas en los diferentes puntos mencionados, tomando fotografías digitales de lo observado.

Se hizo también una comparación de los caracteres macroscópicos y microscópicos de las muestras respecto a lo reportado en la bibliografía europea, puesto que la especie fue descrita originalmente de Europa. Todo esto con el fin de verificar si se trataba de la misma especie, de una variedad o de una especie diferente.

Macroscópicamente, *Boletus pinophilus* en Europa es más grande y robusto, con pie bulboso y grueso, mientras que los especímenes guatemaltecos poseen un pie generalmente delgado a sub-bulboso y con una coloración más rojiza. En cuanto a la microscopía, existen variaciones en la forma y dimensión de cistidios, basidios y número de esterigmas respecto a las muestras guatemaltecas. La principal diferencia se encuentra en la forma, estructura y dimensión de las hifas del píleo, dado que la especie europea presenta hifas terminales clavadas a sub-agudas, mientras que las guatemaltecas presentan células terminales ovaladas a globosas, bifurcadas, clavadas o variables, además, las europeas presentan hifas pileicas de hasta 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que las guatemaltecas de hasta 20  $\mu\text{m}$ .

Otra diferencia fundamental es el olor y el sabor según el origen. Para Europa se reporta un sabor suave a algo almendrado (el más pobre en sabor del grupo *Edulis*). En Guatemala, el Este de Norteamérica y México, las muestras poseen un fuerte olor a ajo-almendra, un poco dulce, mucho mejor que *B. edulis*. Por otro lado, el hábitat varía también: en Europa se asocia generalmente a coníferas (*Abies*, *Pinus*, *Picea*) y raramente con encinos (*Quercus* spp) y en Guatemala se ha encontrado en bosques mixtos de *Pinus-Quercus-Arbutus* y terreno arenoso-calizo de montaña.

Debido a que toda la bibliografía analizada no contiene información completa de cada una de las variables estudiadas, en esta tesis se analizaron dos muestras italianas pertenecientes a una colección micológica privada, para poder complementar la comparación y llegar a conclusiones más fundamentadas. Con este análisis se confirmó que existen diferencias entre las muestras de ambos continentes, siendo la más relevante la morfología de las hifas del píleo. Las otras diferencias se encuentran en la morfología y dimensión de basidios, cistidios y esporas.

Por último, se hizo una comparación bibliográfica sobre *Boletus rex-veris* Arora y Simonini (2008), debido a que este hongo se tomaba como *B. pinophilus* en California (Estados Unidos) y por el hecho de que en Guatemala se encuentran especies fúngicas que provienen de la zona occidental de Norteamérica. La comparación demostró que ambas especies son diferentes, tanto por sus características macroscópicas, *B. rex-veris* es más grande, con pie grueso, semi-enterrado y con carpóforos cespitosos (varios de una misma base común) y también microscópicas por la morfología de sus esporas, basidios y cistidios.

Con estas comparaciones (bibliográficas y análisis microscópico) y de un análisis intraespecífico local, se llegó a la conclusión de que el boletal determinado como *B. pinophilus* Pilát & Dermek en Guatemala, corresponde a una entidad genética y morfológica diferente a *B. pinophilus* en Europa y del Oeste de Norteamérica.

Por el momento, se propone el descubrimiento y descripción científica de la variedad *Boletus pinophilus* var. *americanus* var nov **R. Flores & G. Che**. La respuesta última a un futuro cambio de la variedad propuesta a especie nueva dependerá del próximo análisis molecular de secuencias de la región ITS del ARN(r) de varias muestras guatemaltecas que será realizado próximamente en la Universidad de Murcia, España.

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Boletus* (Basidiomycota) se encuentra presente en casi todo el planeta y está particularmente distribuido en el Hemisferio Norte con un gran número de especies. El género es de suma importancia por la formación de asociaciones micorrícicas con una gran variedad de árboles madereros y por la producción de setas comestibles valiosas (1,2).

Dentro de este género se encuentra el grupo *Edulis*, que goza de mucho aprecio internacional por el alto valor comercial de los cuerpos fructíferos, principalmente en los países europeos y norteamericanos. Las especies de este grupo, bastante similares entre sí a simple vista, poseen precios que oscilan entre €15.00-30.00 el kilo en fresco hasta €150.00 el kilo en peso seco, según la estación, calidad y presentación de los cuerpos fructíferos (1, 3).

*Boletus pinophilus* Pilát & Dermek es una de estas especies. Fue determinada y descrita taxonómicamente en Europa, por micólogos de Checoslovaquia, donde está ampliamente distribuida. Sin embargo su consumo es más apreciado en la zona mediterránea. En Norteamérica se han recolectado ejemplares en casi todo lo ancho de ese territorio, pero la mayor cantidad de información sobre la especie pertenece a estudios efectuados en Europa (1, 4).

En Guatemala, *Boletus pinophilus s. l.* se ha encontrado en áreas montañosas de Quetzaltenango, Totonicapán, El Quiché y Sierra de Las Minas; sin embargo, no se sabe con certeza si las muestras guatemaltecas corresponden exactamente con la especie descrita en Europa, ya que las muestras locales poseen ciertas diferencias en cuanto a la intensidad de la coloración, tamaño, olor y sabor, así como en el grosor de las hifas del píleo (1, 3, 5, 6).

Hasta el momento se ha considerado que *B. pinophilus s.l.* puede tener su límite de distribución en Guatemala, ya que no se ha reportado en los demás países de Centro y Sudamérica al igual que *B. edulis* (1, 3, 7). Excepción es el hecho de introducción de *B. edulis* en Chile para cultivo del mismo y de pino para producción maderera.

En Guatemala, *B. pinophilus* s. l. ha sido poco estudiado por lo escaso de su distribución, frecuencia de cuerpos fructíferos y porque no se ha encontrado ningún reporte de consumo por comunidades campesinas indígenas, tal como sucede con otras especies del género y de tantas otras especies fúngicas. Por otro lado, no se ha realizado ningún estudio sobre la estructura microscópica de sus tejidos, componente fundamental para la descripción de una especie.

El propósito de la presente investigación fue determinar si las muestras recolectadas e identificadas como *Boletus pinophilus* en Guatemala corresponden exactamente a dicha especie. Para esto se hicieron observaciones al microscopio para describir la forma, tamaño, presencia o ausencia de granulaciones y mucílago en las hifas de la cutícula del píleo y del pie, así como la forma y medida de basidios, basidiolos, cistidios y esporas. Las diferencias en estas estructuras fueron fundamentales para confirmar su presencia y/o establecer la existencia de una variedad o nueva especie para la ciencia.

### III. ANTECEDENTES

#### A. El género *Boletus* Dill. ex Fr.

El género *Boletus* comprende especies con cuerpo carnoso, píleo convexo a plano-convexo e himenio con tubos generalmente separables, amarillentos, verdosos o rojizos, que pueden cambiar de color al tacto, generalmente a café o azulado según la sección taxonómica en que se agrupe. La trama intertubular es de tipo divergente y laxa, con hifas hialinas a coloreadas en el centro. Los poros por donde se expulsan las esporas son angulares o redondeados, entre 1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esporada de color verde-oliváceo a café-oliváceo. Sus esporas son lisas, fusiformes, elipsoidales a faseoliformes. El estípite o pie, es usualmente clavado a bulboso, con superficie lisa a reticulada, con retículo de diversos colores, generalmente pálidos que se oscurecen al tacto (4, 8, 9). Los pigmentos más frecuentes en sus hifas son el ácido variegático, variegatorubina y ácido xerocómico.

Se encuentra presente en muchas partes del planeta, particularmente en el hemisferio norte (Norteamérica, Europa, Asia y norte de África). La mayor parte de sus especies se asocian simbióticamente con coníferas (pino, abeto), otras con fagáceas (encinos), ulmáceas (olmos) o pueden unirse a las raíces de árboles en bosques mixtos de coníferas y latifoliadas, como las anteriores (1, 10). En regiones del norte de África y Sudamérica, se encuentra asociado a leguminosas por dispersión evolutiva o por introducción del hombre, generalmente con pinos (1, 9, 11, 12).

El género *Boletus* debió llegar a Guatemala a partir del periodo Cretácico unido a los sistemas radiculares de las especies forestales de Norteamérica (pinos, abetos, encinos, alisos, entre otros), en su migración y colonización de nuevos territorios hacia el Sur del continente norteamericano. Estas plantas se establecieron en las partes más altas de las montañas guatemaltecas, que eran las emergidas durante dicho periodo geológico. Actualmente las zonas montañosas más altas del país son las que poseen una mayor cantidad de géneros vegetales y fúngicos de origen norteamericano o Neártico (1, 13, 14).

Su distribución hacia el resto de Centroamérica se vio aparentemente limitada por la depresión territorial de Nicaragua, que carece de la vegetación forestal propia de zonas montañosas de Guatemala y México (9, 15, 16).

Los resultados obtenidos por Lodge *et al.* (2007) en Belice y República Dominicana, confirman la relación entre los boletales del Norte y Centroamérica (14). Sus resultados, por otra parte, reafirman las conexiones biogeográficas propuestas por Halling (1996) y Halling & Mueller (2002) entre los boletales del Norte, Centro y Sudamérica, ya que, con base a las características fenotípicas de muchas especies de Agaricales y Boletales, se evidenció que éstos tienen una distribución de norte a sur, presencia de poblaciones relictuales disjuntas, así como endemismo local (14, 18).

El género *Boletus* comprende macrohongos de gran importancia económica, especialmente en los países europeos, por la gran demanda de cuerpos fructíferos comestibles del grupo *Edules*. En España, por ejemplo, el precio varía año con año; de €18.00-20.00 el kilo en fresco hasta €130.00-150.00 en peso seco (1) (Anexo 1). En Estados Unidos, el precio en 1997 fue de US10.00 a 55.00 dólares por Kg de peso fresco y hasta US200 dólares por Kg. en fechas en las cuales el hongo no es común. Un mercado de exportación importante y de reciente desarrollo está en China y Sudáfrica, donde se ha introducido la especie para exportación (1). Este hongo tiene ventaja sobre el matsutake (*Tricholoma matsutake*) y la trufa (*Tuber spp*), ya que puede ser deshidratado sin perder el sabor que lo caracteriza. Además tiene importancia ecológica debido a su capacidad de formar micorrizas con pinos y fagáceas, ayudando así a la formación y mantenimiento de este tipo de bosques. (1, 2, 4).

## **1. Distribución y diversidad en América**

Dado que muchos boletales son simbiontes ectomicorrícicos obligados, su distribución biogeográfica depende de la distribución de sus plantas hospederas. La invasión de las nuevas áreas geográficas por una planta y sus hongos simbiontes debió ocurrir simultáneamente para asegurar el éxito del establecimiento en la nueva área (14). En

Norteamérica y partes de América Central, los boletales están principalmente asociados con numerosos miembros de las familias arbóreas *Betulaceae* (alisos y abedules), *Fagaceae* (encinos y hayas), *Pinaceae* (abetos, alerces, pinos y píceas) y *Salicaceae* (sauces). En el neotrópico, miembros de la familia *Fabaceae* (leguminosas cesalpinoideas), *Nyctaginaceae* (*Neea* y *Pisonia* spp.) y *Polygonaceae* (especialmente *Coccoloba* spp.) son los huéspedes ectomicorrícicos predominantes (14, 17-19).

En términos de distribución y diversidad de boletales en el continente americano, hay estudios que documentan la presencia de ciertas especies en Norteamérica, el norte de América del Sur y la región del Caribe. También es evidente que su distribución no se conoce completamente en algunos países de Centroamérica e islas del Caribe. Norteamérica, excluyendo México, tiene el mayor número de boletales descritos, con aproximadamente 300 especies asociadas a diversos hospederos vegetales, que incluyen 60 especies de encinos y 35 especies de pinos. La mayor parte de estos estudios han sido ejecutados en la parte Este de Canadá, de Nueva York a Florida y California (14). En México, han sido documentados aproximadamente 212 taxa de boletales, principalmente en el sureste del estado de Veracruz, asociados a 52 plantas, particularmente pinos y encinos (14).

