

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a crown above, and two lions on either side. The shield is set against a background of green hills and a blue sky. The circular border contains the Latin text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA ORBIS CONSPICUA".

DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis sensu lato* DE GUATEMALA CON RESPECTO A LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis* DE EUROPA

MANUEL JOSÉ MALDONADO DÍAZ

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, ABRIL 2010

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
	a. Morfología de los macrohongos	5
	b. Microestructuras fúngicas de interés taxonómico	6
	c. Distribución de los macromicetos en América	7
	c.1 Distribución respecto a la altitud	8
	c.2 Relación hongos y lluvia	8
	d. El género <i>Boletus</i> y su taxonomía	9
	e. <i>Boletus edulis</i>	10
	Características de <i>Boletus edulis</i> en Europa	10
	Características macroscópicas de <i>Boletus edulis</i> de Europa	11
	Características microscópicas	11
	e.1 <i>Boletus edulis</i> en América	11
	e.2 <i>Boletus edulis</i> en Guatemala	12
	e.3 <i>Boletus edulis</i> y su importancia en la industria alimenticia	12
IV.	JUSTIFICACION	13
V.	OBJETIVOS	14
VI.	HIPÓTESIS	15
VII.	MATERIALES Y METODOS	16
VIII.	RESULTADOS	20
	a. Características microscópicas de <i>Boletus edulis sensu lato</i> en Guatemala	20
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	26
X.	CONCLUSIONES	29
XI.	RECOMENDACIONES	30

XII. BIBLIOGRAFÍA

31

XIII. ANEXOS

34

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



DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis sensu lato* DE GUATEMALA CON RESPECTO A LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis* DE EUROPA

Informe de Tesis

Presentado por

MANUEL JOSÉ MALDONADO DÍAZ

Para optar el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

RESUMEN

Boletus edulis es uno de los hongos micorrícicos comestibles más conocidos en todo el mundo, especialmente en los países del hemisferio norte y en algunos países del sur donde se ha introducido como cultivo junto a distintas especies de pino (1). En Guatemala su consumo se restringe al mercado gourmet de la Ciudad Capital y Quetzaltenango, aunque existen algunas poblaciones campesinas que lo comen de forma tradicional o por haberlo aprendido recientemente.

En el país *B. edulis* sensu lato (s.l.) posee diferencias macroscópicas respecto a la descripción original europea, particularmente en el área mediterránea, en cuanto a color (tonalidades más rojizas y purpúreas), forma del estípote (más alargado que piriforme) y tamaño (diámetros del píleo mayores desde jóvenes). Por otro lado, en Guatemala crece en altitudes arriba de los 2000 metros (hasta 3600msnm) asociado a pino y aparentemente también con pinabete, mientras que en Europa se asocia con más vegetales, particularmente con encinos y avellanos, en altitudes mucho más bajas, incluso a nivel del mar (2, 3, 4 y 5).

Tomando en consideración estas variantes y que no existe información definitiva sobre el estatus de *B. edulis* en el continente americano, ni se reporta su existencia en el resto de Centroamérica, se procedió a analizar las diversas estructuras reproductivas microscópicas así como la forma y disposición de las hifas cuticulares del píleo y estípote de ejemplares guatemaltecos de *B. edulis* s.l., para compararlas con *B. edulis* sensu stricto y determinar si existen diferencias a ese nivel. La existencia de éstas permitirá definir la presencia de nuevas variedades o subespecies en el continente. Los resultados muestran que los ejemplares guatemaltecos poseen esporas más grandes, basidios más largos, generalmente trispóricos, caulocistidios más largos (incluso con 2-3 septos) e hifas del píleo dispuestas en ixotricoderma.

Dado que el único estudio molecular sobre *B. edulis* con muestras guatemaltecas las posiciona claramente como dicha especie, se propone que los ejemplares recolectados en el país sean considerados al menos como dos variedades nuevas para la ciencia hasta que se resuelva el complejo molecular que se está encontrando en diversas partes del mundo para esta especie (3, 4 y 6). Las nuevas variedades que se proponen son: *Boletus edulis* var.

americanus (Flores & Maldonado) var. nov. y *Boletus edulis* var. *guatemalensis* (Flores & Maldonado) var. nov.

III. INTRODUCCIÓN

Boletus edulis es una de las especies de hongos micorrícicos más apreciadas a nivel mundial, especialmente en los países del hemisferio norte y con gran tradición micófila (1), principalmente Europa, donde fue descrita. Esta especie se encuentra dentro la Sección *Boletus*, que hasta hace poco era más conocida como Grupo Edulis, el cual incluye 4 especies en Europa y al menos 6 en América. Todas coinciden en los siguientes caracteres macroscópicos: píleo plano-convexo de color café-rojizo o beige-café oscuro; himenio con tubos inicialmente blanquecinos y luego verde-amarillento oliváceo al madurar y sin cambio de color al tacto; esporas alargadas y lisas; contexto blanco, carnoso, con una ligera coloración beige, rosada o rojiza bajo la cutícula y sabor agradable y retículo blanquecino o beige-café en la superficie del pie (2, 4).

En Guatemala se han detectado al menos seis especies de esta Sección, algunas con clara distribución desde Norteamérica y otras que parecen ser endémicas como *B. luteoloincrustatus* (Flores y Simonini). La más notoria y conocida de ellas es *Boletus edulis* s.l., que crece naturalmente en bosques de pino en altitudes alrededor de los 2000-3600 msnm, produciendo carpóforos que llegan a pesar cerca de 2 kg (11). La mayor demanda local de esta especie se registra en restaurantes gourmet de la Ciudad de Guatemala y Quetzaltenango, así como en tiendas de comestibles finos importados (12). Los estudios sobre su distribución indican que son muy pocas las localidades campesinas que lo consumen a pesar de su sabor y textura (7). *B. edulis* s.l. es una especie muy importante para Guatemala porque puede ser cultivada mediante manejo de bosques de pino en zonas de alta montaña, lo que favorecería no sólo la economía de sus pobladores sino que también contribuiría al mantenimiento de la cobertura boscosa, de fuentes de agua, la creación de áreas de turismo ecológico y micológico y producción de un alimento rico en proteínas y vitaminas (2,17).

B. edulis s.l en Guatemala manifiesta características que no se están reportadas para la especie en Europa, tales como a) diferencias en color (tonalidades más rojizas y purpúreas) b) forma del estípote (más alargado que piriforme en los jóvenes y adultos) c) tamaño (cuerpos fructíferos grandes desde jóvenes) y d) hábitat (en Guatemala crece en

altitudes mayores a los 2000 metros asociados a pino mientras que en Europa se asocia con varias coníferas y árboles de hoja ancha, particularmente con encinos y avellanos, en altitudes mucho menores) (12, 13).

En este trabajo se describen por primera vez las estructuras microscópicas de valor taxonómico de cuerpos fructíferos de *B. edulis* sensu lato, recolectados en diversos puntos geográficos de Guatemala, con la finalidad de compararlas y determinar si existen diferencias respecto a la descripción original (*B. edulis* sensu stricto), de origen europeo. La existencia de diferencias morfométricas será un patrón fundamental para la propuesta de nuevas variedades o subespecies y el conocimiento de la evolución genética y distribución de esta especie en el continente americano.

III. ANTECEDENTES

Guatemala es el país más septentrional del istmo centroamericano. Su geografía física y topografía hace que posea una gran variedad de paisajes y climas distintos con gran riqueza en flora y fauna. Esta diversidad ecológica, junto a la cultural, posiciona al país como una de las áreas de mayor atractivo turístico en América, lo cual debe ser aprovechado para la mejora en la calidad de vida de sus habitantes, principalmente del área rural (1).

En esta gran biodiversidad se incluyen los macrohongos, que en su mayoría pertenecen al Phylum *Basidiomycota*. Los hongos de este filo se pueden encontrar creciendo sobre la tierra (epígeos) o bajo de ésta (hipógeos). Se calcula que existen alrededor de 16.000 especies de basidiomicetos, de los cuales 10.000 son macroscópicos. La mayoría de ellos tienen aplicaciones en la industria agro-alimentaria y medicina y otros son de gran interés por sus propiedades alucinógenas, tóxicas y venenosas (2).

a. Morfología de los macrohongos

Los macrohongos, también llamados setas, manifiestan una gran diversidad de formas en la naturaleza, por ejemplo: los nidos de pájaros (*Nidulariales*), las estrellas de tierra (*Geastrum*), las royas (*Uredinales*), los carbones (*Ustilaginales*), las bolas o bejines (Licoperdáceos), faloideos (*Phallus*), auriculiformes (*Auricularia*) y hongos gelatinosos (*Tremellales*). Poseen además, diversos mecanismos para dispersar sus esporas, ya sea a través de las corrientes de aire, animales (insectos, gusanos y mamíferos), la lluvia y mecánicamente mediante maquinaria y utensilios usados por el hombre (2).

Los basidiomicetos incluyen especies que producen enfermedades en plantaciones ocasionando grandes pérdidas económicas; otros son de gran valor económico y ecológico por la relación micorrícica con plantas y otros son excelentes comestibles (*Agaricus bisporus*, *B. edulis*, *C. cibarius*, etc.) o venenosos como *Amanita phalloides* que causa la muerte en pocas horas (2).

El cuerpo fructífero de un basidiomiceto consta básicamente de tres partes: a) el píleo o sombrero, b) el himenio o himenóforo, situado debajo del píleo y donde se encuentran los

basidios y c) el estípite o pie. El himenio es muy variado en los basidiomicetos pues puede ser liso (*Thelephoraceae*), poroso (*Polyporaceae*), tubular (*Boletaceae*), con agujas (*Hydnaceae*) o con láminas (*Agaricales*). *Boletus edulis* es una especie del orden *Boletales*, con aspecto de seta e himenio compuesto por tubos, donde se encuentran las estructuras reproductivas sexuales (2).

b. Microestructuras fúngicas de interés taxonómico

Entre las estructuras más importantes para la determinación de una especie o de un grupo taxonómico particular se encuentran las siguientes:

En el Píleo:

Cutícula: esta varía según la especie y ambiente. Puede ser lisa o tomentosa, con mucílago o sin él. Las hifas que lo conforman mantienen una estructura espacial que debe ser descrita y que le es característica. Muchas veces el tipo de cutícula es la clave para separar especies.

En el Himenio:

Basidios: estructuras fértiles productoras de esporas. A estas estructuras se les debe medir el largo, ancho, número de esterigmas y su longitud así como su forma y presencia o no de incrustaciones y reacciones de amiloidía.

-**Probasidios:** estructura donde ocurre la cariogamia para la formación de esporas.

-**Basidiolos:** estructuras no fértiles y paráfisis que se organizan en forma de empalizada en el himenio.

-**Metabasidios:** estructura donde ocurre la meiosis previo a la formación de esporas.

Esporas: son sus células reproductivas sexuales, las cuales tienden a mantener una forma relativamente constante según el género fúngico. Se debe medir el largo, ancho y el factor Q, que es la relación largo/ancho. Debe incluirse la descripción de la superficie y medidas de las ornamentaciones como apículos, venas, crestas, placa amiloidea, perforaciones, etc.

Cistidios: son estructuras no fértiles de dos tipos (pleurocistidios y queilocistidios), los cuales pueden funcionar como atrapadores de aire, humedad y compuestos volátiles.

-**Pleurocistidios:** estructuras que se encuentran a los lados de las láminas, tubos o apículos.

-**Queilocistidios:** estructuras que se encuentran en las puntas de las láminas, poros o apículos.

En el Estípite:

-Caulocistidios: estructuras que se encuentran en la superficie del estípite, los cuales varían según su posición en el pie y el tipo de hongo. Son particularmente visibles en el retículo de boletos. Se denominan esferocistos a las células redondeadas que los acompañan. Los caulocistidios más importantes a medir en *Boletus* son los de la parte apical del pie, pues a medida que se observan hacia la base, éstos tienden a manifestar formas variadas y poco útiles en descripciones taxonómicas. Se debe medir el largo, ancho, si existen tabiques o septos y su forma (2).

c. Distribución de los macromicetos en América.

En *Agaricales* parece ser que la distribución de especies con rangos restringidos es la regla y no la excepción. Estos pueden estar prevalentemente en cimas de montañas de climas templados en el Neotrópico, como sucede en Centroamérica, Sudamérica y las islas del Caribe. El sureste de EEUU es un área con alto endemismo de *Boletales* pero el área de las cumbres de montaña es muy limitada y puede restringir el número de especies que estén adaptadas a bosques templados y páramos en las cumbres montañosas de latitudes tropicales (14).

La diversidad de hospederos puede contribuir al gradiente altitudinal de la diversidad fúngica debido a que los potenciales hospederos vegetales e invertebrados alcanzan su mayor diversidad en altitudes medias y bajas (14).

Los grupos de hongos con rangos de diversidad taxonómica alta en grandes altitudes, como *Cortinariaceae* y los grupos de hongos con rangos más diversos a bajas altitudes, se solapan con los de altitudes intermedias, lo que crea una gran riqueza fúngica en esa zona. Hay una gran diversidad de hongos ectomicorrícicos asociados a bosques de *Quercus* spp en altitudes medias y altas en Centroamérica y Colombia, así como de asociación con *Pinaceae* en México y el norte de Centroamérica (15).

Se ha señalado que los hongos micorrícicos de etapas iniciales (*early stage fungi*) tienden a establecerse como monocariones, mientras que los hongos de etapas tardías (*late*

stage fungi) necesitan de sustancias producidas por un micelio pre-establecido que ayude a romper la dormancia de las esporas fúngicas. Si este fenómeno se aplica a los basidiomicetos en general, ayudaría a explicar las diferencias entre dispersión y especies restringidas geográficamente (16).

Las especies con hábitats restringidos son más abundantes en islas, cumbres de montañas de las áreas tropicales y en las largas extensiones del bosque lluvioso tropical. Estos sistemas de distribución coinciden con el de muchos grupos de plantas y animales (16).

La diversidad fúngica parece estar mas fuertemente relacionada con el hábitat y la diversidad de plantas hospederas (especialmente en parásitos y simbioses mutualistas, así como con ciertos grupos de descomponedores (16).

c.1 Distribución respecto a la altitud.

La diversidad de macromicetos, particularmente basidiomicetos parece ser mayor a altitudes medianas y bajas. Dentro de este grupo, *Cortinariaceae* y *Boletales* son los más diversos a altas y medianas altitudes (especialmente en latitudes tropicales), mientras que la diversidad es aparentemente mayor en *Gasteromycetes*, *Aphylllophorales*, *Tricholomataceae* y Homobasidiomicetos en general (12, 17).

Los *Agaricales*, por el contrario, presentan mayor diversidad a mayores altitudes respecto a las bajas altitudes de los bosques montanos del Neotrópico. La diversidad de muchos de los hongos, cae dramáticamente debajo de la “línea de árboles” en el Neotrópico (13, 17).

c.2 Relación hongos y lluvia

La mayoría de los macromicetos presentan una estrecha fructificación en relación con la precipitación anual, por lo que la cantidad de lluvia en cada estación puede ser importante. Ciertos grupos como los *Aphylllophorales*, *Boletales*, *Agaricales* y *Tricholomataceae* fructifican más abundantemente en áreas con precipitación media a alta en el Neotrópico (13, 17).

Algunos órdenes y familias de hongos muestran correlación entre riqueza de especies y abundancia (producción de cuerpos fructíferos) de las mismas, como sucede en *Boletales* y *Cortinariaceae*. Esta relación, sin embargo, no se mantiene en todas las regiones (por ejemplo con *Agaricales* en el oeste de EEUU) (13).

d. El género *Boletus* y su taxonomía

Uno de los grupos más estudiados de macrohongos ha sido precisamente el orden *Boletales*. Este incluye géneros que han sido profundamente estudiados y utilizados en la producción de planta forestal micorrizada, particularmente en Europa, EEUU y Australia. *Boletus* es un género amplio que ha sufrido muchas variaciones en el último siglo. Actualmente está aceptado que su antigua división en subgéneros pase a conformar géneros independientes (17). Gran parte de los estudios sobre *Boletus* han sido enfocados hacia la producción de cuerpos fructíferos comestibles, ya que incluye especies de gran calidad gastronómica y pocos problemas tóxicos (17 y 18) y también a su contenido alimenticio y relaciones filogenéticas, no sólo por conocimiento evolutivo son también comercial para evitar la venta de una especie por otra en estado seco, donde los boletales tienden a ser muy parecidos (8,9 y10).

Parece ser que la mayor cantidad de especies de *Boletus* se concentra en Norteamérica, donde muchas de ellas evolucionaron y quedaron restringidas y distribuidas localmente. Según estudios de fitogeografía, los pinos (*Pinus* spp) y robles (*Quercus* spp), vegetales ectomicorrícicos, contribuyeron en América Central a formar un importante *centro secundario* de evolución, con muchos taxones, varios híbridos naturales y muchos refugios de condiciones ecológicas especiales (17 y 18).

La mayoría de las especies de la familia *Boletineae* asociadas a encinos pertenecen a dos categorías: 1) especies que entran a México desde el norte (Canadá y EEUU), sin cambiar de huésped micorrícico, 2) especies originadas en el sur que se adaptaron a varios huéspedes vegetales. Los de la primera categoría, pueden identificarse con el género *Boletus*, algunos de los cuales se adaptaron a las condiciones especiales de América Central

o México, pero claramente con progenitores norteamericanos (de Florida, Texas y la costa Atlántica) (18 y 19).

