

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



**Evaluación del crecimiento micelial de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH**

CRISTOBAL REYES MORENO

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2011

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

**Evaluación del crecimiento micelial de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH**

Proyecto de Investigación

Presentado por

Cristobal Reyes Moreno

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Noviembre de 2011

## JUNTA DIRECTIVA

|  |            |
|--|------------|
| Oscar Cobar Pinto, Ph.D.               | Decano     |
| Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.    | Secretario |
| Licda. Liliana Vides de Urizar         | Vocal I    |
| Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares | Vocal II   |
| Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli   | Vocal III  |
| Br. José Roy Morales Coronado          | Vocal IV   |
| Br. Cecilia Liska de León              | Vocal V    |

## **ACTO QUE DEDICO**

### **A DIOS**

Por darme fortaleza para culminar esta meta de mi vida

### **A MIS PADRES**

Flor de María Moreno Peralta y Miguel Reyes Pérez

Por sus sabios consejos, amor y apoyo incondicional durante mi vida, para lograr cumplir mi anhelo

### **A MI ABUELA**

Aura Isabel Peralta Álvarez

Por todo su cariño, atención y apoyo durante mi vida

### **A MI NOVIA**

Lizbeth Gabriela Zelada Martínez

Por todo su amor, cariño y apoyo incondicional para cumplir nuestra meta

### **A MIS AMIGOS**

Franklin Beltrán, Marco Antonio Farfán, Jairo

Nosif, Kristel Paola Ramírez, José Arturo

Cuessi, Carlos Castro, Celeste Picón, Brenda

Gonzales, Julia Chang y a toda la familia Sosa

Linares, Castro Conde, Zelada Martinez

Por los momentos compartidos y palabras de aliento en los momentos más necesitados.

### **A MIS COMPAÑEROS**

Por su amistad y compañía durante mis estudios a largo de mi vida

### **AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

Doña Olgita, Don Fily, Don Julio, Doña Cony y Charly

Por ayudar en mi formación profesional y por haberme brindado la mano cuando más lo necesite durante mis estudios e investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**A MIS ASESORES LICDA. MARIA DEL CARMEN BRAN  
GONZALEZ Y LIC. OSBERTH ISAAC MORALES ESQUIVEL**

**A MIS REVISORES LICDA. VIVIAN LUCRECIA MATTA RÍOS**

## ÍNDICE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I.    | Resumen   | 1  |
| II.   | Introducción  | 2  |
| III.  | Antecedentes  | 3  |
|       | A. Generalidades de los hongos  | 3  |
|       | B. Hongos comestibles   | 3  |
|       | 1. Morfología   | 3  |
|       | 2. Ciclo de vida  | 4  |
|       | 3. Valor nutricional  | 5  |
|       | C. Cultivo de hongos comestibles  | 5  |
|       | 1. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala                                 |    |
|       | a. Cultivo a nivel industrial y artesanal                                     | 6  |
|       | b. Estudios de investigación  | 7  |
|       | D. Efecto del pH en el desarrollo micelial de los basidiomycetes              | 15 |
|       | E. <i>Agrocybe cylindracea</i> (DC.:Fr) Maire                                 | 16 |
|       | 1. Clasificación taxonómica   | 16 |
|       | 2. Morfología   | 16 |
|       | 3. Distribución y hábitat   | 17 |
|       | 4. Etnomicología  | 18 |
|       | 5. Características miceliales   | 19 |
|       | 6. Requerimientos para el cultivo   | 19 |
|       | 7. Estudios sobre cultivo de <i>A. cylindracea</i> en Guatemala               | 19 |
|       | 8. Otros estudios sobre <i>A. cylindracea</i>                                 | 20 |
|       | a. Producción de inóculo y cuerpos fructíferos                                | 21 |
|       | b. Propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y antioxidantes             | 21 |
|       | c. Propiedades bioquímicas  | 22 |
|       | d. Propiedades degradativas   | 22 |
|       | e. Estudios moleculares   | 23 |
| IV.   | Justificación   | 24 |
| V.    | Objetivos   | 25 |
| VI.   | Hipótesis   | 26 |
| VII.  | Materiales y métodos  |    |
|       | A. Fase de laboratorio  | 27 |
|       | B. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias | 28 |
|       | C. Diseño estadístico   | 29 |
| VIII. | Resultados  | 30 |
| IX.   | Discusión de resultados   | 36 |
| X.    | Conclusiones  | 43 |
| XI.   | Recomendaciones   | 44 |
| XII.  | Referencias   | 45 |
| XIII. | Anexos  | 53 |

## I. RESUMEN

*Agrocybe cylindracea* es un hongo que se consume en el municipio de Tecpán Guatemala, Chimaltenango, San Juan Ostuncalco, Quetzaltenango y las aldeas Escuachil y Vista Hermosa de San Antonio Sacatepéquez, San Marcos.

En la presente investigación se utilizaron cinco cepas guatemaltecas de *A. cylindracea*, determinándose la morfología colonial y el crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y pH, para obtener la mejor condición en su cultivo a nivel de laboratorio como paso previo a la obtención de biomasa fúngica, producción de inóculo y cuerpos fructíferos.

Se determinó que todas las colonias de las cepas evaluadas mostraron las características morfológicas reportadas en la literatura para *A. cylindracea* (con excepción de la cantidad de micelio aéreo el cual fue abundante) en todos los medios y pH estudiados.

Al evaluar el crecimiento micelial empleando como medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (EMA), y agar harina de maíz y levadura (CMYA), ajustados a pH 5, 5.5 y 6 e incubados a una temperatura de 26 °C, se determinó que el medio de cultivo EMA a pH 6 favoreció el crecimiento de la mayoría de las cepas estudiadas. Al evaluar las interacciones entre la cepa, el medio de cultivo y el pH se observó que las combinaciones con mayor crecimiento micelial se obtuvieron con las cepas 638.08 y 58.01 en los medios PDA y EMA a pH 6. Adicionalmente, la cepa 638.08 en el medio EMA puede tener buen rendimiento a pH 5 y 5.5. Como consecuencia de los resultados obtenidos, se recomienda el cultivo de ambas cepas bajo las condiciones indicadas, para la producción de biomasa micelial como paso previo a la producción de inóculo y cuerpos fructíferos.

## II. INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre hongos comestibles en Guatemala son escasos, sin embargo, hasta el año 2010 se han reportado 83 especies, en su mayoría documentadas por los resultados obtenidos a partir de trabajos de investigación, venta de hongos en mercados de las cabeceras departamentales y en algunos municipios como San Juan Sacatepéquez, Guatemala; Sumpango, Sacatepéquez; Todos Santos Cuchumatán y San Mateo Ixtatán, Huehuetenango y Tecpán Guatemala, Chimaltenango, entre otros. Dentro de este grupo de hongos se encuentra *Agrocybe cylindracea*, especie que es utilizada como alimento por personas de las etnias Mam y Kaqchikel en los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Chimaltenango. En estos lugar se le conoce como hongo del saúco, Tx'yol B'aqman, Tx'yol te chib'j (en el idioma Mam) y Rukoxil Tunay Che' (idioma Kaqchikel).

*A. cylindracea* es una especie de reconocida comestibilidad en el mundo, ya que su consumo también está documentado en China, Italia y México. Además, se ha encontrado que posee actividad antiinflamatoria, antitumoral, hipoglicémica, inmunoestimulante y contrarresta la diabetes e hipertensión. Dada la naturaleza saprobia de este hongo, es factible de ser cultivada sobre desechos agrícolas y forestales que se generan en el país, para la producción de cuerpos fructíferos los cuales pueden utilizarse como una alternativa alimenticia y potencialmente medicinal. Mediante su cultivo se estaría dando uso a la diversidad fúngica del país, y se crearían alternativas alimenticias, económicas y medicinales, que pueden contribuir al desarrollo de comunidades campesinas.

Por tal razón, se estudiaron cinco cepas nativas (58.01, 59.01, 60.01, 112.02 y 638.08) para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo (EMA, PDA y CMYA) y pH (5, 5.5 y 6), como un primer paso para lograr la producción de cuerpos fructíferos a nivel de sustrato. Se efectuó análisis de varianza e intervalos múltiples de Duncan, para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento micelial en los medios de cultivo y pH.



### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

Los hongos son algunos de los organismos más importantes del mundo, no solo por su importancia en los ecosistemas si no también por la influencia que poseen sobre los humanos. Son esenciales en muchas actividades cruciales como la descomposición, el ciclo de los nutrientes y transporte de nutrientes. Algunas especies son patógenas importantes de plantas y animales, mientras que otras forman simbiosis mutualista obligada con ciertas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales. Tienen una importancia económica muy grande, por sus efectos negativos y positivos en las actividades humanas, siendo útiles en procesos industriales, farmacéuticos, biotecnológicos y producción de algunas especies para el consumo humano. Al mismo tiempo, generan millones de dólares en daños, a través de la degradación de productos alimenticios, de materiales usados por los humanos y por enfermedades provocadas a plantas y animales. Por otra parte, existe una gran diversidad de hongos que cumplen con funciones vitales en los ecosistemas naturales, por lo que deben incluirse en las estrategias de conservación de la biodiversidad (1).

#### B. Hongos comestibles

Los hongos comestibles se conocen desde tiempos inmemoriales. Se estima que cerca de 7,000 especies poseen varios grados de comestibilidad y más de 3,000 especies de 31 géneros se consideran como las principales comestibles (2).

Se tiene conocimiento que el primer esfuerzo por cultivar hongos comestibles, se remonta 1,400 años atrás en la antigua China. La primera especie cultivada exitosamente fue *Auricularia auricula*, seguida de *Flammulina velutipes*, la cual se cultivó 200 a 300 años después y la tercera fue *Lentinula edodes* (2).

#### 1. Morfología

Los hongos comestibles se pueden encontrar principalmente en el grupo Basidiomycota. Los cuerpos fructíferos de este grupo pueden ser carnosos, gelatinosos o pulverulentos y tener forma de sombrilla, oreja, trompeta coral, etc. También poseen basidios, que son estructuras microscópicas especializadas sobre las cuales se producen las esporas (basidiosporas). Los cuerpos fructíferos comúnmente poseen un píleo (sombrero), himenóforo (estructura que sostiene la capa fértil, ya sea lamelas, tubos, etc.), contexto y estípíte. Los cuerpos fructíferos sésiles que no tienen estípíte no son comunes y estos se adhieren lateralmente al sustrato. También existen

otras especies que no poseen píleo ni estípote, los cuales son características únicas de ellos o típicas de la familia, género o especie a los que pertenecen (3).

## 2. Ciclo de vida

Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan al estar en contacto con el sustrato que contenga los requerimientos nutricionales necesarios para su adecuado desarrollo, así como temperatura, pH y humedad apropiadas. Estas basidiosporas dan origen al micelio primario, denominado homocarión, por poseer un solo tipo de núcleo haploide. Las especies que poseen un único núcleo por cada célula que conforma la hifa, se le denomina monocarión. Los basidiomicetes que poseen un micelio homocarión generalmente no fructifican, pero son capaces de crecer vegetativamente. Algunos hongos comestibles, pueden formar esporas asexuales del tipo oidio, el cual durante la germinación dan lugar a un micelio homocarión. En otros casos los oidios funcionan como gametos masculinos y se unen a hifas de micelio compatible para formar el micelio heterotálico, típico de la reproducción sexual (4).

Para que se lleve a cabo el desarrollo del cuerpo fructífero, se requiere que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen. Luego por disolución de la pared en el lugar de contacto, se forman compartimentos hifales con citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes cada una de las células que se fusionaron. A partir de este proceso se generan divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos, formándose un micelio heterocarión o dicarión. Este tipo de micelio se conoce como micelio secundario en la mayoría de casos, ya que presenta en cada septo una estructura lateral denominada conexión en grapa o fíbula (4).