En Centroamérica, la mayor parte de estudios se han concentrado en Costa Rica, reportándose 84 especies en asociación micorrícica con 12 especies de encinos (1, 7, 14-16). En Belice, se reportan 13 especies asociadas con *Pinus caribaea* y *Quercus* spp. En Guatemala, según reportes en revistas científicas internacionales, sólo se mencionan 7 especies asociadas con *P. caribaea* y *Quercus* spp (3, 14) así como la existencia de un rico número de especies en el grupo *Edulis* asociadas con pinos y/o encinos del altiplano (20). Sin embargo el número de géneros y especies recolectadas, descritas y almacenadas en la Micoteca Rubén Mayorga de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, muestra que en este país existe la mayor diversidad del Orden Boletales del Istmo. En Honduras se han reportado 12 especies asociadas a *P. caribaea* y en Nicaragua, sólo 6 especies, también asociadas a *P. caribaea* (14).

Respecto a Sudamérica, Colombia reporta 23 especies asociadas principalmente a *Quercus humboldtii* Bonpl. y Guyana, con 24 especies, todas identificadas en asociación con leguminosas arbustivas ectomicorrícicas (*Dycimbe corymbosa*, *Dycimbe altsonii* y *Aldina insignis*). Para la región del Caribe, se han reportado 18 especies en Cuba, asociadas con *Pinus* spp., *Coccoloba* spp. y *Quercus* spp., y al menos 12 para la República Dominicana (14).

## 2. Estudios en Guatemala

Existen muy pocos estudios sobre el género *Boletus* en Guatemala. Los principales han sido realizados por Flores *et al.* (2000), como un proyecto sobre hongos ectomicorrícicos para aprovecharlos en planes de reforestación, donde se realizaron cultivos miceliares de *Boletus* spp. Bran *et al.* (2003), que incluyen varias especies del grupo Edulis en el listado de hongos comestibles de Guatemala (5).

Flores y Simonini (2000) describieron a nivel macro y microscópico seis especies de Boletales encontradas en Guatemala; cuatro de estas especies fueron descritas por primera vez para América Latina y dos más resultaron nuevas para la ciencia: *Boletus guatemalensis* Flores & Simonini y *B. luteoloincrustatus* Flores & Simonini (3).

Por otro lado, desde 2001, la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia está realizando el estudio más amplio sobre hongos comestibles de Guatemala, llegándose a formar un cepario de hongos nativos que incluye distintos géneros como *Amanita*, *Boletus*, *Laccaria*, *Lactarius* y *Pleurotus* entre otros; sin embargo, muchas de las especies no se han descrito microscópicamente (1, 6).

Un estudio a nivel molecular realizado por Flores (2003), demostró que en Guatemala existen varias especies que han sido identificadas con nombres de especies europeas por su gran parecido fenotípico pero que no corresponden genéticamente con las mismas. De hecho se logra ver en los árboles filogenéticos que existen complejos de especies bajo un mismo nombre y que deben ser aún estudiados. En dicho estudio se encontró también que

hay una gran similitud genética de la región ITS de una muestra guatemalteca de *B. pinophilus s.l.*, recolectada en Quetzaltenango, con muestras de *B. pinophilus* recolectadas en España, Italia y secuencias europeas depositadas en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); sin embargo, se observan sustituciones de algunas bases nitrogenadas que podrían ser las responsables del fenotipo de la muestra local (1).

Por otro lado, los estudios sobre la gran diversidad fúngica existente en Guatemala, particularmente sobre el género *Boletus*, indican que este país es el que posee mayor diversidad de boletales en el istmo centroamericano debido a su historia fitogeográfica y evolutiva, así como por sus características orográficas, altitudinales y de vegetación actual (1, 21-24).

### **3. Clasificación del género *Boletus* Dill ex Fr.**

Hay diferentes propuestas para la clasificación de este género según la opinión de los distintos micólogos, siendo las principales la europea y la norteamericana.

En la clasificación europea, según Fries, el género *Boletus* se divide en siete secciones: Sección *Subpruinosi*, Sección *Boletus*, Sección *Appendiculatii*, Sección *Fragrantes*, Sección *Calopodes*, Sección *Luridi* y Sección *Erythropodes*. *Boletus pinophilus* Pilát & Derneck se clasifica en la Sección *Boletus* (8).

La otra clasificación importante es la que incluye a las especies norteamericanas. Según Singer, el género *Boletus* se divide en cuatro secciones: Sección *Boletus*, Sección *Pseudoboleti*, Sección *Subtomentosi* y Sección *Truncati*. De acuerdo con este sistema, *Boletus pinophilus* se clasifica en la Sección *Boletus*, Sub-sección *Boleti* (12).

Binder & Hibbet (2006) concluyeron, a través de un estudio molecular, que el orden Boletales consta de más de ocho linajes en cuanto a subórdenes o familias, pero todas remiten a un origen monofilético. El estudio menciona que la familia Boletaceae es la que incluye el mayor número de especies con píleo y estípites, particularmente el género

*Boletus*, que incluye especies tan diferentes entre sí como *B. edulis*, *B. pallidus* o *B. satanas* (25).

#### 4. La sección *Boletus* del género *Boletus*

Según Mosser, esta sección comprende las cuatro especies europeas comestibles más conocidas: *B. edulis* Bull. ex Fr., *B. pinophilus* Pilát & Dermek, *B. aestivalis* Paulet ex Fr. y *B. aereus* Bull. ex Fr (8).

Estas especies se caracterizan por poseer un píleo plano-convexo de 50-150 mm (o más) de diámetro, de color beige o crema, rojizo, café-avellanado, café-oscuro a casi negruzco o achocolatado. Tubos blanquecinos en ejemplares jóvenes que al madurar van cambiando a amarillo-oliváceo y finalmente verde-oliváceo. Los poros también son blanquecinos en los ejemplares jóvenes y también cambian a amarillo-verdoso con la edad y se manchan de café-rojizo al dañarse o al envejecer. El estípite mide entre 50-150 mm de longitud, de color beige a ligeramente café o con tonos café-rojizo y presentan un retículo de color beige a blanquecino. La carne o contexto es siempre blanca con algunas tonalidades beige o rosadas bajo la cutícula del píleo, sin cambio a coloraciones azuladas. Las esporas miden de 12–15µm de largo x 4–5µm de diámetro. Crecen asociados simbióticamente con las raíces de coníferas y con robles o encinos (8).

Se han recolectado en varios países de Europa y Asia, variando la distribución según una aparente preferencia por la alta humedad y el clima frío (9). En América se han encontrado especies muy similares o que aparentan ser las mismas que en Europa. Algunas de las especies americanas de esta sección y que también se reportan como comestibles son *B. mottiae* Thiers, *B. atkinsonii* Peck, *B. variipes* Peck, *B. quercophilus* Halling & Mueller, *B. luteoloincrustatus* Flores & Simonini, *B. chippewanensis* A. H. Smith and Thiers, *B. nobilis* Peck, *B. fibrillosus* Thiers, *Boletus occidentalis* B. Ortiz & T.J. Baroni y otros (8, 26).

## **B. *Boletus pinophilus* Pilát & Dermek**

*Boletus pinophilus* Pilát & Dermek, *Ceská Mycol.* 27(1): 6 (1973)

*Boletus aestivalis* var. *pinicola* (Vittad.) Sacc., *Syll. Fung. (Abellini)* **19**: 154 (1910)

*Boletus edulis* f. *pinicola* (Vittad.) Vassilkov, *C. R. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve*: 14 (1966)

*Boletus edulis* var. *pinicola* Vittad.

*Boletus pinicola* (Vittad.) A. Venturi, (1863)

### **1. Descripción para ejemplares recolectados exclusivamente en Europa:**

**Píleo:** 60–300 mm de diámetro, hemisférico en los más jóvenes a convexo o plano-convexo en los adultos, raramente deprimido en el centro, superficie lisa a un poco rugosa, de color rojo-cobre a café-rojizo oscuro, sin franja marginal amarilla. En ejemplares jóvenes puede existir una leve franja blanquecina tomentosa (4, 9), que en los adultos cambia a un color rosado-claro a ligeramente purpúreo en los maduros, particularmente en el margen. Cutícula débilmente tomentosa y de manera única en los ejemplares jóvenes, luego lisa a un poco viscosa en tiempo lluvioso. En ejemplares maduros se presenta un borde membranoso que supera moderadamente al himenio (9).

**Himenio:** Tubos libres alrededor del pie, de hasta 25mm de largo, inicialmente de color crema luego amarillo con tonos oliváceos. Poros de igual color que los tubos, pero adquieren pronto una tonalidad café únicamente alrededor del pie (9). Inmutables al presionarse (4).

**Estípite:** de 70-160 mm de largo x 30–100 mm de diámetro, bulboso, grueso y a veces más ancho que el píleo. En especímenes jóvenes es oviforme a casi esférico, pero luego cambia a claviforme, cilíndrico y corto. Galli (4), sin embargo, reporta que la forma bulbosa se mantiene siempre en los cuerpos fructíferos adultos. La superficie del pie es de color crema-rojizo a café-claro sólo en el ápice, pero blanco o blancuzco con un retículo delicado de color beige-blanquecino que se extiende casi hasta la base. Micelio basal blanco (9).

**Contexto:** carnosos, blanco o blanquecino, inmutable al corte excepto por el color rosado a rojizo-vino a rojo-café bajo la cutícula del píleo (4, 9).

**Sabor y olor** agradables, aunque se menciona que el sabor es menos notorio que en *B. edulis* (9). Galli, menciona que esta especie es la menos perfumada y gustosa del grupo *Edulis* y que al cocinarse con agua y vinagre adquiere una coloración rojo-granate, muy distinta al amarillo que se produce con *B. edulis* (4).

**Microscopía:** Según Pilát & Dermek, la microscopía es similar a *B. edulis* (9).

**Basidios** de 30–40µm x 7.0–12µm de ancho, tetraspóricos y claviformes. Los cistidios, de 36–60µm x 4.5–12µm. **Esporas** de 14–20µm x 3.5–6.0µm, fusiformes, con depresión suprahilar, lisas y de color amarillento al microscopio (4, 9). **Hifas** en la cutícula del píleo de 7.0–10µm de grosor. El retículo del pie está compuesto de hifas irregulares y elementos himenoforales (9), como basidios (caulobasidios) y cistidios (caulocistidios). A diferencia de *B. edulis*, *B. pinophilus* no presenta hifas cuticulares dispuestas en forma paralela, sus células terminales no son nunca claviformes (en forma de mazo) ni puntiagudas. Excepcionalmente las hifas se pueden observar apretadas por aglutinación en el material viscoso, condición que sucede en tiempo húmedo. La muestra tipo de esta especie (*typus*) se encuentra en el Herbario del Museo Nacional de Praga (9).

**Hábitat:** Es una especie muy frecuente en el norte de Europa y que al igual de *B. edulis*, es una especie hidrófila y criófila (gusta del frío) (4). Crece en bosques de *Pinus sylvestris* y probablemente bajo otras especies de pino así como bajo abeto rojo y blanco, en llanuras y montañas. Según Singer, crece hasta los 2000 msnm (9). Aparece raramente en bosques de latifoliadas particularmente bajo encinos. Maire lo recolectó en España bajo abeto blanco (*Abies alba*) y *Fagus*. Es abundante en casi toda Europa y raro en América septentrional según Singer. Aparece también en África septentrional en la Sierra del Atlante (Marruecos) y en Asia. Está particularmente difundido en Polonia y la parte europea de Rusia, hasta la reserva lapona, en el límite de crecimiento de pinos, cerca del Círculo Polar (9).

## 2. Descripción de especímenes de *B. pinophilus* recolectados y descritos en Norteamérica:

**Píleo:** de 100–150mm de ancho, plano-convexo a casi plano, margen incurvado al principio con una estrecha banda de tejido estéril blanquecino; superficie seca, típicamente arrugada de color café-rojizo, rojo-ladrillo a café-oscuro, aunque en los más jóvenes se puede observar una fina cubierta blanquecina, algodonosa, similar al himenio (27). Contexto blanco pero de color café-rosado bajo la pileipellis o cutícula del píleo, no se mancha cuando se expone al aire después del corte; olor sazonado o no distintivo (26), aunque Metzler & Metzler, en su libro sobre hongos de Texas (27), mencionan que su sabor es mucho mejor que el de *B. edulis*.

**Himenio:** Deprimido cerca del estípite (al igual que en Europa); tubos de 8.0–25mm de longitud, de color blanquecino al inicio y luego amarillo-oliváceo, con tonos verde-oliváceo o café-amarillentos en los más maduros; poros circulares a angulares, blanquecinos también al inicio y luego concoloros con los tubos. El color de la esporada es oliváceo-oscuro a café-oliváceo (26, 27).