En el norte del Neotrópico (México y Centroamérica), se desarrollan la mayor parte de los géneros de *Boletales* que se conocen del Hemisferio Norte. Muchas de sus especies parecen coincidir entre el Norte y el Neotrópico, así como con muchas europeas, aunque también existen especies endémicas, como *B. guatemalensis*, *B. luteoloincrustatus*, *B. flavoniger*, *B. neoregius*, y *B. quercophilus* (17,18).

e. *Boletus edulis*

Características de *Boletus edulis* en Europa

B. edulis posee un estípote muy ancho, que incluso cuando el hongo aún es joven, llega a ser más ancho que el propio sombrero del hongo; y con ausencia de escamas finas, que son características de algunas especies de *Leccinum*. Algunos taxónomos dividen a *B. edulis* en varias sub-especies y separan a las especies *B. aereus*, *B. aestivalis*, *B. edulis*, *B. pinicola* y *B. reticulatus*. Ninguna de estas puede ser realmente confundida con especies venenosas, sin embargo el cuidado debe mantenerse durante la identificación de *B. edulis*. Cuando el sombrero del hongo se encuentra totalmente abierto, puede llegar a medir hasta unos 20 centímetro aproximadamente. Sin embargo, una ilustración en la revista “The Mycologist” demuestra un enorme *B. edulis* colectado en el Reino Unido, de aproximadamente 7 libras de peso, y con un sombrero de 42 centímetro de diámetro, con 18 centímetros de alto (3). En Europa existen actualmente cuatro formas de *Boletus edulis* (*B. edulis f. edulis*, *B. edulis f. citrinus*, *B. edulis f. albus*, *B. edulis f. betulicola*), que aunque difieren en el hábitat, huésped micorrícico y coloración, sus micro estructuras tienden a ser similares (4).

Características macroscópicas de *Boletus edulis* de Europa

Características macroscópicas del cuerpo fructífero de *B. edulis*:

- Sombrero con cutícula lisa, brillante y untosa.
- Sombrero de color marrón bayo, pardo rojizo, con el margen más claro.
- Carne blanca inmutable, rosa a rosa-marrón bajo la cutícula.
- Pie con retículo en la parte superior, de color blanquecino.

Características microscópicas:

- Cutícula sin mucílago.
- Esporada: color ocre-olivácea.
- Esporas: de color marrón-oliváceo, lisas, fusiformes y elipsoidales, con gúttulas internas. 13-18 μ m x 4-7 μ m.
- Basidios: tetraspóricos a bispóricos, claviformes; 30-40 μ m x 10-12 μ m.
- Cistidios: En forma de huso de 48-67 μ m x 5-10 μ m, inconspicuos, hialinos y de pared delgada.
- Hábitat: Crece sobre todo bajo frondosas (robles, castaños, hayas y encinas), aunque existe alguna cita bajo coníferas (pino/abetos) (20).

e.1 *Boletus edulis* en América:

En el Nuevo Mundo, la diversidad de *Boletales* disminuye a medida que se aproxima hacia el ecuador, pero no hay concordancia en aumento de especies de hongos en las latitudes mayores del hemisferio sur. Los *Boletales* del Nuevo Mundo son en su mayoría simbiontes ectomicorrícicos de las familias *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Salicaceae*, y su diversidad sigue el patrón de diversidad de sus hospederos vegetales (17 y 18).

La alta diversidad de *Boletales* asociados con árboles pertenecientes a *Leguminosaceae* y *Dipterocarpaceae* en África central y con *Dipterocarpaceae* en Malasia sugiere que la baja diversidad de *Boletales* en el Nuevo Mundo tropical es anómala (17).

e.2 *Boletus edulis* en Guatemala

En Guatemala, la presencia de *Boletales* es grande. Hasta la fecha sólo se han determinado 4 especies del grupo *Edulis*: *Boletus edulis* Bulliard:Fries sensu lato, *B. luteoloincrustatus* Flores & Simonini, *B. pinophilus* Pilat & Dermeck y recientemente en 2007, *B. variipes* var *fagicola* Smith & Thiers y *Boletus* aff *variipes* Peck.(17).

Boletus edulis en Guatemala produce carpóforos de gran tamaño en cualquiera de las áreas donde crece en el país, además el píleo posee tonalidades anaranjadas en cuerpos fructíferos maduros (17). Reportes sobre la fenología de la especie en México, indican que la producción de cuerpos fructíferos está asociada principalmente a bosques de coníferas, comprende los meses de junio, julio y agosto y posee características organolépticas excelentes (19 y 21).

e.3 *Boletus edulis* y su importancia en la industria alimenticia

El Grupo *Edulis* incluye algunas de las setas más apreciadas a nivel mundial por su carácter gastronómico por su excelente sabor. Existe poca información sobre la venta y mercadeo de esta especie a nivel mundial, sin embargo datos oficiales indican que sólo en el año 1987, 1049 toneladas de *B. edulis* fueron vendidas en Francia con un valor estimado de 56 millones de francos (aproximadamente \$9,600,000); asimismo, 1000 toneladas en Alemania con un valor aproximado de \$6,000,000 y 2387 toneladas en Italia con valor de \$17,000,000. Se estima que en la actualidad la demanda del consumo se ha incrementado respecto de los valores reportados para ese entonces (21).

En Norteamérica existen otras especies de *Boletus* grupo *Edulis* respecto a las que se encuentran en Europa. Aparentemente es más rico en especies en América que en Europa, pero hasta la fecha no hay suficientes estudios moleculares que confirmen la identidad y origen de tal diversidad (3, 4, 6, 10, 16, 22 y 23).

IV. JUSTIFICACION

Debido a que existen algunas diferencias a nivel macroscópico en *Boletus edulis* s.l. de Guatemala respecto a lo descrito para Europa, es necesario hacer un análisis minucioso de las microestructuras reproductivas así como de la disposición y estructura de las hifas del píleo y estípite de las muestras locales, para determinar si se trata de la misma especie o de variedad(es) local(es) que aún no han sido conocidas por la ciencia.

Teniendo en cuenta que las muestras locales han sido recolectadas en diversos puntos del país, es fundamental hacer una descripción completa que incluya la comparación de sus microestructuras y así elaborar una descripción general con todas las características que le son propias.

Por otro lado, es importante realizar este tipo de estudios en Guatemala, ya que es necesario revisar y confirmar la identidad de especies registradas con nombres de especies europeas, ahora que se dispone de más elementos informativos a nivel taxonómico que hace algunas décadas.

La descripción de las microestructuras y los resultados moleculares actuales de la especie en Guatemala podrán ser de utilidad para la comercialización certificada de cuerpos fructíferos a Europa y de conocimiento de la evolución genética y de distribución en el continente americano.

IX. OBJETIVOS

General:

Describir y comparar las microestructuras reproductivas y los diferentes tipos de hifas en cuerpos fructíferos de *Boletus edulis* s.l. recolectados en Guatemala y compararlas con las descritas para la especie en Europa.

Específicos:

1. Describir la morfología y dimensión de estructuras reproductivas microscópicas (basidios, cistidios, esterigmas, esporas y caulocistidios) presentes en los cuerpos fructíferos de *B. edulis* s.l. hallados en diversas regiones de Guatemala.
2. Describir y fotografiar la estructura de la cutícula del píleo y del estípite de los carpóforos de *B. edulis* s.l. así como la morfología y dimensión de las hifas que la conforman.
3. Determinar si existen variaciones en la microscopia de las muestras guatemaltecas de *B. edulis* s.l. respecto a lo descrito en la bibliografía europea y compararlas con muestras de *B. edulis* sensu stricto de Europa, con el fin de confirmar la presencia o ausencia de variedades o si se trata de una nueva especie.

X. HIPÓTESIS

Las muestras de *B. edulis* encontradas en Guatemala poseen algunas diferencias a nivel microscópico de las reportadas para *B. edulis* en Europa.

XI. MATERIALES Y METODOS

Universo:

Todos los carpóforos de la especie *B. edulis* recolectados en Guatemala que se encuentran depositados en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta”, del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Muestra:

Se escogieron los mejores ejemplares, jóvenes y maduros, de *B. edulis* recolectados en Quetzaltenango, Sololá, Huehuetenango, San Marcos, Totonicapán y El Progreso, depositados en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta” (RPM), acorde a su estado de conservación y descripción.

Materiales:

La mayoría de los materiales que fueron utilizados pertenecen al Laboratorio de Micología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC:

Equipo:

- Microscopio Unico® con objetivo de medición en micras
- Microscopio estereomicroscópico Axiostar®
- Cámara fotográfica Sony Cybershot® de 7.2 MGP de pertenencia propia
- Hojas de afeitar (para realizar cortes)
- Cuaderno de 40 hojas (Para anotar resultados)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Internet (recabar información bibliográfica)
- Papel mayordomo
- Piseta
- Papel limpiantes

Reactivos:

- Reactivo de Melzer (medio de contraste y para tinción de estructuras amiloideas)
- Lugol
- Rojo Congo (medio de contraste)
- Agua destilada (para rehidratar muestras)
- KOH al 3%
- Aceite de Inmersión.:

Recursos económicos:

Las muestras se encontraban en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta. Los reactivos utilizados así como el estereoscopio y el microscopio fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.

Recursos institucionales:

- Instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.
- Instalaciones del Laboratorio de Micología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.

Metodología:

1. Se obtuvieron las muestras de la Micoteca RMP del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.
2. Se seleccionaron las muestras de *Boletus edulis* a analizar, acorde a su estado de conservación y descripción de sus características.
3. Se sustrajo la porción de interés para el análisis microscópico: una parte del píleo, otra del himenio y otra del estípite.
4. Unas muestras fueron rehidratadas con agua destilada y KOH al 3%. Otras solamente con agua destilada y posteriormente se agregó reactivo de Melzer para teñir áreas amiloideas en las microestructuras. Otras muestras se tiñeron con Rojo Congo para contrastar las estructuras, observarlas y fotografiarlas mejor.

5. Se llevó a cabo la medición microscópica de las estructuras de interés (basidios, esterigmas, cistidios: queilocistidios y pleurocistidios, esporas e hifas), utilizando el microscopio con ocular de medida y con objetivo de inmersión (100X), realizándose al menos 20 mediciones diferentes de cada una de esas estructuras.
6. Se tomaron fotografías de las estructuras microscópicas para tener una base gráfica de lo encontrado.
7. Se reportaron los resultados obtenidos en tablas y gráficas.
8. Se realizó una comparación bibliográfica entre *B. edulis* de Guatemala con *B. edulis* de Europa. En vista que se ha ido publicando más información sobre la especie, se hizo una breve comparación con las distintas variedades de *B. edulis* que existen en Norteamérica (EEUU).
9. Se preparó el informe de los análisis realizados, los resultados y las conclusiones, utilizando también secuencias genéticas y árboles filogenéticos que ya han sido reportados.

Diseño de la investigación:

Muestreo: Las muestras que fueron analizadas se encuentran en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta” (RPM). La colección cuenta con 18 ejemplares de diversas procedencias, de los cuales se escogió el mejor por procedencia. En total se analizaron 6 muestras herborizadas de *Boletus edulis* y 4 frescas recolectadas en el Astillero Municipal de San Pedro Sacatepéquez, San Marcos (ver tabla 1).

Tabla 1: Procedencia de las muestras guatemaltecas de *Boletus edulis* s.l.

No. de muestra	Tipo de muestra	Procedencia
MMG-1279	Micoteca	Ixchiguán, San Marcos
MMG-1246	Micoteca	Ixchiguán, San Marcos
MMG-1234	Micoteca	San Mateo Ixtatán, Huehuetenango
MMG-1242	Micoteca	Momostenango, Totonicapán
MMG-1240	Micoteca	San Miguel Siguilá, Quetzaltenango
MMG-1231	Micoteca	Sierra de Las Minas, El Progreso
MMG-1.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-2.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-3.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-4.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos

Variables:

Cuantitativas: largo y ancho de basidios, cistidios, esporas, esterigmas e hifas cuticulares, haciendo 20 mediciones de cada estructura por ejemplar seleccionado. Con ello se evaluó la exactitud y reproducibilidad.

Cualitativas: forma de las microestructuras y disposición de las hifas de la cutícula del píleo y del estípite. Amiloidía de las microestructuras y presencia o ausencia de incrustaciones en las mismas. Se descartó la muestra de Sololá por exceso de secado, ya que al observarse al microscopio muchas estructuras se destruían.

Análisis de resultados: Se llevó a cabo un análisis morfométrico de las variables con los valores de referencia para la especie sensu stricto (europea). Se trabajó con un nivel de confianza del 99% (ver tabla 2).

Modelo estadístico:

$$n = \sigma^2 z^2 / d^2$$

σ = Desviación estándar

z = Nivel de confianza

d = Límite de error

Tabla 2: Número de repeticiones con nivel de confianza de 99%

Nivel de confianza %	Z	Z ²	# de repeticiones para cada microestructura:
90	1.64	2.7	3
95	1.96	3.84	4
99	2.58	6.65	7*

*Esto corresponde al número **mínimo** de muestras analizadas para trabajar a este nivel de confianza, sin embargo debido a requisitos internacionales, se analizaran 20 repeticiones para cada microestructura

XII. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 10 carpóforos para su microscopía. En la Micoteca Rubén Mayorga Peralta se encontraban depositados 18 ejemplares de *Boletus edulis* sensu lato, recolectados en distintos puntos del país (San Marcos: Ixchiguán, Astillero Municipal, San José Ojetenam, Volcán Tajumulco; Sololá: Santa Lucía Utatlán; Totonicapán: Momostenango y carretera a Huehuetenango; Quetzaltenango: San Miguel Siguilá y San Juan Ostuncalco; El Progreso: Sierra de Las Minas). De estos se escogió un ejemplar por Departamento y por sus características macroscópicas, estado de conservación y descripción. También se incluyeron 4 ejemplares recolectados en el municipio de San Pedro Sacatepéquez, Departamento de San Marcos, los cuales son llamativos por su gran tamaño, y que posteriormente fueron ingresados y almacenados en la Micoteca (ver tabla 1).

A. Características microscópicas de *Boletus edulis* sensu lato en Guatemala

Para cada ejemplar se realizaron 20 mediciones de cada estructura microscópica de valor taxonómico: largo y ancho de basidios, cistidios, esporas y número de esterigmas por basidio para cada una de las muestras (de donde se obtuvieron los valores máximos y mínimos). También se analizó la forma y medida de las hifas en las cutículas del píleo y estípite para cada ejemplar. Los resultados de las mediciones y observaciones se anotan en la tabla 3 donde se comparan con las distintas formas de *B. edulis* para Europa y Norteamérica.

Tabla 3. Comparación dimensional de microestructuras entre variedades de *Boletus edulis* de Norteamérica, Europa y Guatemala.

Estructuras microscópicas	Europa				Norteamérica			Guatemala		
	<i>Boletus edulis f. edulis</i>	<i>Boletus edulis f. albus</i>	<i>Boletus edulis f. citrinus</i>	<i>Boletus edulis f. betulicola</i>	<i>Boletus edulis var. edulis</i>	<i>Boletus edulis var. clavipes</i>	<i>Boletus edulis var. aurantio ruber</i>	<i>Boletus edulis var. grandedulis</i>	<i>Boletus edulis var. americana</i>	<i>Boletus edulis var. guatemalensis</i>
Esporas	13.5-16.5 (19) x 4.3-5.5 (6.5) μm	14-16.5 (19.5) x 4.3-5.6 (6.5) μm	13.8-16.2 x 4.6-5.4 μm	14.9-17 x 4.3-5.6 μm	14-17 x 4-6.5 μm	15-19 x 4.5-6 μm	13-17(19) x 4.5-6 μm	(12) 13-15.5 (17) x (3.8) 4-5.5 (6) μm	15-17(18) x 5-6.4 μm	(15)-17(18) x 5-6(7) μm
Basidios	30-50 x 8-15 μm	30-50 x 8-15 μm	30-50 x 8-15 μm	30-45 x 8-15 μm	32-40 x 10-12 μm	32-42 x 9-11 μm	26-35 x 7-9 μm	_____	30-38 x 10-13 μm	(25)30-34(37) x 10-12(13) μm
Cistidios	35-60 x 8-12 μm	35-60 x 8-12 μm	35-60 x 8-12 μm	35-50 x 7-12 μm	_____	25-50 x 7-9 μm	_____	_____	50-63 x 7-12 μm	(35)50-55(61) x (7)8-10(11) μm
Caulocistidios	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	42-48 (65) x 10-12 μm	sin datos	sin datos	_____	90-130 (210) x 9-13 μm Con 2-3 septos	70-120 x 10-12 μm Con 1-3 septos
Esterigmas	4 o 1	4 o 1	2 o 4	2 o 4	4	4	4	2,3 o 4	2 -3	2-3(4)

Fuente: Muñoz, J.(2005), Arora *et al* (2008) y datos experimentales.

En la tabla 4 se compara, en líneas generales, los resultados del análisis microscópico con lo reportado para la especie *sensu stricto*. En ella se aprecia la diferencia de máximos y mínimos y la media numérica. A todos los resultados obtenidos de las mediciones se les aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas con el objetivo de determinar diferencias entre las muestras (diferencias intra-específicas). La tabla 3 revela que existe una diferencia significativa para largo y ancho de esporas así como para el ancho de cistidios en las muestras guatemaltecas.

Tabla 4: Estadísticos descriptivos de las variables basidios, esporas, cistidios de *Boletus edulis s.l.* recolectados en Guatemala

Variable	Reporte bibliográfico europeo μm	Datos para <i>B.edulis s.l.</i> en Guatemala		
		Mínimo μm	Máximo μm	Media μm
Largo de basidios	30-40	30.00	38.00	32.3450
Ancho de basidios	10-12	10.00	13.00	11.2600
Largo de esporas	14-17	15.00	18.00	16.0550
Ancho de esporas	4-6	5.00	6.42	5.8400
Largo de cistidios	43-67	50.00	63.00	53.2900
Ancho de cistidios	5-10	7.00	12.00	9.2200

Fuente: Base de datos experimental. Elaboración en Minitab, análisis en SPSS versión 15

En la tabla 5 se analizan y comparan los resultados obtenidos de las muestras guatemaltecas con los valores de referencia reportados por la literatura para *B. edulis sensu stricto*. En ella se observa claramente la diferencia estadística para las mismas variables (largo de esporas y ancho de basidios y cistidios).