El micelio que presenta fíbulas generalmente se identifica como heterocarión, y en tanto el que no las presenta se conoce como homocarión. Sin embargo, en un gran número de hongos que poseen un micelio heterocarión, no siempre se forman estas estructuras, por lo que no se puede generalizar. El micelio heterocarión puede desarrollarse adecuadamente y multiplicarse vegetativamente en esta condición de forma indefinida. Aún cuando la formación de los basidiomas se regula por la interacción de diversos factores, son de mayor importancia los cambios bruscos de humedad y la concentración de CO<sub>2</sub>. La cariogamia de los núcleos que forman el micelio heterocariótico, se lleva a cabo en las puntas de las hifas que forman la capa fértil del himenio, dando origen a basidios monocarióticos y diploides. Seguidamente el núcleo (2n) presenta meiosis, dando origen a cuatro núcleos haploides (1n) que migran hacia los esterigmas; formando las basidiosporas, generalmente haploides y con un solo tipo de núcleo. Las basidiosporas maduras se liberan y pueden ser diseminadas por el viento, los insectos, el

agua y animales entre otros factores, dando origen a hifas somáticas unicelulares e iniciar nuevamente el ciclo de vida (4).

### **3. Valor nutricional**

En cuanto a la composición nutricional de los hongos comestibles, se sabe que poseen un alto contenido de proteínas y carbohidratos, moderada cantidad de fibra y cenizas y son bajos en grasas. Su valor energético también es bajo, pero proveen de una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los hongos contienen una porción sustancial de tiamina, riboflavina, niacina y de vitamina B<sub>2</sub>. En 100 gramos de proteína cruda hay 32 a 48 gramos de nueve aminoácidos esenciales, de estos, la lisina es la más abundante y las cantidades de triptófano y metionina son bajas (2).

### **C. Cultivo de hongos comestibles**

La fructificación de hongos comestibles es una actividad desarrollada desde hace varios cientos de años. En Asia existen registros del cultivo de especies de hongos comestibles como *Lentinula edodes* y especies de *Auricularia*, mientras que en Europa hay evidencia del cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*). Esta tecnología llegó a nuestro continente a finales del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX, pero fue hasta la segunda mitad de este siglo, gracias al mejoramiento de las técnicas existentes, que la industria de hongos comestibles se hizo presente de manera importante en varios países de América (5).

Los hongos se pueden cultivar a través de una variedad de métodos, algunos conformados por técnicas simples que requieren de poca o casi nada de experiencia por parte del cultivador, mientras que otros demandan técnicas sofisticadas, ya que incluyen procedimientos como el cultivo de tejido estéril bajo un ambiente y condiciones controladas (6).

La fructificación de hongos comestibles por metodologías simples toma poco tiempo, pero requiere paciencia por parte del cultivador, ya que el rendimiento y eficiencia biológica a obtenerse es muy variada y no siempre se logra un buen resultado. Por este motivo, la implementación y utilización de métodos más técnicos y elaborados, aumentan la probabilidad de éxito y mejora significativamente los rendimientos de producción de cuerpos fructíferos (6).

En la década de los 70's los hongos comestibles cultivados a gran escala y adaptados a crecer con una base sistematizada fueron *Agaricus bisporus* (champiñón) cultivado en todo el mundo, *Volvariella volvacea* (hongo de la paja del arroz) cultivado en Indonesia, Madagascar, Malasia y *Tuber melanosporum* (trufa negra) cultivado en Europa, especialmente en Francia (7).

En 1979, la producción del champiñón común *A. bisporus* representaba más del 70% de la oferta mundial y para 1994, solamente el 38% de dicha producción correspondía a este hongo. A nivel mundial, la producción de hongos comestibles se ha incrementado más de 14 veces en 30 años, desde 350 mil toneladas en 1965 hasta más de 4 millones de toneladas en 1994. La mayor parte de este incremento ocurrió durante los últimos 15 años, observándose un considerable cambio en los géneros cultivados. Entre los países productores de hongos comestibles, la República Popular China es el mayor productor de hongos comestibles con 2,640,900 toneladas, lo cual representa aproximadamente el 54% de la producción total mundial (5).

El cultivo de hongos comestibles comprende diferentes fases, entre las cuales podemos mencionar: a) selección del hongo, b) determinación de los requerimientos para el cultivo, c) producción de inóculo, d) preparación del sustrato, e) desarrollo del micelio y f) desarrollo de los cuerpos fructíferos (2,4).

El uso de técnicas mecanizadas para el cultivo de hongos como alimento en grandes cantidades, es un fenómeno del siglo XX. Actualmente, en el mundo se han estudiado para fines de cultivo, cerca de 200 especies, de las cuales aproximadamente 60 se cultivan comercialmente y cerca de 10 se cultivan a escala industrial. Las 10 especies cultivadas más populares a nivel mundial son *A. bisporus/bitorquis*, *L. edodes*, *V. volvacea*, *F. velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota nameko*, *Grifola frondosa* y especies de *Pleurotus* y *Auricularia*. En años recientes, se han cultivado también nuevas especies de hongos comestibles, entre ellos, *Hericium erinaceus*, *Dictyophora indusiata*, *Stropharia rugoso-anulata*, *Lepista nuda*, *A. cylindracea*, *Pleurotus citrinopileatus* y *Cantharellus cibarius* (2).

## **1. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala**

### **a. Cultivo a nivel industrial y artesanal**

En el año 2003, se comunicó que cuatro grandes compañías cultivaban *A. bisporus*, utilizando paja de trigo como sustrato. La producción de *A. bisporus* y *A. bitorquis* en ese año se estimó en 68,504 kg por año, de los cuales, el 70% se consumió en el país y el resto se exportó a El Salvador y Honduras (8).

La primera planta productora de *L. edodes* se estableció en 1984, utilizando troncos de *Quercus* como sustrato. El 70% de la producción era consumido en Guatemala y el otro 30% se exportaba a México y Panamá. La producción anual en esos años alcanzó cerca de 37,000 kg, no obstante en 1993 la producción terminó (24). Hacia el año 2003, se informó de la existencia de una compañía que producía cerca de 34,020 kg por año de *L. edodes*, empleando aserrín de

*Hevea brasiliensis* como sustrato. La mayoría de estos hongos se exportaron (80%), mientras que una pequeña proporción (20%) se comercializó en Guatemala. Por otra parte, se indicó que existían pequeñas granjas donde se cultiva *L. edodes* sobre troncos de roble como sustrato, alrededor de la ciudad de Guatemala. Esta producción se comercializó en los mercados locales (8).

La producción comercial de *Pleurotus* inició en 1986, utilizando paja de trigo y pulpa de café como sustrato. En 1999, se estableció el cultivo de *P. eryngii* sobre aserrín de árbol de caucho y mazorca de maíz. La producción se vendía normalmente en los mercados domésticos (8).

La producción anual en el 2000 de *Pleurotus* fue de aproximadamente de 29,580 kg, la mayoría es consumida en Guatemala (90%) y el resto (10%) es exportado a El Salvador y Honduras, encontrándose también a la venta en mercados y supermercados. La producción total de hongos comestibles en Guatemala en el 2000 se estimó en 132,104 kg por año, incluyendo *A. bisporus* y *A. bitorquis* (51.9%), *L. edodes* (25.7%), y especies de *Pleurotus* (22.4%) (8).

En 1995, se realizaron muchos estudios sobre el cultivo de *F. velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *A. aegerita*, y *P. nameko*, entre los cuales se puede mencionar el trabajo realizado con una cepa Tailandesa de *G. lucidum*, la cual fue cultivada sobre aserrín de árbol de caucho suplementado con mazorca de maíz, en una granja de hongos en Escuintla (región tropical de Guatemala) (8).

## **b. Estudios de investigación**

La investigación del cultivo de hongos comestibles en Guatemala, comenzó en 1955 con la implementación del champiñón *A. bisporus* con cepas de origen norteamericano. Posteriormente, De León *et al.* (1983) iniciaron el cultivo de *Pleurotus* a nivel de laboratorio en el Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), empleando una cepa inglesa de *P. flabellatus* que cultivaron sobre diversos sustratos (9,10).

Uno de los primeros estudios realizados en Guatemala sobre el cultivo de hongos comestibles silvestres adaptados a cultivos utilizando desechos agro-industriales fue el realizado por De León en 1985, con una cepa de *Volvariella bakeri*. En este trabajo se examinó el comportamiento y desarrollo de la cepa sobre medios de cultivo sólidos, concluyendo que el medio óptimo para el cultivo del micelio de *V. bakeri*, es el medio completo para *Volvariella*. Para fines prácticos se recomendó también utilizar agar malta a una temperatura de 32-35°C, ya que bajo estas condiciones el micelio llena la caja de petri de 85mm de diámetro en 3 días. Este

lapso es el óptimo para utilizar el micelio como inóculo para el cultivo comercial en sustratos de desechos orgánicos. Asimismo, se señaló la posibilidad de llegar a cultivar otras cepas silvestres de hongos comestibles a nivel industrial partiendo de un inóculo inicial realizado a nivel de laboratorio (11).

Ovalle (1982), evaluó cuatro sustratos de cobertura en el cultivo de champiñones (*Agaricus bisporus* var. *avellaneus*), los cuales fueron: 1) Suelo con textura franca arenosa, estructura granular con un contenido de materia orgánica de 2% de humus descompuesto (forma Mull), y un 10% de humus semidescompuesto (forma Moder). 2) Suelo con textura franca arenosa, estructura granular, con un contenido de material orgánica del 20% de humus descompuesto (forma Mull), y un 10% de humus semidescompuesto forma (Moder). 3) Suelo con textura franca arenosa, estructura granular, con un contenido de materia orgánica del 50% de humus descompuesto (forma Mull) y un 10% de humus semidescompuesto (forma Moder). 4) Suelo con textura franco arcillosa, estructura granular, con un contenido de materia orgánica del 25% de humus descompuesto (forma Mull), un 10% de humus semidescompuesto (forma Moder). En base a los resultados el sustrato número tres dio los rendimientos más elevados, que supera los obtenidos por el sustrato tradicional (sustrato 4). La capacidad de retención de la humedad fue mayor al existir más humus en el sustrato. Con un 50% de humus descompuesto se logró retener un 58.5% promedio de humedad. El resto de sustratos estuvieron entre un 29 y 42% promedio de humedad (12).

Franco (1986), investigó la utilización de la paja de trigo en la producción de alimento humano (hongos comestibles) y alimento para ovinos (paja residual o gastada), utilizando *Pleurotus sajor caju*. Se obtuvo un rendimiento de hongos frescos/peso seco de la paja de 28% en un período de producción de 30 días. Al evaluar, el comportamiento del peso en un período de 70 días en los 2 grupos de ovinos evaluados se obtuvo una pérdida de peso medio de  $0.65 \pm 1.07$  kg para el grupo alimentado con paja de trigo natural y una ganancia media de  $0.26 \pm 0.9$  kg para el de paja de trigo residual colonizada por *Pleurotus* (13).

Castillo (1989), estudió el valor nutritivo de tres especies de hongos del género *Pleurotus* cultivadas sobre pulpa de café. Los resultados del análisis proximal mostraron que los hongos, en promedio, tienen bajo contenido de grasa y relativamente altas cantidades de proteínas, fibra cruda y cenizas. El análisis de aminoácidos realizado reportó que las tres especies tenían en común todos los aminoácidos esenciales y los siguientes no esenciales: Histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, prolina, glicina, alanina y tirosina. Porcentajes altos de ácido glutámico y ácido aspártico y bajos porcentajes de metionina fueron comunes en los tres hongos.

Comparando las cantidades de aminoácidos esenciales con el patrón de referencia de la FAO (1973), se reportó que *P. sajor caju* y *P. ostreatus* eran deficientes en metionina, triptófano, leucina, isoleucina y fenilalanina mientras que *P. florida* era deficiente en metionina, leucina y fenilalanina. Valores altos de lisina y deficientes en metionina, leucina y fenilalanina fueron comunes a las tres especies. La metionina fue el aminoácido limitante en las tres especies. Se estableció que la proteína de los tres hongos era incompleta, ya que no promovía el crecimiento de las ratas blancas como lo hace la caseína, y que los hongos en promedio tienen un 64% de deficiencia en metionina. Sin embargo, se observó que tienen altas cantidades de lisina y que por eso, podrían ser usados como posibles componentes de mezclas de harina de valor nutritivo mejorado (14).

