

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



CLAUDIA MARIELA RENDÓN TERRAZA

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Abril de 2010

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



CLAUDIA MARIELA RENDÓN TERRAZA

Para optar al Título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Abril de 2010

## ACTO QUE DEDICO

- A Dios: Por ser todo en mi, y estar conmigo en cada paso que doy.
- A mis padres: Fernando Rendón por su ejemplo de nobleza, sus fuerzas, su dedicación, su cariño y gran amor.  
María Elena de Rendón por ser mi ejemplo de fortaleza de apoyo, por su amistad y amor incondicional.
- A mis Hermanos: Fernando y Alejandro por su apoyo y amor.
- A mi esposo: Douglas por tu paciencia, tu apoyo tu comprensión y el amor que hemos compartido durante estos años y los que nos faltan. También te amo con todo mi corazón.
- A mi hija: Diana, el amor de mi vida, mis fuerzas para seguir adelante y dar lo mejor de mi en todo. Te amo y te quiero mucho.
- A mis abuelitas: Mama Cotía por su gran amor y dulzura que da a mi vida.  
A la abuelita Helent por sus fuerzas, amor, enseñanzas que me llevaron a ser parte de lo que soy.
- A mis primos: Por su amistad y cariño a lo largo de mi vida y de mi carrera.
- A mis tíos: Por su apoyo y cariño.
- A mis Suegros: Don Mario y Doña Mirthala por su cariño, su apoyo y comprensión.
- A mis cuñados: Lorena, Mario, Ale e Irene por su apoyo y amistad, los quiero mucho.
- A mis amigos: A todos Gracias por estar con migo y apoyarme en todo momento.
- A mis catedráticos: Por compartirme sus conocimientos como profesionales y confiar en mis capacidades como su alumno.

## AGRADECIMIENTOS

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

A la Licenciada María del Carmen Bran y Dr. Roberto Flores, mi agradecimiento especial por revisar esta tesis.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, a la Escuela de Química Biológica.

Al Departamento de Microbiología y a la Unidad de Biodiversidad, Aprovechamiento y Tecnología de Hongos.

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

Al Licenciado Juan Mario Dary y al Ingeniero Juan Pablo Dary por el apoyo y confianza que me brindaron en la etapa final de este proyecto.

**JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lilian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal VI
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

## INDICE

I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCCIÓN.....	8
III. ANTECEDENTES.....	9
A. Generalidades.....	9
B. Hongos comestibles y su cultivo.....	10
C. Polyporus umbellatus.....	11
1. Descripción.....	11
2. Clasificación.....	11
3. Hábitat Natural y distribución:.....	12
4. Etnomicología.....	12
5. Propiedades.....	12
6. Comercialización.....	13
7. Cultivo.....	13
IV. JUSTIFICACIÓN.....	14
V. OBJETIVOS.....	15
A. GENERAL.....	15
B. ESPECÍFICOS.....	15
VI. HIPÓTESIS.....	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
A. UNIVERSO.....	17
B. MATERIALES.....	17
C. METODOLOGÍA.....	19

D. Diseño Experimental .....	21
VIII. RESULTADOS .....	23
1. Crecimiento Miceliar .....	23
2. Producción de Inóculo .....	27
3. Producción de Esclerocios .....	28
IX. DISCUSIÓN .....	29
X. CONCLUSIONES .....	32
XI. RECOMENDACIONES .....	33
XII. REFERENCIAS .....	34
XIII. ANEXOS .....	36

## I. RESUMEN

En Guatemala existe un gran número de especies de hongos, de las cuales se conocen unas 70 comestibles, una de ellas es *Polyporus umbellatus*, Este hongo, aparte de sus propiedades gastronómicas, tiene propiedades medicinales como antidiurético e hipotensor, pero principalmente es utilizado para el tratamiento de leucemia y cáncer de pulmón (6,10,11).

Por las cualidades que presenta esta especie se consideró oportuno estudiar las características miceliales de cultivo *in vitro* de la cepa guatemalteca de *Polyporus umbellatus* 25.2000, para determinar el medio y la temperatura donde presente mejor desarrollo, evaluar la producción de inóculo, utilizando diferentes sustratos y temperaturas y ensayar la producción de esclerocios mediante la utilización de aserrín de encino (*Quercus* spp.).

Las colonias de la cepa *P. umbellatus* 25.2000 presentaron color blanco, textura algodonosa y escaso micelio aéreo en los medios PDA y EMA, mientras que en medio PDA-IM formó abundante micelio aéreo; microscópicamente presentaron hifas hialinas y fíbulas en regular cantidad. En el medio SAB, presentaron color blanco y textura compacta, sin micelio aéreo; microscópicamente se observaron fíbulas abundantes. Las hifas de mayor diámetro se formaron en los medios PDA, SAB y EMA, y las hifas más angostas se registraron en el medio PDA-IM. Todas las características se presentaron tanto a 18°C como a 26°C.

La cepa *P. umbellatus* 25.2000 presentó el mayor diámetro medio (52.02 mm.) con una tasa radial de crecimiento de 5.20 mm/día, en medio PDA-IM a 26° C. El menor diámetro medio (23.22mm) con tasa radial de crecimiento 2.32 mm/día se observó en SAB a 18° C, que representa una diferencia significativa entre ambos medios de cultivo y temperatura ( $p = 0.017$ ), según el análisis estadístico utilizando la prueba de ANDEVA.

Respecto a la producción de inóculo de esta cepa en los vehículos utilizados, no se obtuvo crecimiento de micelio en maicillo, cebada y trigo en las dos temperaturas (18° C y 26° C) ensayadas. Tampoco se obtuvo producción de esclerocios en aserrín de encino a 18° C, por lo que se indica que este sustrato no es el adecuado para ese fin a esta temperatura o temperaturas cercanas. Se recomienda realizar estudios alternos para la producción de inóculo ya que se hace muy caro su cultivo sin reproducción de biomasa.

## II. INTRODUCCIÓN

La civilización maya se desarrolló en muchos aspectos: sociales, científicos y técnicos que sobrepasaron en gran manera a civilizaciones contemporáneas de otras partes del planeta. En cuanto al arte culinario, las civilizaciones americanas forzosamente tuvieron que ser diferentes a las del resto del mundo por la riqueza natural propia del continente; sin embargo, tanto los mayas como el resto de civilizaciones antiguas, conocieron las propiedades comestibles de los hongos.

En Guatemala existe un gran número de especies de hongos, de las cuales se conocen unas 70 comestibles. Sin embargo, actualmente el cultivo de hongos comestibles está limitado a muy pocas especies.

Uno de los hongos comestibles que crecen naturalmente en Guatemala es *Polyporus umbellatus*, el cual es muy popular en otras partes del mundo pero poco en nuestro país. Este hongo, aparte de sus propiedades gastronómicas, tiene propiedades medicinales como antidiurético e hipotensor, pero principalmente es utilizado para el tratamiento de leucemia y cáncer de pulmón.