Tabla 5: Prueba de Z aplicada a las recolectas guatemaltecas frente a la media reportada para Europa, con un intervalo de probabilidad de $\alpha=0.01$.

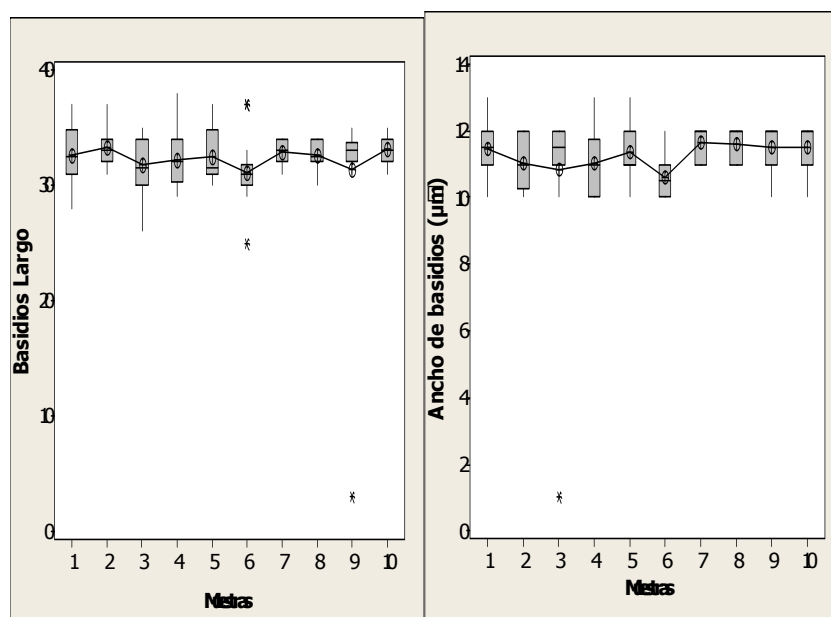
Variable Respuesta	Hipótesis nula Parámetros europeos	Hipótesis alterna Parámetros muestras guatemaltecas	p value
Basidios, largo	$\mu = 30 - 40 \mu\text{m}$	$\mu \neq 30 - 38 \mu\text{m}$	> 0.01
Basidios, ancho	$\mu = 10 - 12 \mu\text{m}$	$\mu \neq 10 - 13 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**
Esporas, largo	$\mu = 15 - 17 \mu\text{m}$	$\mu \neq 13 - 18 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**
Esporas, ancho	$\mu = 4 - 7 \mu\text{m}$	$\mu \neq 4 - 7 \mu\text{m}$	> 0.01
Cistidios, largo	$\mu = 48 - 67 \mu\text{m}$	$\mu \neq 50 - 63 \mu\text{m}$	> 0.01
Cistidios, ancho	$\mu = 5 - 10 \mu\text{m}$	$\mu \neq 7 - 12 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**

Fuente: Base de datos experimental. Análisis en GenStat versión 7

**Diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significancia.

En la gráfica 1, que muestra la media de las mediciones para cada uno de los ejemplares analizados para las variables largo y ancho de basidios, se observa que existe diferencia entre los ejemplares de San Marcos, particularmente con el de Sierra de Las Minas, que posee basidios más pequeños. La gráfica muestra la uniformidad entre los ejemplares de la misma zona.

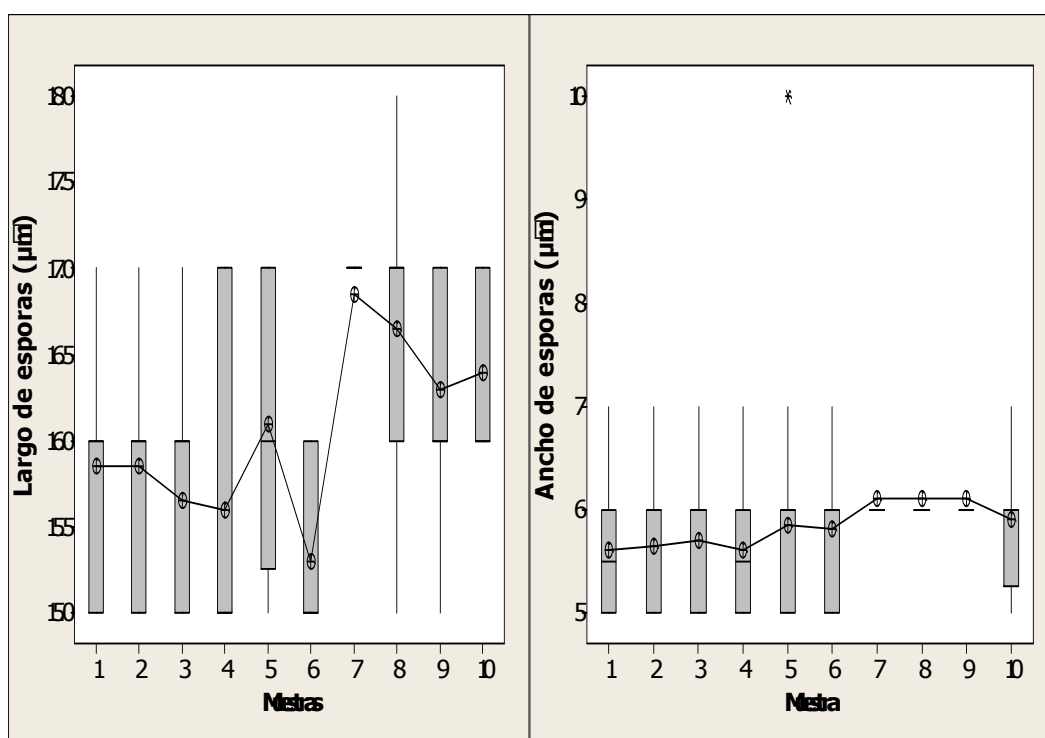
Gráfica 1: Boxplot de la medición del largo y ancho de basidios de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en Guatemala.



Fuente: Base de datos experimental. Elaboración en Minitab versión 14.

La gráfica 2, que muestra la tendencia de las variables largo y ancho de esporas, permite observar que los ejemplares de San Marcos (cordillera volcánica) poseen esporas más grandes que en los del resto del país. También se puede apreciar que las esporas del ejemplar de Sierra de las Minas tienen una media inferior al resto de las demás.

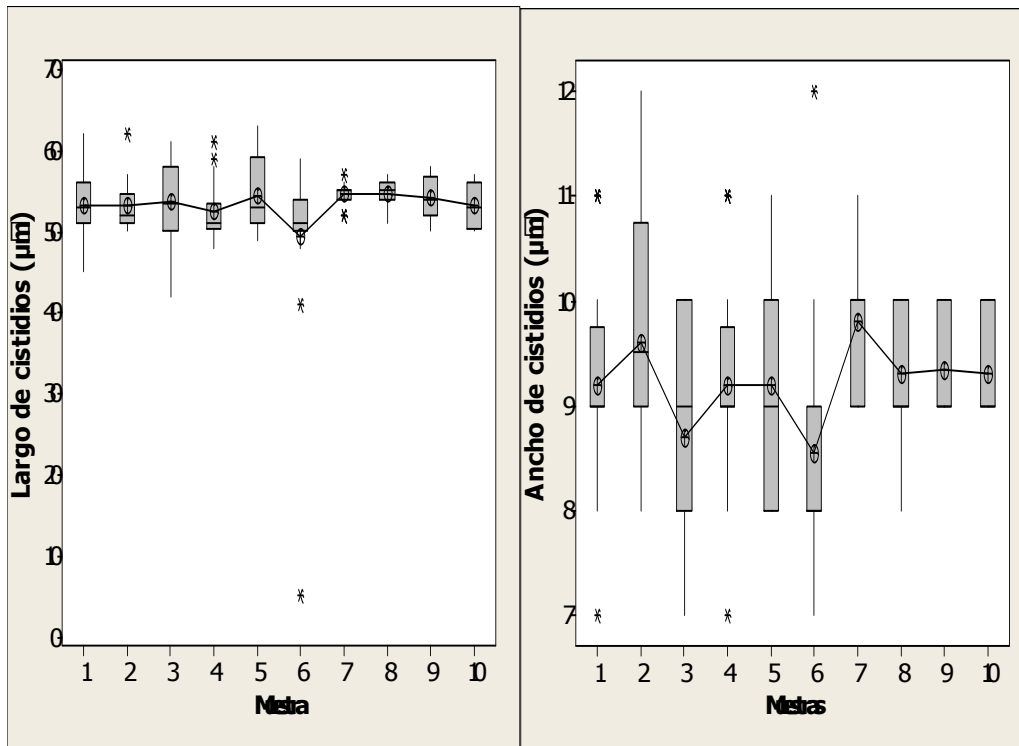
Gráfica 2: Boxplot de la medición de largo y ancho de esporas de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en Guatemala.



Fuente: Base de Datos, elaboración en Minitab versión 14

La gráfica 3 representa las variables largo y ancho de cistidios. En esta gráfica se repite la uniformidad entre las muestras de San Marcos y variabilidad media en las otras procedencias. La muestra 6, de Sierra de Las Minas, presenta la media más pequeña en dimensiones.

Gráfica 3: Boxplot de la medición de largo y ancho de cistidios de *Boletus edulis* s.l. recolectados en Guatemala.



Fuente: Base de Datos, elaboración en Minitab versión 14

Otras variables medidas que resultaron diferentes a las reportadas para la especie *sensu stricto*, fueron la forma y tamaño de caulocistidios de la parte apical del estípite. Mientras que en Europa los caulocistidios son reportados entre 40-60 micras de longitud, los guatemaltecos, particularmente los de San Marcos, sobrepasan las 200 micras y con 2-3 septos (ver tabla 3). La cutícula del píleo también muestra diferencia en la estructura, pues hay reportes que la describen como tipo “cutis” o en “tricoderma”, pero todas las muestras guatemaltecas poseen la cutícula en ixotricoderma (tricoderma embebido en abundante mucílago). Las hifas muestran una longitud variable entre 18-45µm por 7-10µm de diámetro. Sin embargo es fácil observar algunas hifas terminales largas y gruesas, que se tiñen con más facilidad, de hasta 100 µm de longitud por 15 µm de ancho. La forma es sumamente variable, pues van desde clavadas simples a bifurcadas, globosas o tipo pileocistidios. Los extremos apicales miden entre 10-15 µm de largo y hasta 8 µm de diámetro.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Dos aspectos importantes en la identificación de especies de macrohongos lo constituyen las descripciones macroscópicas y el análisis microscópico. Al realizar las descripciones macroscópicas se encontró que los ejemplares de *B. edulis* recolectados en Guatemala presentaron algunas similitudes respecto a lo descrito para Europa, tales como cutícula lisa, brillante y untuosa, borde excedente y blanquecino, coloración rosado-beige en el contexto bajo la cutícula y retículo blanco a beige en el estípite. Sin embargo, en cuanto al color, los cuerpos fructíferos de los ejemplares jóvenes en Guatemala varían pues presentan tonalidades un tanto purpúreas a café-rojizo en los más jóvenes y que después cambian a naranja en los carpóforos maduros (principalmente los ejemplares 7, 8, 9, 10 de San Marcos: Ixchiguán y Astillero Municipal), otros tienden a mantener una coloración café-rojiza similar a lo descrito para Europa o que se reporta en Norteamérica (pardo y en algunas ocasiones rojiza) (15).

En cuanto a la altitud en que habita *B. edulis* en Guatemala es necesario resaltar que todos los ejemplares fueron recolectados en alturas mayores a los 2,000 metros, en bosques de pino; ésta es una notoria diferencia ecológica ya que *B. edulis* en Europa crece desde el nivel del mar (cercano a las playas) hasta los 1,250 metros y en asociación principalmente a coníferas y latifoliadas (24). La mayoría de los cuerpos fructíferos maduros recolectados fueron muy grandes, algunos llegando a alcanzar los 30 centímetros de diámetro en el píleo y hasta 27 centímetros de altura en el estípite, sobretodo en los ejemplares de San Marcos, seguidamente de San Mateo Ixtatán (Huhuetenango) y Totonicapán. La variedad *grand-edulis*, que se encuentra en California, posee cuerpos fructíferos muy similares e incluso de mayor tamaño; sin embargo no hay datos de su microscopía (23) como para comparar con las muestras guatemaltecas. El estudio molecular de Flores (2003), que incluye muestras de California y muy probablemente de esa variedad por la descripción de hábitat y tamaño, revela que se trata de una entidad genética distinta aunque más cercana que *B. edulis* sensu stricto.

En el análisis microscópico, la estadística descriptiva demostró que en conjunto los ejemplares guatemaltecos presentan diferencias respecto a *B. edulis* sensu stricto y sus formas (*f. citrinus*, *f. albus*, *f. edulis*, *f. betulicola*), en algunas de las variables taxonómicas más importantes como largo de esporas y ancho de basidios y cistidios, que mostraron valores más altos que los reportados para *B. edulis* s.s. de Europa (20) (ver Anexo 2 y Tabla 3).

Estas tres variables fueron sometidas a un análisis de prueba de Z con el fin de determinar significancia estadística con respecto de la especie en Europa, lo cual fue confirmado (ver Anexo 3 y Tabla 4).

El análisis microscópico de las muestras guatemaltecas también reveló la presencia de notorios caulocistidios (presentes en la superficie del estípite) sobre los cuales se ha escrito muy poco (4, 5 y 6). Los caulocistidios de los ejemplares guatemaltecos son mucho más grandes que los descritos para las formas europeas, cuyo valor oscila entre 40-60 μm de largo (4 y 24) y no presentan septos, mientras que en las muestras guatemaltecas estas estructuras llegaron a medir hasta 210 μm y presentaron en algunos casos hasta tres o más septos (ver Anexo 4 y Tabla 2). Las mayores dimensiones fueron para las muestras de San Marcos, tanto frescas como deshidratadas, lo que debe considerarse un elemento taxonómico importante y particular.

Respecto a la estructura de la pileipellis o cutícula del píleo, las hifas de las muestras guatemaltecas presentaron una distribución con terminación en tricoderma e ixotricoderma, distinto de lo reportado por la especie europea y sus formas, que sólo son reportadas en forma de cutis o en tricoderma (ver Anexo 5) (22). Aunque los estudios más antiguos sobre la estructura de la cutícula de *B. edulis* en Europa mencionan hifas terminales cortas y delgadas, últimamente se ha publicado que existe mayor diversidad de formas (4) similares a las encontradas en Guatemala; sin embargo debe mencionarse que éstas presentan también hifas aisladas muy gruesas, dextrinoides, con puntas romas.

A lo largo del análisis se encontró que existen diferencias microscópicas según la procedencia de las muestras. Los ejemplares recolectados en los bosques de pino de los

municipios de Ixchiguán y San Pedro Sacatepéquez (San Marcos), muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10, demostraron poseer cistidios y basidios un poco más anchos (gráficas 1 y 2), así como esporas más largas (gráfica 3) que los ejemplares recolectados en Huehuetenango, Quetzaltenango, Totonicapán y Sierra de Las Minas (El Progreso) (muestras 3, 4, 5 y 6), situación que viene a corroborar lo encontrado por Flores (2003) sobre la diversidad genética entre una muestra de Ixchiguán y otra de San Mateo Ixtatán (Huehuetenango). La muestra de la Sierra de Las Minas siempre mostró dimensiones un poco inferiores a las otras aunque dentro del mismo rango, situación que podría verse afectada por las condiciones climáticas del lugar.

Tomando en consideración las diferencias macro y microscópicas de *B. edulis* s.l. de Guatemala con *B. edulis* de Europa y las diferencias entre las mismas muestras guatemaltecas, se propone el establecimiento de dos nuevas variedades de *Boletus edulis* para la ciencia: *Boletus edulis* var. *americanus*, que abarca todos los hongos recolectados en bosques de pino de San Pedro Sacatepéquez e Ixchiguán del departamento de San Marcos (muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10) y *Boletus edulis* var. *guatemalensis*, conformada por las muestras recolectadas en los departamentos de Huehuetenango, Quetzaltenango, El Progreso, Totonicapán y muy probablemente Sololá (muestras 3, 4, 5 y 6). Dado que están apareciendo complejos de morfo-especies en los macrohongos y de complejos dentro de la misma especie *B. edulis*, es necesario confirmar estos resultados con análisis moleculares que comparen la región ITS de más ejemplares guatemaltecos con la más reciente colección de secuencias europeas disponibles en los bancos de genes (25). Los resultados de un estudio global permitirán definir si estas nuevas variedades o especies que se han agregado al grupo *Edulis* deben considerarse variedades, subespecies o nuevas especies (3, 26).