**Estípite:** de 50–120mm. de largo por 20–40mm. de grosor, ensanchado en la base a bulboso. Superficie seca, de color café-pálido a café-oscuro cuando es manipulado. Reticulado en el ápice y en ocasiones hasta la parte media; retículo blancuzco cerca del ápice pero beige-café más abajo; velo parcial ausente. Contexto blanco, carnoso, lleno y a veces con un color amarillo pálido cerca del ápice. Exámenes macroquímicos no descritos en la bibliografía norteamericana (26).

**Microscopía:** Esporas de 15–20 $\mu$ m x 4.0–6.0 $\mu$ m, fusiformes a cilíndricas, lisas, amarillentas (26).

**Hábitat:** Fructificación solitaria (26) o numerosa (27), asociado a coníferas, especialmente con especies de pino de hoja larga (27); a veces enterrado, de mayo a octubre; común y extensamente distribuido a lo largo de Norteamérica (26) y presenta en abundantes

fructificaciones cada 18-24 meses (27). Se presentan dos descripciones y aparentemente dos tipos en EEUU: uno para la costa este y sus Montañas Rocallosas (Rocky Mountains) con pie delgado y píleo rojizo, y otros para la costa oeste con pie grueso y con crecimiento cespitoso (varios de un mismo pie u origen), lo que ha dado lugar a pensar que se trata de especies distintas aunque similares.

### **3. Distribución de *B. pinophilus* s. l. en América.**

La distribución de *Boletus pinophilus* a nivel mundial es casi la misma que la del género *Boletus*, en particular con la distribución de *B. edulis*. En México existen reportes de esta especie, por ejemplo en Tlaxcala, en bosques de pino (*Pinus* spp.) y encino (*Quercus* spp.) en alturas de 2,600 msnm, donde la temperatura oscila entre 12°C y 18°C, con clima subtropical. Es llamado por los lugareños “*Xotoma*” o “*Xotomame*”, que en idioma náhuatl significa “hongo como tomate” y es utilizado como alimento y comercio; además lo venden más comúnmente de forma individual y no por kilo, como sucede con otros hongos, y es considerado de excelente calidad por su consistencia dura que impide ser afectado durante el transporte (28).

En Guatemala se ha reportado en varios departamentos de la República: Quetzaltenango, Totonicapán, Sololá y Quiché en bosques de pino y bosques mixtos de *Pinus-Quercus-Arbutus*. Recientemente se encontró en la Sierra de Las Minas, El Progreso, en altitudes superiores a los 2000 metros en un bosque mixto con dominancia de pino (1, 21-24) (Anexo 2). No hay hasta el momento ningún reporte sobre la especie en el resto de Centro y Sudamérica.

Por los estudios sobre diversidad fúngica efectuados en Guatemala, aunque no hayan sido aún publicados en revistas internacionales, se podría decir que este país es el que posee mayor diversidad de boletales en el istmo centroamericano debido a su historia fitogeográfica y evolutiva, así como por sus características geográficas, altitudinales y de vegetación actual (1, 21-24).

#### **4. Usos de *B. pinophilus*:**

Es uno de los mejores hongos comestibles, muy apreciado en cualquier lugar y universalmente recolectado para uso alimenticio, incluso para utilizarlo en forma de conserva industrial. Muchos recolectores de hongos lo prefieren antes que a *B. aestivalis* y porque no se llena fácilmente de gusanos (9).

Teniendo en cuenta las características de este hongo, se le pueden atribuir utilidades de tipo forestal, es decir que siendo un hongo micorrízico se puede emplear en la conservación de bosques así como en la ampliación de área forestal. Por otro lado la producción de sus cuerpos fructíferos y los bosques donde crece puede crear un tipo de turismo micológico (1) y contribuir a la economía del país. En caso del descubrimiento de nuevas variedades, estas se pueden comercializar aumentando así la economía del país.

Por otro lado, se ha visto a los hongos como productos de bosques no maderables (NTFP, por sus iniciales en inglés: *Non Timber Forest Product*) los cuales son indicadores de especies que existen o que formalmente existieron en una región y que pueden ser potencialmente incorporados en planes de conservación de la biodiversidad, restauración de bosques, patrones de uso cultural y desarrollo económico sustentable (29).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

*Boletus pinophilus s.l.* es un hongo que se encuentra presente en diversas regiones de Europa, Asia y Norteamérica. Su importancia es tanto económica como ecológica. En Guatemala, la especie se encuentra presente pero ha sido poco estudiada y no existen descripciones que incluyan el análisis de sus estructuras microscópicas (hifas pileicas, hifas estipitales, basidios, basidiolos, cistidios, esporas, etc.). Por otro lado, observaciones macroscópicas que incluyen porte, color, hábitat, olor y sabor, indican que existen diferencias respecto a las descritas para Europa, por lo que podría(n) existir variedad(es) o especies que deben conocerse por razones taxonómicas, de evolución y de comercio. De hecho ya se han establecido varias técnicas para la identificación de genética de hongos comestibles para su ingreso en Europa y evitar el engaño de vender una especie por otra debido a similitudes morfológicas.

Se sabe que por evolución y adaptación, algunas especies pueden ir cambiando hasta originar variedades. Existen reportes de hongos identificados en Norteamérica y Guatemala con nombres de especies europeas, pero se ha comprobado que algunas corresponden a especies propiamente americanas, a pesar de la enorme similitud macroscópica. Muchas parecen tener origen Euroasiático, cuya ruta se remonta al gran continente de Pangea y otras que parecen haberse originado en Norteamérica.

En el caso de *Boletus pinophilus* de Guatemala es necesario realizar un análisis microscópico de sus estructuras y compararlas con los datos de la especie original europea para verificar si se trata de la misma especie, de una variedad local o de una nueva especie y con ello contribuir al estudio de la ruta de distribución y probable origen.

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo General:

1. Describir y comparar las estructuras microscópicas de los cuerpos fructíferos de *Boletus pinophilus* recolectados en Guatemala respecto a la especie europea, con el fin de determinar si existen diferencias y así corroborar su identidad genética.

### B. Objetivos específicos:

1. Describir y comparar la morfología y dimensión de basidios, basidiolos, cistidios, esporas, hifas pileicas y estipitales, de las muestras guatemaltecas de *Boletus pinophilus s.l.* con las descripciones de la especie original europea.
2. Analizar los resultados obtenidos con dos muestras italianas de *B. pinophilus* para corroborar y ampliar la información obtenida en la bibliografía, en cuanto a elementos de microscopía de la especie.
3. Determinar mediante análisis macroscópico, microscópico y bibliográfico si las muestras guatemaltecas de *Boletus pinophilus s. l.* corresponden con la descripción europea o si pertenecen a una nueva variedad o una nueva especie.

## **VI. HIPÓTESIS**

*Boletus pinophilus s.l.* en Guatemala posee al menos una variación morfológica en sus microestructuras respecto a la descripción de la especie para Europa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO DE TRABAJO:

El universo de trabajo son todas las muestras de *Boletus pinophilus* recolectadas en Guatemala y almacenadas en la “Micoteca “Rubén Mayorga Peralta” del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### B. MUESTRA:

Corresponde a seis muestras guatemaltecas y dos muestras italianas identificadas como:

- Ref. 17.2008, recolectado en Aldea La Emboscada, San Miguel Siguilá, Quetzaltenango (26 de julio de 2008).
- 18.2008, recolectado en Aldea La Emboscada, San Miguel Siguilá, Quetzaltenango (26 de julio de 2008).
- 19.2008, recolectado en Aldea La Emboscada, San Miguel Siguilá, Quetzaltenango (26 de julio de 2008).
- Ref. 1.2008, recolectado en Chichicastenango. 10 de julio de 2008.
- Ref. 113.04, recolectado en Momostenango. 24 de julio de 2004.
- Ref. 28.2006, recolectado en Finca “La Montañita” San Agustín Acasaguastlán, Sierra de Las Minas, El Progreso.
- Ref. EMGS #1623, recolectada en Cerdeña, Italia. Herbario Micológico G. Simonini
- Ref. EMGS #1622, recolectada en Reggio Emilia, Italia. Herbario Micológico G. Simonini.

### C. METODOLOGÍA:

**1. Recolección de muestras:** se hicieron tres salidas de campo para recolectar cuerpos fructíferos frescos en zonas previamente conocidas por investigadores de la Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos -UBiotaH-, de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

**2. Material herborizado:** Se usaron ejemplares herborizados y depositados en la micoteca Rubén Mayorga Peralta, los cuales fueron recolectados en años anteriores.

**3. Preparación de las Muestras:**

- a. De las muestras herborizadas se extrajeron pequeñas porciones para el análisis microscópico por medio de cortes transversales y longitudinales muy finos de la cutícula del píleo, del pie y del himenio.
- b. Para hacer los cortes se emplearon hojas de afeitar y pinzas finas así como uso del estereoscopio.
- c. Inicialmente, cada corte se colocó en un portaobjetos y se le agregó 1 gota de etanol al 95% durante 30 segundos, luego se agregó una gota de agua destilada para su rehidratación. Posteriormente se optó por colocar los cortes en una gota de agua destilada durante un minuto, luego se les agregó una gota de KOH al 5% para mejorar la rehidratación y se dejó reposar un minuto más. Luego se quitó la mezcla con papel absorbente y se volvió a agregar agua destilada.
- d. Se agregó una gota de reactivo de Melzer, Azul de Lactofenol o Rojo Congo para teñir las estructuras y determinar el mejor colorante para observación al microscopio.
- e. Los cortes se presionaron según la necesidad para su observación microscópica (15).

**4. Análisis microscópico de las muestras:**

- a. Se midieron basidios, basidiolos, esterigmas, cistidios, esporas, hifas pileicas y espitales utilizando el microscopio con ocular de medida y con objetivo de inmersión (100X).
- b. Se realizaron 20 mediciones de cada estructura (basidios, cistidios, basidiolos, esporas) en ancho y largo de cada una de las muestras.
- c. Se tomaron fotografías digitales de las diferentes estructuras y se apuntaron las observaciones en cuaderno.
- d. Para la estructuración de los resultados (distintas mediciones) se elaboraron tablas para la mejor comprensión y fácil comparación.

## **5. Interpretación de resultados:**

- a. Se compararon los resultados con la descripción original de *Boletus pinophilus* Pilát & Dermeck, reportada en la literatura.
- b. Se compararon los resultados con dos muestras de *Boletus pinophilus*, recolectadas en Italia y pertenecientes a la colección particular de Simonini G.
- c. Se consultó a expertos extranjeros (Bryn Dentinger, *New York Botanical Garden*, EEUU; Manfred Binder, *Clark University*, EEUU y Giampaolo Simonini, *Associazione Micologica Bresadola*, Italia) para obtener su opinión.
- d. Se elaboró el informe final.

## **D. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:**

### **1. Variables:**

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Basidios
- Basidiolos
- Cistidios
- Esterigmas
- Esporas
- Hifas pileicas y estipitales

### **2. Análisis de resultados:**

Se realizó un análisis morfométrico (exclusivamente por rangos):

- Entre las muestras guatemaltecas.
- Contra los valores de referencia (valores descritos para Europa).
- Se estableció las similitudes y diferencias.

El modelo estadístico (Anexo 3), sugiere medir un mínimo de 7 repeticiones por cada variable; sin embargo, la literatura recomienda medir un mínimo de 20 repeticiones para que sea un trabajo válido, por lo cual en la presente investigación se trabajó con este número y esquema.

## VIII. RESULTADOS

Los especímenes de *Boletus pinophilus* de Guatemala analizados en este estudio presentaron variación en las medidas de la mayoría de estructuras analizadas, lo cual fue corroborado por los valores de desviación estándar en cada parámetro analizado (Tablas 1-3).

Las medidas del largo de los cistidios fueron las que más variabilidad mostraron, así como el largo de los basidios y basidiolos (Tablas 1-3). Las dimensiones de esporas y esterigmas son las que menos variabilidad presentaron.

Además de la variabilidad entre estructuras en general de cada muestra, las muestras analizadas evidenciaron diferencias entre ellas. Se puede apreciar que dichas diferencias son mayormente en las dimensiones de los basidios (especialmente en el largo) (Tabla 4). La muestra 1.2008 posee basidios de 28.0 – 34.0  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que los basidios de la muestra 19.2008 van de 35.0 – 42.0  $\mu\text{m}$ . Otra diferencia se da en el largo de los esterigmas, donde la muestra 19.2008 los presentó de hasta 8.0  $\mu\text{m}$ , mientras que las demás llegaron hasta 6.0  $\mu\text{m}$ . Los cistidios de la muestra 1.2008 y 28.2006 fueron más pequeños (hasta 46.0  $\mu\text{m}$ ) que los cistidios de las demás muestras (hasta 53.0  $\mu\text{m}$ ). Asimismo, no existieron diferencias de consideración en el número de esterigmas y la dimensión de esporas de las distintas muestras (Tabla 4).