Debido a la importancia y propiedades que posee esta especie, se consideró oportuno ensayar el cultivo *in vitro* de la única cepa aislada en Guatemala y evaluar su producción en forma de inóculo y esclerocios, a efecto de desarrollar un procedimiento apropiado para su cultivo.

Por este motivo se consideró conveniente describir las características miceliales de cultivo *in vitro* de la cepa nativa *Polyporus umbellatus* 25.2000, determinándose el medio y la temperatura donde presentó mejor desarrollo, su producción como inóculo en diferentes sustratos y temperaturas, así como el ensayo de producción de esclerocios mediante utilización de aserrín de encino (*Quercus* spp.) como medio de propagación o cultivo.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

Los hongos son seres vivos que se encuentran clasificados dentro del reino Fungi. Se diferencian del resto de los microorganismos vivos, en su estructura microscópica en base de hifas, en sus procesos de reproducción diferentes a los de los animales y vegetales y en la composición química de sus células. Desde el punto de vista del tamaño de las fructificaciones que producen los hongos, se pueden clasificar en macromicetos y micromicetos (1).

El reino de los hongos incluye cuatro phyla, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*, clasificación que refleja las relaciones evolutivas hipotéticas de los organismos que conforman este reino (2).

La influencia de los hongos sobre el medio es enorme, en parte debido a que es el segundo grupo más grande en especies de la tierra después de los insectos (4).

Además, los hongos tienen un papel ecológico muy importante en todos los sistemas como descomponedores de la materia orgánica, contribuyen a la formación de suelo. Muchos hongos dependen o influyen en las plantas vasculares, en los animales, en el hombre e incluso en otros hongos (4).

Según su nutrición, los hongos se clasifican en saprófitos, ésto es, desarrollándose sobre materia orgánica en descomposición; pueden vivir en simbiosis con otras plantas o pueden vivir como parásitos, estos son los que se desarrollan y llevan a cabo su existencia sobre tejidos vivos (3).

Independientemente de la gran importancia ecológica de los hongos, está su utilidad en la vida cotidiana del hombre. Son muchas la especies comestibles que utiliza el hombre desde tiempos inmemorables y modernamente numerosas las que cultiva o que usa para la obtención de proteínas, ácidos orgánicos, agentes antitumorales, antibióticos, alcaloides, hormonas y diversos medicamentos (4).

## B. Hongos comestibles y su cultivo

Desde la antigüedad, los hongos eran considerados elementos poseedores de propiedades mágicas; ciertas variedades eran muy apreciadas, tanto por su sabor agradable como por sus presuntos efectos afrodisíacos (3,6).

Los hongos son ricos en sales minerales, fibras, carbohidratos, azúcares, proteínas (en forma de aminoácidos), vitaminas (de los complejos B, C, D y E) y minerales (potasio, fósforo, calcio, hierro y manganeso). Sus propiedades medicinales hacen que su consumo sea además saludable (6,12).

Contienen todos los aminoácidos esenciales para el hombre incluyendo lisina y metionina que se encuentra en muy pequeñas cantidades en las plantas, además de ser fuente de varias vitaminas, fibra y minerales (6).

La actividad meramente artesanal de cultivar hongos en forma experimental o casera ha ido dando lugar paulatinamente a pequeñas industrias primero, y luego a verdaderas empresas, en donde el cultivo de hongos comestibles se ha tornado una actividad semi-industrial rentable (5).

Existen más de 2.000 especies comestibles, de las cuales son muy pocas las que se cultivan. Entre las especies que son más cultivadas se encuentran *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* (más conocida como shiitake), *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra), y *Agaricus blazei*, entre otras (8,9).

Las especies que se cultivan a nivel mundial hasta el momento son *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Ganoderma spp.*, *Volvariella volvacea*, *Tremella fuciformis*, *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus florida*, *Pholiota nameko*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus bitorquis*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus citrinopileatus* (11).

El cultivo de los hongos en Guatemala empezó hasta finales de los años cincuentas con *Agaricus bisporus*, el cual se estableció comercialmente durante los años setentas. En el año 2002 se produjeron cerca de 68,504kg de *A. bisporus* y *A. bitorquis*; 34,020kg de *L. edodes*, y 29,580kg de

*Pleurotus*. Otros hongos como *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* y *Pholiota nameko* se producen experimentalmente desde 1995 (9,10).

## C. *Polyporus umbellatus*

### 1. Descripción

*Polyporus umbellatus* Fr., se conoce también como *Grifola umbellata* (Pers.: Fr.). Los cuerpos fructíferos de esta especie en el estado silvestre emergen desde un esclerocio bajo tierra, con textura similar a madera y con infinidad de rizomorfos, luego forma fructificaciones semiesféricas, con numerosos sobrerillos que emergen de una base en común, con un color grisáceo al inicio y pardo al final. El estípite es central o algo excéntrico (Anexo 1). Posee hifas generativas de 2-12  $\mu\text{m}$  de diámetro, hialinas, de finas paredes, con fíbulas (3,6,11,14).

El himenio está formado por tubos muy cortos, netamente decurrentes, con poros de 1 a 3 milímetros de diámetro, blancos, manchados de crema al final. Microscópicamente, presenta basidios de 9-30  $\mu\text{m}$ , claviformes, tetraspóricos, sin fíbulas. Las esporas miden de 8-11 x 4  $\mu\text{m}$ , cilíndricas, lisas, hialinas, gutuladas (6,14).

### 2. Clasificación

Se clasifica de la manera siguiente (3, 6,12):

Reino: *Fungi*

Phylum: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Poriales*

Familia: *Polyporaceae*

Género: *Polyporus*

Especie: *umbellatus* (Pers.: Fr.).

### 3. Hábitat Natural y distribución:

Se encuentra en las regiones templadas de China, Corea, Europa y Norte y Centro América, aunque es poco frecuente en regiones boscosas del área norte-central y noreste de Norte América (3,9).

Crece en el suelo, fructificando en raíces muertas o madera enterrada, debajo de ciertos árboles como *Quercus*, *Fagus* y *Populus*; en árboles de maple, sauce y se ha reportado raramente en bosques de coníferas (8,9).

En Guatemala se ha encontrado creciendo bajo árboles de encino (*Quercus* spp), en Tecpán Chimaltenango (8,9,13).

### 4. Etnomicología

En Guatemala se conoce como rujolom moch (cabeza de chivo) y raq' mes (lengua de gato) en idioma Kaqchikel. En China se conoce como zhu Ling (Hog tuber en inglés que significa tubérculo de cerdo) y en Japón como Chorei-maitake y Tsuchi-maitake (Wild borrad's dung en inglés que significa estiércol de jabalí salvaje) (3,8).

### 5. Propiedades

Es un excelente hongo comestible, tanto el carpóforo como el esclerocio, cuya última porción es blanda, dulce a insípida. Su contenido nutricional es de 8% de proteínas, 47% de fibra y 5 % de carbohidratos. El esclerocio posee más polisacáridos y menos proteína que el cuerpo fructífero (3,12).