X. CONCLUSIONES

- Los hongos guatemaltecos fueron localizados en su mayoría en altitudes mayores o iguales a los 2,000 metros, lo que supera la altitud reportada para Europa.
- En cuanto al hábitat, *B. edulis* s.l. de Guatemala crece asociado a pino mientras que la especie *sensu stricto* se asocia a varias coníferas y latifoliadas de Europa.
- Las muestras guatemaltecas presentaron diferencia significativa para las variables largo de esporas y ancho de basidios y cistidios respecto a la especie *sensu stricto*, de origen europeo
- Las muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10, recolectadas en los municipios de San Pedro Sacatepéquez e Ixchiguán, San Marcos, muestran mucha semejanza entre sí en sus aspectos macro y microscópicos, demostrado también a nivel estadístico, y con diferencia respecto a las muestras de otros Departamentos.
- Los caulocistidios de las muestras de San Marcos (Ixchiguán y Astillero Municipal de San Pedro Sacatepéquez) superan notablemente en longitud a los reportados en Europa (hasta 210 versus 60 micras). También presentan septos, de 1 a 3, mientras que están ausentes en *B. edulis* s.s.
- Las muestras de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en otras zonas del país, difieren un poco entre sí, aunque los rangos de las medidas de las micro estructuras coinciden como para ser consideradas como un grupo taxonómico diferente al que existe en San Marcos.
- Se proponen dos nuevas variedades para la ciencia en vista a los resultados de esta investigación: *Boletus edulis* var *americanus* (Flores & Maldonado) var. nov. y *Boletus edulis* var *guatemalensis* (Flores & Maldonado) var. nov.

XIV. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios moleculares de las regiones ITS de las variedades propuestas en el presente estudio, con el fin de esclarecer más la situación taxonómica del *B. edulis* guatemalteco respecto de la especie de origen europeo.
- Realizar más recolectas de *B. edulis* en la Sierra de Las Minas (El Progreso y Zacapa) así como en el Cerro Miramundo (Jalapa) para conocer mejor la distribución de la especie y corroborar las medidas microscópicas con relación a parámetros climáticos.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Bran M, *et al.* 2003. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. *Revista Científica*. 1:1-24
2. Herrera T. y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
3. D.C.M. Beugelsdijk, S. van der Linde, G.C. Zuccarello, H.C. den Bakker, S.G.A. Draisma, M.E. Noordeloos. 2008. A phylogenetic study of *Boletus* section *Boletus* in Europe. *Persoonia*. 20: 1–7
4. Muñoz. J. 2005. *Boletus* s.l. *Fungi Europaei* 2. Candusso Ed. Italia. p.307-335
5. Foiera F., Lazzarini E., Snabl M.& Tani O. *Fungi Boleti*. Edagricole. Bologna. 260p.
6. Korhonen M., Liimatainen K. and Niskanen T. 2009. A new boletoid fungus, *Boletus pinetorum*, in the *Boletus* section *Boletus* from Fennoscandia (Basidiomycota, Boletales) *Karstenia* 49: 41–60.
7. Flores R. Hongos comestibles de Guatemala. En: Boa E. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Non-wood forest products No.17. 148p
8. Iotti, M., Barbieri, E., Stocchi, V. and Zambonelli, A. 2005. Morphological and molecular characterisation of mycelia of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Fungal Diversity* 19: 51-68.
9. Bauer B., Panov S., Roganovic D. and Kulevanova S. 2004. Electrophoretic study of mushroom proteins. *Food, Agriculture & Environment* Vol.2 (1): 148-152.

10. Mello A., Ghignone S., Vizzini A., Sechi C., Pino Ruiu P., Bonfante P. 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. *Journal of Biotechnology* 121: 318–329.
11. Watling R. 1993. Comparison of the macromycete biotas in selected tropical areas of África and Australia: In: Isaac S., Frankland JC., Watling R. & Whalley A.J.S.(eds): *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge University Press. p103-119.
12. Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res* 95: 642-655.
13. Dennis RW. 1970. Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. *Kew Bull. Additional Series*. 111-531.
14. Muller GM. & Halling R.E. 1995. Evidence for high biodiversity of Agaricales in neotropical montane *Quercus* Forests. In: Churchill S.P. *et al.* (Eds.): *Biodiversity and conservation of Neotropical Montane Forests*. New York Botanical Garden. USA.
15. Deacon J.W. & Fleming L.V. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Alle, M.F. (Ed): *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. New York, Chapman ad Hall. Pp. 249-300.
16. Flores R. 2003. *Lactarius* Sección *Dapetes* y *Boletus* Grupo *Edulis* en Guatemala, micorrización y estudio filogenético. Tesis Doctoral: Universidad de Murcia, Facultad de Biología. Murcia, España.
17. Lodge J. et al. 1995. A Survey of Patterns in Non-Lichenized Fungi. *Mitt. Eidgenöss. Forsch.anst. Wald Schnee Landsch.* 70. 1:150-173.
18. Flores R. y Simonini G. 2000. Contributo alla conoscenza delle *Boletales* del Guatemala. *RdM*. 2:141-156

19. Gonzáles A. y Valenzuela R. 1993. Boletáceos y Gonfidáceos del Estado de México I. Discusiones sobre su distribución en diferentes tipos de vegetación, asociaciones ectomicorrizógenas, fenología y comestibilidad. *Rev Mex Micol.* 9: 39-45.
20. Hall I., Stephenson SL., Buchanan PK., Yun W. & Cole AL. 2003. Edible and poisonous mushrooms of the World. Timber Press Inc. Oregon, USA. Pp.222-227
21. Boa E. 2004. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Non-wood forest products 17. 148p.
22. Muñoz JA. 2001. Clave dicotómica para la familia *Boletaceae*. Belarra. 10 -11: 23-30.
23. Arora D. 2008. California Porcini: Three New Taxa, Observations on Their Harvest, and the Tragedy of No Commons. *Economic Botany* 62: 356-375
24. Watling R. 1970. Boletaceae: Gomphidiaceae: Paxillaceae. In: Henderson DM, Orton PD, Watling R, Eds. British Fungus Flora. Agarics and Boleti I. Edinburgh, Scotland:Royal Botanical Garden. 124 p.
25. Singer, R. 1975. Agaricales in Modern Taxonomy. 3ta.Edición J. Cramer. Germany.
26. Dentinger B. 2006. University of Minnesota, Systematics, biogeography, and speciation of Porcini mushrooms 26th Annual Midwest Ecology & Evolution Conference. March 17-19.

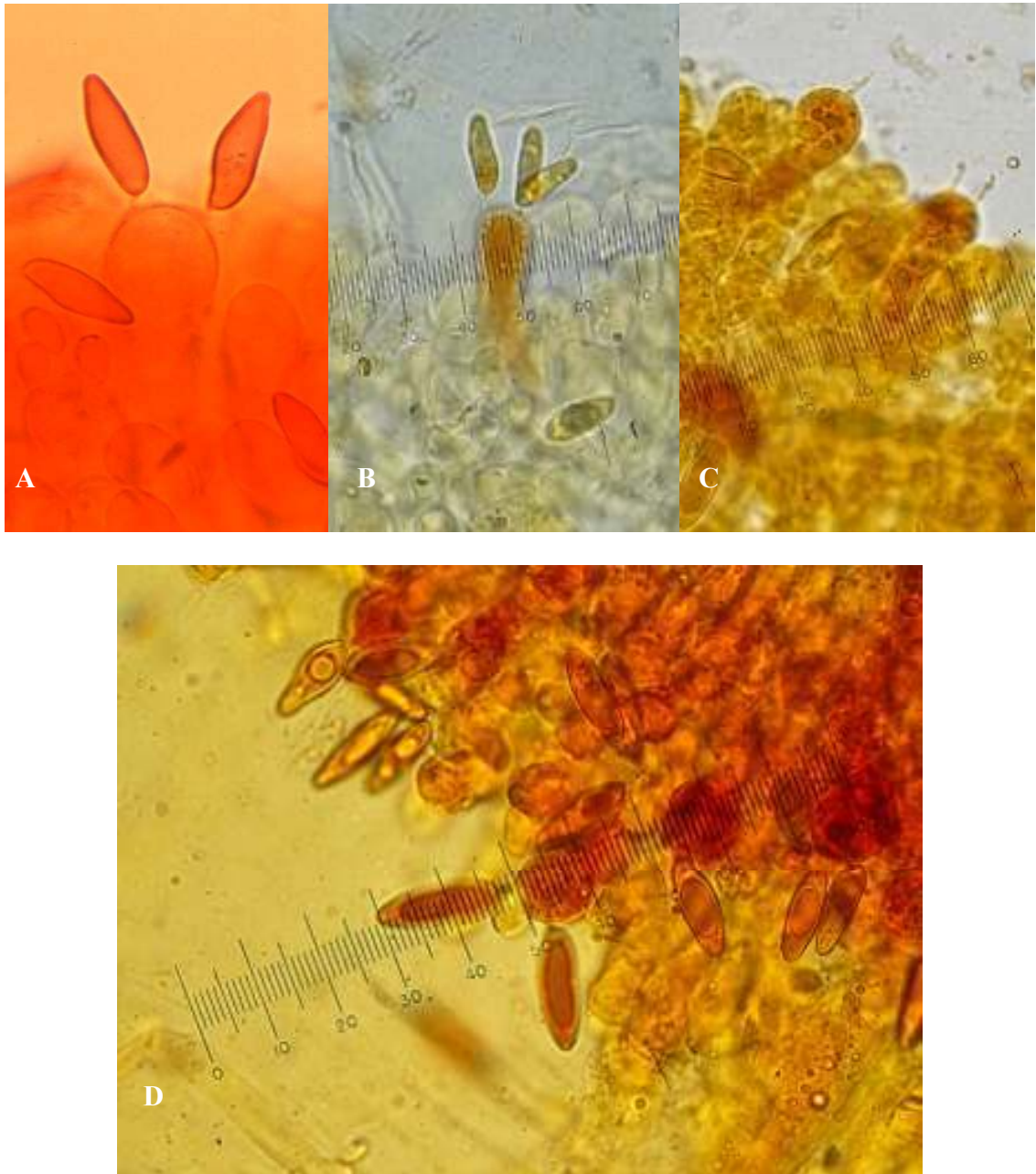
XIII. ANEXOS

Anexo I. Diferencia macroscópica entre *Boletus edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



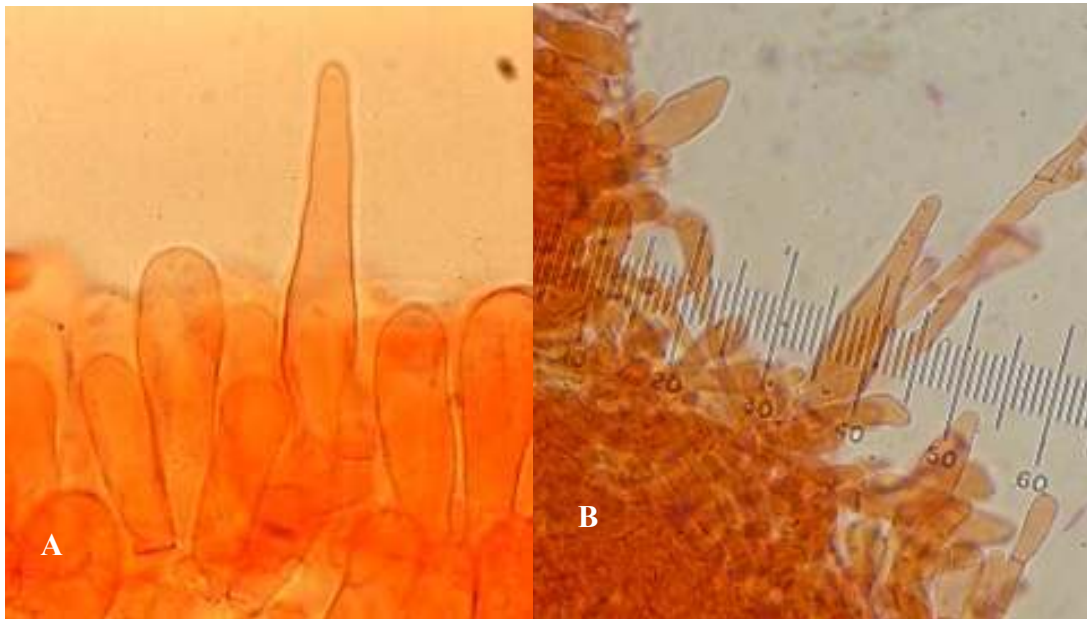
- A. *Boletus edulis* europeo, tomado de *Boletus edulis*, Finland, Uusimaa, Vantaa, Veromies, 1992 Korhonen 11110. Photo M. Korhonen
- B. *Boletus edulis* guatemalteco (Astillero Municipal de San Marcos). Foto: M. Maldonado. Sept.2008

Anexo 2: Diferencia entre basidios de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



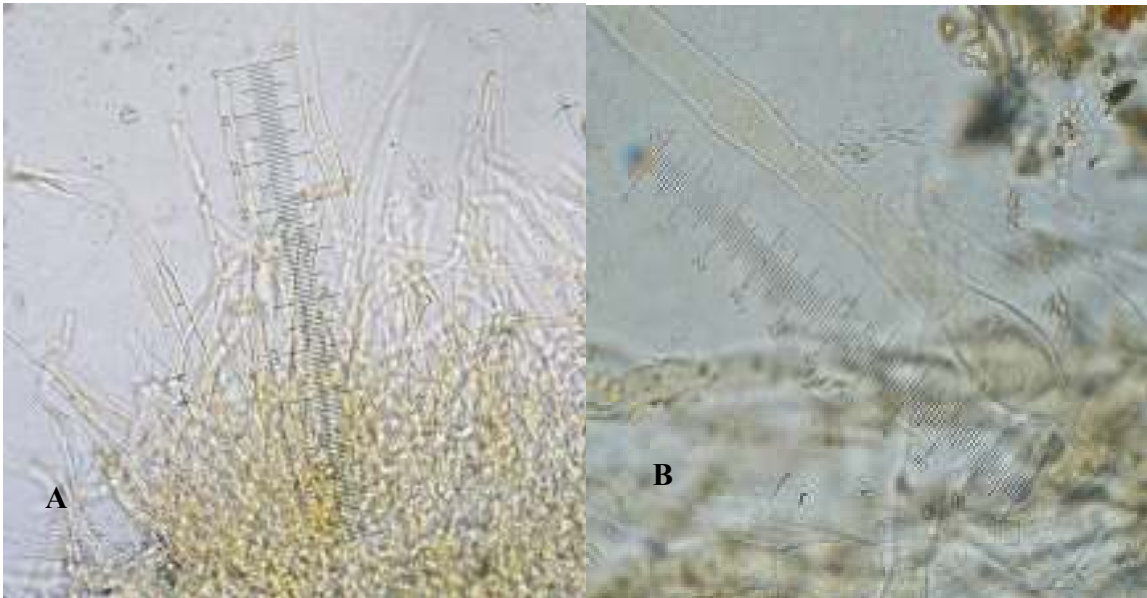
A. Basidio bispórico de *B. edulis* europeo (foto: G. Simonini), B. Basidio trispórico de *B. edulis* guatemalteco C y D. Basidios bispóricos y trispóricos de *B. edulis* guatemalteco (fotos M. Maldonado).

Anexo 3: Cistidios de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



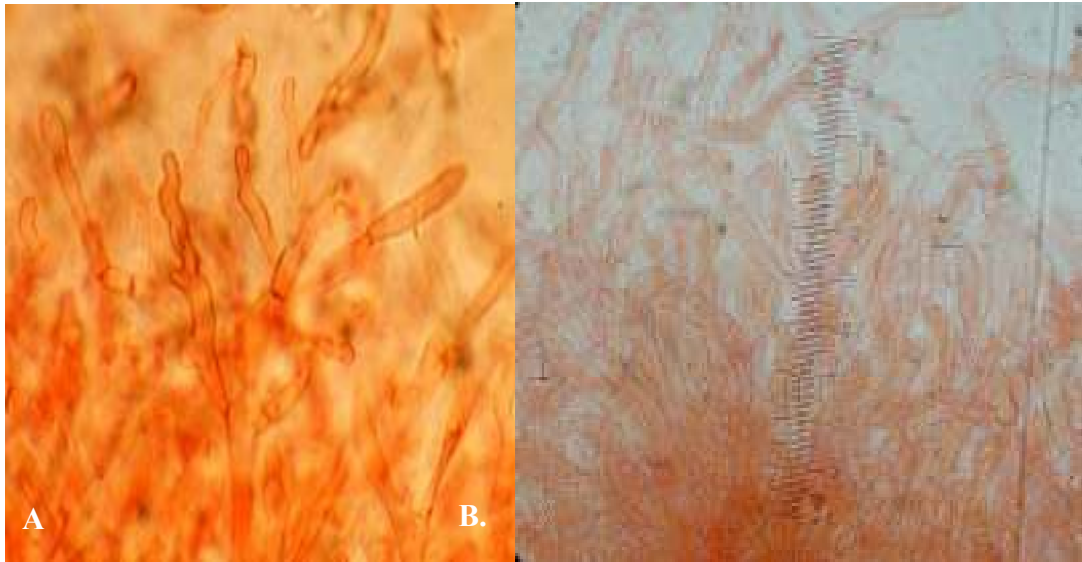
A. Pleurocistidio de *B. edulis* europeo (Foto: G. Simonini) y B. Pleurocistidio de *B. edulis* guatemalteco (Foto: Manuel Maldonado)

Anexo 4: Caulocistidios de *B. edulis* guatemalteco.



Fotos: Manuel Maldonado

Anexo 5: Diferencia entre la distribución de las hifas de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



- A. Hifas en tricoderma de *B. edulis* europeo (Foto: G. Simonini).
- B. Hifas en tricoderma e ixotricoderma *B. edulis* guatemalteco (Foto: Manuel Maldonado).

Anexo 6.

Bosque mixto de coníferas y de pino en
Astillero Municipal San Pedro
Sacatepéquez, San Marcos.



Foto: Manuel Maldonado.

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a crown above, and various heraldic symbols. The shield is set against a background of green hills. The circular border contains the Latin text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA ORBIS CONSPICUA".

DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis sensu lato* DE GUATEMALA CON RESPECTO A LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis* DE EUROPA

MANUEL JOSÉ MALDONADO DÍAZ

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, ABRIL 2010

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
	a. Morfología de los macrohongos	5
	b. Microestructuras fúngicas de interés taxonómico	6
	c. Distribución de los macromicetos en América	7
	c.1 Distribución respecto a la altitud	8
	c.2 Relación hongos y lluvia	8
	d. El género <i>Boletus</i> y su taxonomía	9
	e. <i>Boletus edulis</i>	10
	Características de <i>Boletus edulis</i> en Europa	10
	Características macroscópicas de <i>Boletus edulis</i> de Europa	11
	Características microscópicas	11
	e.1 <i>Boletus edulis</i> en América	11
	e.2 <i>Boletus edulis</i> en Guatemala	12
	e.3 <i>Boletus edulis</i> y su importancia en la industria alimenticia	12
IV.	JUSTIFICACION	13
V.	OBJETIVOS	14
VI.	HIPÓTESIS	15
VII.	MATERIALES Y METODOS	16
VIII.	RESULTADOS	20
	a. Características microscópicas de <i>Boletus edulis sensu lato</i> en Guatemala	20
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	26
X.	CONCLUSIONES	29
XI.	RECOMENDACIONES	30

XII. BIBLIOGRAFÍA

31

XIII. ANEXOS

34

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



DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis sensu lato* DE GUATEMALA CON RESPECTO A LAS MICROESTRUCTURAS DE *Boletus edulis* DE EUROPA

Informe de Tesis

Presentado por

MANUEL JOSÉ MALDONADO DÍAZ

Para optar el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

RESUMEN

Boletus edulis es uno de los hongos micorrícicos comestibles más conocidos en todo el mundo, especialmente en los países del hemisferio norte y en algunos países del sur donde se ha introducido como cultivo junto a distintas especies de pino (1). En Guatemala su consumo se restringe al mercado gourmet de la Ciudad Capital y Quetzaltenango, aunque existen algunas poblaciones campesinas que lo comen de forma tradicional o por haberlo aprendido recientemente.

En el país *B. edulis* sensu lato (s.l.) posee diferencias macroscópicas respecto a la descripción original europea, particularmente en el área mediterránea, en cuanto a color (tonalidades más rojizas y purpúreas), forma del estípite (más alargado que piriforme) y tamaño (diámetros del píleo mayores desde jóvenes). Por otro lado, en Guatemala crece en altitudes arriba de los 2000 metros (hasta 3600msnm) asociado a pino y aparentemente también con pinabete, mientras que en Europa se asocia con más vegetales, particularmente con encinos y avellanos, en altitudes mucho más bajas, incluso a nivel del mar (2, 3, 4 y 5).

Tomando en consideración estas variantes y que no existe información definitiva sobre el estatus de *B. edulis* en el continente americano, ni se reporta su existencia en el resto de Centroamérica, se procedió a analizar las diversas estructuras reproductivas microscópicas así como la forma y disposición de las hifas cuticulares del píleo y estípite de ejemplares guatemaltecos de *B. edulis* s.l., para compararlas con *B. edulis* sensu stricto y determinar si existen diferencias a ese nivel. La existencia de éstas permitirá definir la presencia de nuevas variedades o subespecies en el continente. Los resultados muestran que los ejemplares guatemaltecos poseen esporas más grandes, basidios más largos, generalmente trispóricos, caulocistidios más largos (incluso con 2-3 septos) e hifas del píleo dispuestas en ixotricoderma.

Dado que el único estudio molecular sobre *B. edulis* con muestras guatemaltecas las posiciona claramente como dicha especie, se propone que los ejemplares recolectados en el país sean considerados al menos como dos variedades nuevas para la ciencia hasta que se resuelva el complejo molecular que se está encontrando en diversas partes del mundo para esta especie (3, 4 y 6). Las nuevas variedades que se proponen son: *Boletus edulis* var.

americanus (Flores & Maldonado) var. nov. y *Boletus edulis* var. *guatemalensis* (Flores & Maldonado) var. nov.

III. INTRODUCCIÓN

Boletus edulis es una de las especies de hongos micorrícicos más apreciadas a nivel mundial, especialmente en los países del hemisferio norte y con gran tradición micófila (1), principalmente Europa, donde fue descrita. Esta especie se encuentra dentro la Sección *Boletus*, que hasta hace poco era más conocida como Grupo Edulis, el cual incluye 4 especies en Europa y al menos 6 en América. Todas coinciden en los siguientes caracteres macroscópicos: píleo plano-convexo de color café-rojizo o beige-café oscuro; himenio con tubos inicialmente blanquecinos y luego verde-amarillento oliváceo al madurar y sin cambio de color al tacto; esporas alargadas y lisas; contexto blanco, carnoso, con una ligera coloración beige, rosada o rojiza bajo la cutícula y sabor agradable y retículo blanquecino o beige-café en la superficie del pie (2, 4).

En Guatemala se han detectado al menos seis especies de esta Sección, algunas con clara distribución desde Norteamérica y otras que parecen ser endémicas como *B. luteoloincrustatus* (Flores y Simonini). La más notoria y conocida de ellas es *Boletus edulis* s.l., que crece naturalmente en bosques de pino en altitudes alrededor de los 2000-3600 msnm, produciendo carpóforos que llegan a pesar cerca de 2 kg (11). La mayor demanda local de esta especie se registra en restaurantes gourmet de la Ciudad de Guatemala y Quetzaltenango, así como en tiendas de comestibles finos importados (12). Los estudios sobre su distribución indican que son muy pocas las localidades campesinas que lo consumen a pesar de su sabor y textura (7). *B. edulis* s.l. es una especie muy importante para Guatemala porque puede ser cultivada mediante manejo de bosques de pino en zonas de alta montaña, lo que favorecería no sólo la economía de sus pobladores sino que también contribuiría al mantenimiento de la cobertura boscosa, de fuentes de agua, la creación de áreas de turismo ecológico y micológico y producción de un alimento rico en proteínas y vitaminas (2,17).

B. edulis s.l en Guatemala manifiesta características que no se están reportadas para la especie en Europa, tales como a) diferencias en color (tonalidades más rojizas y purpúreas) b) forma del estípote (más alargado que piriforme en los jóvenes y adultos) c) tamaño (cuerpos fructíferos grandes desde jóvenes) y d) hábitat (en Guatemala crece en

altitudes mayores a los 2000 metros asociados a pino mientras que en Europa se asocia con varias coníferas y árboles de hoja ancha, particularmente con encinos y avellanos, en altitudes mucho menores) (12, 13).

En este trabajo se describen por primera vez las estructuras microscópicas de valor taxonómico de cuerpos fructíferos de *B. edulis* sensu lato, recolectados en diversos puntos geográficos de Guatemala, con la finalidad de compararlas y determinar si existen diferencias respecto a la descripción original (*B. edulis* sensu stricto), de origen europeo. La existencia de diferencias morfométricas será un patrón fundamental para la propuesta de nuevas variedades o subespecies y el conocimiento de la evolución genética y distribución de esta especie en el continente americano.

III. ANTECEDENTES

Guatemala es el país más septentrional del istmo centroamericano. Su geografía física y topografía hace que posea una gran variedad de paisajes y climas distintos con gran riqueza en flora y fauna. Esta diversidad ecológica, junto a la cultural, posiciona al país como una de las áreas de mayor atractivo turístico en América, lo cual debe ser aprovechado para la mejora en la calidad de vida de sus habitantes, principalmente del área rural (1).

En esta gran biodiversidad se incluyen los macrohongos, que en su mayoría pertenecen al Phylum *Basidiomycota*. Los hongos de este filo se pueden encontrar creciendo sobre la tierra (epígeos) o bajo de ésta (hipógeos). Se calcula que existen alrededor de 16.000 especies de basidiomicetos, de los cuales 10.000 son macroscópicos. La mayoría de ellos tienen aplicaciones en la industria agro-alimentaria y medicina y otros son de gran interés por sus propiedades alucinógenas, tóxicas y venenosas (2).

a. Morfología de los macrohongos

Los macrohongos, también llamados setas, manifiestan una gran diversidad de formas en la naturaleza, por ejemplo: los nidos de pájaros (*Nidulariales*), las estrellas de tierra (*Geastrum*), las royas (*Uredinales*), los carbones (*Ustilaginales*), las bolas o bejines (Licoperdáceos), faloideos (*Phallus*), auriculiformes (*Auricularia*) y hongos gelatinosos (*Tremellales*). Poseen además, diversos mecanismos para dispersar sus esporas, ya sea a través de las corrientes de aire, animales (insectos, gusanos y mamíferos), la lluvia y mecánicamente mediante maquinaria y utensilios usados por el hombre (2).

Los basidiomicetos incluyen especies que producen enfermedades en plantaciones ocasionando grandes pérdidas económicas; otros son de gran valor económico y ecológico por la relación micorrícica con plantas y otros son excelentes comestibles (*Agaricus bisporus*, *B. edulis*, *C. cibarius*, etc.) o venenosos como *Amanita phalloides* que causa la muerte en pocas horas (2).

El cuerpo fructífero de un basidiomiceto consta básicamente de tres partes: a) el píleo o sombrero, b) el himenio o himenóforo, situado debajo del píleo y donde se encuentran los

basidios y c) el estípite o pie. El himenio es muy variado en los basidiomicetos pues puede ser liso (*Thelephoraceae*), poroso (*Polyporaceae*), tubular (*Boletaceae*), con agujas (*Hydnaceae*) o con láminas (*Agaricales*). *Boletus edulis* es una especie del orden *Boletales*, con aspecto de seta e himenio compuesto por tubos, donde se encuentran las estructuras reproductivas sexuales (2).

b. Microestructuras fúngicas de interés taxonómico

Entre las estructuras más importantes para la determinación de una especie o de un grupo taxonómico particular se encuentran las siguientes:

En el Píleo:

Cutícula: esta varía según la especie y ambiente. Puede ser lisa o tomentosa, con mucílago o sin él. Las hifas que lo conforman mantienen una estructura espacial que debe ser descrita y que le es característica. Muchas veces el tipo de cutícula es la clave para separar especies.

En el Himenio:

Basidios: estructuras fértiles productoras de esporas. A estas estructuras se les debe medir el largo, ancho, número de esterigmas y su longitud así como su forma y presencia o no de incrustaciones y reacciones de amiloidía.

-**Probasidios:** estructura donde ocurre la cariogamia para la formación de esporas.

-**Basidiolos:** estructuras no fértiles y paráfisis que se organizan en forma de empalizada en el himenio.

-**Metabasidios:** estructura donde ocurre la meiosis previo a la formación de esporas.

Esporas: son sus células reproductivas sexuales, las cuales tienden a mantener una forma relativamente constante según el género fúngico. Se debe medir el largo, ancho y el factor Q, que es la relación largo/ancho. Debe incluirse la descripción de la superficie y medidas de las ornamentaciones como apículos, venas, crestas, placa amiloidea, perforaciones, etc.

Cistidios: son estructuras no fértiles de dos tipos (pleurocistidios y queilocistidios), los cuales pueden funcionar como atrapadores de aire, humedad y compuestos volátiles.

-**Pleurocistidios:** estructuras que se encuentran a los lados de las láminas, tubos o apículos.

-**Queilocistidios:** estructuras que se encuentran en las puntas de las láminas, poros o apículos.

En el Estípite:

-Caulocistidios: estructuras que se encuentran en la superficie del estípite, los cuales varían según su posición en el pie y el tipo de hongo. Son particularmente visibles en el retículo de boletos. Se denominan esferocistos a las células redondeadas que los acompañan. Los caulocistidios más importantes a medir en *Boletus* son los de la parte apical del pie, pues a medida que se observan hacia la base, éstos tienden a manifestar formas variadas y poco útiles en descripciones taxonómicas. Se debe medir el largo, ancho, si existen tabiques o septos y su forma (2).

c. Distribución de los macromicetos en América.

En *Agaricales* parece ser que la distribución de especies con rangos restringidos es la regla y no la excepción. Estos pueden estar prevalentemente en cimas de montañas de climas templados en el Neotrópico, como sucede en Centroamérica, Sudamérica y las islas del Caribe. El sureste de EEUU es un área con alto endemismo de *Boletales* pero el área de las cumbres de montaña es muy limitada y puede restringir el número de especies que estén adaptadas a bosques templados y páramos en las cumbres montañosas de latitudes tropicales (14).

La diversidad de hospederos puede contribuir al gradiente altitudinal de la diversidad fúngica debido a que los potenciales hospederos vegetales e invertebrados alcanzan su mayor diversidad en altitudes medias y bajas (14).

Los grupos de hongos con rangos de diversidad taxonómica alta en grandes altitudes, como *Cortinariaceae* y los grupos de hongos con rangos más diversos a bajas altitudes, se solapan con los de altitudes intermedias, lo que crea una gran riqueza fúngica en esa zona. Hay una gran diversidad de hongos ectomicorrícicos asociados a bosques de *Quercus* spp en altitudes medias y altas en Centroamérica y Colombia, así como de asociación con *Pinaceae* en México y el norte de Centroamérica (15).

Se ha señalado que los hongos micorrícicos de etapas iniciales (*early stage fungi*) tienden a establecerse como monocariones, mientras que los hongos de etapas tardías (*late*

stage fungi) necesitan de sustancias producidas por un micelio pre-establecido que ayude a romper la dormancia de las esporas fúngicas. Si este fenómeno se aplica a los basidiomicetos en general, ayudaría a explicar las diferencias entre dispersión y especies restringidas geográficamente (16).

Las especies con hábitats restringidos son más abundantes en islas, cumbres de montañas de las áreas tropicales y en las largas extensiones del bosque lluvioso tropical. Estos sistemas de distribución coinciden con el de muchos grupos de plantas y animales (16).

La diversidad fúngica parece estar mas fuertemente relacionada con el hábitat y la diversidad de plantas hospederas (especialmente en parásitos y simbioses mutualistas, así como con ciertos grupos de descomponedores (16).

c.1 Distribución respecto a la altitud.

La diversidad de macromicetos, particularmente basidiomicetos parece ser mayor a altitudes medianas y bajas. Dentro de este grupo, *Cortinariaceae* y *Boletales* son los más diversos a altas y medianas altitudes (especialmente en latitudes tropicales), mientras que la diversidad es aparentemente mayor en *Gasteromycetes*, *Aphylophorales*, *Tricholomataceae* y Homobasidiomicetos en general (12, 17).

Los *Agaricales*, por el contrario, presentan mayor diversidad a mayores altitudes respecto a las bajas altitudes de los bosques montanos del Neotrópico. La diversidad de muchos de los hongos, cae dramáticamente debajo de la “línea de árboles” en el Neotrópico (13, 17).

c.2 Relación hongos y lluvia

La mayoría de los macromicetos presentan una estrecha fructificación en relación con la precipitación anual, por lo que la cantidad de lluvia en cada estación puede ser importante. Ciertos grupos como los *Aphylophorales*, *Boletales*, *Agaricales* y *Tricholomataceae* fructifican más abundantemente en áreas con precipitación media a alta en el Neotrópico (13, 17).

Algunos órdenes y familias de hongos muestran correlación entre riqueza de especies y abundancia (producción de cuerpos fructíferos) de las mismas, como sucede en *Boletales* y *Cortinariaceae*. Esta relación, sin embargo, no se mantiene en todas las regiones (por ejemplo con *Agaricales* en el oeste de EEUU) (13).

d. El género *Boletus* y su taxonomía

Uno de los grupos más estudiados de macrohongos ha sido precisamente el orden *Boletales*. Este incluye géneros que han sido profundamente estudiados y utilizados en la producción de planta forestal micorrizada, particularmente en Europa, EEUU y Australia. *Boletus* es un género amplio que ha sufrido muchas variaciones en el último siglo. Actualmente está aceptado que su antigua división en subgéneros pase a conformar géneros independientes (17). Gran parte de los estudios sobre *Boletus* han sido enfocados hacia la producción de cuerpos fructíferos comestibles, ya que incluye especies de gran calidad gastronómica y pocos problemas tóxicos (17 y 18) y también a su contenido alimenticio y relaciones filogenéticas, no sólo por conocimiento evolutivo son también comercial para evitar la venta de una especie por otra en estado seco, donde los boletales tienden a ser muy parecidos (8,9 y10).

Parece ser que la mayor cantidad de especies de *Boletus* se concentra en Norteamérica, donde muchas de ellas evolucionaron y quedaron restringidas y distribuidas localmente. Según estudios de fitogeografía, los pinos (*Pinus* spp) y robles (*Quercus* spp), vegetales ectomicorrícicos, contribuyeron en América Central a formar un importante *centro secundario* de evolución, con muchos taxones, varios híbridos naturales y muchos refugios de condiciones ecológicas especiales (17 y 18).

La mayoría de las especies de la familia *Boletineae* asociadas a encinos pertenecen a dos categorías: 1) especies que entran a México desde el norte (Canadá y EEUU), sin cambiar de huésped micorrícico, 2) especies originadas en el sur que se adaptaron a varios huéspedes vegetales. Los de la primera categoría, pueden identificarse con el género *Boletus*, algunos de los cuales se adaptaron a las condiciones especiales de América Central

o México, pero claramente con progenitores norteamericanos (de Florida, Texas y la costa Atlántica) (18 y 19).