En cuanto a diferencias y similitudes entre los especímenes de *B. pinophilus* de Guatemala respecto a los reportes de la bibliografía europea, la única similitud se encontró en las dimensiones de las esporas. El rango del largo de las muestras guatemaltecas (13.0 – 17.0  $\mu\text{m}$ ), encajó dentro del rango de la especie europea (de 14.0 – 20.0  $\mu\text{m}$ ) y el ancho de estas es muy similar (Tabla 5).

Las diferencias encontradas mostraron que los cistidios de las muestras guatemaltecas son un poco más pequeños (hasta 53.0  $\mu\text{m}$  de largo) respecto a los europeos (hasta 60.0  $\mu\text{m}$  de largo). Los basidios tienden a ser más anchos (hasta 18.0  $\mu\text{m}$ ) que los basidios europeos

(hasta 12.0  $\mu\text{m}$ ). El número de esterigmas de la especie en Europa se reporta con un promedio de 4 esterigmas mientras que en las muestras guatemaltecas se encontró una media de 2 esterigmas. El grosor de las hifas de la especie europea es de un máximo de 10.0  $\mu\text{m}$  mientras que en las muestras guatemaltecas las hifas alcanzaron hasta 20.0  $\mu\text{m}$  (Tabla 5).

También existieron diferencias entre los especímenes guatemaltecos respecto a especímenes italianos analizados en este estudio. Las esporas de las muestras italianas mostraron un largo máximo de 20.0  $\mu\text{m}$  contra un máximo de 17.0  $\mu\text{m}$  en las guatemaltecas (Tabla 6). Los basidiolos fueron similares en cuanto a las dimensiones; sin embargo, presentaron diferencia en la morfología (Tabla 6, Figura 1). Los basidios de las muestras guatemaltecas fueron más anchos (hasta 18.0  $\mu\text{m}$ ) que los basidios italianos (hasta 14.0  $\mu\text{m}$ ). En cuanto a la morfología de los basidios, los italianos poseen el extremo apical mucho más ancho, mientras que los de guatemaltecos son clavados (Tabla 6, Figura 1). Los esterigmas de las muestras guatemaltecas fueron más largos (hasta 8.0  $\mu\text{m}$ ) que los esterigmas de las muestras italianas (hasta 4.0  $\mu\text{m}$ ) (Tabla 6). La morfología de esporas y cistidios fue muy similar (Figura 2).

La mayor diferencia entre ambas especies (guatemalteca y europea) radicó en la morfología de las hifas. Las muestras guatemaltecas presentaron hifas clavadas a globosas con un ancho máximo de 20.0  $\mu\text{m}$  mientras que las hifas de las muestras italianas mostraron forma sub-aguda a clavada con un ancho máximo de 15.0  $\mu\text{m}$  (Tabla 6, Figura 3).

**Tabla 1. Características microscópicas de basidios y sus esterigmas de los especímenes de *Boletus pinophilus* s.l. recolectados en Guatemala y de dos muestras italianas analizadas en este estudio.**

ESPÉCIMEN	BASIDIOS (µm)						ESTERIGMAS (µm)						
	Largo	Min	Max	Ancho	Min	Max	Num.	Largo	Min	Max	Ancho	Min	Max
<b>113.04</b>	<b>38.2±</b> 2.04 *	35.0	41.0	<b>11.0±</b> 1.23	10.0	13.0	1-3	<b>3.5±</b> 0.69	3.0	5.0	<b>1.1±</b> 0.37	1.0	2.0
<b>1.2008</b>	<b>30.5±</b> 1.67	28.0	34.0	<b>9.6 ±</b> 0.88	8.0	11.0	1-4	<b>3.9±</b> 0.95	2.0	6.0	<b>1.1±</b> 0.31	1.0	2.0
<b>17.2008</b>	<b>36.8±</b> 2.67	30.0	42.0	<b>12.3±</b> 2.27	8.0	18.0	2-4	<b>3.6±</b> 1.04	2.0	5.0	<b>1.4±</b> 0.50	1.0	2.0
<b>18.2008</b>	<b>37.2±</b> 2.64	31.0	43.0	<b>10.7±</b> 1.03	10.0	14.0	2-4	<b>3.5±</b> 0.60	3.0	5.0	<b>1.4±</b> 0.50	1.0	2.0
<b>19.2008</b>	<b>39.0±</b> 1.75	35.0	42.0	<b>9.5 ±</b> 0.95	8.0	12.0	1-4	<b>5.5±</b> 1.05	4.0	8.0	<b>1.4±</b> 0.50	1.0	2.0
<b>28.2006</b>	<b>38.0±</b> 2.92	34.0	45.0	<b>12.7±</b> 1.02	10.0	14.0	1-3	<b>3.6±</b> 0.88	2.0	5.0	<b>1.4±</b> 0.50	1.0	2.0
<b>EMGS</b> <b>1623</b>	<b>37.4±</b> 1.84	34.0	41.0	<b>12.0±</b> 1.37	10.0	14.0	1-3	<b>2.8±</b> 0.67	2.0	4.0	<b>1.4±</b> 0.50	1.0	2.0
<b>EMGS</b> <b>1622</b>	<b>37.9±</b> 2.25	33.0	41.0	<b>12.4±</b> 1.50	10.0	15.0	1-4	<b>2.4±</b> 0.51	2.0	3.0	<b>1.1±</b> 0.36	1.0	2.0

\* **Media** ± desviación estándar.

**Tabla 2. Características microscópicas de esporas y basidiolos de los especímenes de *Boletus pinophilus* s.l. recolectados en Guatemala y de dos muestras italianas analizadas en este estudio.**

ESPÉCIMEN	ESPORAS ( $\mu\text{m}$ )						BASIDIOLOS ( $\mu\text{m}$ )					
	Largo	Min	Max	Ancho	Min	Max	Largo	Min	Max	Ancho	Min	Max
<b>113.04</b>	<b>15.0</b> $\pm$	14.0	16.0	<b>5.2</b> $\pm$	5.0	6.0	<b>32.5</b> $\pm$	30.0	35.0	<b>10.8</b> $\pm$	10.0	12.0
	0.65 *			0.41			2.10			0.99		
<b>1.2008</b>	<b>14.8</b> $\pm$	13.0	17.0	<b>5.2</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>31.7</b> $\pm$	26.0	35.0	<b>9.6</b> $\pm$	8.0	12.0
	1.05			0.72			2.38			1.00		
<b>17.2008</b>	<b>15.4</b> $\pm$	14.0	17.0	<b>5.6</b> $\pm$	5.0	6.0	<b>34.2</b> $\pm$	30.0	38.0	<b>13.4</b> $\pm$	10.0	15.0
	0.87			0.50			1.65			1.35		
<b>18.2008</b>	<b>16.1</b> $\pm$	15.0	17.0	<b>5.0</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>32.5</b> $\pm$	28.0	38.0	<b>9.8</b> $\pm$	8.0	12.0
	1.02			0.39			2.48			1.06		
<b>19.2008</b>	<b>14.3</b> $\pm$	13.0	15.0	<b>5.1</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>37.2</b> $\pm$	33.0	40.0	<b>8.7</b> $\pm$	7.0	11.0
	0.66			0.55			2.04			1.34		
<b>28.2006</b>	<b>14.9</b> $\pm$	14.0	17.0	<b>5.2</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>32.8</b> $\pm$	30.0	35.0	<b>9.9</b> $\pm$	9.0	13.0
	0.85			0.62			1.82			0.97		
<b>EMGS 1623</b>	<b>14.7</b> $\pm$	14.0	16.0	<b>4.7</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>36.4</b> $\pm$	32.0	40.0	<b>10.4</b> $\pm$	8.0	12.0
	0.55			0.64			2.43			1.43		
<b>EMGS 1622</b>	<b>18.0</b> $\pm$	15.0	20.0	<b>5.0</b> $\pm$	4.0	6.0	<b>32.9</b> $\pm$	30.0	36.0	<b>12.7</b> $\pm$	9.0	16.0
	1.63			0.76			2.01			2.02		

\* Media  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 3: Características microscópicas de los cistidios del himenio (pleurocistidios) encontrados en muestras de *Boletus pinophilus* s.l. recolectados en Guatemala.**

ESPÉCIMEN	CISTIDIOS ( $\mu\text{m}$ )					
	Largo	Min	Max	Ancho	Min	Max
<b>113.04</b>	<b>49.1</b> $\pm$ 1.80 *	46.0	52.0	<b>10.3</b> $\pm$ 1.03	9.0	12.0
<b>1.2008</b>	<b>40.1</b> $\pm$ 2.12	37.0	44.0	<b>9.55</b> $\pm$ 0.94	8.0	11.0
<b>17.2008</b>	<b>45.7</b> $\pm$ 4.57	40.0	53.0	<b>11.3</b> $\pm$ 1.21	9.0	13.0
<b>18.2008</b>	<b>45.4</b> $\pm$ 3.69	40.0	52.0	<b>10.0</b> $\pm$ 0.79	9.0	12.0
<b>19.2008</b>	<b>48.7</b> $\pm$ 1.88	45.0	51.0	<b>9.7</b> $\pm$ 1.03	8.0	11.0
<b>28.2006</b>	<b>40.4</b> $\pm$ 2.79	36.0	46.0	<b>9.9</b> $\pm$ 0.71	9.0	11.0

\* Media  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 4: Dimensiones de basidios, esterigmas esporas y cistidios de muestras de *Boletus pinophilus* s.l. recolectadas en Guatemala y analizadas en este estudio.**

Número Herbario	Basidios	Número de esterigmas	Dimensión esterigmas	Cistidios	Esporas
113.04 Momostenango.	(35) <b>38-40</b> (41) x <b>10</b> -(13) μm	(1) <b>2</b> -(3)	<b>3-4</b> (5) x <b>1</b> -(2) μm	(46) <b>48-50</b> (52) x (9) <b>10-11</b> (12) μm	(14) <b>15</b> -(16) x <b>5</b> -(6) μm
1.2008 Chichicastenango.	(28) <b>30-31</b> (34) x (8) <b>9-10</b> (11) μm	(1) <b>2</b> -(4)	(2) <b>3-4</b> (6) x <b>1</b> -(2) μm	(37) <b>40-42</b> (44) x (8)- <b>10</b> (11) μm	(13)- <b>15</b> (17) x (4) <b>5</b> -(6) μm
17.2008 Quetzaltenango	(34) <b>35-40</b> (42) x (8) <b>10-14</b> (18) μm	<b>2</b> -(4)	(2) <b>3-5</b> x <b>1</b> -(2) μm	(40)- <b>45</b> (53) x (9) <b>10-11</b> (13) μm	(14) <b>15</b> -(17) x <b>5</b> -(6) μm
18.2008 Quetzaltenango	(31) <b>35-38</b> (43) x <b>10-12</b> (14) μm	<b>2</b> -(4)	<b>3-4</b> (5) x <b>1</b> -(2) μm	(40) <b>45-48</b> (52) x (9) <b>10</b> -(12) μm	(15) <b>16</b> -(17) x <b>5</b> -(6) μm
19.2008 Quetzaltenango	(35) <b>40</b> (42) x (8) <b>9-10</b> (12) μm	(1) <b>2</b> -(4)	(4) <b>5-6</b> (8) x <b>1</b> -(2) μm	(45) <b>49-51</b> x (8) <b>9-10</b> (11) μm	(13) <b>14-15</b> x (4) <b>5</b> -(6) μm
28.2006 Sierra de Las Minas	(34) <b>38-40</b> (45) x (10) <b>12-13</b> (14) μm	(1) <b>2</b> -(3)	(2) <b>3-4</b> (5) x <b>1</b> -(2) μm	(36) <b>38-40</b> (46) x <b>9-10</b> (11) μm	(14) <b>15</b> -(17) x (4) <b>5</b> -(6) μm

Fuente: Datos experimentales.

*Nota:* los datos enmarcados en un cuadro indican la mayor diferencia intra-específica de las estructuras analizadas.