*P. umbellatus* contiene propiedades hipotensoras, diuréticas y es utilizado para alteraciones urinarias como nefritis aguda; también se obtienen excelentes resultados para el tratamiento de vómitos, insolaciones y diarrea, ictericia, cirrosis y ascitis. También es utilizado en el tratamiento de leucemia y cáncer de pulmón (Anexo 3)(12,13).

## 6. Comercialización

En China se exporta el esclerocio para cultivo, ya sea entero, en pedazos o seco; los cuerpos fructíferos se venden frescos para su consumo (figura No 2). En Guatemala se vende el Km 94 de la carretera CA-1 y en el mercado de Tecpán, Chimaltenango, comercializándolo de forma unitaria con un valor aproximado de Q6.00 el cuerpo fructífero (3).

## 7. Cultivo

Los medios de cultivo sugerido para el cultivo de *P. umbellatus* son agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (EMA) y agar Sabouraud (SAB), a una temperatura de 15 a 24°C, con una humedad relativa de 90 a 100%, con requerimiento de CO<sub>2</sub> mayor a 500 ppm, con una duración de crecimiento de 21 a 30 días (3,14,15).

El inóculo se produce en granos de maicillo, cebada o trigo, y para la formación del esclerocio debe ser trasladado a aserrín a una temperatura de 10 a 18°C con una humedad relativa de 90 a 100%, con un requerimiento de CO<sub>2</sub> mayor a 5000ppm, en condiciones de oscuridad, con una duración de 60 a 90 días. Para la formación de los cuerpos fructíferos, no se ha tenido mucho éxito en su cultivo ya que *P. umbellatus* se comporta como saprófito secundario, esto quiere decir que depende de las habilidades degradativas de otros hongos. Esto ha sido utilizado para lograr una mayor fructificación en sustratos reciclados, es decir, un sustrato que ha sido utilizado para el crecimiento de otros hongos, como Shiitake o Maitake. En China el método más utilizado es el "modelo natural modificado", donde el esclerocio es inoculado en troncos que se deben enterrar cerca de las raíces de los árboles como sauce, maple o encino (3,14,15).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país con una alta diversidad de especies de hongos, muchas de las cuales aún no son conocidas o han sido muy poco estudiadas en cuanto genética, cultivo y aprovechamiento. Como ha sido reportado, en algunas regiones de nuestro país existe cultura relacionada con la ingesta y utilización de los hongos.

*Polyporus umbellatus* es un hongo comestible silvestre muy poco conocido en Guatemala, siendo utilizado como alimento solamente en Tecpán, Chimaltenango. En otros países como China, Japón, Corea y algunos de Europa, aparte de manejarlo con fines comestibles, es utilizado por sus propiedades medicinales como hipotensor y diurético, pero principalmente para el tratamiento de cáncer de pulmón y leucemia.

En Guatemala gracias a los trabajos ejecutados sobre la diversidad fúngica, se ha podido establecer que existe una rica micobiota que puede ser utilizada como una alternativa alimenticia y como un medio de ingresos económicos para el desarrollo de las comunidades.

Actualmente en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se ha aislado una cepa de *Polyporus umbellatus*, la cual no ha sido estudiada para cultivo hasta el momento. Por tal motivo se consideró oportuno evaluar el crecimiento de la cepa sobre varios medios sólidos, describiendo sus características miceliales y su cultivo en forma de inóculo, así como el estudio de la producción de esclerocios *in vitro* a nivel de laboratorio, a efecto de desarrollar un procedimiento apropiado para su cultivo dadas las oportunidades medicinales y alimenticias que posee.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Determinar las características de cultivo de una cepa de *P. umbellatus* con el fin de que puedan ser utilizadas posteriormente para la producción de cuerpos fructíferos

### B. ESPECÍFICOS

1. Evaluar la velocidad media de crecimiento micelial de una cepa de *P. umbellatus* en tres medios de cultivo (PDA, SAB, AEM), a dos diferentes temperaturas (18°C y 26°C), para determinar el medio y la temperatura donde las cepas presenten un mejor crecimiento.
2. Evaluar la producción de inóculo de una cepa de *P. umbellatus* utilizando como sustrato granos de maicillo, cebada y trigo, a dos diferentes temperaturas (18°C y 26°C), para establecer el sustrato y temperatura donde las cepas presenten un mejor crecimiento.
3. Ensayar la producción de esclerocios de la cepa 25.2000 *P. umbellatus in vitro* utilizando aserrín de encino y observando el tiempo de colonización micelial y la producción de los mismos a 18°C.

## VI. HIPÓTESIS

1. La cepa de *Polyporus umbellatus* presenta mayor crecimiento miceliar en el medio PDA a 26°C.
2. El maicillo es el mejor sustrato para producir el inóculo de *P. umbellatus* a ambas temperaturas.
3. Es posible producir esclerocios de *P. umbellatus* utilizando aserrín de encino como sustrato a una temperatura de 18°C.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO

Una cepa guatemaltecas de *Polyporus umbellatus* (25.2000) proporcionada por el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrizicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### B. MATERIALES

#### 1. Medios de cultivo

Agar Sabouraud (SAB)

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Agar Papa Dextrosa con infusión de madera de encino (PDA-IM)

Agar Extracto de Malta (EMA)

#### 2. Reactivos

Agua desmineralizada estéril

Etanol al 70%

#### 3. Sustratos

Granos de maicillo

Granos de trigo

Granos de cebada

Aserrín de encino

#### 4. Cepa

Cepa *P. umbellatus* 25.2000

## 5. Equipo

Balanza semianalítica

Balanza analítica

Campana de flujo laminar

Mechero

Autoclave

Incubadoras

Papel filtro

Asas de nicromo

Oradores de 7mm de diámetro

Estereóscopo o Lupa tipo cuenta hilos de 10 a 15 aumentos

Regla

Bisturí No. 20 o 22 con mango No. 4.

Incubadora a 18°C.

Incubadora a 26°C.

## 6. Cristalería

Probetas graduadas de 150, 250 y 1000

Erlenmeyer de 500 y 1000ml

Cajas plásticas de Petri de 20cc

Pipetas graduadas de 0.1 a 10ml

Tubos de ensayo

Pipetas Pasteur

Frascos de vidrio con tapadera de rosca y respiradero.

## C. METODOLOGÍA

### FASE 1. Evaluación del crecimiento miceliar

1. Se revitalizó la cepa de *P. umbellatus* en medios de cultivo sólidos (PDA)
2. Se prepararon los medios de cultivo: agar extracto de malta (EMA), agar Sabouraud (SAB), agar Papa Dextrosa (PDA) y agar Papa dextrosa con infusión de encino (PDA- IM). La infusión de encino se prepara hirviendo 45 g de viruta de madera de encino (*Quercus spp*) en 1500 ml de agua destilada.
3. Se esterilizaron los medios de cultivo por 15 minutos a 121°C, 15 psi.
4. Se inocularon los medios de cultivo con 5mm de biomasa producida, 5 cajas por medio de cultivo (PDA, EMA, SAB, PDA-IM) y por cepa.
5. Se incubaron los medios de cultivo inoculados a 18°C y 26°C por 30 días.
6. Se registró la velocidad media de crecimiento, midiendo el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 72 horas y durante el tiempo de incubación.
7. Se realizó la descripción de las características macroscópicas de las colonias de *P. umbellatus* obtenidas en los tres medios de cultivo a las diferentes temperaturas, documentando la forma del crecimiento miceliar, apariencia, color, así como consistencia y forma de la colonia.
8. Se identificó la temperatura óptima bajo en que se alcanzó la mayor velocidad de crecimiento.