En el norte del Neotrópico (México y Centroamérica), se desarrollan la mayor parte de los géneros de *Boletales* que se conocen del Hemisferio Norte. Muchas de sus especies parecen coincidir entre el Norte y el Neotrópico, así como con muchas europeas, aunque también existen especies endémicas, como *B. guatemalensis*, *B. luteoloincrustatus*, *B. flavoniger*, *B. neoregius*, y *B. quercophilus* (17,18).

e. *Boletus edulis*

Características de *Boletus edulis* en Europa

B. edulis posee un estípote muy ancho, que incluso cuando el hongo aún es joven, llega a ser más ancho que el propio sombrero del hongo; y con ausencia de escamas finas, que son características de algunas especies de *Leccinum*. Algunos taxónomos dividen a *B. edulis* en varias sub-especies y separan a las especies *B. aereus*, *B. aestivalis*, *B. edulis*, *B. pinicola* y *B. reticulatus*. Ninguna de estas puede ser realmente confundida con especies venenosas, sin embargo el cuidado debe mantenerse durante la identificación de *B. edulis*. Cuando el sombrero del hongo se encuentra totalmente abierto, puede llegar a medir hasta unos 20 centímetro aproximadamente. Sin embargo, una ilustración en la revista “The Mycologist” demuestra un enorme *B. edulis* colectado en el Reino Unido, de aproximadamente 7 libras de peso, y con un sombrero de 42 centímetro de diámetro, con 18 centímetros de alto (3). En Europa existen actualmente cuatro formas de *Boletus edulis* (*B. edulis f. edulis*, *B. edulis f. citrinus*, *B. edulis f. albus*, *B. edulis f. betulicola*), que aunque difieren en el hábitat, huésped micorrícico y coloración, sus micro estructuras tienden a ser similares (4).

Características macroscópicas de *Boletus edulis* de Europa

Características macroscópicas del cuerpo fructífero de *B. edulis*:

- Sombrero con cutícula lisa, brillante y untosa.
- Sombrero de color marrón bayo, pardo rojizo, con el margen más claro.
- Carne blanca inmutable, rosa a rosa-marrón bajo la cutícula.
- Pie con retículo en la parte superior, de color blanquecino.

Características microscópicas:

- Cutícula sin mucílago.
- Esporada: color ocre-olivácea.
- Esporas: de color marrón-oliváceo, lisas, fusiformes y elipsoidales, con gúttulas internas. 13-18 μ m x 4-7 μ m.
- Basidios: tetraspóricos a bispóricos, claviformes; 30-40 μ m x 10-12 μ m.
- Cistidios: En forma de huso de 48-67 μ m x 5-10 μ m, inconspicuos, hialinos y de pared delgada.
- Hábitat: Crece sobre todo bajo frondosas (robles, castaños, hayas y encinas), aunque existe alguna cita bajo coníferas (pino/abetos) (20).

e.1 *Boletus edulis* en América:

En el Nuevo Mundo, la diversidad de *Boletales* disminuye a medida que se aproxima hacia el ecuador, pero no hay concordancia en aumento de especies de hongos en las latitudes mayores del hemisferio sur. Los *Boletales* del Nuevo Mundo son en su mayoría simbiontes ectomicorrícicos de las familias *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Salicaceae*, y su diversidad sigue el patrón de diversidad de sus hospederos vegetales (17 y 18).

La alta diversidad de *Boletales* asociados con árboles pertenecientes a *Leguminosaceae* y *Dipterocarpaceae* en África central y con *Dipterocarpaceae* en Malasia sugiere que la baja diversidad de *Boletales* en el Nuevo Mundo tropical es anómala (17).

e.2 *Boletus edulis* en Guatemala

En Guatemala, la presencia de *Boletales* es grande. Hasta la fecha sólo se han determinado 4 especies del grupo *Edulis*: *Boletus edulis* Bulliard:Fries sensu lato, *B. luteoloincrustatus* Flores & Simonini, *B. pinophilus* Pilat & Dermeck y recientemente en 2007, *B. variipes* var *fagicola* Smith & Thiers y *Boletus* aff *variipes* Peck.(17).

Boletus edulis en Guatemala produce carpóforos de gran tamaño en cualquiera de las áreas donde crece en el país, además el píleo posee tonalidades anaranjadas en cuerpos fructíferos maduros (17). Reportes sobre la fenología de la especie en México, indican que la producción de cuerpos fructíferos está asociada principalmente a bosques de coníferas, comprende los meses de junio, julio y agosto y posee características organolépticas excelentes (19 y 21).

e.3 *Boletus edulis* y su importancia en la industria alimenticia

El Grupo *Edulis* incluye algunas de las setas más apreciadas a nivel mundial por su carácter gastronómico por su excelente sabor. Existe poca información sobre la venta y mercadeo de esta especie a nivel mundial, sin embargo datos oficiales indican que sólo en el año 1987, 1049 toneladas de *B. edulis* fueron vendidas en Francia con un valor estimado de 56 millones de francos (aproximadamente \$9,600,000); asimismo, 1000 toneladas en Alemania con un valor aproximado de \$6,000,000 y 2387 toneladas en Italia con valor de \$17,000,000. Se estima que en la actualidad la demanda del consumo se ha incrementado respecto de los valores reportados para ese entonces (21).

En Norteamérica existen otras especies de *Boletus* grupo *Edulis* respecto a las que se encuentran en Europa. Aparentemente es más rico en especies en América que en Europa, pero hasta la fecha no hay suficientes estudios moleculares que confirmen la identidad y origen de tal diversidad (3, 4, 6, 10, 16, 22 y 23).

IV. JUSTIFICACION

Debido a que existen algunas diferencias a nivel macroscópico en *Boletus edulis* s.l. de Guatemala respecto a lo descrito para Europa, es necesario hacer un análisis minucioso de las microestructuras reproductivas así como de la disposición y estructura de las hifas del píleo y estípite de las muestras locales, para determinar si se trata de la misma especie o de variedad(es) local(es) que aún no han sido conocidas por la ciencia.

Teniendo en cuenta que las muestras locales han sido recolectadas en diversos puntos del país, es fundamental hacer una descripción completa que incluya la comparación de sus microestructuras y así elaborar una descripción general con todas las características que le son propias.

Por otro lado, es importante realizar este tipo de estudios en Guatemala, ya que es necesario revisar y confirmar la identidad de especies registradas con nombres de especies europeas, ahora que se dispone de más elementos informativos a nivel taxonómico que hace algunas décadas.

La descripción de las microestructuras y los resultados moleculares actuales de la especie en Guatemala podrán ser de utilidad para la comercialización certificada de cuerpos fructíferos a Europa y de conocimiento de la evolución genética y de distribución en el continente americano.

IX. OBJETIVOS

General:

Describir y comparar las microestructuras reproductivas y los diferentes tipos de hifas en cuerpos fructíferos de *Boletus edulis* s.l. recolectados en Guatemala y compararlas con las descritas para la especie en Europa.

Específicos:

1. Describir la morfología y dimensión de estructuras reproductivas microscópicas (basidios, cistidios, esterigmas, esporas y caulocistidios) presentes en los cuerpos fructíferos de *B. edulis* s.l. hallados en diversas regiones de Guatemala.
2. Describir y fotografiar la estructura de la cutícula del píleo y del estípite de los carpóforos de *B. edulis* s.l. así como la morfología y dimensión de las hifas que la conforman.
3. Determinar si existen variaciones en la microscopia de las muestras guatemaltecas de *B. edulis* s.l. respecto a lo descrito en la bibliografía europea y compararlas con muestras de *B. edulis* sensu stricto de Europa, con el fin de confirmar la presencia o ausencia de variedades o si se trata de una nueva especie.

X. HIPÓTESIS

Las muestras de *B. edulis* encontradas en Guatemala poseen algunas diferencias a nivel microscópico de las reportadas para *B. edulis* en Europa.

XI. MATERIALES Y METODOS

Universo:

Todos los carpóforos de la especie *B. edulis* recolectados en Guatemala que se encuentran depositados en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta”, del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Muestra:

Se escogieron los mejores ejemplares, jóvenes y maduros, de *B. edulis* recolectados en Quetzaltenango, Sololá, Huehuetenango, San Marcos, Totonicapán y El Progreso, depositados en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta” (RPM), acorde a su estado de conservación y descripción.

Materiales:

La mayoría de los materiales que fueron utilizados pertenecen al Laboratorio de Micología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC:

Equipo:

- Microscopio Unico® con objetivo de medición en micras
- Microscopio estereomicroscópico Axiostar®
- Cámara fotográfica Sony Cybershot® de 7.2 MGP de pertenencia propia
- Hojas de afeitar (para realizar cortes)
- Cuaderno de 40 hojas (Para anotar resultados)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Internet (recabar información bibliográfica)
- Papel mayordomo
- Piseta
- Papel limpiantes

Reactivos:

- Reactivo de Melzer (medio de contraste y para tinción de estructuras amiloideas)
- Lugol
- Rojo Congo (medio de contraste)
- Agua destilada (para rehidratar muestras)
- KOH al 3%
- Aceite de Inmersión.:

Recursos económicos:

Las muestras se encontraban en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta. Los reactivos utilizados así como el estereoscopio y el microscopio fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.

Recursos institucionales:

- Instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.
- Instalaciones del Laboratorio de Micología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.

Metodología:

1. Se obtuvieron las muestras de la Micoteca RMP del Departamento de Microbiología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC.
2. Se seleccionaron las muestras de *Boletus edulis* a analizar, acorde a su estado de conservación y descripción de sus características.
3. Se sustrajo la porción de interés para el análisis microscópico: una parte del píleo, otra del himenio y otra del estípite.
4. Unas muestras fueron rehidratadas con agua destilada y KOH al 3%. Otras solamente con agua destilada y posteriormente se agregó reactivo de Melzer para teñir áreas amiloideas en las microestructuras. Otras muestras se tiñeron con Rojo Congo para contrastar las estructuras, observarlas y fotografiarlas mejor.

5. Se llevó a cabo la medición microscópica de las estructuras de interés (basidios, esterigmas, cistidios: queilocistidios y pleurocistidios, esporas e hifas), utilizando el microscopio con ocular de medida y con objetivo de inmersión (100X), realizándose al menos 20 mediciones diferentes de cada una de esas estructuras.
6. Se tomaron fotografías de las estructuras microscópicas para tener una base gráfica de lo encontrado.
7. Se reportaron los resultados obtenidos en tablas y gráficas.
8. Se realizó una comparación bibliográfica entre *B. edulis* de Guatemala con *B. edulis* de Europa. En vista que se ha ido publicando más información sobre la especie, se hizo una breve comparación con las distintas variedades de *B. edulis* que existen en Norteamérica (EEUU).
9. Se preparó el informe de los análisis realizados, los resultados y las conclusiones, utilizando también secuencias genéticas y árboles filogenéticos que ya han sido reportados.

Diseño de la investigación:

Muestreo: Las muestras que fueron analizadas se encuentran en la Micoteca “Rubén Mayorga Peralta” (RPM). La colección cuenta con 18 ejemplares de diversas procedencias, de los cuales se escogió el mejor por procedencia. En total se analizaron 6 muestras herborizadas de *Boletus edulis* y 4 frescas recolectadas en el Astillero Municipal de San Pedro Sacatepéquez, San Marcos (ver tabla 1).

Tabla 1: Procedencia de las muestras guatemaltecas de *Boletus edulis* s.l.

No. de muestra	Tipo de muestra	Procedencia
MMG-1279	Micoteca	Ixchiguán, San Marcos
MMG-1246	Micoteca	Ixchiguán, San Marcos
MMG-1234	Micoteca	San Mateo Ixtatán, Huehuetenango
MMG-1242	Micoteca	Momostenango, Totonicapán
MMG-1240	Micoteca	San Miguel Siguilá, Quetzaltenango
MMG-1231	Micoteca	Sierra de Las Minas, El Progreso
MMG-1.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-2.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-3.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos
MMG-4.08	Muestra en fresco	Astillero Municipal, San Pedro, San Marcos

Variables:

Cuantitativas: largo y ancho de basidios, cistidios, esporas, esterigmas e hifas cuticulares, haciendo 20 mediciones de cada estructura por ejemplar seleccionado. Con ello se evaluó la exactitud y reproducibilidad.

Cualitativas: forma de las microestructuras y disposición de las hifas de la cutícula del píleo y del estípite. Amiloidía de las microestructuras y presencia o ausencia de incrustaciones en las mismas. Se descartó la muestra de Sololá por exceso de secado, ya que al observarse al microscopio muchas estructuras se destruían.

Análisis de resultados: Se llevó a cabo un análisis morfométrico de las variables con los valores de referencia para la especie sensu stricto (europea). Se trabajó con un nivel de confianza del 99% (ver tabla 2).

Modelo estadístico:

$$n = \sigma^2 z^2 / d^2$$

σ = Desviación estándar

z = Nivel de confianza

d = Límite de error

Tabla 2: Número de repeticiones con nivel de confianza de 99%

Nivel de confianza %	Z	Z ²	# de repeticiones para cada microestructura:
90	1.64	2.7	3
95	1.96	3.84	4
99	2.58	6.65	7*

*Esto corresponde al número **mínimo** de muestras analizadas para trabajar a este nivel de confianza, sin embargo debido a requisitos internacionales, se analizaran 20 repeticiones para cada microestructura

XII. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 10 carpóforos para su microscopía. En la Micoteca Rubén Mayorga Peralta se encontraban depositados 18 ejemplares de *Boletus edulis* sensu lato, recolectados en distintos puntos del país (San Marcos: Ixchiguán, Astillero Municipal, San José Ojetenam, Volcán Tajumulco; Sololá: Santa Lucía Utatlán; Totonicapán: Momostenango y carretera a Huehuetenango; Quetzaltenango: San Miguel Siguilá y San Juan Ostuncalco; El Progreso: Sierra de Las Minas). De estos se escogió un ejemplar por Departamento y por sus características macroscópicas, estado de conservación y descripción. También se incluyeron 4 ejemplares recolectados en el municipio de San Pedro Sacatepéquez, Departamento de San Marcos, los cuales son llamativos por su gran tamaño, y que posteriormente fueron ingresados y almacenados en la Micoteca (ver tabla 1).

A. Características microscópicas de *Boletus edulis* sensu lato en Guatemala

Para cada ejemplar se realizaron 20 mediciones de cada estructura microscópica de valor taxonómico: largo y ancho de basidios, cistidios, esporas y número de esterigmas por basidio para cada una de las muestras (de donde se obtuvieron los valores máximos y mínimos). También se analizó la forma y medida de las hifas en las cutículas del píleo y estípite para cada ejemplar. Los resultados de las mediciones y observaciones se anotan en la tabla 3 donde se comparan con las distintas formas de *B. edulis* para Europa y Norteamérica.

Tabla 3. Comparación dimensional de microestructuras entre variedades de *Boletus edulis* de Norteamérica, Europa y Guatemala.

Estructuras microscópicas	Europa				Norteamérica			Guatemala		
	<i>Boletus edulis f. edulis</i>	<i>Boletus edulis f. albus</i>	<i>Boletus edulis f. citrinus</i>	<i>Boletus edulis f. betulicola</i>	<i>Boletus edulis var. edulis</i>	<i>Boletus edulis var. clavipes</i>	<i>Boletus edulis var. aurantio ruber</i>	<i>Boletus edulis var. grandedulis</i>	<i>Boletus edulis var. americana</i>	<i>Boletus edulis var. guatemalensis</i>
Esporas	13.5-16.5 (19) x 4.3-5.5 (6.5) μm	14-16.5 (19.5) x 4.3-5.6 (6.5) μm	13.8-16.2 x 4.6-5.4 μm	14.9-17 x 4.3-5.6 μm	14-17 x 4-6.5 μm	15-19 x 4.5-6 μm	13-17(19) x 4.5-6 μm	(12) 13-15.5 (17) x (3.8) 4-5.5 (6) μm	15-17(18) x 5-6.4 μm	(15)-17(18) x 5-6(7) μm
Basidios	30-50 x 8-15 μm	30-50 x 8-15 μm	30-50 x 8-15 μm	30-45 x 8-15 μm	32-40 x 10-12 μm	32-42 x 9-11 μm	26-35 x 7-9 μm	_____	30-38 x 10-13 μm	(25)30-34(37) x 10-12(13) μm
Cistidios	35-60 x 8-12 μm	35-60 x 8-12 μm	35-60 x 8-12 μm	35-50 x 7-12 μm	_____	25-50 x 7-9 μm	_____	_____	50-63 x 7-12 μm	(35)50-55(61) x (7)8-10(11) μm
Caulocistidios	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	40-90 x 9-16 μm Sin septos	42-48 (65) x 10-12 μm	sin datos	sin datos	_____	90-130 (210) x 9-13 μm Con 2-3 septos	70-120 x 10-12 μm Con 1-3 septos
Esterigmas	4 o 1	4 o 1	2 o 4	2 o 4	4	4	4	2,3 o 4	2 -3	2-3(4)

Fuente: Muñoz, J.(2005), Arora *et al* (2008) y datos experimentales.

En la tabla 4 se compara, en líneas generales, los resultados del análisis microscópico con lo reportado para la especie *sensu stricto*. En ella se aprecia la diferencia de máximos y mínimos y la media numérica. A todos los resultados obtenidos de las mediciones se les aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas con el objetivo de determinar diferencias entre las muestras (diferencias intra-específicas). La tabla 3 revela que existe una diferencia significativa para largo y ancho de esporas así como para el ancho de cistidios en las muestras guatemaltecas.