Pérez (1990), estudió el valor nutritivo de los anacates (*Cantharellus cibarius*) reportando que la digestibilidad de las proteínas presente en los mismos es alta, aún cuando no pudo establecerse con certeza el grado de disponibilidad de ésta, debido a que no existen datos comparativos para obtener un criterio válido. Además, se encontró un efecto positivo del cocimiento de los anacates sobre la digestibilidad de su proteína. Con relación al análisis de aminoácidos se encontraron todos los esenciales, aunque en bajas cantidades, siendo el más limitante el triptófano dada la baja concentración que reporta y la lisina el aminoácido esencial que se encontró en mayor cantidad. El ácido glutámico, tal como se esperaba, fue uno de los aminoácidos más abundantes dentro de los anacates. Dicha autora comparó los valores nutricionales de la proteína del anacate estudiado contra los valores estándar de la FAO (Índice nutricional, Índice de aminoácidos esenciales y el valor biológico) resultando ser realmente bajos. Por otro lado, la fibra encontrada en los anacates se encuentra en mayores cantidades que en otros alimentos consumidos por la población guatemalteca (15).

Mairén (1994), evaluó el rendimiento de 4 diferentes substratos (aserrín de encino, pino, ilamo y ciprés), inoculado con tres cepas de *Lentinula edodes* (cepas CS-41, CS-53 y Japonesa). Concluyó que los mejores tratamientos en cuanto a mayor rendimiento y mejor tiempo de producción fueron: Substrato basado en madera de encino (*Quercus pilicaulis* Trelease) inoculado con la cepa CS-41 y substrato basado en la madera de Ilamo (*Alnus Arguta* (Schlecht) Spach), inoculado con la cepa CS-41. Asimismo, reportó que la cepa CS-53 y la cepa Japonesa fueron las que produjeron basidiomas más grandes lo cual puede considerarse, provisionalmente, como propio de la cepa (16).

Arriola (1996), estudió la ventaja de utilizar bolsas de polipapel y celofán, en lugar de botellas de vidrio (control) para producir el inóculo (primario y secundario), de una cepa

mexicana de *Pleurotus ostreatus* sembrado sobre porciones de 250gr. de sorgo empacados en los tres diferentes sistemas. Los resultados obtenidos revelaron que tanto las bolsas de celofán como los frascos de vidrio, son poco resistentes al calor, por lo que pueden no ser adecuados para empacar los inóculos. En el caso de las bolsas de celofán, éstas se vuelven sumamente frágiles después de ser esterilizadas y deben ser manejadas con extremo cuidado para evitar que se rompan. En relación a los frascos de vidrio, éstos se templan por el cambio brusco de temperatura que sufren al ser retirados de la autoclave, y por lo tanto se vuelven sumamente frágiles y deben ser manipulados con extremo cuidado. Se concluyó que las bolsas de polipapel son un sistema alternativo para empacar los inóculos, ya que éstas no presentaron ningún daño. En cuanto al desarrollo del micelio sobre el grano empacado en bolsas de polipapel y celofán, es similar al observado en el sistema control (frascos). Sin embargo, la manipulación de la semilla es mucho más fácil de llevar a cabo cuando se emplean bolsas para empacar los inóculos (17).

Godoy (1997), estudió el cultivo de una cepa de *Pleurotus ostreatus* utilizando como substrato aserrín de caoba y cedro, fibra de coco y olote de maíz. Concluyendo que es posible cultivar la cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* en olote de maíz, fibra de coco y aserrín de caoba y cedro. El porcentaje de eficiencia biológica de los tres substratos es diferente, evidenciando que el olote de maíz y el aserrín de caoba y cedro fueron los mejores substratos para el cultivo de la cepa mencionada. La fibra de coco fue la que presentó menor porcentaje de eficiencia biológica (18).

García (1999), recolectó y aisló cepas silvestres de *Auricularia*, en tres fincas cafetaleras del municipio de San Rafael Pie de la Cuesta San Marcos. Los especímenes recolectados se encontraron creciendo sobre troncos de cushín (*Inga paterna*) (cepas A-1 y A-3) y sobre troncos de arbustos de café (A-2). Se evaluó el crecimiento micelial de estas cepas en tres medios: Agar extracto de malta (AEM), agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud (SAB), incubando tanto a temperatura ambiente (24°C) como a 30°C. La mayor velocidad de crecimiento a 24°C se reportó en los medios AEM y PDA con un promedio de 4.3mm día respectivamente, mientras que en SAB el micelio creció a razón de 2.1mm/día. El mejor substrato orgánico para el crecimiento de las cepas aisladas fue la mezcla de aserrín con salvado de arroz con el que se obtuvo un crecimiento de 4.8cm<sup>3</sup>/día a 24°C y 6.2cm<sup>3</sup>/día a 30°C. Para este sustrato se reportó una eficiencia biológica del 75%. El sustrato que presentó la velocidad de crecimiento más baja fue la pulpa de café con 3cm<sup>3</sup>/día a 24°C y 4cm<sup>3</sup>/día a 30°C. Solo una cepa (A-3), no presentó crecimiento en este sustrato. De las tres cepas estudiadas la que presentó mayor tolerancia a cambios nutricionales y de temperatura fue la cepa A-1, asimismo las mejores velocidades de crecimiento



tanto en medio de cultivo como en los sustratos orgánicos utilizados, además fue la única cepa que fructificó (19).

Orozco (2000), estudió el cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando como sustratos rastrojo, zacate y tusa a una temperatura de 26°C, con una fase de fructificación que duró de 25 a 28 días para la primera cosecha y entre 15 y 24 días para la segunda y tercera cosechas respectivamente. La eficiencia biológica de cada uno de los sustratos fue: para el zacate 42.20%, para el rastrojo 34.70% y para la tusa 23.90% (20).

García (2000), estudió la utilización de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.) y cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, utilizándolos individualmente y en mezclas en tres diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2), además de pulpa de café como testigo. En relación a los resultados obtenidos se concluyó que la mezcla de rastrojos de maíz y cascarilla de arroz en relación 2:1 proporciona los mejores resultados de porcentaje de eficiencia biológica y porcentaje de producción. También se deduce que las otras mezclas son aceptables en su rendimiento (pues superan el 100 por ciento de eficiencia biológica, mínimo requerido) y excluyen a los sustratos individuales debido a su bajo porcentaje de eficiencia biológica (21).

Giron (2000), estudió el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos lignocelulósicos derivados de la agroindustria de la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.). Se concluyó que los mejores rendimientos en peso y porcentaje de eficiencia biológica de la cepa utilizada de *P. ostreatus* ECS-0112 de origen mexicano, fueron con la fibra sin mezclar, obteniendo en promedio un 135.62 por ciento de eficiencia biológica y un peso promedio de 3,119.46g por cada unidad experimental. Las eficiencias más bajas las obtuvo con el raquis y las mezclas de cuesco y fibra; y raquis con cuesco. El mayor número de cuerpos fructíferos se obtuvo en las unidades experimentales donde se utilizó la fibra como sustrato, con una media de 836.29g. Los mayores promedios se lograron con la fibra, cosechándose 108 hongos de la primera cosecha, 190 hongos de la segunda y 565 hongos de la tercera (22).

Aldana (2000), comparó la eficiencia de producción de inóculo primario del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa ECS 0110, en cinco granos (sorgo, trigo, arroz, maíz y cebada). Cada unidad experimental fue incubada durante 21 días a 28°C en completa oscuridad. Los resultados obtenidos establecieron que el grano de cebada presentó mejores rangos de crecimiento y en menor tiempo que los demás, lo que incrementó el número de ciclos de producción del hongo, que a la vez aumentó la rentabilidad del proceso en 34% (23).

Lazo (2001), determinó la eficiencia del rastrojo de tomate (*Lycopersicon sculentum*

Miller) y la corona del fruto de piña (*Ananas comosus* (L.) Merril) y sus mezclas en el cultivo de la cepa ESC 0110 de *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*). Asimismo con los resultados obtenidos se concluyó que el mejor de los tratamientos evaluados en la producción del hongo es la corona del fruto de piña, sin mezclarla con rastrojo de tomate. El único tratamiento de los evaluados que dio un porcentaje de eficiencia biológica superior al 100% fue el que contenía únicamente la corona del fruto de piña (24).

Barrios (2002), comparó el rendimiento de dos cepas de *Lentinula edodes* (Shiitake) (cepa H y M3776) utilizando cinco sustratos diferentes (hule, sangre, mario, volador y chichique) bajo condiciones controladas. Para la reproducción del micelio se utilizó agar extracto de malta y para la generación de semilla granos de sorgo. El mayor peso promedio de hongos frescos, fue dado por el sustrato de hule inoculado con la cepa H, seguido por el sustrato de sangre con la misma cepa, siendo la cantidad en gramos de 304.99 y 257.44 respectivamente. El diámetro promedio en centímetros de los carpóforos fue de 5.35, 5.19 y 4.38 para la cepa M3776 en los sustratos de hule, sangre y mario, respectivamente, con un número promedio de hongos frescos de 112, para la combinación de hule, 73 para el aserrín de sangre y 51 con el aserrín de mario, todo con la cepa H. Así mismo el porcentaje de eficiencia biológica para el aserrín de hule fue de 18.94%, sangre 18.00% y mario de 16.00%, los tres sustratos inoculados con la cepa H (25).

Rojas (2004), evaluó la paja de trigo (*Triticum sativum*), broza de encino (*Quercus* sp) y rastrojo de maíz (*Zea mays*), para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones artesanales, en el municipio de San Rafael La Independencia, Huehuetenango. Reportó que la mezcla de paja de trigo y broza de encino en proporción 1:1, como el sustrato que dio el mayor rendimiento del hongo en peso fresco. Se determinó que las eficiencias biológicas fueron de 91.07% para paja de trigo mas broza de encino (relación 1:1); 79.16% para broza de encino mas rastrojo de maíz (relación 1:1); 63.32% para paja de trigo, 56.55% para paja de trigo mas rastrojo de maíz (relación 1:1); 43.82% para rastrojo de maíz y 30.06% para broza de encino (26).

Gómez (2004), evaluó la adaptabilidad de tres cepas del genero *Pleurotus*, sobre tres diferentes sustratos de fructificación y bajo condiciones de invernadero. Utilizó como sustrato paja de trigo (*Triticum aestivum*), olote de maíz (*Zea mays*) y aserrín de pino (*Pinus* sp), para cultivar las cepas de origen mexicano (ECS-0110, ECS-0112, ECS-0166). Se concluyó que los sustratos de paja de trigo y olote de maíz fueron los que proporcionan los mejores resultados en cuanto a peso fresco de hongos producidos y el menor tiempo en relación al apareamiento de cuerpos fructíferos, para las cepas utilizadas (27).

Tuchan (2004), evaluó la pulpa de café (*Coffea arabica*) mezclada con cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) y bambú (*Bambusa vulgaris* var. *striata*) en cinco proporciones diferentes, para cuantificar la eficiencia biológica de la cepa ECS-110 (INIREB-8) de *Pleurotus ostreatus*. Concluyó que el agregar pulpa de café a los substratos tiene un efecto positivo pues presentan mayor eficiencia biológica (28).