## **FASE 2. Producción de Inóculo**

1. Se prepararon los granos, maicillo, cebada y trigo, para la producción de inóculo, en bolsas de polipapel con 200g., remojado previamente durante 16 horas. Esterilización a 121°C y 15 psi. de presión por 30 minutos.
2. Se inoculó el micelio de *P. umbellatus*, (5 cuadros de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del cultivo) en sustrato de maicillo, cebada y trigo, cinco de cada sustrato, para la producción de inóculo.
3. Se incubaron los 30 sustratos inoculados, 18°C y 26°C hasta que el micelio cubrió todo el sustrato.

## **FASE 3. Producción de esclerocios**

1. Se preparó el sustrato (aserrín de encino), humedeciendo por 12 horas.
2. Se llenaron frascos de vidrio con tapón de rosca con 500 gramos de sustrato.
3. Se esterilizó el sustrato a 121°C y 15 psi., de presión por 45 minutos.
4. Se inoculó el sustrato con 5% del inóculo producido (5 bolsas por sustrato y por cepa). Se Inoculó con 10 fragmentos de micelio (1 cm<sup>2</sup>) de la colonia.
5. Se incubó a 18°C, en condiciones de oscuridad, hasta obtener la producción de esclerocios.
6. Una vez colonizado el sustrato, se indujo la producción de esclerocios, a través de la incubación de los sustratos a 18°C. Se anotó el tiempo (días), necesarios para la formación de los esclerocios.

## **D. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **1. Variables independientes (factores)**

Medio: PDA, PDA-Infusión de encino, EMA Y SAB (cuatro niveles).

Temperatura: 26°C y 18°C (dos niveles).

Vehículo: 3 (granos de cebada, trigo, y maicillo)

Sustrato: 1 (aserrín de encino).

(1, 3,4 son separados y se combinan con la temperatura).

Diferentes tratamientos: combinaciones de las variables independientes en sus diferentes niveles.

### **2. Variable dependiente**

Crecimiento del hongo en mm/día

Diseño factorial 4 X 2

Medios: 4 niveles y temperatura: 2 niveles

### **3. FASE 1**

Medición: Velocidad media de crecimiento (mm.)

Se aplicó un Análisis de Varianza para un Diseño Factorial 4x2.

Con 5 Repeticiones de cada tratamiento.

Medios de cultivo 4 niveles (PDA, EMA, SAB, PDA-IM),

Temperaturas 2 niveles 18°C y 26°C

### **4. FASE 2**

Se aplicó un Análisis de Varianza para un Diseño Factorial 3x2

Con sus Variables: Vehículo / Temperatura

Con 5 Repeticiones de cada tratamiento

Vehículo 3 niveles (maicillo, cebada y trigo)

Temperatura 2 niveles 18°C y 26°C

### **5. FASE 3**

Estadística Descriptiva.

Se evaluó la producción de esclerocio en aserrín de encino en un determinado tiempo de incubación, de 60 a 90 días a una temperatura de 18°C en condiciones de oscuridad, llevando un control semanal para observar el crecimiento.

## VIII. RESULTADOS

### 1. Crecimiento micelial

Las colonias de la cepa de *P. umbellatus* presentaron color blanco, textura algodonosa y escaso micelio aéreo, en los medios PDA y EMA. En el medio PDA-IM se evidenciaron características similares, pero con abundante micelio aéreo. En el medio SAB se presentaron colonias de color blanco y textura compacta (sin micelio aéreo). Estos detalles se observaron tanto a 18°C como a 26°C (Figuras 1 y 2).

Microscópicamente se presentaron hifas hialinas y fíbulas en regular cantidad en la mayoría de medios de cultivo evaluados, con excepción del medio SAB a 26°C, donde se encontraron fíbulas abundantes. Las hifas de mayor diámetro se formaron en los medios PDA, SAB y EMA, tanto a 18°C como a 26°C, por el contrario, las hifas más angostas se registraron en el medio PDA-IM, en ambas temperaturas (Tabla1).

**Tabla 1.** Características macroscópicas y microscópicas de la cepa *P. umbellatus* 25.2000 en diferentes medios de cultivo a 18°C y 26°C, a los 10 días de incubación.

	Características Macroscópicas				Características Microscópicas		
	Color	Textura	Hifas	Fíbulas	Diámetro	Ramificaciones	
18 °C	PDA-IM	Blanco	Algodonosa*	Hialinas	Regular cantidad	1-4 µm	Presentes
	PDA	Blanco	Algodonosa**	Hialinas	Regular cantidad	2-4 µm	Presentes
	SAB	Blanco	Compacta	Hialinas	Regular cantidad	2-4 µm	Presentes
	EMA	Blanco	Algodonosa*	Hialinas	Regular cantidad	2-5µm	Presentes
26 °C	PDA-IM	Blanco	Algodonosa*	Hialinas	Regular cantidad	1-3µm	Presentes
	PDA	Blanco	Algodonosa**	Hialinas	Regular cantidad	2-4 µm	Presentes
	SAB	Blanco	Compacta	Hialinas	Abundantes	2-4 µm	Presentes
	EMA	Blanco	Algodonosa*	Hialinas	Regular cantidad	2-4 µm	Presentes

\* Colonia algodonosa con poco micelio aéreo.

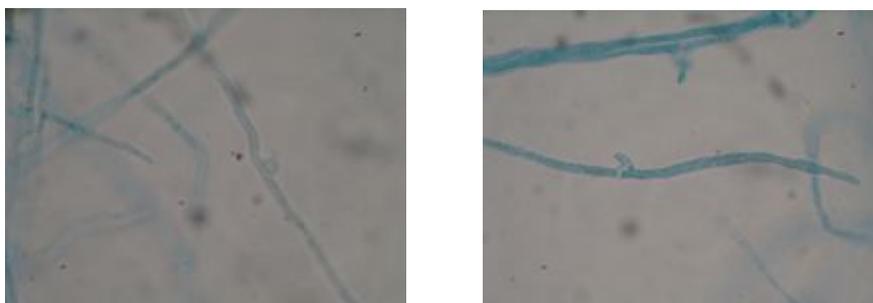
\*\*Colonia algodonosa con abundante micelio aéreo.



**Figura 1.** Características coloniales de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 a 18°C, a los 10 días de incubación. **A.** Crecimiento en agar PDA-IM, donde se observa escaso micelio aéreo de color blanco. **B.** Crecimiento en agar SAB; véase el color blanco y textura compacta de la colonia, así como su escaso crecimiento.