Tabla 4: Estadísticos descriptivos de las variables basidios, esporas, cistidios de *Boletus edulis s.l.* recolectados en Guatemala

Variable	Reporte bibliográfico europeo μm	Datos para <i>B.edulis s.l.</i> en Guatemala		
		Mínimo μm	Máximo μm	Media μm
Largo de basidios	30-40	30.00	38.00	32.3450
Ancho de basidios	10-12	10.00	13.00	11.2600
Largo de esporas	14-17	15.00	18.00	16.0550
Ancho de esporas	4-6	5.00	6.42	5.8400
Largo de cistidios	43-67	50.00	63.00	53.2900
Ancho de cistidios	5-10	7.00	12.00	9.2200

Fuente: Base de datos experimental. Elaboración en Minitab, análisis en SPSS versión 15

En la tabla 5 se analizan y comparan los resultados obtenidos de las muestras guatemaltecas con los valores de referencia reportados por la literatura para *B. edulis sensu stricto*. En ella se observa claramente la diferencia estadística para las mismas variables (largo de esporas y ancho de basidios y cistidios).

Tabla 5: Prueba de Z aplicada a las recolectas guatemaltecas frente a la media reportada para Europa, con un intervalo de probabilidad de $\alpha=0.01$.

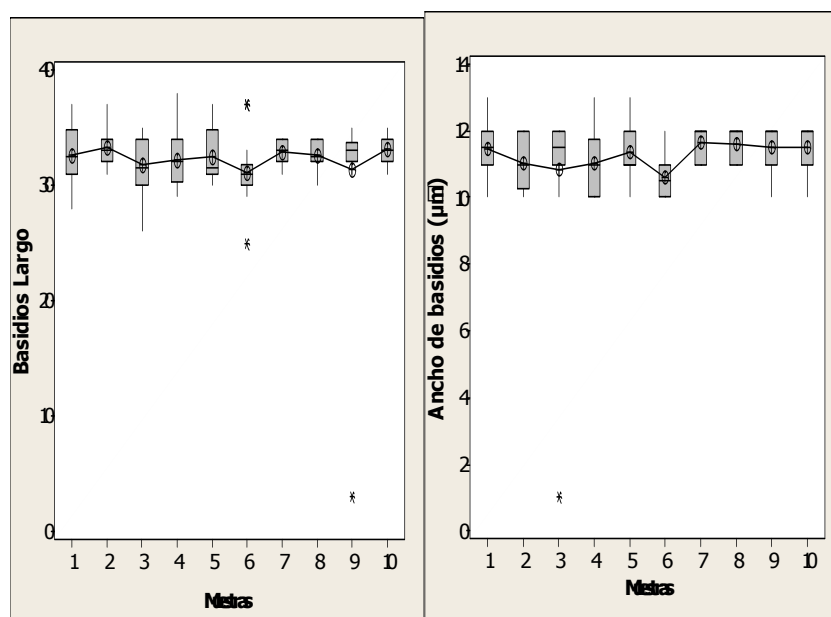
Variable Respuesta	Hipótesis nula Parámetros europeos	Hipótesis alterna Parámetros muestras guatemaltecas	p value
Basidios, largo	$\mu = 30 - 40 \mu\text{m}$	$\mu \neq 30 - 38 \mu\text{m}$	> 0.01
Basidios, ancho	$\mu = 10 - 12 \mu\text{m}$	$\mu \neq 10 - 13 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**
Esporas, largo	$\mu = 15 - 17 \mu\text{m}$	$\mu \neq 13 - 18 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**
Esporas, ancho	$\mu = 4 - 7 \mu\text{m}$	$\mu \neq 4 - 7 \mu\text{m}$	> 0.01
Cistidios, largo	$\mu = 48 - 67 \mu\text{m}$	$\mu \neq 50 - 63 \mu\text{m}$	> 0.01
Cistidios, ancho	$\mu = 5 - 10 \mu\text{m}$	$\mu \neq 7 - 12 \mu\text{m}$	Menor a 0.01**

Fuente: Base de datos experimental. Análisis en GenStat versión 7

**Diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significancia.

En la gráfica 1, que muestra la media de las mediciones para cada uno de los ejemplares analizados para las variables largo y ancho de basidios, se observa que existe diferencia entre los ejemplares de San Marcos, particularmente con el de Sierra de Las Minas, que posee basidios más pequeños. La gráfica muestra la uniformidad entre los ejemplares de la misma zona.

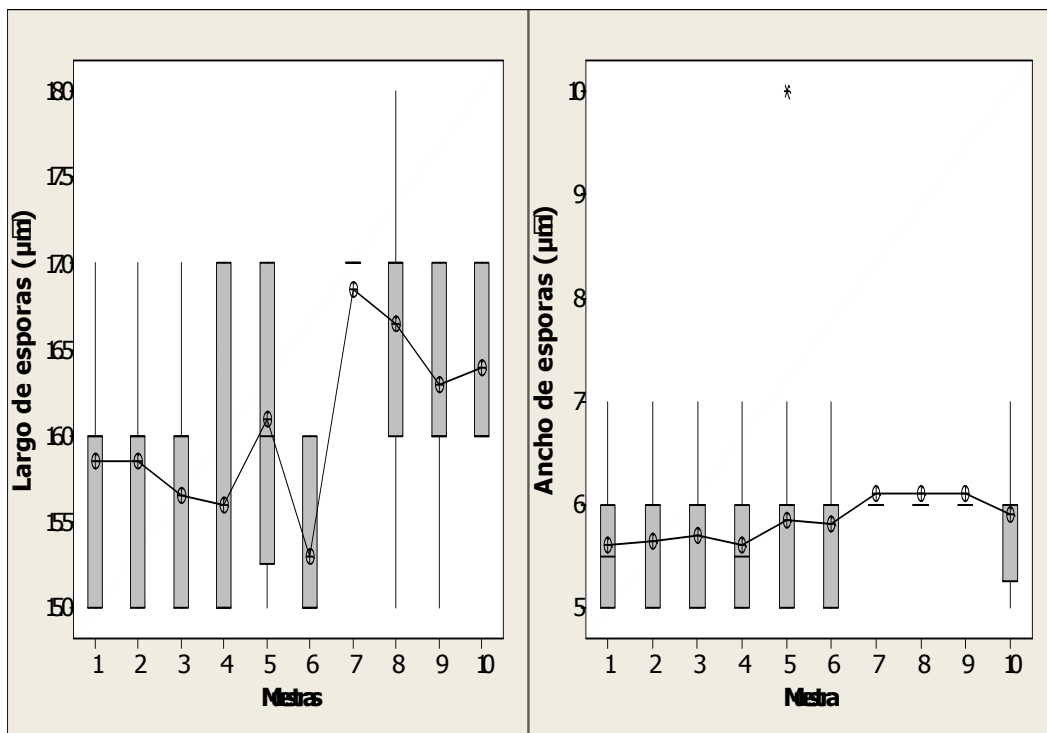
Gráfica 1: Boxplot de la medición del largo y ancho de basidios de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en Guatemala.



Fuente: Base de datos experimental. Elaboración en Minitab versión 14.

La gráfica 2, que muestra la tendencia de las variables largo y ancho de esporas, permite observar que los ejemplares de San Marcos (cordillera volcánica) poseen esporas más grandes que en los del resto del país. También se puede apreciar que las esporas del ejemplar de Sierra de las Minas tienen una media inferior al resto de las demás.

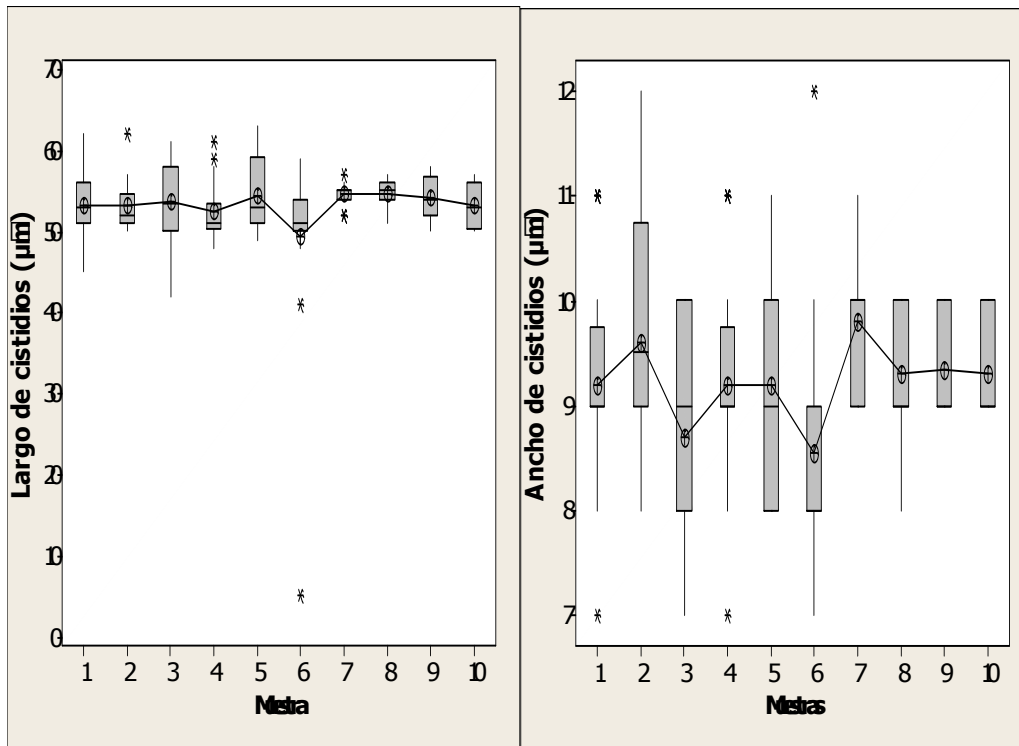
Gráfica 2: Boxplot de la medición de largo y ancho de esporas de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en Guatemala.



Fuente: Base de Datos, elaboración en Minitab versión 14

La gráfica 3 representa las variables largo y ancho de cistidios. En esta gráfica se repite la uniformidad entre las muestras de San Marcos y variabilidad media en las otras procedencias. La muestra 6, de Sierra de Las Minas, presenta la media más pequeña en dimensiones.

Gráfica 3: Boxplot de la medición de largo y ancho de cistidios de *Boletus edulis* s.l. recolectados en Guatemala.



Fuente: Base de Datos, elaboración en Minitab versión 14

Otras variables medidas que resultaron diferentes a las reportadas para la especie *sensu stricto*, fueron la forma y tamaño de caulocistidios de la parte apical del estípite. Mientras que en Europa los caulocistidios son reportados entre 40-60 micras de longitud, los guatemaltecos, particularmente los de San Marcos, sobrepasan las 200 micras y con 2-3 septos (ver tabla 3). La cutícula del píleo también muestra diferencia en la estructura, pues hay reportes que la describen como tipo “cutis” o en “tricoderma”, pero todas las muestras guatemaltecas poseen la cutícula en ixotricoderma (tricoderma embebido en abundante mucílago). Las hifas muestran una longitud variable entre 18-45µm por 7-10µm de diámetro. Sin embargo es fácil observar algunas hifas terminales largas y gruesas, que se tiñen con más facilidad, de hasta 100 µm de longitud por 15 µm de ancho. La forma es sumamente variable, pues van desde clavadas simples a bifurcadas, globosas o tipo píleo-cistidios. Los extremos apicales miden entre 10-15 µm de largo y hasta 8 µm de diámetro.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Dos aspectos importantes en la identificación de especies de macrohongos lo constituyen las descripciones macroscópicas y el análisis microscópico. Al realizar las descripciones macroscópicas se encontró que los ejemplares de *B. edulis* recolectados en Guatemala presentaron algunas similitudes respecto a lo descrito para Europa, tales como cutícula lisa, brillante y untuosa, borde excedente y blanquecino, coloración rosado-beige en el contexto bajo la cutícula y retículo blanco a beige en el estípite. Sin embargo, en cuanto al color, los cuerpos fructíferos de los ejemplares jóvenes en Guatemala varían pues presentan tonalidades un tanto purpúreas a café-rojizo en los más jóvenes y que después cambian a naranja en los carpóforos maduros (principalmente los ejemplares 7, 8, 9, 10 de San Marcos: Ixchiguán y Astillero Municipal), otros tienden a mantener una coloración café-rojiza similar a lo descrito para Europa o que se reporta en Norteamérica (pardo y en algunas ocasiones rojiza) (15).

En cuanto a la altitud en que habita *B. edulis* en Guatemala es necesario resaltar que todos los ejemplares fueron recolectados en alturas mayores a los 2,000 metros, en bosques de pino; ésta es una notoria diferencia ecológica ya que *B. edulis* en Europa crece desde el nivel del mar (cercano a las playas) hasta los 1,250 metros y en asociación principalmente a coníferas y latifoliadas (24). La mayoría de los cuerpos fructíferos maduros recolectados fueron muy grandes, algunos llegando a alcanzar los 30 centímetros de diámetro en el píleo y hasta 27 centímetros de altura en el estípite, sobretodo en los ejemplares de San Marcos, seguidamente de San Mateo Ixtatán (Huhuetenango) y Totonicapán. La variedad *grand-edulis*, que se encuentra en California, posee cuerpos fructíferos muy similares e incluso de mayor tamaño; sin embargo no hay datos de su microscopía (23) como para comparar con las muestras guatemaltecas. El estudio molecular de Flores (2003), que incluye muestras de California y muy probablemente de esa variedad por la descripción de hábitat y tamaño, revela que se trata de una entidad genética distinta aunque más cercana que *B. edulis* sensu stricto.

En el análisis microscópico, la estadística descriptiva demostró que en conjunto los ejemplares guatemaltecos presentan diferencias respecto a *B. edulis* sensu stricto y sus formas (*f. citrinus*, *f. albus*, *f. edulis*, *f. betulicola*), en algunas de las variables taxonómicas más importantes como largo de esporas y ancho de basidios y cistidios, que mostraron valores más altos que los reportados para *B. edulis* s.s. de Europa (20) (ver Anexo 2 y Tabla 3).

Estas tres variables fueron sometidas a un análisis de prueba de Z con el fin de determinar significancia estadística con respecto de la especie en Europa, lo cual fue confirmado (ver Anexo 3 y Tabla 4).

El análisis microscópico de las muestras guatemaltecas también reveló la presencia de notorios caulocistidios (presentes en la superficie del estípite) sobre los cuales se ha escrito muy poco (4, 5 y 6). Los caulocistidios de los ejemplares guatemaltecos son mucho más grandes que los descritos para las formas europeas, cuyo valor oscila entre 40-60 μm de largo (4 y 24) y no presentan septos, mientras que en las muestras guatemaltecas estas estructuras llegaron a medir hasta 210 μm y presentaron en algunos casos hasta tres o más septos (ver Anexo 4 y Tabla 2). Las mayores dimensiones fueron para las muestras de San Marcos, tanto frescas como deshidratadas, lo que debe considerarse un elemento taxonómico importante y particular.

Respecto a la estructura de la pileipellis o cutícula del píleo, las hifas de las muestras guatemaltecas presentaron una distribución con terminación en tricoderma e ixotricoderma, distinto de lo reportado por la especie europea y sus formas, que sólo son reportadas en forma de cutis o en tricoderma (ver Anexo 5) (22). Aunque los estudios más antiguos sobre la estructura de la cutícula de *B. edulis* en Europa mencionan hifas terminales cortas y delgadas, últimamente se ha publicado que existe mayor diversidad de formas (4) similares a las encontradas en Guatemala; sin embargo debe mencionarse que éstas presentan también hifas aisladas muy gruesas, dextrinoides, con puntas romas.

A lo largo del análisis se encontró que existen diferencias microscópicas según la procedencia de las muestras. Los ejemplares recolectados en los bosques de pino de los

municipios de Ixchiguán y San Pedro Sacatepéquez (San Marcos), muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10, demostraron poseer cistidios y basidios un poco más anchos (gráficas 1 y 2), así como esporas más largas (gráfica 3) que los ejemplares recolectados en Huehuetenango, Quetzaltenango, Totonicapán y Sierra de Las Minas (El Progreso) (muestras 3, 4, 5 y 6), situación que viene a corroborar lo encontrado por Flores (2003) sobre la diversidad genética entre una muestra de Ixchiguán y otra de San Mateo Ixtatán (Huehuetenango). La muestra de la Sierra de Las Minas siempre mostró dimensiones un poco inferiores a las otras aunque dentro del mismo rango, situación que podría verse afectada por las condiciones climáticas del lugar.

Tomando en consideración las diferencias macro y microscópicas de *B. edulis* s.l. de Guatemala con *B. edulis* de Europa y las diferencias entre las mismas muestras guatemaltecas, se propone el establecimiento de dos nuevas variedades de *Boletus edulis* para la ciencia: *Boletus edulis* var. *americanus*, que abarca todos los hongos recolectados en bosques de pino de San Pedro Sacatepéquez e Ixchiguán del departamento de San Marcos (muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10) y *Boletus edulis* var. *guatemalensis*, conformada por las muestras recolectadas en los departamentos de Huehuetenango, Quetzaltenango, El Progreso, Totonicapán y muy probablemente Sololá (muestras 3, 4, 5 y 6). Dado que están apareciendo complejos de morfo-especies en los macrohongos y de complejos dentro de la misma especie *B. edulis*, es necesario confirmar estos resultados con análisis moleculares que comparen la región ITS de más ejemplares guatemaltecos con la más reciente colección de secuencias europeas disponibles en los bancos de genes (25). Los resultados de un estudio global permitirán definir si estas nuevas variedades o especies que se han agregado al grupo *Edulis* deben considerarse variedades, subespecies o nuevas especies (3, 26).