Ardon (2004), realizó una evaluación de pericarpio de Jacaranda (*Jacaranda mimosaeifolia*) y pasto Estrella Africana (*Cynodon plectostachyus*), para el cultivo artesanal del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*), cepa ECOSUR-0112. El ciclo de producción de carpóforos duró 45 días, a partir de la inoculación hasta obtener la tercera cosecha. El mayor rendimiento en peso fresco se obtuvo en la primera cosecha, registrada entre los 17 y 20 días y disminuyó en las subsiguientes. En la segunda cosecha se obtuvo el 85.52% de la producción total obtenida hasta la tercera. Asimismo que la eficiencia biológica en los substratos constituidos por pasto estrella, pericarpio de jacaranda y la mezcla formada por ambos, es de 107.40, 67.80 y 83.75% respectivamente. La tasa de producción obtenida sobre pasto estrella africana, pericarpio de jacaranda y en el substrato formado por la mezcla de ambos, fue de 2.72, 1.8 y 2.05 por ciento respectivamente. Se concluyó que la mezcla de substratos no ofrece efectos favorables para el cultivo artesanal de *Pleurotus ostreatus*, dado que no mejora la eficiencia biológica y prolonga significativamente el período productivo del hongo (29).

Bran y cols. (2005), cultivaron varias especies de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus*. y *P. levis*) a nivel artesanal, en 235 módulos ubicados en el occidente del país, logrando producir alrededor de 3,200 libras durante ese año (30).

Estos mismos autores (2006), efectuaron el mejoramiento genético de dos cepas nativas de *P. djamor* var. *djamor* y dos de *P. ostreatus*, por medio del entrecruzamiento de micelio monocariótico. Una de las cepas obtenidas (DJS3) se considera promisoría para su cultivo en comunidades rurales, por su velocidad de crecimiento micelial y alta producción de cuerpos fructíferos (31).

Mahler (2006), reportó la descripción de las características del cultivo *in vitro* y producción de inóculo de cuatro cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*. Se determinó que los crecimientos más rápidos fueron observados en el medio EMA a 18°C para las cepas *N. lepideus* 90.2002 y *N. ponderosus* 02.2002; y a 26°C para la cepa *N. ponderosus* 145.2002; así como en el medio ASD a 26°C para la cepa *N. ponderosus* 02.2003 (32).

Pérez (2006), evaluó el crecimiento micelial y biomasa de ocho cepas de *Pleurotus* (*Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. djamor* var. *djamor*, y *P. djamor* var. *roseus*), en tres medio de

cultivo (PDA, AEM y ASD) y tres temperaturas de incubación (18, 24 y 26°C). La cepa que presentó la mejor tasa radial de crecimiento (mm/día) fue *P. ostreatus* 06.2003 en el medio PDA a 18, 24 y 26°C, así como en el medio AEM a 24 y 26°C; seguida de la cepa *P. djamor* var. *roseus* 03.2002 en los medios PDA y ASD a 24°C. La cepa *P. levis* 50.2002, fue la que obtuvo la menor tasa radial de crecimiento. La producción de biomasa fue mayor en *P. djamor* var. *roseus* 131.2002 en todos los medios a 26°C y la cepa con menor biomasa producida fue *P. levis* 50.2002 (33).

Ceballos (2007), evaluó el rastrojo de maíz (*Zea mays*) L. y hojarasca de roble (*Quercus peduncularis*) previo al cultivo artesanal del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) cepa ECS 110. Asimismo se utilizó agar PDA para aislar micelio a partir de un carpóforo del hongo. Luego el micelio se inoculó sobre granos de sorgo (*Sorghum vulgare*), para su posterior inoculación sobre los sustratos utilizados: Restos de cosecha de maíz (caña de milpa y tusa) y hojarasca de roble, obtenidos de las comunidades del “Bosque Pinalón” de San Pedro Pinula, Jalapa. La evaluación de la potencialidad de los sustratos empleados para la producción de carpóforos comestibles se realizó mediante su comparación con pulpa de café. La eficiencia biológica en porcentaje del hongo *P. ostreatus* sobre rastrojo de maíz, hojarasca de *Quercus*, fueron de 113.28 y 113.52% respectivamente, las cuales estadísticamente son menores a las obtenidas sobre el testigo (148.21%), por lo que se consideran aceptables para ser explotados en la producción de carpóforos de la cepa ECS 110. La tasa de producción en porcentaje obtenido sobre el rastrojo de maíz y hojarasca de *Quercus* fue de 2.28 y 1.90% respectivamente, los cuales no presentaron diferencia significativa con el registrado sobre el testigo (2.58%). Los períodos productivos sobre rastrojo de maíz y hojarasca de *Quercus* son de 52 y 49.20 días respectivamente, el cual estadísticamente es menor al obtenido sobre el testigo (54.80 días) (34).

Cojtí (2008), describió las características miceliales de cultivo *in vitro* de una cepa nativa de *Pleurocybella porrigens* (Pers. Ex Fr.) Singer, así como el medio y la temperatura más adecuada para su desarrollo. El crecimiento más vigoroso y rápido fue observado en el medio PDA-IM a 24°C a los 17 días de incubación con un diámetro de 50.9 mm y una tasa radial de crecimiento de 2.9 mm/día (35).

Mérida (2008), reportó los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la eficiencia biológica de dos variedades del hongo comestible *Pleurotus djamor* var. *djamor* y var. *roseus*), en donde se utilizaron como sustratos los subproductos agrícolas propios de la región de Huehuetenango. La mayor eficiencia biológica a partir del peso fresco (46.23%), se obtuvo de la cepa *Pleurotus djamor* var. *djamor*, utilizando como sustrato la paja de avena. Se indicó además

que la actividad productiva de cultivar el hongo comestible *Pleurotus djamor* var. *djamor* en condiciones artesanales, utilizando como sustrato paja de avena, tiene una rentabilidad positiva (36).

#### **D. Efecto del pH en el desarrollo micelial de los basidiomycetes**

Existen diversos factores ambientales como la temperatura, el pH, el oxígeno, la humedad y fuente de carbono que han sido estudiados por su efecto sobre el crecimiento micelial. Específicamente el pH y la temperatura son los factores más importantes sobre este crecimiento (37).

El efecto del pH sobre el crecimiento fúngico es bastante complejo, porque inicialmente el pH afecta el crecimiento y subsecuentemente el crecimiento afectará el pH a través de la acumulación de metabolitos en el medio (37).

En un estudio realizado con el hongo comestible *Lepista nuda*, se evaluó el crecimiento micelial de cepas silvestres mexicanas, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos ajustados a pH 6, 7 y 8, con la finalidad de determinar el efecto de estas condiciones en la  $K_t$  (tasa de crecimiento). Se encontró que la más alta  $K_t$  se observó a pH 7, siendo este valor el óptimo para el crecimiento de las cepas de *L. nuda* estudiadas, seguido del pH 6 y 8 (38).

En otro estudio se cuantificó la reducción del daño por *Trametes versicolor* en árboles de manzano. Para el efecto, se aplicaron tratamientos para modificar el pH del suelo, materia orgánica y otros componentes del suelo. Se determinó que los valores de pH mayores que 7, disminuyen la disponibilidad de fosfatos y otros microelementos necesarios para el adecuado crecimiento tanto de *T. versicolor* como de los brotes de manzano y por lo tanto el daño es mayor (39).

Asimismo, a nivel de laboratorio se evaluó el diámetro de las colonias de *Trametes versicolor* utilizando el medio agar papa dextrosa (PDA), con valores de pH de 4.0-7.1. Se demostró que el crecimiento del hongo fue mayor a un pH entre 4.5 y 6.5. Sin embargo, en pH neutro (7.1), el hongo se desarrolló más lentamente entre las primeras 24 y 48 horas, pero después de las 48 horas, se reportó un crecimiento más activo en todos los rangos de pH estudiados. Por tal razón, se concluyó que posiblemente las enzimas extracelulares producidas por *T. versicolor* alteran el pH del medio, estabilizándolo entre los límites de 4 y 5.5 (40).

Se evaluó también el efecto del pH sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *Ganoderma lucidum* (ECS-502, 505 y 506), utilizando cuatro medios de cultivo, agar extracto de malta, agar de malta y levadura, agar papa dextrosa-levadura y agar dextrosa extracto de

flamboyán (*Delonix regia*) (AEM, AML, APDL, ADF, respectivamente) a cuatro valores de pH (5, 5.5, 6 y 6.5). Se determinó que todas las cepas presentaron un menor crecimiento en el medio AEM sin detectarse influencia alguna del pH en el rango de 5 a 6.5. Asimismo, la temperatura óptima de crecimiento para la cepa 505 fue de 30°C, en tanto que para las otras dos fue de 25 y 30°C (41).

### **E. *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire**

*Agrocybe cylindracea* es un hongo comestible cultivado sobre sustratos de bajo costo principalmente, desechos agrícolas y forestales (42).

Presenta una amplia distribución, siendo reportado en todos los continentes, sin embargo, es raro en Norteamérica y México (43).

#### **1. Clasificación taxonómica**

Se clasifica en el *Phylum* Basidiomycota, Clase Basidiomycetes, Subclase Agaricomycetidae, Orden Agaricales, Familia *Bolbitiaceae*, Género *Agrocybe* (44).

*Agrocybe cylindracea* presenta múltiples sinónimos, entre los cuales el más conocido es *A. aegerita* (Brig.) Singer, ampliamente difundido en todo el mundo, pero la utilización de este podría deberse a un error ortográfico o tipográfico, considerándose que el epíteto correcto para este sinónimo es “*aegirita*” (42).

#### **2. Morfología**

El píleo es convexo o plano, 8-200 mm de ancho, de color marrón, generalmente oscuro (marrón oscuro) en el centro y casi blanco (color marrón muy pálido) en el margen, siendo el primordio de color marrón oscuro uniforme. La superficie del píleo es lisa, que con el tiempo presenta ranuras o estriaciones en algunos especímenes pero usualmente es suave y sedoso y no es higrofano, ni viscoso. Las lamelas son blancas, gris claro y eventualmente de coloración marrón fuerte o marrón oscuro, moderadamente amplias, estrechas, onduladas o rectas, de borde liso o crenado. El estípite es cilíndrico, sólido, de 10-150 x 2-25 mm, de color blanco a marrón muy pálido, con pequeñas escamas o filamentos. El velo forma un amplio y persistente anillo. El contexto de color blanco, con olor agradable, afrutado, sabor excelente. Se le puede encontrar creciendo en grupo. Esporada con una coloración marrón fuerte (42).

Las esporas miden de (8-) 9-16 (-17) x 5-9 (-10)  $\mu\text{m}$ , Q = 1.8 (n=700), oblongas, lisas, algunas con gúttulas en el interior, pigmentadas (color miel o castaño marrón) con un pequeño

poro germinal nunca truncado. Los basidios miden de (17-) 22-46 x 5-8  $\mu\text{m}$ , con un extremo engrosado, pero ligeramente más delgados por el centro, poseen una pared delgada, hialina, conteniendo de 1-4 esporas. Pleurocistidios de (18-) 21-65 x (5-) 7-17  $\mu\text{m}$ , con una estructura que es más amplia en el centro y disminuye hacia los extremos, pero también puede presentar extremos engrosados, sus puntas pueden ser redondeadas o terminar en una punta afilada o alargada, con una pared delgada y están presentes en abundante cantidad. Queilocistidios con longitudes de 18-49 x (3-) 5-13  $\mu\text{m}$ , similares a los pleurocistidios o más pequeños de forma cilíndrica o lageniforme. Las hifas presentan conexiones en grapa o fíbulas. La trama del himenóforo es regular. El epicutis del píleo está formado por elementos vesiculares clavados y amplios en su base, más angostos a medida que se alejan de la base, de 14-42 x 6-25  $\mu\text{m}$ , formando una capa himeniforme. Pileocistidios de 17-55 x (5-) 6-13  $\mu\text{m}$ , mucronados y ventricosos, algunas veces pueden presentar dos constricciones cerca del ápice o lageniforme y raramente son agudos. Caulocistidios de 16-88 (-95) x 4-16  $\mu\text{m}$ , similares en forma a los queilocistidios, o pueden ser capitados o mucronados (42).

Muchas variaciones morfológicas macro y microscópicas han sido observadas previamente entre diferentes colecciones. Dentro de las características macroscópicas, el color del píleo y la superficie son variables. En cuanto a las variaciones microscópicas, el número de esporas producidas por basidio, el tamaño de las basidiosporas y el tamaño de los cistidios, son de las características que pueden variar. Además, la caracterización molecular y morfogenética de los genes de *A. cylindracea* han revelado un polimorfismo genético extenso. Por todas estas razones se ha propuesto que *A. cylindracea* puede corresponder a más de una microespecie o alternativamente, puede ser una especie filomórfica cosmopolita (42).