**Figura 2.** Características coloniales de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 a 26°C, a los 10 días de incubación. **A.** Agar PDA-IM; nótese el color blanco, abundante micelio aéreo. **B.** Agar SAB; se puede observar el color blanco de la colonia y la textua compacta, así como su moderado crecimiento.



**Figura 3.** Características microscópicas de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000. **A.** Célula gancho (fibula en formación), en el medio PDA a 26°C (x1000). **B.** Fibula en el medio SAB, a 26°C (x1000).

Respecto al crecimiento micelar a 18°C (10 días de incubación), el medio de cultivo que presentó el mayor crecimiento fue PDA-IM con colonias con diámetro medio de 37.70 mm y con una tasa de crecimiento radial de 3.77 mm/día; seguido del medio EMA, donde se observó un diámetro medio de 37.32 y una tasa radial de crecimiento de 3.73 mm/día. El menor crecimiento fue registrado en el medio SAB, donde obtuvo un diámetro medio de 23.22 mm y una tasa de crecimiento radial de 2.32 mm/día (Tabla 2, Gráfica 1). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diámetros de crecimiento micelar, obtenidos en los medios PDA-IM, EMA y PDA ( $p>0.05$ ). El crecimiento micelar observado en el medio SAB fue estadísticamente diferente, con relación a los demás medios ( $p>0.05$ ).

**Tabla 2.** Crecimiento micelar de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 durante 10 días de incubación a 18°C

Medio	Diámetro Medio (mm) <sup>1,2</sup>		Diámetro Final (mm) <sup>3</sup>	Tasa radial de crecimiento (mm/día)
PDA-IM	37.70 ± 20.87	<b>a</b>	63.8 ± 1.40	3.77
EMA	37.32 ± 20.26	<b>a</b>	63.3 ± 1.15	3.73
PDA	35.45 ± 20.30	<b>a</b>	60.9 ± 2.33	3.54
SAB	23.22 ± 11.17	<b>b</b>	37.0 ± 4.00	2.32

<sup>1</sup> Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.

<sup>2</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de rango múltiple de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

<sup>3</sup> Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.

El crecimiento miceliar a 26°C y 10 días de incubación, mostró que el mayor crecimiento se presentó en el medio PDA-IM, con un diámetro medio de 52.02 mm y con una tasa radial de crecimiento miceliar de 5.20 mm/día, seguido del medio EMA, donde se observó un diámetro medio de 48.85 mm y una tasa radial de crecimiento miceliar de 4.88 mm/día. El medio donde se observó menor crecimiento fue SAB, con un diámetro medio de 38.80 mm y una tasa radial de crecimiento miceliar de 3.88 mm/día. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento miceliar obtenido en todos los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3, Gráfica 1).

**Tabla 3.** Crecimiento miceliar de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 durante 10 días de incubación a 26°C

Medio	Diámetro Medio (mm) <sup>1,2</sup>	Diámetro Final (mm) <sup>3</sup>		Tasa radial de crecimiento (mm/día)
PDA-IM	52.02 ± 5.43	80.4 ± 1.52	<b>a</b>	5.20
EMA	48.85 ± 23.49	75.4 ± 0.65	<b>b</b>	4.88
PDA	43.85 ± 21.63	68.1 ± 4.19	<b>c</b>	4.38
SAB	38.80 ± 23.49	62.5 ± 1.69	<b>d</b>	3.88

<sup>1</sup> Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.

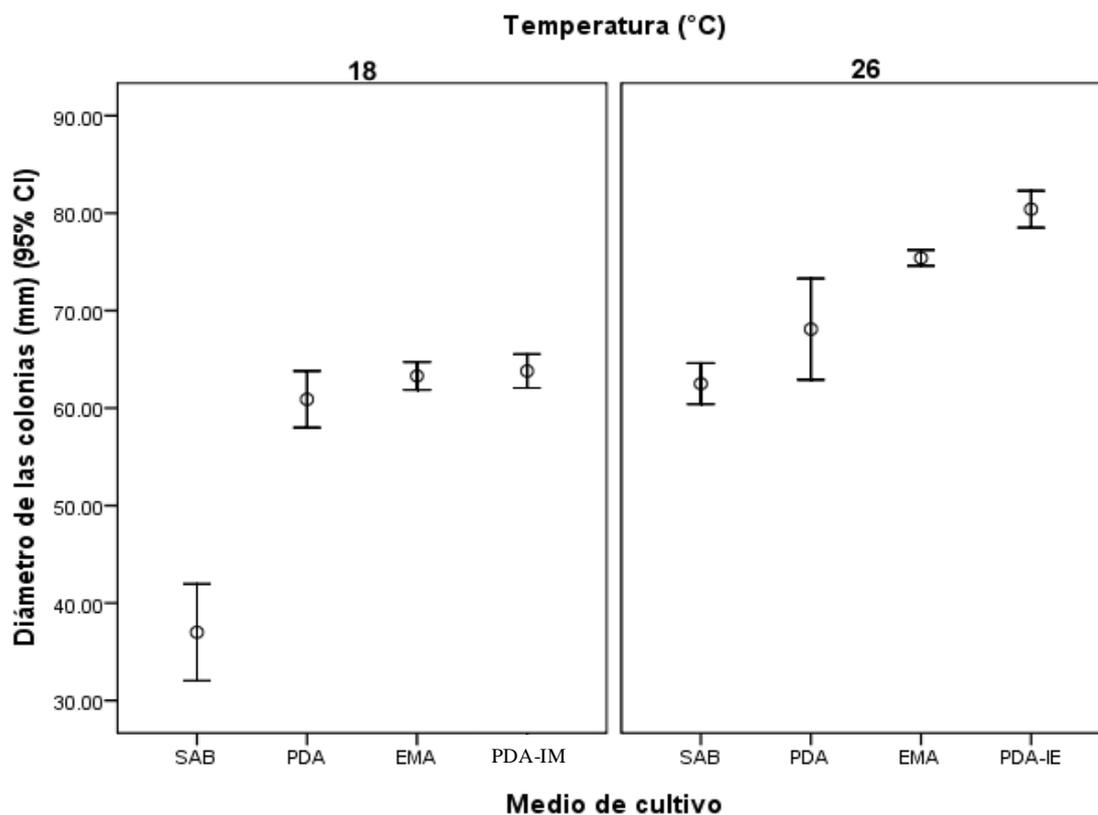
<sup>2</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de rango múltiple de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

<sup>3</sup> Calculado a partir de la media de 5 repeticiones.

Al comparar el crecimiento miceliar observado en los medios de cultivo con referencia a la temperatura (18° C y 26° C) se determinó que existió diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en el medio SAB a 18° C con el medio PDA-IM a 26° C ( $p=0.01$ ), con el medio PDA a 26° C ( $p = 0.040$ ) y con el medio EMA a 26° C ( $p=0.003$ ).

No se observó diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en el medio SAB a 18°C comparado con el observado en el medio SAB a 26°C (anexo 4).