**Tabla 5: Descripción y comparación de microestructuras de *Boletus pinophilus* según la bibliografía europea respecto a las muestras guatemaltecas analizadas en este estudio.**

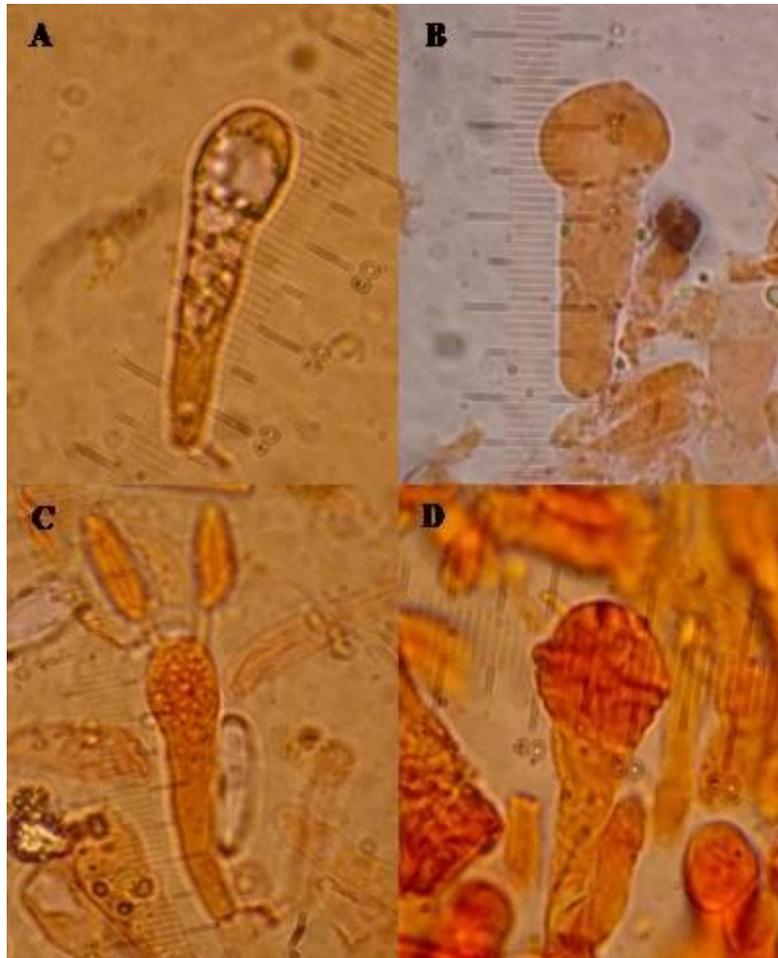
<b>Variable</b>	<b>Material europeo</b>	<b>Muestras guatemaltecas</b>
<b>Esporas</b>	<b>14–20 x 3.5–6 <math>\mu\text{m}</math>.</b>  Fusiformes con depresión suprahilar, lisas de coloración amarillenta.	(13) <b>15-16</b> (17) x (4) <b>5</b> -(6) $\mu\text{m}$ .  Q = 2.91 (N=120).  Cilíndricas, lisas y de coloración verde–oliva.
<b>Cistidios</b>	<b>36–60 x 4.5–12 <math>\mu\text{m}</math>.</b>	<b>36.0–53.0 x 8.0–13.0 <math>\mu\text{m}</math></b>  Digitados, presentan pocas granulaciones no amiloideas.
<b>Basidiolos</b>	Sin datos	<b>26.0–40.0 x 7.0–15.0 <math>\mu\text{m}</math></b>  Clavados con granulaciones no amiloideas.
<b>Basidios</b>	<b>30–40 x 7–12 <math>\mu\text{m}</math>.</b>  Tetraspóricos y claviformes.	<b>28.0–45.0 x 8.0–18.0 <math>\mu\text{m}</math></b>  Generalmente bispóricos pero también hay tetraspóricos, clavados con granulaciones no amiloideas.
<b>Esterigmas</b>	Sin datos	<b>2.0–8.0 x 1.0–2.0 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>Hifas</b>	<b>7–10 <math>\mu\text{m}</math>.</b>	Disposición en ixotricoderma, embebidas abundante material gelatinoso en la cutícula del píleo, de <b>8.0–20 <math>\mu\text{m}</math></b> . y de <b>10–15 <math>\mu\text{m}</math></b> . en la parte baja del estípite. Presentan paredes de aproximadamente 1 $\mu\text{m}$ de ancho.  Hifas terminales generalmente piriformes a globosas. No presentan fíbulas y en su mayoría presentan granulaciones no amiloideas.

Fuente: Datos experimentales y Datos bibliográficos.

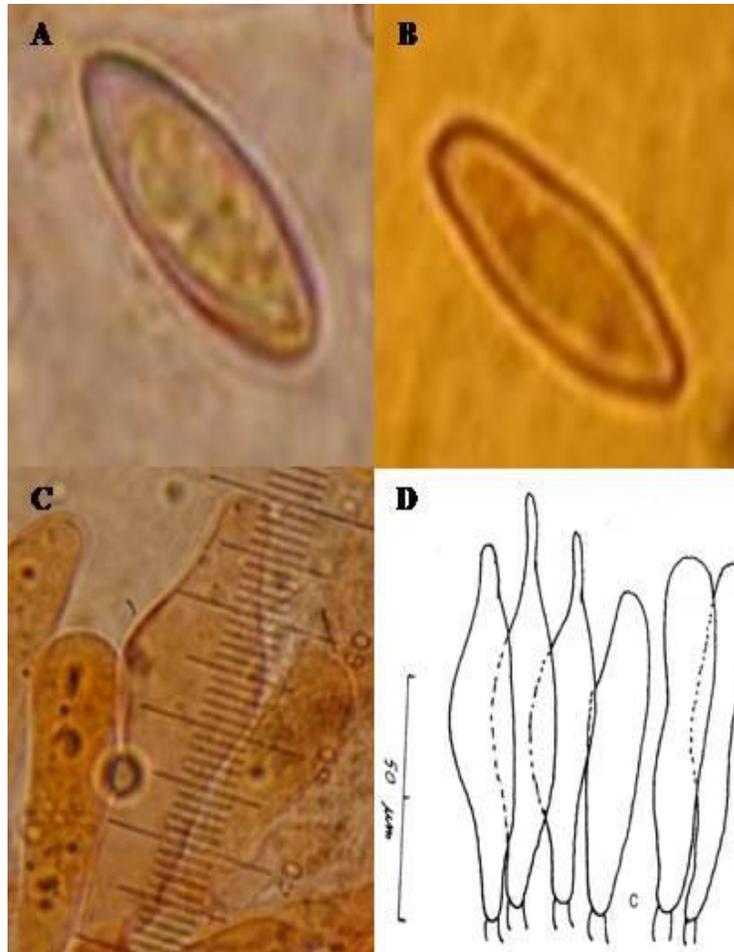
**Tabla 6: Descripción y comparación de microestructuras de muestras italianas respecto a muestras guatemaltecas de *Boletus pinophilus* analizadas en este estudio.**

Variable	Muestras italianas	Muestras guatemalteca
<b>Esporas</b>	<b>14.0–20.0 x 4.0–6.0</b> $\mu\text{m}$ Lisas de coloración verde-oliváceas a cafés.	(13) <b>15-16</b> (17) x (4) <b>5</b> -(6) $\mu\text{m}$ . Q = 2.91 (N=120). Cilíndricas, lisas y de coloración verde–oliva.
<b>Basidiolos</b>	<b>30.0–40.0 x 8.0–16.0</b> $\mu\text{m}$ Clavados o en forma de mazo con granulaciones no amiloideas	<b>26.0–40.0 x 7.0–15.0</b> $\mu\text{m}$ . Clavados con granulaciones no amiloideas.
<b>Basidios</b>	<b>33.0–41.0 x 10.0–14.0</b> $\mu\text{m}$ . Clavados o en forma de maza con granulaciones no amiloideas. Generalmente bi y trispóricos. Algunos son tetraspóricos	<b>28.0–45.0 x 8.0–18.0</b> $\mu\text{m}$ . Clavados con granulaciones no amiloideas. Bispóricos en su mayoría, algunos tetraspóricos.
<b>Esterigmas</b>	<b>2.0–4.0 x 1.0–2.0</b> $\mu\text{m}$	<b>2.0–8.0 x 1.0–2.0</b> $\mu\text{m}$ .
<b>Cistidios</b>	Digitados a obclavados.*	<b>36.0–53.0 x 8.0–13.0</b> $\mu\text{m}$ . Digitados, presentan pocas granulaciones no amiloideas.
<b>Hifas</b>	Disposición en ixotricoderma, embebidas en <i>poco</i> material gelatinoso, con un ancho de 10–15 $\mu\text{m}$ , paredes de aproximadamente 1 $\mu\text{m}$ , algunas con pequeñas y escasas granulaciones no amiloideas. Hifas terminales sub-agudas a clavadas, algunas dicotomizadas o bifurcadas	Disposición en ixotricoderma, embebidas en <i>abundante</i> material gelatinoso, con un ancho en la cutícula de 8.0–20.0 $\mu\text{m}$ . y de 10–15 $\mu\text{m}$ . en la parte baja del estípite. Presentan paredes de aproximadamente 1 $\mu\text{m}$ de ancho. Hifas terminales generalmente piriformes a globosas. No presentan fíbulas y la mayoría con granulaciones no amiloideas.

Fuente: datos experimentales. \*Tomado de Foiera F. (1993).



**Figura 1. Comparación de microestructuras entre los especímenes de Guatemala respecto a los especímenes italianos. A. Muestra guatemalteca:** Basidiolos clavados y delgados, con granulaciones no amiloideas notorias. Ref. 19.2008. **B. Muestra italiana:** Basidiolos clavados o en forma de mazo con granulaciones no amiloideas escasas. Ref. EMGS 1623. **C. Muestra guatemalteca:** Basidios clavados y delgados, con granulaciones no amiloideas, bispóricos en su mayoría; algunos tetraspóricos. Ref. 19.2008. **D. Muestra italiana:** Basidios clavados o en forma de mazo con granulaciones no amiloideas, generalmente bi y trispóricos. Ref. EMGS 1623.



**Figura 2. Comparación de microestructuras entre los especímenes de Guatemala respecto a los especímenes italianos. A. Muestra guatemalteca:** Esporas cilíndricas elipsoidales, lisas y de coloración verde-oliva. Ref. 19.2008. **B. Muestra italiana:** Esporas lisas de coloración verde-oliváceas a cafés cilíndricas. Ref. EMGS 1622. **C. Muestra guatemalteca:** Cistidios himeniales digitados, presentan pocas granulaciones no amiloideas. Ref. 19.2008. **D. Muestra italiana:** Cistidios himeniales digitados a obclavados (Tomado de Foiera F 1993).



**Figura 3: Comparación de hifas del píleo de los especímenes guatemaltecos respecto a los especímenes italianos, donde resulta la mayor diferencia microscópica entre ambas. A. Muestra guatemalteca:** Hifas terminales clavadas a globosas con granulaciones y con abundante cantidad de material gelatinoso. Ref 19.2008. **B. Muestra italiana:** Hifas terminales alargadas, subagudas y/o clavadas, bifurcadas, lisas y con menor cantidad de mucílago. EMGS 1622

A continuación se propone una nueva variedad de *Boletus pinophilus*, descrita mediante el análisis de muestras recolectadas en Guatemala:

***Boletus pinophilus* var. *americanus* var. nov. R. flores & G. Ché:**

**Pileo** plano-convexo a convexo, centro plano a ligeramente deprimido, 90.0–135.0 mm diámetro. Color café a cocoa-rojizo  $S_{60}O_{41}Y_{07}$ , café-chocolate  $S_{80}O_{60}Y_{15}$  y tonos beige-amarillento  $S_{33}O_{33}Y_{26-33}$ . Borde con cubierta tomentosa grisácea sobre el color café-rojizo del fondo. En adultos el color se hace más rojizo e intenso  $S_{70}O_{60}Y_{04}$ ,  $S_{70}O_{80}M_{11}$  y tonos café-oscuro  $S_{80}O_{80}M_{20}$  pero el borde es café-claro  $S_{41}O_{33}Y_{26}$ , con tonalidades naranja, amarillentas y beige. Al exponerse al sol se presenta superficie tomentosa y aerolada de color mostaza. Algunos especímenes presentan color café rojizo-ladrillo  $S_{50}O_{60}Y_{07}$ , con margen amarillento-mostaza  $S_{26}O_{60}Y_{60}$  y borde blanquecino. Al dañarse se mancha de café-purpúreo, además café rojizo oscuro  $S_{70}O_{60}M_{26}$ , a rojizo mas claro  $S_{60}O_{60}Y_{41}$  en el centro o hacia el borde en áreas expuestas al sol. En ejemplares jóvenes se observan áreas café purpúreas  $S_{70}O_{50}Y_{41}$ . Ejemplares adultos de color café  $S_{41}O_{41}Y_{33}$  que se decolora a rojizo en los bordes.