### 3. Distribución y hábitat

Posee una amplia distribución geográfica ya que es un hongo lignícola y ha sido encontrada en todos los continentes (42).

Se ha reportado que en Argentina, *A. cylindracea* puede ser fácilmente encontrada creciendo en grupos, sobre troncos muertos o vivos, con frecuencia en heridas o en la base de las ramas. Las especies más comunes de árboles pertenecen a los géneros *Populus*, *Salix* y *Hacer*. También en *Quercus*, *Ulmus*, *Robinia*, *Brunonettia*, *Melia*, *Allophylus*, *Cupania*, *Phebe* y *Araucaria angustifolia* (42).

Aunque es raro en Norteamérica, en México se ha reportado en bosques de *Pinus-Quercus*, de las reservas de la Biosfera de La Michilía y de Mapimí, Estado de Durango (42, 45).

En Guatemala se le ha encontrado creciendo sobre *Sambucus* sp y *Salix* sp, en las comunidades de Tecpán Guatemala, Chimaltenango (2300 msnm) y en las aldeas Escuachil y Vista Hermosa, San Antonio Sacatepéquez, San Marcos (2500 msnm), así como en San Juan Ostuncalco (aldea Buena Vista) Quetzaltenango al pie de los saúcos viejos (*Sambucus* sp) (46, 47, 48, 49, 50).

#### 4. Etnomicología

Los hongos silvestres comestibles han tenido un lugar importante en la alimentación de algunas culturas, por su valor nutricional y sabor agradable al paladar. Guatemala cuenta con la tradición de la búsqueda y consumo de hongos, practicadas principalmente por las etnias de origen maya, hasta ahora se conocen y recolectan alrededor de 70 especies de hongos comestibles, entre los que se encuentran *A. cylindracea* (51).

Morales (2001) reportó más de 40 especies de hongos recolectados en la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Entre ellas, *A. cylindracea* (citado como *A. aegerita*), el cual crece sobre troncos de árboles de saúco (*Sambucus mexicana*) y se recolecta en el mes de junio. En este lugar se le conoce como hongo del saúco o Rukoxil Tunay Che' en el idioma Kaqchikel (46).

Asimismo, se ha comunicado que es un hongo comestible muy popular en los municipios de Cajolá, San Miguel Sigüilá, San Juan Ostuncalco (aldea Buena Vista) y Concepción Chiquirichapa en el departamento de Quetzaltenango, donde se le conoce con el nombre de Tx'yol B'aqman, Tx'yol te chib'j (en el idioma Mam) u hongo del saúco. En estas localidades se recolecta al pie de los árboles de saúco (*Sambucus* sp) durante mayo y junio y su cosecha tarda veinte días. Se indica también que se pudre por el agua, y si no le da el sol, su color es blanco, cambiando a café si es expuesto a la luz del sol. Se comercializa en los mercados de la región, para la elaboración de platillos típicos, tales como recado y paches. El valor de la libra en los mercados es de Q.6.00 (50).

También se ha informado que esta especie comestible es muy apreciada en las aldeas Escuachil y Vista Hermosa de San Antonio Sacatepéquez, San Marcos, donde se le conoce como hongo del soico (51, 52, 53).

En Italia se le conoce con los nombres comunes de Piopparello y Pioppino. En Japón se nombra como Yanagi Matsutake. En Tailandia se le llama Hed Yanagi. En China Popular hongo del sur o Zhuzhuang Tiantougu. En México se le denomina comúnmente hongo de chopo, hongo negro del álamo y seta del chopo (54, 55).



## 5. Características miceliales

En general las colonias presentan un crecimiento longitudinal y linear, de aspecto algodonoso, usualmente con poco micelio aéreo, de color blanquecino al principio de su desarrollo y posteriormente, muestra manchas de color café y/o marrón oscuro en agar extracto de malta (AEM). Algunas veces se forman primordios. Posee un olor dulce, farináceo a veces no muy agradable (42, 54).

## 6. Requerimientos para el cultivo

Para un adecuado crecimiento micelial de las distintas cepas de *A. cylindracea*, se ha recomendado el uso de diferentes medios de cultivo, entre ellos, agar malta, levadura y peptona (MYPA), agar papa dextrosa (PDA), agar papa dextrosa y levadura (PDYA), agar extracto de malta (EMA), agar harina de maíz y levadura (CMYA) y agar comida para perro (DFA) (54).

## 7. Estudios sobre cultivo de *A. cylindracea* en Guatemala

En un estudio sobre las características de cepas guatemaltecas de *A. aegerita* (AA1 y AA2) aisladas a partir de carpóforos que crecían silvestremente en la región de Tecpán y una cepa europea (AAO), se demostró que el medio de cultivo influye en la cantidad de micelio que producen todas las cepas, no así la temperatura de incubación. Así, se observó que en los medios PDA y AEM a 26°C se obtuvo la mayor producción de micelio para las cepas utilizadas, siendo el medio ASD a 18°C donde se produjo la menor cantidad de micelio (57).

La mayor producción de micelio para la cepa AA1 se obtuvo al incubar a 26°C, encontrándose diferencia significativa entre agar ASD, donde se obtuvo la menor cantidad de micelio en comparación con los otros medios de cultivo utilizados. Para la cepa AA2 no se obtuvo diferencia significativa entre las temperaturas de incubación, aunque a diferencia de la cepa AA1, fue en agar AEM donde hubo mayor producción de micelio. Para la cepa AAO la mayor producción de biomasa se alcanzó en agar AEM incubado a 22°C. Los contenidos de humedad en los cuales se obtuvo la mayor degradación de sustrato para la cepa AA1 fueron del 78.13 a 85.47%, mientras que la cepas AA2 y AAO degradaron mayores porcentajes de paja con un contenido de humedad del 85.47%. Por otra parte, la cepa AA2 degradó más sustrato en la paja suplementada con nitrato de sodio a una concentración de 0.32g N/100g de paja, mientras que la cepas AA1 y AAO degradaron mayor cantidad de paja en los sustratos suplementados con fosfato ácido de amonio a las concentraciones de 0.64 y 0.48g N/100g de paja (57).

Vallejo (2002) realizó un análisis químico de la paja de cebada con y sin suplemento para el cultivo de *A. aegerita*. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de carbono en el sustrato no afecta la degradación de la paja de cebada por la cepa de *A. aegerita* AA-O. La mayor degradación de la paja de cebada (25.64 y 25.06%), cuando esta es suplementada con  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , se obtiene con un porcentaje de nitrógeno entre 1.21 y 1.37, con una relación C:N entre 42 y 36 y una relación N:P entre 1.83 y 1.63. La paja de cebada suplementada con  $\text{NaNO}_3$ , a una relación C:N entre 42 y 36 no produce una mayor degradación del sustrato por *A. aegerita*. Asimismo, se reportó que en el sustrato, el ión  $\text{NH}_4^+$  es una fuente de nitrógeno disponible para ser utilizado por el micelio de *A. aegerita*; sin embargo, no ocurre lo mismo cuando el sustrato está suplementado con  $\text{NO}_3^-$ . También se indicó que *A. aegerita*, durante su degradación de paja de cebada suplementada con  $\text{NaNO}_3$  eleva el pH de 5.5 a 6.8 (aproximadamente). El  $\text{NO}_3^-$  posiblemente fue removido del medio por el micelio de *A. aegerita*. Con la paja de cebada suplementada con  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , el pH permaneció casi invariable entre el sustrato testigo (pH inicial) y el pH del sustrato degradado por *A. aegerita*. Asimismo se reportó que la poca variación en el pH posiblemente se debe a que esta fuente de nitrógeno actuó como un amortiguador (buffer) en el sustrato (58).

Andrade (2007), indicó que la producción de micelio vegetativo de seis cepas guatemaltecas de *A. aegerita* (2.2001, 58.2001, 59.2001, 60.2001, 97.2002, 112.2002), debe de realizarse en el medio de cultivo PDA a una temperatura de 26°C, ya que en el medio de cultivo AEM se producen pigmentos que le reducen la vida media al micelio vegetativo. Asimismo, se recomendó no utilizar la temperatura de 18°C para el crecimiento del micelio vegetativo, la producción de biomasa o de inóculo, porque se obtiene baja tasa radial de crecimiento micelial. De igual forma, se recomendó utilizar como sustrato para la producción de inóculo, uno que contenga alto porcentaje de fibra. Asimismo en relación a los resultados obtenidos concluye que la cepa que presentó mejor crecimiento fue la 112.2002 (52).

## **8. Otros estudios sobre *A. cylindracea***

El hongo comestible *A. cylindracea* es un hongo que es relativamente fácil de cultivar, no tanto como el hongo ostra, dado que es más propenso a la contaminación y requiere un tiempo de incubación mayor antes de la primera cosecha (1 - 1½ meses). En Tailandia, este hongo es un producto relativamente nuevo en el mercado asiático y gracias a su comercialización y a los esfuerzos promocionales, su alta demanda brinda a los cultivadores un ingreso atractivo, ya que alcanza un precio de USD 3.10 por kg (año 2004). Una bolsa de cultivo de hongos hecha con

aserrín, salvado de arroz (7.5-10%), CaCO<sub>3</sub> (2%), azúcar (1%) y yeso (1%) podía llegar a costar USD 0.15 por bolsa de kg en Tailandia. En este mismo país, un ciclo de producción de 10 colectas durante un año, produce 150-200g/kg de hongos frescos en total. Los hongos frescos pueden guardarse a 7°C por un máximo de 7 días (55).

#### **a. Producción de inóculo y cuerpos fructíferos**

Se ha indicado que el inóculo primario y secundario de *A. cylindracea* se puede preparar en granos de cereales (centeno, trigo, mijo, sorgo, entre otros). Para el inóculo terciario se recomienda el uso de aserrín (54).

Para la producción de basidiomas, se han utilizado diversos sustratos, entre ellos, paja de trigo, paja de trigo adicionada con CaCO<sub>3</sub>, aserrín o viruta de encino y aliso suplementado, así como madera de sauce, álamo, chopo y maple, utilizando bolsas de polipropileno para contener los sustratos que se usen para la fructificación (8, 42, 54).

El micelio de *A. cylindracea* es estable solamente hasta 20 subcultivos sucesivos, por lo que es importante tomar en cuenta este aspecto cuando se produce micelio primario a gran escala (56).

#### **b. Propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y antioxidantes**

El péptido denominado Agrocybina (peso molecular de 9 kDa), fue obtenido a partir de cuerpos fructíferos frescos de *A. cylindracea*. Este péptido presentó actividad antifúngica contra varias especies de hongos, sin embargo, la actividad inhibitoria contra bacterias, se pierde cuando se utiliza una concentración superior a los 300 µM. Por otra parte, la presencia de Agrocybina atenuó la actividad de la transcriptasa reversa del virus HIV-1 (59).

La lectina AAL (*Agrocybe aegerita* lectin) proveniente del hongo *A. aegerita*, es una proteína antitumoral que suprime el crecimiento de tumores, via apoptosis de las células cancerígenas. Como resultado, se confirma que la AAL posee actividad anticancerígena y crea una nueva opción para el desarrollo de drogas antitumorales basadas en la AAL como modelo (60).

Para evaluar el potencial que *A. aegerita* presenta contra el cáncer, se investigó el efecto que produce en cinco líneas celulares de cáncer humano *in vitro*. *A. aegerita* mostró inhibición de la proliferación de células cancerígenas en el estómago, las mamas y diferentes células del sistema nervioso central. El compuesto responsable de la actividad es una ceramida, la cual presenta una actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa y de la proliferación de células tumorales

(61).