**Gráfica 1.** Diámetro medio del crecimiento micelial  $\pm$  la desviación estándar, de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 durante 10 días de incubación a 18° C y a 26° C

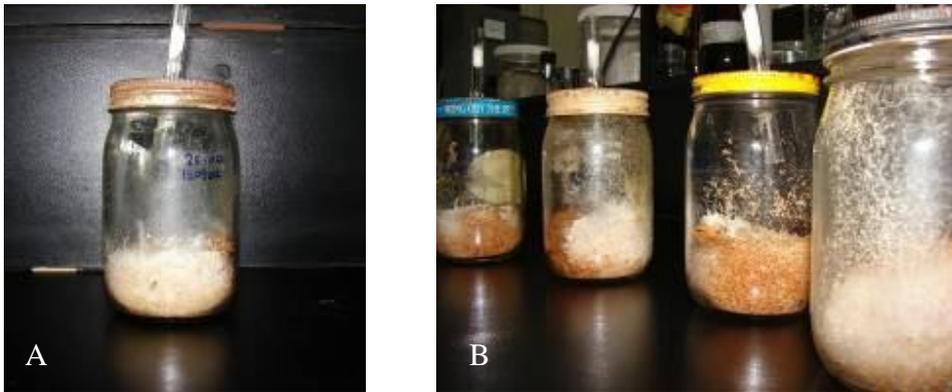


## 2. Producción de Inóculo

La producción de inóculo se evaluó durante 50 días en los vehículos maicillo, cebada y trigo, incubados a 18° C y 26° C. Transcurrido este lapso, no se observó el crecimiento micelial en ninguno de ellos, por lo que no fue posible producir el inóculo de la cepa *P. umbellatus* 25.2000 en ninguno de los vehículos y temperaturas evaluadas en esta investigación.

### 3. Producción de Esclerocios

La producción de esclerocios se evaluó durante 4 meses, incubándose el sustrato (aserrín de encino) a 18°C. Finalizado este lapso, no se observó la formación de esclerocios a pesar del prolongado tiempo de incubación y la colonización completa del sustrato.



**Figura 4.** Crecimiento de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000 en aserrín de encino a 18°C, por 4 meses, donde no se observó la presencia la formación de esclerocios. **A.** Vista detallada, donde se nota la colonización del micelio en el sustrato. **B.** Vista general de los sustratos.

## IX. DISCUSIÓN

*Polyporus umbellatus* es una especie de reconocida comestibilidad en el mundo, a la cual también se le han atribuido propiedades hipotensoras, diuréticas y para el tratamiento de diarrea, ictericia, cirrosis, ascitis, leucemia y cáncer de pulmón, al preparar infusiones con los esclerocios que produce (12,13). En Guatemala, la comestibilidad de este hongo ha sido documentada en Tecpán, Chimaltenango (9,10) y, debido a que se trata de una especie saprobia, en esta investigación se evaluó el cultivo de una cepa nativa de *P. umbellatus* en medios sólidos y la producción de esclerocios *in vitro*.

Se observó que la cepa *P. umbellatus* 25.2000 en todos los medios de cultivo y temperaturas estudiados, presentó colonias con características similares a las descritas para la especie, es decir, colonias de color blanco a amarillento, textura algodonosa, densidad de abundante a escasa y micelio aéreo abundante a escaso (3). Por lo tanto, el aislamiento evaluado en este estudio presentó características coloniales similares a los evidenciados en aislamientos de Estados Unidos y Asia (3).

Respecto a las características microscópicas, solamente en el medio SAB en ambas temperaturas se observaron abundante cantidad de fibulas, lo que es indicativo de la condición dicariótica del micelio, el cual es capaz de formar cuerpos fructíferos bajo condiciones adecuadas (3,4). Además, dado que esta característica se observó sólo en este medio de cultivo, se puede suponer que alguno de los nutrientes presentes en el medio SAB promueve la formación de fibulas.

Así mismo, se comprobó que la cepa formó hifas de menor diámetro en el medio PDA-IM. Esta característica probablemente fue inducida por la infusión de madera de encino contenida en el medio, ya que se ha reportado que las hifas de menor diámetro son más eficientes para colonizar la madera, simulando la respuesta observada en su hábitat natural (2,3).

Además, dado que en el medio PDA sin infusión de madera de encino no se observó esta cualidad, se deduce que el hongo necesita la presencia de los compuestos de la madera de encino para producir hifas de menor diámetro. Por otra parte, ya que en este medio se producen regular cantidad de fibulas, se puede recomendar su uso para futuros cultivos de la cepa, con fines de productividad (16).

Con respecto al crecimiento micelial, la suplementación del medio PDA con infusión de encino estimuló el crecimiento del hongo, tanto a 18°C como a 26°C, lo cual puede deberse a que *P. umbellatus* crece naturalmente en madera de encino. Probablemente al haber adicionado la infusión de madera de encino al medio PDA, se introdujeron factores que estimularon el crecimiento micelial (4), sin embargo, esta observación deberá ser corroborada en estudios posteriores, ya que el crecimiento micelial no mostró diferencia significativa con los medios PDA y EMA. Con este resultado, se rechaza la primera hipótesis planteada, debido a que el mayor crecimiento no se observó en el medio de cultivo PDA a 26°C.

En general, los mayores valores de crecimiento micelial (diámetro medio y tasa radial de crecimiento) se obtuvieron a 26° C y los menores crecimientos se observaron a 18°C. Esto se debe a que la temperatura afecta el metabolismo de la célula e influye tanto en la capacidad enzimática del microorganismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular (7).

En cuanto al medio SAB en ambas temperaturas, la cepa de *P. umbellatus* produjo el menor crecimiento micelial, por lo que no se recomienda la utilización de este medio para su cultivo, a pesar de que en él se hayan formado la mayor cantidad de fibras, que es una característica aceptable con fines de productividad (16).

Con respecto a la producción de inóculo en las semillas de maicillo, cebada y trigo, no se obtuvo crecimiento alguno después de 50 días de incubación a ambas temperaturas. Se piensa que la principal razón que puede explicar este hecho es que, si bien *P. umbellatus* es un hongo de pudrición blanca (degrada primero lignina, luego la celulosa y de último la hemicelulosa), no se ha reportado que degrade también almidón (20) el cual es el principal componente presente en los granos utilizados (17). Por tal razón, es razonable que el micelio no se haya desarrollado en ninguno de los granos evaluados. Consecuentemente, se rechaza la segunda hipótesis que indicaba que el maicillo era el mejor sustrato para producir inóculo.

En la fase de producción de esclerocios se observó un crecimiento micelial muy lento en el aserrín de encino, llegando a colonizar completamente el sustrato en un periodo de 3 meses. La colonización de la madera de encino por parte de *P. umbellatus* es natural, ya que es un hongo de pudrición blanca que degrada primero la lignina, luego la celulosa y por último la hemicelulosa (20),

de manera que este hongo es capaz de degradar este tipo la madera de encino en condiciones de laboratorio.