**Margen** decurvado a recto, borde entero y apendiculado de 1-2mm de largo, blanquecino y un poco ondulado en los más jóvenes a café-rojizo en los adultos, claramente diferenciado del color amarillento del borde. Superficie viscosa-untuosa, casi glutinosa en húmedo, elástica a un poco untuosa en seco, finamente tomentosa, rugosa en el margen. Cutícula desprendible y contexto color beige. Algunos ejemplares jóvenes presentan superficie rugulosa. Contexto lleno, esponjoso-carnoso con coloración blanca a beige debajo de la cutícula, beige rojizo sobre el himenio. Olor a hongo y ajo, Sabor de almendras y un poco a ajo.

**Himenio** sinuado, cubierto de tomento blanco en los mas jóvenes y luego de color amarillo oliváceo  $S_{15}O_{33}Y_{60}$  a ligeramente naranja pálido  $S_{15}O_{41}Y_{50}$  y áreas de color café-ladrillo  $S_{60}O_{60}Y_{02}$  en los adultos. Tubos de color amarillo oliváceo a verde-oliva, 0.5-1.0 mm de diámetro y hasta 15-18 mm de longitud; separables, sin cambio de color, se manchan

levemente de beige rojizo con la presión. Poros pequeños; rojizos, de hasta 1-2 mm diámetro en los adultos, redondeados, angulares, dentelados, laberintiformes, se manchan un poco de café-rojizo al tacto y daño. Trama himenial paralela.

**Estípites** oblicuo, un poco clavado a sub-bulboso, sub-radicante a torcido, 40-170 mm de longitud. Ápice atenuado de 26-30 mm de diámetro; base bulbosa a sub-radicante, 25 mm de diámetro. Superficie rojiza-café  $S_{41}O_{60}Y_{11}$  a  $S_{33}O_{41}M_{11}$  a tonos mas naranja  $S_{15}O_{41}Y_{20-26}$ , cubierta de un notorio y fino retículo blanquecino que cubre la mitad a casi la totalidad (2/3 partes) del pie, el resto es fibrilar, con base blanca y micelio tomentoso blanco que se mancha de café-rojizo a la presión. Desde el ápice hasta la parte media del pie, el retículo esta sobre un fondo de color café-rojizo  $S_{50}O_{60}Y_{20}$  hasta un café-rojizo intenso  $S_{60}O_{70}Y_{02}$ . Áreas comidas por animales o insectos presentan color  $S_{50}O_{60}M_{33}$  en algunos ejemplares. Contexto lleno, blanco, carnosos, fibriloso.

**Olor** agradable, fúngico y similar a ajo; el cual se intensifica con el corte. El olor es más fuerte que *B. edulis* de Guatemala.

**Sabor** fúngico, con notorio sabor a ajo y almendra cruda, un poco dulce.

**Hábitat** solitario, en bosques de pino (*p. tenuifolia*, *p. montezumae*, *P. rocarpa*), en bosques mixtos (pino-encino) y en asociación aparente con madroño (*Arbutus xalapensis*). Crece siempre en terrenos calizos y arenosos.

**Reacciones:**

*KOH* 3%: rojizo a naranja pálido en contexto-píleo, cutícula del pie café, poros y tubos café-naranja.

*H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*: anaranjado sobre cutícula del píleo, cutícula del pie naranja, rojo en los poros y amarillo-naranja en tubos, se aclara la cutícula de cualquier mancha oscura.

*Melzer*: azulado en tubos.

*FeCl<sub>3</sub>*: gris oscuro en tubos.

*Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>*: gris negruzco en tubos.

**Descripción microscópica:**

**Esporas** cilíndricas, lisas, color verde-oliva a café, con dimensiones de (13)14-16(17) x (4)5-(6)  $\mu\text{m}$ .  $Q = 2.91$  ( $N=120$ ).

**Basidiolos** clavados de 26.0–40.0 x 7.0–15.0  $\mu\text{m}$ , con granulaciones no amiloideas.

**Cistidios** digitados de 36.0–53.0 x 8.0–13.0  $\mu\text{m}$ . con pocas granulaciones no amiloideas.

**Basidios** clavados de 28.0–45.0 x 8.0–18.0  $\mu\text{m}$ , presentan granulaciones de tipo no amiloideas. Esterigmas de 1–4, en su mayoría bispóricos. Esterigmas de 2.0 – 8.0 x 1.0–2.0  $\mu\text{m}$ .

***Pileipellis* (hifas del píleo):** Ixo-tricodermico (hifas en tricoderma pero embebidas en material gelatinoso), de 8.0-20.0  $\mu\text{m}$  de grosor, hifas sin fíbulas y con paredes de aproximadamente 1.0  $\mu\text{m}$  de grosor. Presentan granulaciones no amiloideas dispersas. Las hifas de la cutícula se caracterizan por terminar en forma clavada, principalmente ovaladas, incluso esféricas o piriformes, con un ancho máximo de hasta 20  $\mu\text{m}$ .

***Stipeipellis* (hifas del pie y retículo):** Presenta elementos himenoforales (basidios, cistidios, etc.) en la parte alta del estípite. En la parte baja del estípite las hifas tienden a presentar formas clavadas con un ancho de hasta 10.0–15.0  $\mu\text{m}$ . Son notorios los caulocistidios, por su longitud tan variable en las muestras (de 30.0-78.0  $\mu\text{m}$  de longitud), aunque todos parten de una base ovoide y con extensiones alargadas con 2 segmentos (ref: 113.2004; 17.2008; 18.2008) y con 3 segmentos (ref: 19.2008; 28.2006; 1.2008). La base de estos cistidios varía de 6.0-65.0  $\mu\text{m}$  de largo x 4-20 $\mu\text{m}$  de ancho, el primer segmento de 8.0-70.0  $\mu\text{m}$  de largo x 5.0-18.0  $\mu\text{m}$  de ancho y en el segundo segmento, de 15.0-40.0 $\mu\text{m}$  de largo x 8.0-14.0  $\mu\text{m}$  de ancho.

**Material estudiado:** Ref. 17.2008, 18.2008, 19.2008 en bosque de *Pinus rudis*, aldea la Emboscada, San Miguel Siguilá, Quetzaltenango (26 de julio de 2008). Ref. 1.2008, bosque mixto de *Quercus*, *Pinus* y *Arbutus*, Chichicastenango (10 de julio de 2008). Ref. 113.04,

bosque mixto *Quercus*, *Pinus* y *Arbutus*, Momostenango (24 de julio de 2004). Ref. 28.2006 en bosque de *Pinus* sp. Finca “La Montañita” San Agustín Acasaguastlán, Sierra de las Minas, El Progreso.

## IX. DISCUSIÓN

La descripción de *Boletus pinophilus s.l.* de Guatemala se hizo a partir de seis muestras recolectadas en diferentes partes del país. Esta especie no es muy frecuente ni produce grandes cantidades de cuerpos fructíferos como sucede con otros hongos en el país o como sucede en Europa y Norteamérica, donde fructifica dos veces al año e incluso en grandes cantidades (9, 10, 27). Los lugares de recolecta en el país no difieren mucho entre sí en cuanto a altitud, clima, tipo de bosque y suelo (arenoso y calizo, con abundante piedra pómez) por lo que el material estudiado es representativo de la variedad que se ha propuesto y descrito en esta tesis.

La comparación bibliográfica de las muestras se hizo particularmente con la descripción original de la especie realizada por Pilát & Dermek y con los datos de varias fuentes europeas y norteamericanas; luego se procedió a comparar los datos obtenidos de la observación y medición de las muestras guatemaltecas analizadas (9, 26, 27).

Es importante resaltar que por tratarse de un estudio taxonómico en el que se carece de información escrita y detallada respecto a las microestructuras de la especie europea, la comparación con las muestras guatemaltecas se realizó por medio de *rangos numéricos* y por *análisis morfológico* de las variables microscópicas.

*Boletus pinophilus s. l.* en Guatemala difiere en algunos aspectos tanto macro como microscópicos respecto a la especie europea.

Mientras la especie europea alcanza en el píleo un diámetro máximo de 300 mm, las muestras guatemaltecas alcanzan un máximo de 135 mm, es decir hasta 150 mm menos de diferencia. Esta dimensiones llamativas podrían darse en aquellos sitios húmedos y fríos de Europa, donde los hongos pueden llegar a absorber mayor cantidad de agua e incluso beneficiarse del carbono del suelo. El largo del estípite, tiende a ser similar en ambos continentes (9), pero el diámetro reportado para Europa es de hasta 100 mm mientras que en Guatemala alcanza solamente 30 mm como máximo. Esta característica debe estar

asociada también al hábitat aunque no se debe descartar ninguna variación genética. Estas diferencias macroscópicas en conjunto señalan que *B. pinophilus* en Europa es más grande y robusto que *B. pinophilus s.l.* en Guatemala.

El color del píleo de la especie europea es café-rojizo oscuro, con tonos rojizos de granada o rojo cobre (9, 10) hasta violáceos (9), mientras que en las muestras guatemaltecas se presenta el color rojizo-cobre con predominio del color café, llegando incluso a un color café-chocolate. Para Europa se reporta un cambio de color en los más jóvenes pues aparecen cubiertos de una película blanca que desaparece con la edad; esto no se aprecia mucho en los ejemplares locales. Por otro lado, la coloración del estípite se hace más rojiza a medida que envejece o se manipula, siendo más notorio que en muestras europeas (Flores y Simonini, datos no publicados).

La morfología del píleo de ambas es similar, convexo a plano-convexo; sin embargo la forma del estípite cambia. También se menciona la presencia de una superficie rugulosa a rugosa en Europa (9, 10). La especie europea posee estípite grueso, bulboso a ovoide, a veces más ancho que el píleo, incluso desde las fases más tempranas o de “botón” (4, 9, 10), cosa no vista hasta el momento en las muestras guatemaltecas. Las muestras locales presentan estípite un poco clavado a sub-bulboso y no sobrepasa nunca el ancho del píleo.

En Europa, *B. pinophilus* está reportado como una especie de olor y sabor agradables, a veces poco perceptible o simplemente fúngico (4, 10). De hecho, se menciona en algunas referencias como el más pobre en olor de las 4 especies europeas del grupo *Edulis* (10), incluso con sabor terroso o de musgo, ácido y algo dulce (4). Las muestras guatemaltecas, por el contrario, muestran olor y sabor fuerte y agradable a ajo-almendra, mucho más fuerte que *B. edulis* (9). Flores R. (comunicación personal) reporta que el olor y sabor de las muestras locales sobrepasan a los de muestras frescas tanto de *B. pinophilus* como *B. edulis* en el área mediterránea. Esta es una característica fundamental a la hora de comparar ambas muestras ya que significa un cambio genético particular.

En la comparación del hábitat de *Boletus pinophilus*, ambas coinciden parcialmente en cuanto a su crecimiento en bosques de pino; sin embargo, en Europa crece también en suelos a baja altitud, bosques de encino y bosques de otras coníferas- *Abies*, *Picea*, *Larix*- (9), mientras que en Guatemala sólo se encuentra en bosques mixtos de pino (*Pinus*), encino (*Quercus*) y madroño (*Arbutus*), obligatoriamente en torno a los 2000 msnm y en suelos volcánicos ricos en piedra pómez y arenosos.

En cuanto a la microscopía de *Boletus pinophilus* de Guatemala es necesario mencionar que existe mucha variación entre las medidas de las estructuras analizadas, incluso en muestras recolectadas cercanamente, por lo que los rangos tienden a ser grandes. Por ejemplo, el largo de los basidios de las muestra 17.2008 y 18.2008 de Quetzaltenango y la 28.2006 de Sierra de las Minas muestran una variación de hasta 12  $\mu\text{m}$  mientras que en las otras es de 6-8  $\mu\text{m}$ . La Desviación Estándar tiende a ser grande por la variabilidad de las medidas.

Las variaciones entre muestras guatemaltecas también son notorias: la muestra 1.2008 posee basidios de 28-34  $\mu\text{m}$  de largo versus la muestra 19.2008, con basidios de 35-42  $\mu\text{m}$ . Esta variación se encuentra incluso en especímenes recolectados en la misma localidad. La muestra 19.2008 también presenta esterigmas más largos (hasta 8  $\mu\text{m}$ ) que el resto de las demás muestras. Los cistidios también presentan variación: en la muestra 1.2008 alcanzan un largo máximo de 44  $\mu\text{m}$  mientras que en la 17.2008 llegan hasta las 53  $\mu\text{m}$ . Estas diferencias intra-específicas pueden deberse la presencia de micro-especies (Simonini, comunicación personal) o a factores como altitud, clima y edad de los especímenes.