Por lo anteriormente descrito, se sugiere que el consumo de *A. aegerita* contribuiría a aliviar las condiciones inflamatorias, reducir el desarrollo de los diferentes tipos de cánceres, así como inducir una actividad inmunoestimulante en el organismo (62). Sin embargo, es importante considerar que los compuestos presentes en *A. cylindracea*, puede ser extraídos en agua pero no en acetato de etilo o metanol, siendo por otra parte sensibles al tratamiento térmico (63).

Al obtener extractos etanólicos y en agua caliente a partir de los cuerpos fructíferos de *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* y *Boletus edulis*, se encontraron 3.18–6.18 mg/g de tocoferoles y 5.67–5.81 mg/g de fenoles totales. Estos compuestos presentaron propiedades antioxidantes (64).

Huang y cols. (2006), reportaron la capacidad antioxidante de *A. cylindracea*, a partir del análisis de distintos extractos metanólicos preparados con cuerpos fructíferos, micelio y filtrado de fermentación. Se encontró que el extracto metanólico obtenido a partir de los cuerpos fructíferos presentó una mayor habilidad inhibitoria en la oxidación de lípidos (90.0-97.3%) a una concentración de 5-20mg/ml. La capacidad quelante (sobre iones  $F^{+2}$ ) del extracto metanólico de cuerpos fructíferos, micelio y filtrado fue de 90.6%, 84.6% y 96.5% respectivamente a una concentración de 5mg/ml. Los resultados anteriores indicaron que este hongo posee buenas propiedades antioxidantes, excepto en la habilidad de eliminar radicales hidroxilo (65).

### **c. Propiedades bioquímicas**

Recientemente, se describió la primera enzima extracelular (AaP o *A. aegerita* peroxidasa) y la primera peroxidasa en catalizar la reacción de oxidación de la piridina. Esta enzima puede ser considerada una verdadera peroxygenasa por su capacidad de transferencia de un átomo de oxígeno a partir del peróxido al sustrato. La identificación de la AaP (una enzima biocatalítica extracelular muy versátil, que puede oxigenar compuestos aromáticos), se suma a los dos únicos tipos de enzimas involucradas en la oxidación de piridina: la metano monooxygenasa bacteriana y las monooxygenasas P450 (66).

### **d. Propiedades degradativas**

Se reportó que cepas pertenecientes al género *Agrocybe* poseen un alto potencial de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo y alto peso molecular, ya que pueden degradar el compuesto fluoreno, el cual se utiliza en la elaboración de tintes, plásticos y pesticidas. Una concentración inicial de 100 ppm de fluoreno fue degradada en un 99% en un

tiempo aproximado de 6 días y como resultado, se identificaron dos metabolitos denominados 9-fluorenol y 9-fluorenono, los cuales son dos intermediarios menos tóxicos generados a partir del fluoreno (67).

#### **e. Estudios moleculares**

Diversos estudios genéticos se han realizado con *A. aegerita* por la facilidad que se tiene de producir micelio vegetativo y primordios bajo condiciones adecuadas. Así, se identificó el gen Aa-Pril y la proteína que codifica, señalando que éste aumenta su transcripción al iniciar la fructificación y esta decrece conforme el cuerpo fructífero de *A. aegerita* madura (68).

Se clonó e identificó el gen Pri3 y la proteína que lo codifica en nueve cepas de *A. aegerita* procedentes de Europa, Asia y América Latina. Este gen se expresa en dos cariosomas al inicio de la fructificación. La proteína Pri3 no presenta homólogo significativo con otras proteínas relacionadas con el crecimiento del hongo, constituyendo una nueva clase de proteína rica en cisteína. Asimismo, se encontró una divergencia genética en la evolución de los grupos de cepas analizadas (69).

Asimismo, se estudió la transición mitocondrial durante la plasmogamia, crecimiento del micelio vegetativo y la diferenciación del basidiocarpo de *A. aegerita*. Se comprobó que la migración nuclear es bilateral y que depende del genotipo expresado, estableciendo que solamente el 75% de los aislamientos dicarióticos producen una migración mitocondrial parcial halotípica (mezcla de monocarióticos) y que el otro 25%, presentó un solo halotipo (dicariótico homoplásmico) (70).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Latinoamérica es una región fundamental para la conservación de la biodiversidad. Los países pertenecientes a esta región son considerados lugares con megadiversidad y resulta paradójico que, en ellos, existan pocos programas de búsqueda, recuperación, caracterización y conservación del germoplasma fúngico nativo. A pesar de ello, se ha producido un notable desarrollo de la industria de hongos en los últimos años (71).

En el país, los hongos comestibles de naturaleza saprobia poseen un gran potencial para ser cultivados a nivel artesanal e industrial, no solo por sus propiedades nutricionales, si no también por sus propiedades medicinales y su capacidad de producir metabolitos secundarios.

Los estudios realizados en la Universidad de San Carlos de Guatemala, han permitido obtener y aislar cepas nativas de *Agrocybe cylindracea*, a partir de especímenes provenientes de las localidades donde se utiliza como alimento y se comercializa. Estas cepas nativas pueden ser utilizadas con fines de bioprospección de la diversidad fúngica, ya que pueden ser una alternativa alimenticia para autoconsumo y económica mediante la producción y comercialización de cuerpos fructíferos a nivel rural. Por otra parte, también pueden utilizarse para la producción de sustancias con propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y antioxidantes.

Por lo tanto, se hizo necesario el estudio de estas cepas nativas, para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo y pH, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas de crecimiento de las mismas, previo a la producción de cuerpos fructíferos.

Los resultados obtenidos establecieron las bases para generar una tecnología que posteriormente podría utilizarse para el cultivo de *A. cylindracea* en regiones rurales del país, como una alternativa alimenticia, económica y medicinal.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Establecer el comportamiento de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* en diferentes medios de cultivo, bajo diferentes pH.

### B. Específicos

1. Determinar el medio de cultivo y pH donde las cepas presentan el mayor crecimiento micelial, a través de la evaluación del diámetro de las colonias.
2. Describir las características macro y microscópicas de cultivo *in vitro*, obtenidas en diferentes medios de cultivo y pH, para documentar las características morfológicas de las colonias y de las hifas que exhiben cada una de las cepas.

## VI. HIPÓTESIS

El crecimiento micelial de los aislamientos de *Agrocybe cylindracea* estudiados, evidencian mayor diámetro de crecimiento micelial en por lo menos en un medio de cultivo y un pH a estudiar.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Las cepas que se utilizaron están depositadas en el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrízicos, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Siendo las siguientes (Tabla 1):

Tabla 1. Procedencia y registros de las cepas

| Código de la cepa | Procedencia   | Sustrato <sup>1</sup> |
|-------------------|---|-----------------------|
| 58.2001           | Aldea Vista Hermosa, San Antonio Sacatepéquez, San Marcos | <i>Sambucus sp</i>    |
| 59.2001           | Aldea Vista Hermosa, San Antonio Sacatepéquez, San Marcos | <i>Sambucus sp</i>    |
| 60.2001           | Aldea Escuachil, San Antonio Sacatepéquez, San Marcos     | <i>Sambucus sp</i>    |
| 112.2002          | Tecpán G., Chimaltenango                                  | <i>Salix sp</i>       |
| 638.2008          | Tecpán G., Chimaltenango                                  | <i>Sambucus sp</i>    |

1: Sustrato en el que crecían los basidiomas, de los cuales fue aislada la cepa.

### B. Procedimiento

- 1 Determinación del comportamiento a diferentes medios y pH:
  - 1.1 Se revitalizaron las 5 cepas, sembrándolas en agar PDA e incubándolas a 26°C, por 30 días.
  - 1.2 Se determinó el diámetro de las colonias de cada una de las cepas, a diferentes pH y medios de cultivo:  
El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier, *et al.*, Stamets y Sánchez (41, 54, 72).
  - 1.3 Se prepararon los medios de cultivo: Agar con extracto de malta (EMA), agar papa dextrosa (PDA) y agar harina de maíz y levadura (CMYA).
  - 1.4 Se tomó el pH inicial de los medios preparados, el cual debió estar entre 5.5 y 6.8.
  - 1.5 Se ajustó el pH de cada medio a utilizar a 5, 5.5 y 6, con NaOH al 10% y Acido láctico al 90%.
  - 1.6 Se esterilizaron los medios por 15 minutos a 121°C.
  - 1.7 Se inocularon 20 cajas de cada uno de los medios, con cada una de las cepas revitalizadas, con un segmento de 0.5mm del cultivo.
  - 1.8 Se identificaron las cajas de petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.

- 1.9 Se sellaron las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- 1.10 Se incubaron 20 cajas de cada medio y pH inoculadas con las cepas a 26°C, durante un máximo de 36 días.
- 1.11 Se anotó el diámetro alcanzado por las colonias cada 3 días, mediante la medición del diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares, los cuales se deben sumar y dividir entre dos, para obtener el diámetro promedio (cm). Esto se realizó en cada uno de los medios y temperaturas.

## 2. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias:

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Nobles (73).

- 2.1 Se caracterizaron macroscópicamente las colonias de las cepas con ayuda de un estereóscopo.
- 2.2 Se observó el color del anverso y reverso, textura, consistencia, forma, olor, micelio aéreo, producción de exudado, formación de rizomorfos o agregaciones hifales.
- 2.3 Se describió microscópicamente el micelio de las colonias, realizando preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales a 400 y 1000 aumentos, determinando el diámetro de las hifas ( $\mu\text{m}$ ) así como la presencia de fíbulas, clamidosporas, hifas en espiral, apresorios y cualquier otra característica relevante.

## 3. Análisis estadístico:

- 3.1 Se elaboró una base de datos en el programa EXCEL®, ordenando los datos en forma vertical, incluyendo los siguientes parámetros en cada columna: Cepa (c/u de las 5 cepas), temperatura de incubación (26°C), medio de cultivo (EMA, PDA, CMYA), pH (5, 5.5, 6), día de medición (día 3, 5, 7, 10, 12, 14) y diámetro de la colonia de cada una de las repeticiones (cm), tomando como punto de corte el día 14.
- 3.2 Se importó la base de datos elaborada previamente, al programa estadístico SPSS 15.0®, para su análisis.
- 3.3 Se elaboraron gráficos de interacción, para observar el patrón de crecimiento de las cepas.
- 3.4 Se estimaron la media del diámetro de las colonias (cm) en el programa SPSS 15.0®

#### 4. Diseño estadístico

El diseño general de la investigación se presenta de acuerdo con los objetivos enunciados.

Objetivo 1: Se aplicó un diseño factorial: 5x3x3 (5 cepas, 3 medios, 3 pH).

Número de réplicas que se utilizaron: 20

Objetivo 2:

Descriptivo.

Análisis de la información:

Objetivo 1:

Se efectuó un análisis de varianza e intervalos múltiples de Duncan, para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento micelial en los medios de cultivo y pH. Además se elaboraron gráficas de interacción para mejorar la comprensión de los resultados del análisis factorial.

Objetivo 2:

Se describieron las características macro y microscópicas de cada una de las cepas en los diferentes medios de cultivos y temperaturas. Se elaboraron tablas y se incluyó fotografías.

## VIII. RESULTADOS

El estudio de las cepas de *A. cylindracea* mostró los siguientes resultados: La cepa 58.01 obtuvo el mejor crecimiento a pH 5.5 ( $8.43 \pm 0.48$  cm) y 6.0 ( $8.42 \pm 0.61$  cm), en el medio EMA, seguido por el pH 5.0 ( $8.19 \pm 0.75$  cm) en el mismo medio. Con la cepa 59.01 a pH 5.0 se obtuvo el mejor crecimiento en el medio EMA ( $6.92 \pm 0.14$  cm), seguido por el pH 6 y 5.5 en este mismo medio ( $6.80 \pm 0.12$  cm y  $6.79 \pm 0.14$  cm respectivamente) (Tabla 1).