Sin embargo, una vez colonizado el sustrato, se incubó por un mes más, no obteniéndose la producción de esclerocios a 18° C, rechazándose así la tercera hipótesis. Según la literatura los esclerocios se forman entre 10° C y 18° C, en un periodo de tiempo entre 60 y 90 días y en condiciones de oscuridad (3), condiciones que se le proporcionaron al sustrato y sin embargo no se produjeron los esclerocios. Por tal motivo, se sugiere que en investigaciones posteriores se tome en cuenta que la producción de esclerocios es un proceso sumamente complejo y depende de múltiples factores (como pH, temperatura, humedad, CO<sub>2</sub>, nutrientes, luz, entre otros) (3), para lograr su producción *in vitro*.

Por otra parte, se ha reportado que *P. umbellatus* produce importantes enzimas antioxidantes y citoprotectoras, lo cual sugiere un considerable potencial terapéutico como protectores contra el daño de radicales libres que inducen daño neurodegenetivos (19) por lo que es de suma importancia continuar con los estudios de esta cepa en otros medios de cultivo.

## X. CONCLUSIONES

1. En el medio PDA-IM a 26°C la cepa *P. umbellatus* 25.2000 mostró el mayor diámetro medio y tasa radial de crecimiento.
2. Macroscópicamente las colonias de la cepa de *P. umbellatus* 25.2000, presentaron color blanco y textura algodonosa a compacta, sin micelio aéreo, en tanto que microscópicamente se observaron fibulas abundantes.
3. No se obtuvo crecimiento de la cepa en maicillo, cebada y trigo para la producción de inóculo a ninguna de las dos temperaturas (18° C y 26° C) evaluadas.
4. No fue posible la producción de esclerocios en aserrín de encino a 18° C, por lo que se indica que este sustrato no es el adecuado para ese fin.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable utilizar el medio PDA-IM a una temperatura de 26°C para el cultivo de *P. umbellatus*.
2. Se recomienda no utilizar el medio SAB para el cultivo de *P. umbellatus*.
3. Se recomienda realizar estudios alternos para la producción de inóculo de *P. umbellatus* probando otros vehículos ya que se hace muy caro su cultivo sin reproducción de biomasa.
4. Evaluar la producción de esclerocios utilizando otros sustratos.
5. Estudiar la producción de cuerpos fructíferos a nivel de laboratorio evaluando diferentes sustratos.
6. Estudiar otras cepas y nuevos aislamientos de *P. umbellatus*.

## XII. REFERENCIAS

1. Guzmán, G. Los Hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción de la microbiota tropical de México. México: INEL y CONABIO, 2003. (p.9).
2. Alexopoulos, C. J. Introductory mycology. 4ª ed. U.S.A.: John Wiley & Sons. Inc., 1996. (p.3-5).
3. Statmets, P. Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms. Hong Kong: Teen Speed Press Mycomedia™ Productions.,1999. (p.380 – 383).
4. Shu-Ting Chang, Philip G Miles. Mushrooms cultivation, Nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2a edición. U.S.A. CRC Press. 2004. (p. 64;451).
5. Guzmán G. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos de México. (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). En: Halffer G. (Comp). La Diversidad Biológica Iberoamericana II. Volumen especial, Acta Zoológica Mexicana, Nueva Serie. 1998. (p. 113 – 114).
6. Deschamps, J. R. Producción y comercialización de hongos comestibles. Buenos Aires, Argentina: Editorial Gráficos S.R.L., 1999., contraportada.
7. Sanchez, J. III Crecimiento y Fructificación. En: Sanchez, J., Royse, D. La biología y el Cultivo de Pleurotus. 1ª edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Mexico. 2002. 294p. p 59.
8. Subhuti Dharmananda, Ph.D. Institute for Traditional Medicine. Sen- traditional Chinese medicine (tcm). Disponible en: Polyporus [www.senhealth.com/.../page/xmlcontent/0,11740,4822-129036-130344-19164-68168-xmlcontent-item,00.html](http://www.senhealth.com/.../page/xmlcontent/0,11740,4822-129036-130344-19164-68168-xmlcontent-item,00.html)
9. Morales O., et al. Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC. Guatemala 2002; 15: 10-20.
10. Bran M., et al. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Edición Especial, Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC 2003; Vol 1. No. 1: 1-24
11. De León, R. Cultivation of edible and medical mushrooms in Guatemala, Central America. Micol Apl Int 2003; 15(1): 31-35
12. Chang, Shu –Ting, Miles, F.G. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact., CRC Press., USA 2004: 375 – 380.
13. Chung, H. I., Chieh, H. T.. *Polyporus umbellatus*. Mycosoc. 1991Apr;11(4):225-226, Disponible en: [www.mycosoc.dk/Issues/vol39/polyumbell.htm](http://www.mycosoc.dk/Issues/vol39/polyumbell.htm)

14. Bran M. C, et al. Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula, fase I. Informe final técnico. Dirección General de Investigación. Guatemala, 2001.
15. Revista el Productor Hongos Comestibles 2004 Marcha; 42(3): 530-533. Disponible en: [www.revistaelproductor.com/abril2004/hongos.htm](http://www.revistaelproductor.com/abril2004/hongos.htm)
16. López, A. Hongos Comestibles. Programa Nacional de Promoción de cultivo de los hongos comestibles. Univ. Ver. México 2002. Disponible en: [www.icidca.cu/Productos/Hongos.htm](http://www.icidca.cu/Productos/Hongos.htm).
17. Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez-Merlo, R., Guzmán, G. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. Rev Iberoam Micol 1997; 14:173-176.
18. Labarère, 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. Pág. 83-124.
19. Cornelius C., Cavallaro M., Cambria M.T., Toscano M.A., Calabrese V. Comparative enzyme analysis of *Polyporus umbellatus*, *Agaricus blazei*, *Pleurotus osteratus* and *Hericium erinaceus*. Clinical Journal of Mycology. Aneid Press. 2009; 3:5-7.
20. Blanchette, R. A., Abad, A.R., Farrell R. L., Leathers T.D. Detection of Lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by Basidiomycetes. Appl and Enviro Microbiol. 1989; 55:1457-1460.

## XIII. ANEXOS

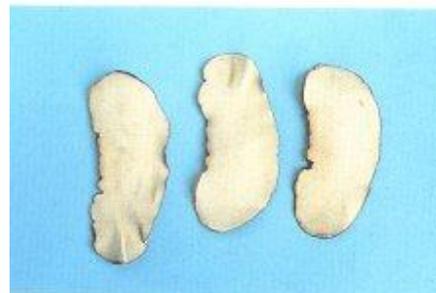
## Anexo1.

*Polyporus umbellatus*, Skanderborg Dyrehave. Photo: Jens Mårbjerg (10, 11)



## Anexo 2.

Esclerocio de *Polyporus umbellatus* (11)



豬苓

**Anexo 3.****Usos y propiedades de los esclerocios de *P. umbellatus* (10, 11, 13)***Polyporus umbellatus*

Esclerocio de *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries (familia *Polyporaceae*).