En cuanto a la microscopía de las muestras guatemaltecas respecto a los reportes de la bibliografía europea, se observan más diferencias que similitudes. La única similitud se encuentra en las dimensiones de las esporas: el rango del largo de las muestras guatemaltecas (13-17  $\mu\text{m}$ ), está dentro del rango de la especie europea (de 14-20  $\mu\text{m}$ ) (9). Aún así, el rango de la europea es mayor.

En cuanto a los cistidios podemos observar que los de las muestras guatemaltecas son un poco más pequeños (hasta 53.0  $\mu\text{m}$  de largo) respecto a las europeas (hasta 60.0  $\mu\text{m}$  de largo). En cuanto a la forma, Foiera (1993) especifica que los cistidios de *B. pinophilus* europeo son obclavados a digitados (30), similares por tanto a las muestras guatemaltecas. En la descripción de Pilát & Dermek sólo se reporta el rango de los cistidios sin mayores detalles de morfología (9). Para poder hacer una comparación completa fue necesario acceder a muestras europeas para su análisis porque hay variables que no se pueden comparar únicamente a nivel bibliográfico, como la morfología de basidios, cistidios, dimensión de esterigmas así como la descripción de los caulocistidios (9).

Respecto a los basidios, hay diferencia en las dimensiones: los de las muestras guatemaltecas tienden a ser más anchos (hasta 18  $\mu\text{m}$ ) que los de las europeas (hasta 12  $\mu\text{m}$ ). En cuanto a la longitud, las muestras locales son levemente más grandes. Una diferencia fundamental en los basidios es el número de esterigmas: la especie en Europa se reporta con un promedio de 4 esterigmas mientras que en Guatemala se ha encontrado una media de 2 esterigmas (9). El largo y el ancho de los basidios pueden tener influencia de los factores ambientales, la edad de los carpóforos o el manejo de las muestras durante el proceso de re-hidratación y observación microscópica, pero el número de esterigmas está más relacionado con su constitución genética.

En cuanto a la estructura pileica (disposición de las hifas, su forma, tamaño y presencia de incrustaciones y de mucílago) se encontró que es la característica que presenta mayor variabilidad entre las dos procedencias. En Europa, la dimensión de las hifas se reporta con un ancho máximo de 10  $\mu\text{m}$  mientras que para Guatemala las hifas alcanzan hasta 20  $\mu\text{m}$ .

El análisis microscópico comparativo con las dos muestras italianas de *B. pinophilus* fue fundamental para comparar variables no incluidas en la descripción original y que son importantes para este tipo de estudios. Los resultados de las muestras italianas coincidieron por completo con la descripción de Pilát & Dermek, por lo que se tomaron como referente microscópico de la especie europea. Se encontraron, sin embargo, algunas pequeñas

diferencias entre ellas. Por ejemplo, en las esporas: la muestra #1623 tiene esporas de hasta 16  $\mu\text{m}$  de largo mientras que en la #1622 alcanzan los 20  $\mu\text{m}$  (la descripción original menciona una longitud de 14-20  $\mu\text{m}$ ).

Al comparar los resultados del análisis de las muestras italianas con las guatemaltecas, se puede observar que sí existe diferencia en la dimensión de las microestructuras (variables comparadas) de ambas muestras y procedencias.

En cuanto a las esporas, las muestras italianas presentan un largo máximo de 20  $\mu\text{m}$  contra un máximo de 17  $\mu\text{m}$  en las guatemaltecas. La bibliografía europea y los datos de este estudio confirman la variación entre 14-20  $\mu\text{m}$  de longitud, que al compararse con las muestras locales, estas resultan un poco más pequeñas (13-17  $\mu\text{m}$ ).

En cuanto a los basidiolos las medidas de largo y ancho son muy similares; sin embargo, presentan diferencia en la morfología; los basidiolos de la especie italiana tienen cabeza ancha mientras que la morfología de los basidiolos de la especie guatemalteca es clavada.

Los cistidios de los especímenes italianos no pudieron ser analizados debido a la escasez de material (himenio); sin embargo, el aporte de Foiera sobre los mismos corrobora la similitud con las muestras locales (30).

Los basidios presentan variabilidad entre las dos procedencias, tanto en dimensiones como en morfología. Las muestras guatemaltecas poseen basidios un poco más largos (hasta 45  $\mu\text{m}$ ) que la especie europea (hasta 41  $\mu\text{m}$ ) y más anchos (18  $\mu\text{m}$  máximo contra 14  $\mu\text{m}$  de la europea). En cuanto a la forma de los basidios, los italianos poseen el extremo apical mucho más ancho mientras que los de guatemaltecos son clavados.

Por otro lado, los esterigmas de las muestras guatemaltecas son más largos (hasta 8.0  $\mu\text{m}$  de longitud) que los esterigmas de las muestras italianas (hasta 4.0  $\mu\text{m}$ ). La longitud de los esterigmas está en relación con la biología de los hongos, de modo que esterigmas

largos facilitan la expulsión de las esporas que es condicionada por factores ambientales y también al número de esterigmas. En un reciente estudio efectuado por Flores *et al.* sobre el género *Cantharellus* en Guatemala, se encontró que varias muestras locales poseían esterigmas más largos que los referidos en la bibliografía para *C. cibarius* en Europa e incluso para otras de origen norteamericano (24, 31).

El análisis entre muestras guatemaltecas e italianas mostró también que la disposición de las hifas de la cutícula es en ixotricoderma (un tricotoderma embebido en abundante material gelatinoso; esta disposición puede variar en algunas porciones a casi forma de cutis). Las hifas de las muestras guatemaltecas son clavadas a globosas con un ancho máximo de 20  $\mu\text{m}$  mientras que las hifas de las muestras italianas presentan forma sub-aguda a clavada con un ancho máximo de 15  $\mu\text{m}$ . La abundancia de hifas terminales ovaladas o globosas resulta muy notorio respecto a las muestras europeas. Por otro lado, resulta llamativo que en el estudio publicado por Beugelsdijk *et al.* (2008) se describe el píleo de *B. pinophilus* con cutícula gruesa y gelatinosa, de color café-rojizo oscuro, glabra y con elementos terminales del pileipellis de hasta 27  $\mu\text{m}$  de ancho, con pigmento parietal café-rojizo y pigmento incrustante que se disuelve en KOH (35). En esta tesis se encontró un ancho máximo de 20  $\mu\text{m}$  para las muestras guatemaltecas, lo que demuestra que hace falta estudiar con mayor profundidad la estructura microscópica de este grupo de hongos. Por otro lado, las muestras guatemaltecas mostraban abundantes pigmentos incrustantes en las hifas de la cutícula, al observarse en agua destilada y parcialmente en KOH. Beugelsdijk *et al.* (2008) dió una confirmación sobre la presencia de las incrustaciones en *B. pinophilus*, que no se menciona en la descripción de Pilát & Dermek. En el análisis de las muestras italianas se encontraron incrustaciones pero mucho más escasas que en las guatemaltecas.

Todo este cúmulo de diferencias encontradas y analizadas nos llevan a afirmar que *B. pinophilus s.l.* de Guatemala no es la misma especie genética que *B. pinophilus* de Europa, por lo que temporalmente debe considerarse una nueva variedad para la ciencia hasta que se analice de una manera más profunda a nivel molecular.

La duda de que *B. pinophilus* y otros del grupo *Edulis* crezcan de forma natural en América, al menos en Norteamérica, ha sido planteado por varios micólogos estadounidenses (25, 27, 33). Arora (2008) ha propuesto que lo que se conocía como *B. pinophilus* en California se cambie a *Boletus rex-veris*. Este boletal se conocía primero como *B. edulis* y luego como *B. pinophilus*; sin embargo al analizarlo detenidamente se llegó a la conclusión de que se trata de una especie muy cercana pero distinta de *B. pinophilus* de Europa (33).

Este trabajo de tesis determina también que *Boletus pinophilus s.l.* de Guatemala es diferente de *Boletus rex-veris* sp. nov. por la morfología, hábitat y tipo de crecimiento (33). Las principales diferencias son:

El píleo de *B. pinophilus* de Guatemala presenta un máximo de 135 mm de diámetro, mientras que *Boletus rex-veris* alcanza los 300 mm. La superficie de *B. pinophilus* de Guatemala es viscosa-untuosa mientras que *B. rex-veris* presenta superficie típicamente no viscosa. El estípite de *B. pinophilus* de Guatemala es mucho más delgado (hasta 30mm diámetro) y de 40-170 mm longitud, clavado a sub-bulboso mientras que *B. rex-veris* alcanza los 100 mm de diámetro y de 50-200 mm longitud, con típicamente clavada (33).

Según Arora *B. rex-veris* tiene un sabor suave, mientras que *B. pinophilus s.l.* tiene un sabor fuerte y agradable a ajo-almendra. En cuanto al hábitat, aunque ambas especies crecen en bosques de pino, *B. rex-veris* crece en asociación con más coníferas en alturas medias (aprox. 1200 msnm) hasta los 2100 msnm (33).

En cuanto a la microscopia, *B. pinophilus s.l.* de Guatemala presenta esporas cilíndricas ( $Q = 2.91$ ), de hasta 17  $\mu\text{m}$  de largo mientras que *B. rex-veris* posee esporas elipsoideo-subfusiformes ( $Q = 3.02$ ), con una longitud máxima de 19  $\mu\text{m}$ . Los basidios de *B. rex-veris* son más largos (65  $\mu\text{m}$ ) y delgados (11.5  $\mu\text{m}$ ) que los basidios de *B. pinophilus* guatemalteco (45  $\mu\text{m}$  x 18  $\mu\text{m}$ ). Los cistidios de *B. rex-veris* son más largos (hasta 70  $\mu\text{m}$ ) y cilíndricos a clavados respecto a las muestras locales (hasta 53 $\mu\text{m}$ ) que son digitados (33).

*B. pinophilus* de Guatemala es más parecido a la especie del Este de Norteamérica (27). En cuanto a olor y sabor, ambas coinciden en que el sabor es más fuerte que *B. edulis*. Esta es una característica fundamental a la hora de comparar ambas especies (26, 27).

En cuanto al hábitat, ambas crecen en bosques de pino. Sin embargo la fructificación es algo que merece mayor estudio. Metzler & Metzler mencionan que crece solitario – similar a la especie guatemalteca- pero que en la costa Oeste crece cespitoso (*B. rex-veris*), es decir varios especímenes de un mismo pie (20). En Norteamérica está ampliamente distribuido y produce fructificaciones abundantes pero en Guatemala su distribución se limita a alturas en torno a los 2000 msnm y su fructificación es escasa (1, 16, 20).

El análisis molecular realizado por Flores (Anexo 4) sobre *Boletus* grupo *Edulis* en Guatemala incluyó varias especies y muestras guatemaltecas, incluyendo una muestra de Quetzaltenango de *B. pinophilus s.l.* la cual fue comparada con varias muestras de *B. pinophilus* europeos y una de *B. mottiae* de EEUU, una especie muy cercana a *B. pinophilus*. El estudio señaló poca diferencia genética entre las especies afines al agruparlas en un mismo clado. Aunque la muestra guatemalteca encaja perfectamente con *B. pinophilus* Pilát & Dermek puede mostrar distancias al manejarse bajo ciertos aspectos moleculares o por análisis de sustitución de nucleótidos (1).

Por tanto, basándose en los análisis y comparaciones macroscópicas y microscópicas realizados, se da por comprobada la hipótesis de este estudio, de que *Boletus pinophilus* de Guatemala posee al menos una variedad morfológica en sus microestructuras respecto a la especie en Europa y se concluye que *B. pinophilus s.l.* de Guatemala es diferente a *B. pinophilus* Pilát & Dermek europeo y al *B. pinophilus* de California (*B. rex-veris*), pero mantiene similitud con el que se encuentra en la costa Este de Norteamérica.

Tomando en consideración la parte molecular publicada hasta la fecha, nos limitamos a proponer una nueva variedad: ***Boletus pinophilus* var. *americanus* R. Flores & G. Che.** El nombre de la variedad, *americanus*, hace referencia al Continente y para que sea una referencia a la entidad que se encuentra en la costa Este de Norteamérica.