La cepa 60.01 obtuvo el mejor crecimiento en el medio EMA a pH 6 ( $8.50 \pm 0.00$  cm). En el pH 5.5 el medio fue CMYA ( $6.86 \pm 0.24$  cm), seguido por el medio PDA ( $6.54 \pm 0.14$  cm) a pH 5.0. Con respecto a la cepa 112.02 el mejor crecimiento se observó en el medio PDA a pH 6.0 ( $4.76 \pm 0.12$  cm). En el pH 5.5 el medio fue PDA ( $4.71 \pm 0.76$  cm) y en el pH 5.0 en el medio CMYA ( $3.87 \pm 0.08$  cm). En contraste, la cepa 638.08 creció mejor en el medio EMA a pH 5.0 ( $8.37 \pm 0.14$  cm), así también a pH 5.5 y 6 ( $8.35 \pm 0.13$  cm y  $8.23 \pm 0.12$  cm respectivamente) (Tabla 1).

**Tabla 1. Crecimiento de las cepas de *A. cylindracea* incubada a 26°C durante 14 días.**

| Cepa   | Crecimiento Micelial (cm) |                                   |                                   |                                   |
|--------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|        | Medio <sup>1</sup> / pH   | 5.0                               | 5.5                               | 6.0                               |
| 58.01  | CMYA                      | $6.00 \pm 0.37$                   | $5.78 \pm 0.54$                   | $5.83 \pm 0.29$                   |
|        | PDA                       | $7.65 \pm 0.34$                   | $7.91 \pm 0.19$                   | $7.89 \pm 0.25$                   |
|        | EMA                       | $8.19 \pm 0.75$                   | <b><math>8.43 \pm 0.48</math></b> | $8.42 \pm 0.61$                   |
| 59.01  | CMYA                      | $5.56 \pm 0.23$                   | $5.59 \pm 0.25$                   | $6.09 \pm 0.17$                   |
|        | PDA                       | $6.54 \pm 0.19$                   | $6.33 \pm 0.19$                   | $6.47 \pm 0.21$                   |
|        | EMA                       | <b><math>6.92 \pm 0.14</math></b> | $6.79 \pm 0.14$                   | $6.80 \pm 0.12$                   |
| 60.01  | CMYA                      | $4.85 \pm 0.26$                   | $6.86 \pm 0.24$                   | $6.99 \pm 0.28$                   |
|        | PDA                       | $6.54 \pm 0.14$                   | $6.73 \pm 0.12$                   | $8.09 \pm 0.10$                   |
|        | EMA                       | $2.24 \pm 0.09$                   | $5.70 \pm 0.23$                   | <b><math>8.50 \pm 0.00</math></b> |
| 112.02 | CMYA                      | $3.87 \pm 0.08$                   | $3.99 \pm 0.11$                   | $3.98 \pm 0.16$                   |
|        | PDA                       | $2.54 \pm 0.05$                   | $4.71 \pm 0.76$                   | <b><math>4.76 \pm 0.12</math></b> |
|        | EMA                       | $2.52 \pm 0.06$                   | $3.39 \pm 0.17$                   | $3.50 \pm 0.09$                   |
| 638.08 | CMYA                      | $7.01 \pm 0.21$                   | $6.97 \pm 0.24$                   | $7.37 \pm 0.32$                   |
|        | PDA                       | $7.28 \pm 0.20$                   | $7.60 \pm 0.25$                   | $7.80 \pm 0.16$                   |
|        | EMA                       | <b><math>8.37 \pm 0.14</math></b> | $8.35 \pm 0.13$                   | $8.23 \pm 0.12$                   |

1. PDA: Agar papa dextrosa; EMA: Agar con extracto de malta; CMYA: Agar harina de maíz y levadura.

Al final del período de incubación, las cinco cepas presentaron un color blanco en todos los medios de cultivo y pH. La textura de todas las colonias fue algodonosa y, en algunos medios y pH, el crecimiento micelial fue zonado, con abundante micelio aéreo, a excepción de la cepa 638.08 que mostró escaso micelio aéreo en el medio CMYA. Asimismo, la forma de las colonias fue circular con crecimiento radial en los distintos medios de cultivo y pH. En el reverso las cepas no mostraron pigmentación.

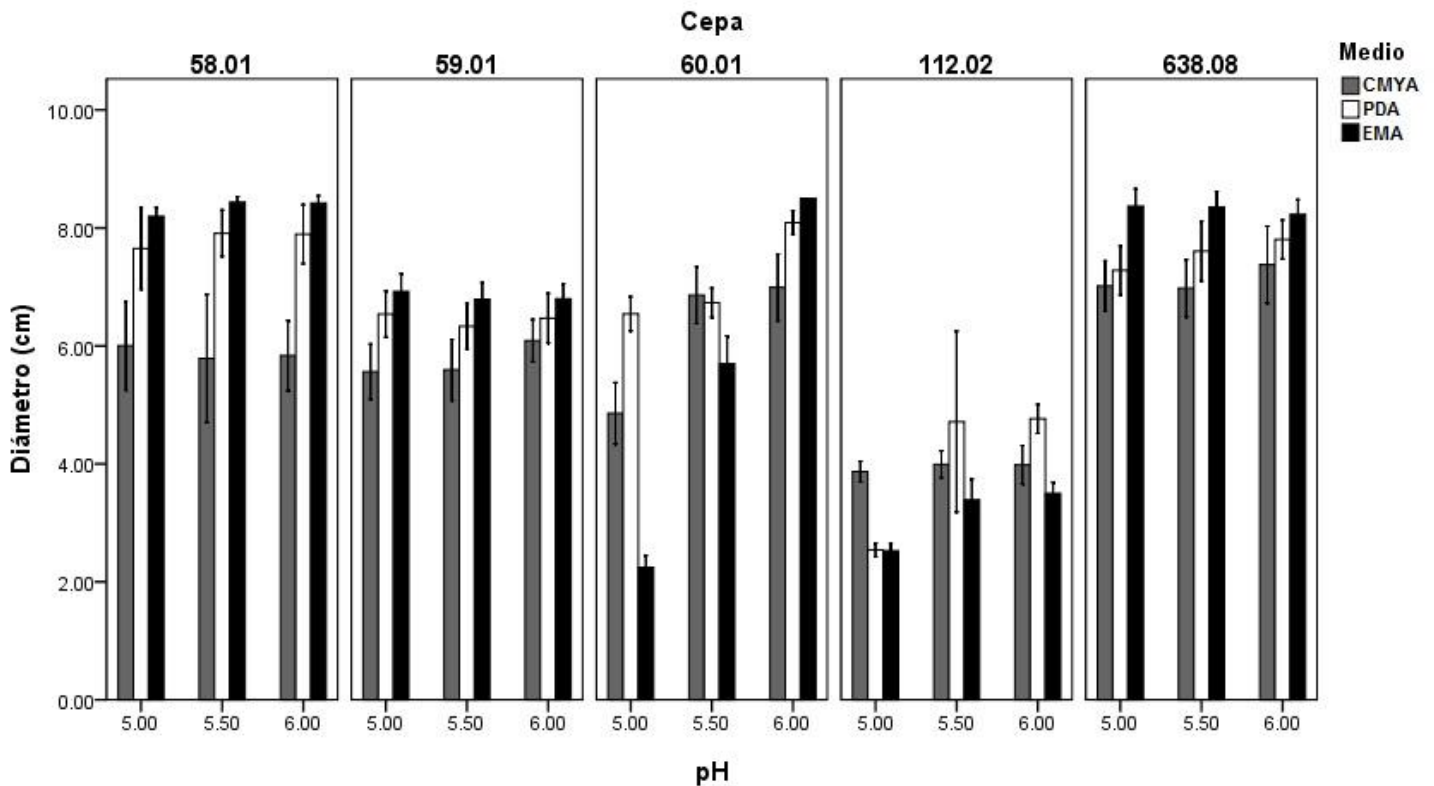
Se evidenció exudado en todas las cepas y pH, con excepción de la cepa 638.08 en el medio CMYA. El color del exudado varió de translúcido en el medio CMYA, a amarillo o ámbar en los medios EMA y PDA. Se percibió olor afrutado en todas las colonias de las cepas evaluadas sin importar el medio y pH (Anexo 1 - 5).

Microscópicamente, en los tres medios de cultivo y pH la mayoría de las cepas presentaron hifas con un diámetro de 2.0-4.0  $\mu\text{m}$ , con excepción de las cepas 59.01 y 638.08 en el medio PDA, las cuales presentaron un diámetro de 2.0-3.0  $\mu\text{m}$ . Asimismo, evidenciaron fíbulas en regular cantidad, excepto las cepas 60.01 y 112.02 que presentaron escasa cantidad. Todas las cepas exhibieron la formación de clamidosporas (Anexo 6 - 10).

Al comparar estadísticamente el crecimiento micelial obtenido de cada cepa en los tres medios de cultivo, se producen 15 combinaciones, de las cuales se indica únicamente el análisis de la prueba de intervalos múltiples de Duncan en los casos relevantes de cepa-medio descritos a continuación: El crecimiento de la cepa 58.01 en los medios EMA y PDA fue significativamente mayor al observado en el medio CMYA ( $p < 0.0001$ ). El desarrollo de la cepa 638.08 en el medio EMA fue significativamente mayor al obtenido en el medio PDA ( $p = 0.047$ ) y CMYA ( $p < 0.0001$ ).

Al comparar las cepas, se determinó que el crecimiento de la cepa 58.01 en el medio EMA fue significativamente mayor que la 638.08 en el medio PDA ( $p = 0.022$ ), y esta última en el medio EMA fue significativamente mayor a la 58.01 en el medio CMYA ( $p < 0.0001$ ). En resumen las combinaciones cepa 638.08 y 58.01 con el medio EMA son las que tuvieron el mayor rendimiento, no observándose diferencia significativa entre ellas, pero teniéndola con las demás cepas ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 1).

**Gráfica 1. Media del diámetro de crecimiento micelial de las cepas de *A. cylindracea* incubadas a 26°C durante 14 días a diferentes pH.**



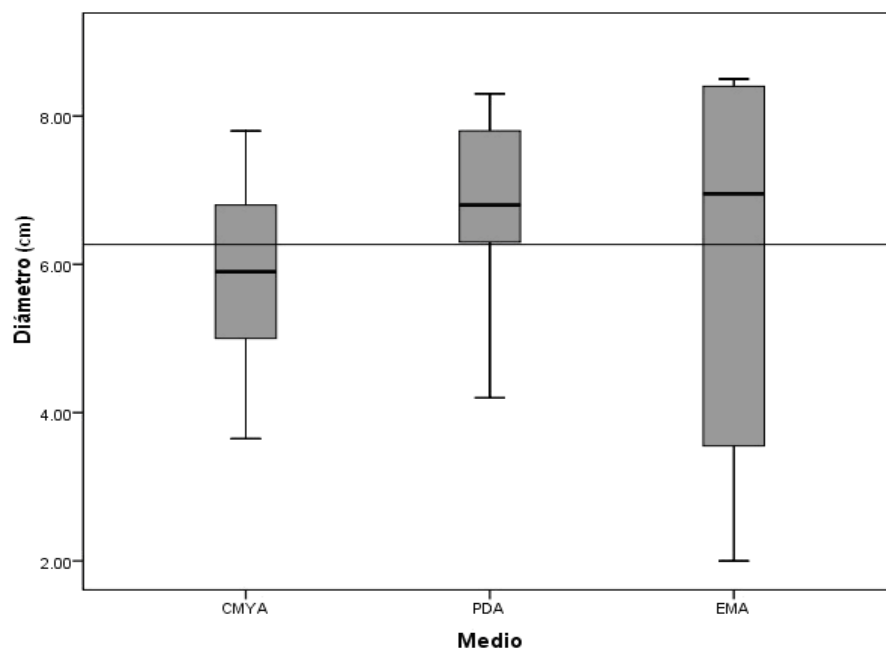
Al evaluar las interacciones cepa-pH, se obtuvo que las cepas 58.01 y 638.08 mostraron diámetros de crecimiento micelial similares a los diferentes pH. Sin embargo, en todos los casos el pH 6 fue el que presentó el mayor crecimiento de las cepas evaluadas, siendo la de mejor crecimiento, la cepa 60.01. No obstante, dado que esta cepa en general no obtuvo los mayores valores de crecimiento micelial, se pueden considerar las cepas 638.08 y 58.01 a pH 6, como las de mejor crecimiento. Al comparar estadísticamente la interacción entre las cepas, el pH y su efecto sobre el desarrollo micelial, se determinó que las combinaciones con mayor crecimiento significativamente diferente con las demás fueron: la cepa 58.01 a pH 5.5 y 6, la cepa 59.01 a pH 6, la cepa 60.0 a pH 6 y la cepa 638.08 a pH 5, 5.5 y 6 ( $p < 0.0001$ ). En resumen, se puede indicar que las cepas 60.01, 638.08 y 58.01 tienen mejor rendimiento a pH 6, sin embargo las últimas dos cepas presentan desarrollo similar a cualquier pH.