X. CONCLUSIONES

- Los hongos guatemaltecos fueron localizados en su mayoría en altitudes mayores o iguales a los 2,000 metros, lo que supera la altitud reportada para Europa.
- En cuanto al hábitat, *B. edulis* s.l. de Guatemala crece asociado a pino mientras que la especie *sensu stricto* se asocia a varias coníferas y latifoliadas de Europa.
- Las muestras guatemaltecas presentaron diferencia significativa para las variables largo de esporas y ancho de basidios y cistidios respecto a la especie *sensu stricto*, de origen europeo
- Las muestras 1, 2, 7, 8, 9 y 10, recolectadas en los municipios de San Pedro Sacatepéquez e Ixchiguán, San Marcos, muestran mucha semejanza entre sí en sus aspectos macro y microscópicos, demostrado también a nivel estadístico, y con diferencia respecto a las muestras de otros Departamentos.
- Los caulocistidios de las muestras de San Marcos (Ixchiguán y Astillero Municipal de San Pedro Sacatepéquez) superan notablemente en longitud a los reportados en Europa (hasta 210 versus 60 micras). También presentan septos, de 1 a 3, mientras que están ausentes en *B. edulis* s.s.
- Las muestras de *Boletus edulis* s.l. recolectadas en otras zonas del país, difieren un poco entre sí, aunque los rangos de las medidas de las micro estructuras coinciden como para ser consideradas como un grupo taxonómico diferente al que existe en San Marcos.
- Se proponen dos nuevas variedades para la ciencia en vista a los resultados de esta investigación: *Boletus edulis* var *americanus* (Flores & Maldonado) var. nov. y *Boletus edulis* var *guatemalensis* (Flores & Maldonado) var. nov.

XIV. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios moleculares de las regiones ITS de las variedades propuestas en el presente estudio, con el fin de esclarecer más la situación taxonómica del *B. edulis* guatemalteco respecto de la especie de origen europeo.
- Realizar más recolectas de *B. edulis* en la Sierra de Las Minas (El Progreso y Zacapa) así como en el Cerro Miramundo (Jalapa) para conocer mejor la distribución de la especie y corroborar las medidas microscópicas con relación a parámetros climáticos.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Bran M, *et al.* 2003. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. *Revista Científica*. 1:1-24
2. Herrera T. y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
3. D.C.M. Beugelsdijk, S. van der Linde, G.C. Zuccarello, H.C. den Bakker, S.G.A. Draisma, M.E. Noordeloos. 2008. A phylogenetic study of *Boletus* section *Boletus* in Europe. *Persoonia*. 20: 1–7
4. Muñoz. J. 2005. *Boletus* s.l. *Fungi Europaei* 2. Candusso Ed. Italia. p.307-335
5. Foiera F., Lazzarini E., Snabl M.& Tani O. *Fungi Boleti*. Edagricole. Bologna. 260p.
6. Korhonen M., Liimatainen K. and Niskanen T. 2009. A new boletoid fungus, *Boletus pinetorum*, in the *Boletus* section *Boletus* from Fennoscandia (Basidiomycota, Boletales) *Karstenia* 49: 41–60.
7. Flores R. Hongos comestibles de Guatemala. En: Boa E. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Non-wood forest products No.17. 148p
8. Iotti, M., Barbieri, E., Stocchi, V. and Zambonelli, A. 2005. Morphological and molecular characterisation of mycelia of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Fungal Diversity* 19: 51-68.
9. Bauer B., Panov S., Roganovic D. and Kulevanova S. 2004. Electrophoretic study of mushroom proteins. *Food, Agriculture & Environment* Vol.2 (1): 148-152.

10. Mello A., Ghignone S., Vizzini A., Sechi C., Pino Ruiu P., Bonfante P. 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. *Journal of Biotechnology* 121: 318–329.
11. Watling R. 1993. Comparison of the macromycete biotas in selected tropical areas of África and Australia: In: Isaac S., Frankland JC., Watling R. & Whalley A.J.S.(eds): *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge University Press. p103-119.
12. Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res* 95: 642-655.
13. Dennis RW. 1970. Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. *Kew Bull. Additional Series*. 111-531.
14. Muller GM. & Halling R.E. 1995. Evidence for high biodiversity of Agaricales in neotropical montane *Quercus* Forests. In: Churchill S.P. *et al.* (Eds.): *Biodiversity and conservation of Neotropical Montane Forests*. New York Botanical Garden. USA.
15. Deacon J.W. & Fleming L.V. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Alle, M.F. (Ed): *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. New York, Chapman ad Hall. Pp. 249-300.
16. Flores R. 2003. *Lactarius* Sección *Dapetes* y *Boletus* Grupo *Edulis* en Guatemala, micorrización y estudio filogenético. Tesis Doctoral: Universidad de Murcia, Facultad de Biología. Murcia, España.
17. Lodge J. et al. 1995. A Survey of Patterns in Non-Lichenized Fungi. *Mitt. Eidgenöss. Forsch.anst. Wald Schnee Landsch.* 70. 1:150-173.
18. Flores R. y Simonini G. 2000. Contributo alla conoscenza delle *Boletales* del Guatemala. *RdM.* 2:141-156

19. Gonzáles A. y Valenzuela R. 1993. Boletáceos y Gonfidáceos del Estado de México I. Discusiones sobre su distribución en diferentes tipos de vegetación, asociaciones ectomicorrizógenas, fenología y comestibilidad. *Rev Mex Micol.* 9: 39-45.
20. Hall I., Stephenson SL., Buchanan PK., Yun W. & Cole AL. 2003. Edible and poisonous mushrooms of the World. Timber Press Inc. Oregon, USA. Pp.222-227
21. Boa E. 2004. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Non-wood forest products 17. 148p.
22. Muñoz JA. 2001. Clave dicotómica para la familia *Boletaceae*. Belarra. 10 -11: 23-30.
23. Arora D. 2008. California Porcini: Three New Taxa, Observations on Their Harvest, and the Tragedy of No Commons. *Economic Botany* 62: 356-375
24. Watling R. 1970. Boletaceae: Gomphidiaceae: Paxillaceae. In: Henderson DM, Orton PD, Watling R, Eds. British Fungus Flora. Agarics and Boleti I. Edinburgh, Scotland:Royal Botanical Garden. 124 p.
25. Singer, R. 1975. Agaricales in Modern Taxonomy. 3ta.Edición J. Cramer. Germany.
26. Dentinger B. 2006. University of Minnesota, Systematics, biogeography, and speciation of Porcini mushrooms 26th Annual Midwest Ecology & Evolution Conference. March 17-19.

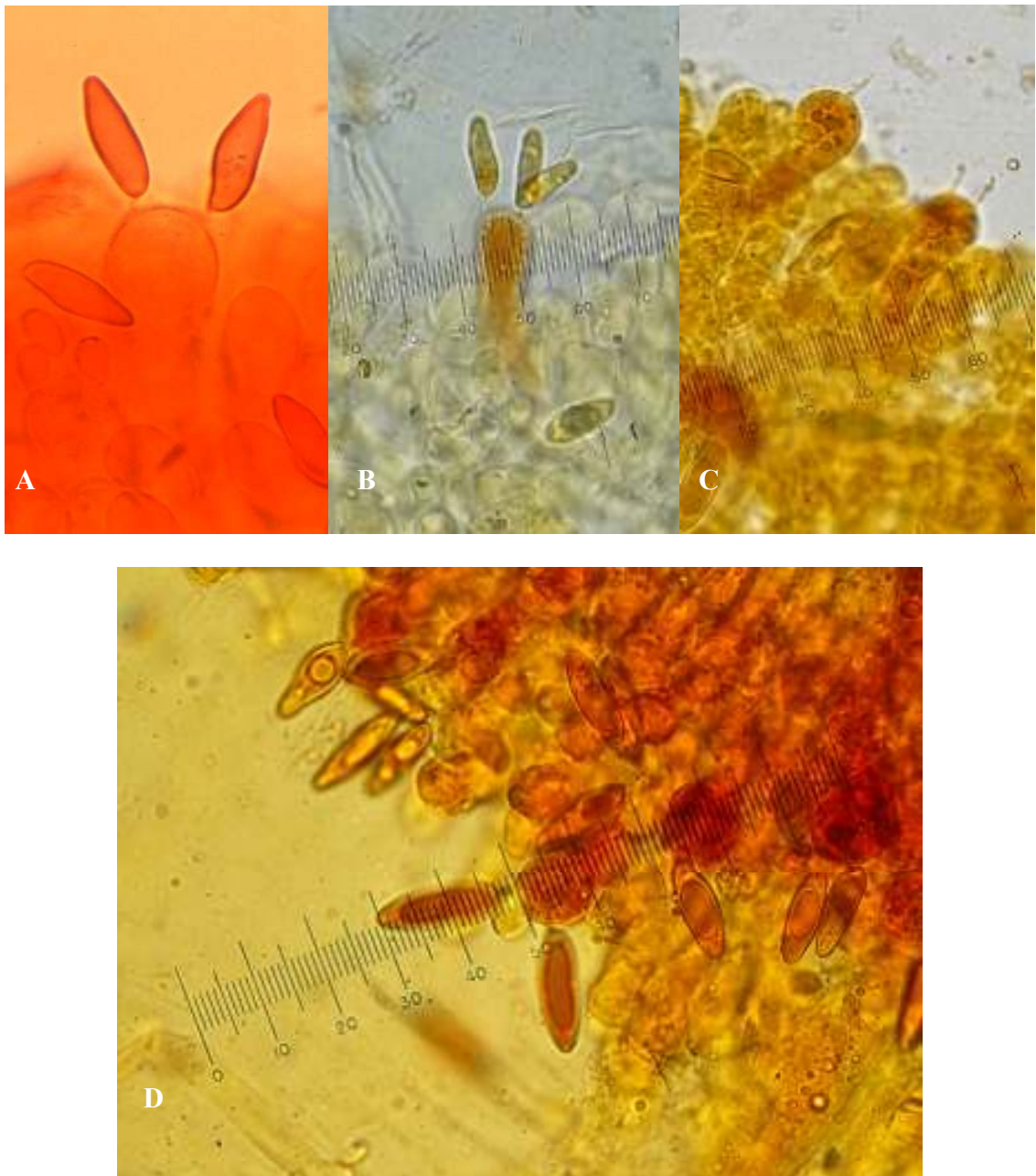
XIII. ANEXOS

Anexo I. Diferencia macroscópica entre *Boletus edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



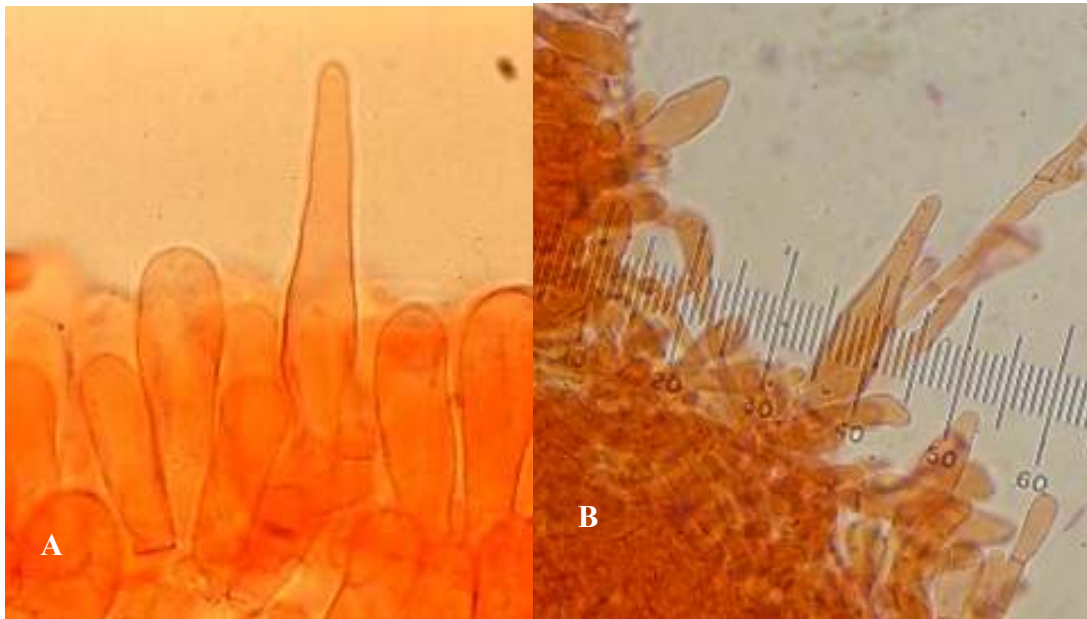
- A. *Boletus edulis* europeo, tomado de *Boletus edulis*, Finland, Uusimaa, Vantaa, Veromies, 1992 Korhonen 11110. Photo M. Korhonen
- B. *Boletus edulis* guatemalteco (Astillero Municipal de San Marcos). Foto: M. Maldonado. Sept.2008

Anexo 2: Diferencia entre basidios de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



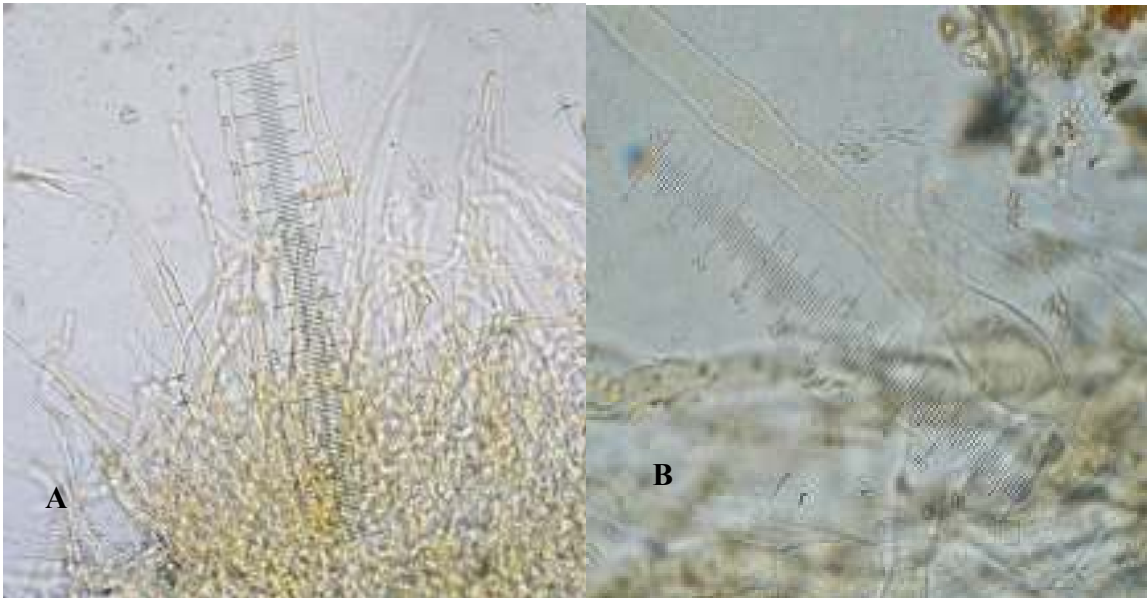
A. Basidio bispórico de *B. edulis* europeo (foto: G. Simonini), B. Basidio trispórico de *B. edulis* guatemalteco C y D. Basidios bispóricos y trispóricos de *B. edulis* guatemalteco (fotos M. Maldonado).

Anexo 3: Cistidios de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



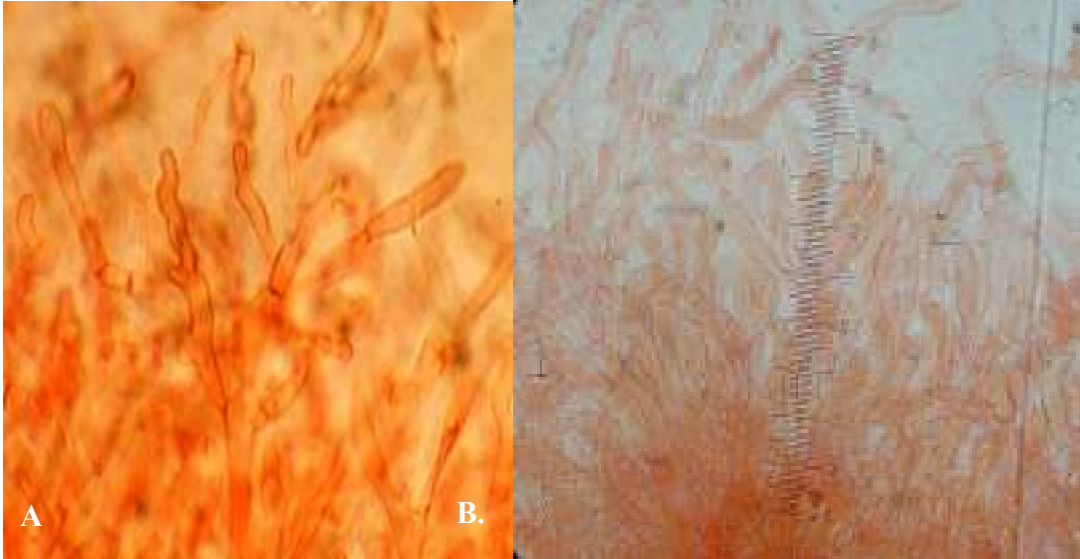
A. Pleurocistidio de *B. edulis* europeo (Foto: G. Simonini) y B. Pleurocistidio de *B. edulis* guatemalteco (Foto: Manuel Maldonado)

Anexo 4: Caulocistidios de *B. edulis* guatemalteco.



Fotos: Manuel Maldonado

Anexo 5: Diferencia entre la distribución de las hifas de *B. edulis* europeo y *B. edulis* guatemalteco.



- A. Hifas en tricoderma de *B. edulis* europeo (Foto: G. Simonini).
- B. Hifas en tricoderma e ixotrichoderma *B. edulis* guatemalteco (Foto: Manuel Maldonado).

Anexo 6.

Bosque mixto de coníferas y de pino en
Astillero Municipal San Pedro
Sacatepéquez, San Marcos.



Foto: Manuel Maldonado.