## X. CONCLUSIONES

1. *B. pinophilus* en Europa es más grande y robusto que *B. pinophilus s.l.* en Guatemala.
2. *B. pinophilus* en Guatemala tiene sabor y olor más intensos que *B. pinophilus* en Europa.
3. La variabilidad en las medidas de las microestructuras de las muestras guatemaltecas de *B. pinophilus* analizadas es amplia y aplica a la mayor parte de las mismas (forma y ancho de basidios, número de esterigmas, largo de las esporas, cistidios digitados, basidiolos más cortos, presencia de caulocistidios, hifas con gruesas incrustaciones en el pileipellis y notorio desarrollo de hifas globosas en el mismo).
4. La mayor diferencia microscópica entre las muestras guatemaltecas y las europeas es la estructura y morfología de las hifas del píleo.
5. *B. pinophilus s.l.* en Guatemala es más semejante a la descripción macroscópica de *B. pinophilus* de la corta Este de Norteamérica.
6. *B. pinophilus s.l.* en Guatemala debe considerarse, al menos temporalmente, como una variedad de *B. pinophilus* Pilát & Dermek.
7. Se propone a *B. pinophilus s.l.* en Guatemala como: ***Boletus pinophilus var. americanus***

**R. Flores & G. Che**

## XI. RECOMENDACIONES

1. Adquirir muestras europeas o norteamericanas para hacer una comparación microscópica más detallada que apoye la propuesta de la nueva variedad o confirmar la presencia de una nueva especie local.
2. Realizar un análisis molecular con las muestras incluidas en este estudio para ampliar la información filogenética y considerar especímenes *typus* que sean depositados en Herbarios extranjeros.

## XII. REFERENCIAS

1. Flores R. *Lactarius* sección *Dapetes* y *Boletus* grupo *Edulis* en Guatemala; micorrización y estudio filogenético. España: Universidad de Murcia, (Tesis doctoral, Facultad de Biología) 2003. 232p. (14-27).
2. Agerer R. Mycorrhizae: Ectomycorrhiza and Ectendomycorrhiza. Special Topic 1995. 461-450.
3. Flores R. & Simonini G. Contributo alla conoscenza delle *Boletales* del Guatemala. Riv Micol 2000; 2:124-145.
4. Galli G. I Boleti; Atlante pratico-monografico per la determinazione dei boleti. Italia: Edinatura, 1996. 287p. (162-165).
5. Bran M, *et al.* Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 2003. 8-24.
6. Flores R. *et al.* Hongos micorrícicos asociados a pino y pinabete en Guatemala. Guatemala: Dirección General de Investigación/Universidad de San Carlos de Guatemala, 2000. 58p. (50-52).
7. Carranza J, Mueller G. Fungi of Costa Rica: selected studies on biodiversity and ecology. Rev Biol 1996. 15-89.
8. Moser M. Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales). Londres, Inglaterra: Geoffrey Kibby 1978. 534p. (72-76).
9. Pilàt A, Dermek A. Boletaceae. Chiavi per le descrizioni sulla famiglia Boletaceae Maire. Vicenza, Italia: Gruppo Micologico Bresadola. 163p. (74-82).

10. Papetti C, Consiglio G, Simonini G. Atlante fotografico dei Funghi d'Italia. Italia: Associazione micologica Bresadola, 1999. 511p. (369-384).
11. Hall I. *et al.* Edible and poisonous Mushrooms of the World. New Zeland Institute for Crops & Food: Research Limited. Timber Press Inc., 2003. 299p. (235-255).
12. Singer R. La fitogeografía de la Boletineas (Basidiomycetes, Agaricales) en relación a las especies mexicanas. *Rev Mex Mic* 1988; 4: 267-274.
13. Vivero J. *et al.* The Red List of Trees of Guatemala; Fauna & Flora International. Cambridge. 2006. 48p.
14. Ortiz-Santana B. *et al.* Boletes from Belize and the Dominican Republic. *Fungal Diversity* 2007; 27: 247-416.
15. Halling R. Boletaceae: Latitudinal biodiversity and biological interactions in Costa Rica and Colombia. IN: Carranza, J. *et al.* Fungi of Costa Rica: Selected Studies on Biodiversity and Ecology. *Biol Trop* 1996; 44: 111-114.
16. Halling R. & Mueller G. Common Mushrooms of the Talamanca Mountains, Costa Rica. New York: The New York Botanical Garden, 2005. 179p. (34-78).
17. Perry J, Graham A, Richardson D. The History of *Pinus* of Mexico and Central America In: *Ecology and Biogeography of Pinus*. United Kingdom: ed. D.M. Richardson. Cambridge University Press, 1998. 165p. (137-149).
18. Lodge D. *et al.* Emerging biogeographic patterns among macrobasidiomycete fungi in the Greater Antilles. In: *Biogeography of Plants in the Greater Antilles* 2001; 12-16.
19. Henkel T, Terborgh J, Vilgalys R. (2002). Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. *Mycol Res* 2002; 106: 515-531.

20. Flores R, Díaz G, Honrubia M. *Boletus edulis* Group in Guatemala: diversity and phylogenetic analysis. *Abstract Book of the 5<sup>th</sup> International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. Chuxiong, China. 2007. 24p. (10-16).
21. Flores R, Bran M, Honrubia M. Edible mycorrhizal mushrooms from Guatemala. *In*: Hall I, Yun W., Danell E., Zambonelli A. (Eds). *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. New Zealand Institute for Crop & Foods Limited. New Zealand. 2002.
22. Morales O, Flores R, Samayoa B, Bran M. Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. *Revista Científica* 2002; 15: 10-20.
23. Bran M, Flores R, Rodríguez E, Culajay F. Hongos ectomicorrícicos asociados a *Abies guatemalensis*, *Pinus rudis* y *P. ayacahuite* de la Sierra de Los Cuchumatanes y su aprovechamiento en la producción de planta forestal micorrizada (Fase I). DIGI-USAC, 1998. 23p. (4-10).
24. Flores R. *et al.* “*Cantharellus* y *Craterellus* en Guatemala: diversidad y análisis microscópico de siete especies representativas en el país. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC)* 2008; 4: 36-41.
25. Binder M, Hibbett D. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycol* 2006; 971-981.
26. Bessette E. *et al.* *North American Boletes, a color guide to the fleshy pored mushrooms*. New York: Syracuse University Press, 2000. 379p. (87 –172).
27. Metzler S. & Metzler V. *Texas Mushrooms. A Field Guide*. USA: University of Texas. Press, 1992. 350p. (204-205).

28. Montoya A. *et al.* Traditional knowledge about mushrooms in a Nahua community in the state of Tlaxcala, México. *Mycol* 2003; 793-806.
29. Jones E. *et al.* The Relationship between Nontimber Forest Product Management and Biodiversity in the United States. National Commission on Science for Sustainable Forestry Institute for Culture and Ecology. 2005.
30. Foiera F. *et al.* *Funghi Boleti*. Bologna, Italia: Edagricole, 1993. 260p. (100-101).
31. Largent D. *et al.* How to identify mushrooms to genus III: Microscopic Features. Arcata, California: Mad River Press Inc. 148p. (14-50).
32. Beugelsdijk D. *et al.* A phylogenetic study of *Boletus* section *Boletus* in Europe. *Persoonia* 2008; 20: 1-7.
33. Arora D. California porcini: Three New Taxa, observations on their harvest, and the tragedy of No Commons. *Economic Botany* 2008; 62: 356-375.

## XIII. ANEXOS

## ANEXO 1



Foto: R. Flores

Muestras de *B. edulis* y *B. pinophilus*, en Barcelona (13).

## ANEXO 2



Foto: G. Che

*B. pinophilus s.l.* de Quetzaltenango

**ANEXO 3:**

Modelo estadístico empleado:

Tipo MORFOMÉTRICO:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{\delta^2}$$

En donde:

n = Número de muestra.

$\sigma$  = Desviación estándar de las mediciones.

z = Nivel de confianza.

$\delta$  = Limite de error.

Asumiendo que:

$$\sigma^2 = \delta^2$$

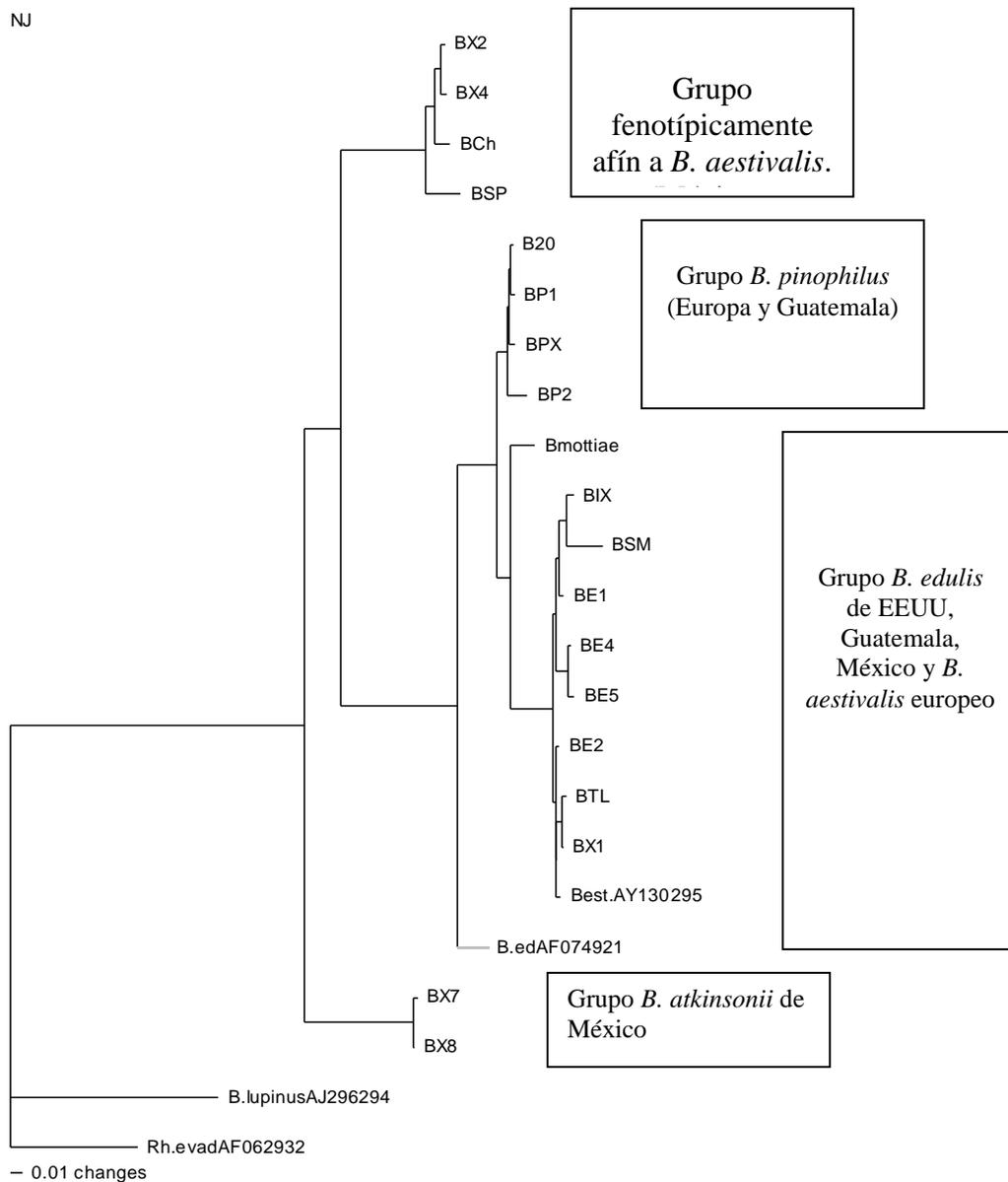
Entonces:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{\delta^2} \quad \mathbf{n = z^2}$$

Nivel de confianza	Z	Z <sup>2</sup>	Aproximado
90	1.64	2.70	3
95	1.96	3.84	4
99	2.58	6.65	7

Al trabajar con un nivel de confianza del 99%, se debe de tomar un tamaño mínimo de muestra de 7, es decir 7 repeticiones.

**ANEXO 4:** Filograma de *Boletus* grupo *Edulis* con Neighborn-joining.



Tomado de: Flores R. 2003. *Lactarius* sección *Dapetes* y *Boletus* grupo *Edulis* en Guatemala. Micorrización y estudio filogenético. Universidad de Murcia, España. La muestra **BPX** corresponde a *Boletus pinophilus* s.l. de Quetzaltenango.