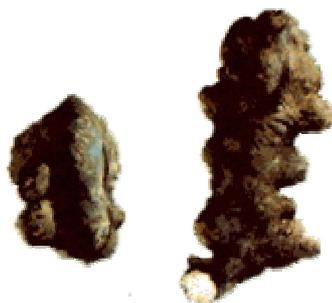
Producido en las provincias de Shanxi, Henan y Hebei; es secado bajo el sol luego de su recolección en primavera y otoño, cortado en rodajas y utilizado sin preparar.

**Propiedades:**

Es dulce e insaboro, neutro, utilizado para tratamientos de hígado y riñón y los conductos urinarios.

**Efectos:**

Induce diuresis.

**Utilizado para:**

Tratamiento de disuria, edema, diarrea, leucorragia, etc. Es utilizado en combinación con cuatro hierbas diuréticas incluyendo el polvo de Poria (Siling San) y la cocción de *Polyporus umbellatus* (Zhu ling Tang).

Dosis de administración: 5-10g, cocción en agua para una dosis oral.

### Anexo 4.

#### ANDEVA del crecimiento miceliar de *P. umbellatus* en tres medios de cultivo a dos temperaturas de incubación.

##### Comparación Múltiple

Variable Dependiente: Diámetro de las colonias

##### Tukey HSD

Variable Dependiente	(I) Medio	(J) Medio	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Lower Bound	Upper Bound
Crecimiento	PDA-IM 18° C	PDA 18° C	2,17500	6,52641	1,000	-17,8847	22,2347
		SAB 18° C	14,30000	6,52641	0,363	-5,7597	34,3597
		EMA 18° C	13,32500	6,52641	1,000	-19,7347	20,3847
		PDA-IM 26° C	-14,40000	6,52641	0,354	-34,4597	5,6597
		PDA 26° C	-6,25000	6,52641	0,980	-26,3097	13,8097
		SAB 26° C	-1,05000	6,52641	1,000	-21,1097	19,0097
		EMA 26° C	-11,20000	6,52641	0,677	-31,2597	8,8597
	PDA 18° C	PDA-IM 18° C	-2,17500	6,52641	1,000	-22,2347	17,8847
		SAB 18° C	12,12500	6,52641	0,582	-7,9347	32,1847
		EMA 18° C	-1,85000	6,52641	1,000	-21,9097	18,2097
		PDA-IM 26° C	-16,57500	6,52641	0,187	-36,6347	3,4847
		PDA 26° C	-8,42500	6,52641	0,901	-28,4847	11,6347
		SAB 26° C	-3,22500	6,52641	1,000	-23,2847	16,8347
		EMA 26° C	-13,37500	6,52641	0,453	-33,4347	6,6847
	SAB 18° C	PDA-IM 18° C	-14,30000	6,52641	0,363	-34,3597	5,7597
		PDA 18° C	-12,12500	6,52641	0,582	-32,1847	7,9347
		EMA 18° C	-13,97500	6,52641	0,394	-34,0347	6,0847
		PDA-IM 26° C	-28,70000	6,52641	0,001	-48,7597	-8,6403
		PDA 26° C	-20,55000	6,52641	0,040	-40,6097	-4,4903
		SAB 26° C	-15,35000	6,52641	0,273	-35,4097	4,7097
		EMA 26° C	-25,50000	6,52641	0,003	-45,5597	-5,4403
EMA 18° C	PDA-IM 18° C	-,32500	6,52641	1,000	-20,3847	19,7347	
	PDA 18° C	1,85000	6,52641	1,000	-18,2097	21,9097	
	SAB 18° C	13,97500	6,52641	0,394	-6,0847	34,0347	

	PDA-IM 26° C	-14,72500	6,52641	0,325	-34,7847	5,3347
	PDA 26° C	-6,57500	6,52641	0,973	-26,6347	13,4847
	SAB 26° C	-1,37500	6,52641	1,000	-21,4347	18,6847
	EMA 26° C	-11,52500	6,52641	0,644	-31,5847	8,5347
PDA-IM 26° C	PDA-IM 18° C	14,40000	6,52641	0,354	-5,6597	34,4597
	PDA 18° C	16,57500	6,52641	0,187	-3,4847	36,6347
	SAB 18° C	28,70000	6,52641	0,001	8,6403	48,7597
	EMA 18° C	14,72500	6,52641	0,325	-5,3347	34,7847
	PDA 26° C	8,15000	6,52641	0,916	-11,9097	28,2097
	SAB 26° C	13,35000	6,52641	0,455	-6,7097	33,4097
	EMA 26° C	3,20000	6,52641	1,000	-16,8597	23,2597
PDA 26° C	PDA-IM 18° C	6,25000	6,52641	0,980	-13,8097	26,3097
	PDA 18° C	8,42500	6,52641	0,901	-11,6347	28,4847
	SAB 18° C	20,55000	6,52641	0,040	4,903	40,6097
	EMA 18° C	6,57500	6,52641	0,973	-13,4847	26,6347
	PDA-IM 26° C	-8,15000	6,52641	0,916	-28,2097	11,9097
	SAB 26° C	5,20000	6,52641	0,993	-14,8597	25,2597
	EMA 26° C	-4,95000	6,52641	0,995	-25,0097	15,1097
SAB 26° C	PDA-IM 18° C	1,05000	6,52641	1,000	-19,0097	21,1097
	PDA 18° C	3,22500	6,52641	1,000	-16,8347	23,2847
	SAB 18° C	15,35000	6,52641	0,273	-4,7097	35,4097
	EMA 18° C	1,37500	6,52641	1,000	-18,6847	21,4347
	PDA-IM 26° C	-13,35000	6,52641	0,455	-33,4097	6,7097
	PDA 26° C	-5,20000	6,52641	0,993	-25,2597	14,8597
	EMA 26° C	-10,15000	6,52641	0,776	-30,2097	9,9097
EMA 26° C	PDA-IM 18° C	11,20000	6,52641	0,677	-8,8597	31,2597
	PDA 18° C	13,37500	6,52641	0,453	-6,6847	33,4347
	SAB 18° C	25,50000	6,52641	0,003	5,4403	45,5597
	EMA 18° C	11,52500	6,52641	0,644	-8,5347	31,5847
	PDA-IM 26° C	-3,20000	6,52641	1,000	-23,2597	16,8597
	PDA 26° C	4,95000	6,52641	0,995	-15,1097	25,0097

SAB 26° C	10,15000	6,52641	0,776	-9,9097	30,2097
-----------	----------	---------	-------	---------	---------

\*. Diferencia significativa de la media a 0.05.

Basado en observación de las Medias

\* La diferencia media presenta una diferencia significativa a un nivel de 0.05



Claudia Mariela Rendon Terraza

Autor



Lic. Osberth Morales Esquivel

Asesor



Licda. María del Carmen Bran González

Revisora



Dr. Roberto Flores Arzu

Revisor



Licda. Viviani Lucrecia Matta Rios

Directora



Oscar Cobar Pinto, PhD.

Decano