La evaluación de las interacciones entre la cepa, el medio y el pH mostró que no existieron diferencias significativas entre las combinaciones compuestas por la cepa 58.01 en el medio PDA a pH 6; la cepa 58.01 en EMA a pH 6 y la cepa 638.08 en PDA a pH 6 y en EMA a pH 5, 5.5 y 6 ( $p > 0.05$ ). En resumen se puede establecer que las combinaciones con mayor

crecimiento se obtuvieron con las cepas 638.08 y 58.01 en los medios PDA y EMA a pH 6. Adicionalmente, la cepa 638.08 en el medio EMA puede tener buen rendimiento a pH 5 y 5.5.

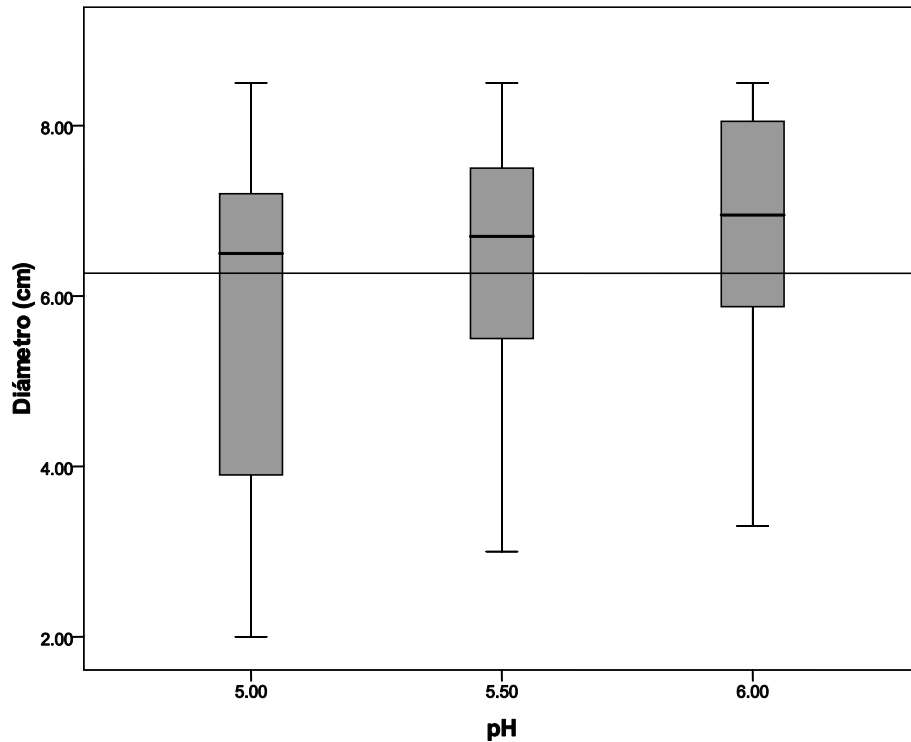
Al comparar el efecto general de los medios de cultivo evaluados sobre el crecimiento micelial (incluyendo todas las cepas y pH), se comprobó que el medio PDA fue significativamente mayor al medio CMYA ( $p < 0.0001$ ), pero no al medio EMA ( $p = 0.494$ ). Este último fue significativamente mayor al medio CMYA ( $p < 0.0001$ ). En resumen los medios PDA y EMA fueron en los que se presentaron los mayores diámetros de crecimiento micelial (6.59 y 6.42 cm respectivamente). El medio CMYA fue en el que se presentó el menor diámetro (5.78 cm) (Gráfica 2).

**Gráfica 2. Efecto del medio de cultivo sobre el diámetro de crecimiento micelial de las cepas evaluadas de *A. cylindracea* a diferentes pH, incubadas a 26°C durante 14 días.**



Al evaluar el efecto general del pH sobre el crecimiento micelial (incluyendo todas las cepas y medios de cultivo), se determinó que a pH 6 existe un crecimiento micelial significativamente mayor que a pH 5 ( $p < 0.0001$ ) y a pH 5.5 ( $p = 0.029$ ). Este último, fue significativamente mayor al pH 5 ( $p < 0.0001$ ). En resumen, el pH 6 fue en el que se presentó el mayor diámetro de crecimiento micelial (6.71 cm), seguido del pH 5.5 (6.34 cm) y el pH 5 (5.74 cm) (Gráfica 3).

**Gráfica 3. Efecto del pH sobre el crecimiento micelial de todas las cepas evaluadas de *A. cylindracea* en diferentes medios de cultivo, incubadas a 26°C durante 14 días.**

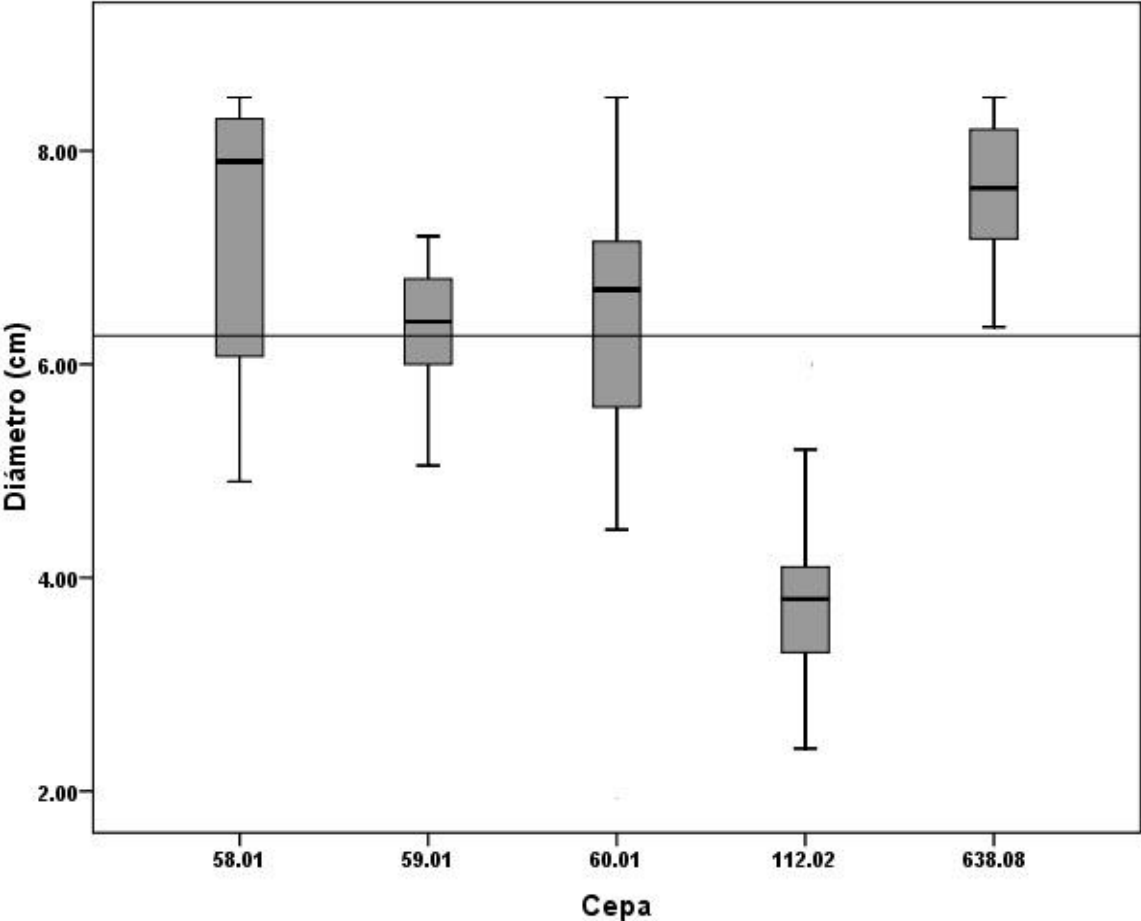


Al comparar de forma general el crecimiento micelial de las cepas de *A. cylindracea* (incluyendo medios de cultivo y pH), se determinó que la cepa 638.08 y 58.01 fueron las que desarrollaron el mayor crecimiento micelial, superando en diámetro a las demás cepas evaluadas (Gráfica 4).

La prueba de intervalos múltiples de Duncan, indicó que el diámetro de la cepa 638.08 fue significativamente mayor a las cepas 112.02, 60.01 y 59.01 ( $p < 0.0001$ ), no así con la cepa 58.01 ( $p = 0.086$ ). La cepa 58.01 fue significativamente mayor a las cepas 112.02, 60.01 y 59.01 ( $p < 0.0001$ ). La cepa 59.01 fue significativamente mayor a la 112.02 ( $p < 0.0001$ ), pero no con la 60.01 ( $p = 0.987$ ). La cepa 60.01 fue significativamente mayor a la 112.02 ( $p < 0.0001$ ) (Gráfica 4).



Grafica 4. Diámetro de crecimiento micelial de las cepas de *A. cylindracea* incubadas a 26°C durante 14 días, en diferentes medios de cultivo y pH.



## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio el pH tuvo una influencia significativa en el crecimiento de las cepas evaluadas, cuando se utilizan los medios PDA, EMA y CMYA, por lo que los resultados de los ensayos *in vitro* probaron que sí existe un efecto del pH en el crecimiento del hongo.

Debido a que las cepas 638.08 y 58.01 a pH 6 presentaron la mejor combinación por su mejor crecimiento, a diferencia del resto de las cepas y pH evaluados, se recomienda utilizar estas condiciones para futuros cultivos de las cepas. Por otra parte, no se recomienda utilizar un  $\text{pH} \leq 5$  en los medios CMYA, PDA y EMA para el cultivo de cepas, debido a que el pH bajo afecta la actividad de las enzimas extracelulares (celulasas, pectinasas y otras), lo cual se traduce en un menor crecimiento (74).

Diversos estudios han evaluado el efecto del pH sobre el crecimiento micelial. El cultivo de *Pochonia chlamydosporia* a diferentes pH (2.5 a 8.5); mostró que los valores de pH 4.5 a 2.5, evidenciaron una rápida disminución de la biomasa, en tanto que en el rango de pH 5 a 6 se observó el crecimiento más adecuado; siendo el pH 6.0 el que mostró la mejor producción de biomasa. Los valores de pH de 6.5 a 8.5 condujeron a una disminución gradual en la cantidad de micelio (75). Estos datos son comparables con la presente investigación, ya que el pH 6 fue óptimo para el crecimiento del micelio de *A. cylindracea* en los medios de cultivos CMYA, PDA y EMA y el diámetro de las colonias fue menor al disminuir el pH.

Hay que considerar también que el pH ajustado inicialmente en el medio de cultivo a evaluar, puede declinar incluso cuando se observe que existe o no un adecuado crecimiento micelial, debido a que el dióxido de carbono se hace más soluble y la cantidad de iones de carbonato en solución se incrementan, lo cual resulta en una disminución del pH del medio (76).

Determinadas sales minerales (como los fosfatos) y otras macromoléculas, que son esenciales para el crecimiento, son menos solubles a un pH alto, lo que genera disminución en la disponibilidad para la absorción a través de la membrana plasmática, por este motivo se ve favorecido el crecimiento micelial a pH 5, 5.5 y 6 (76).

Se ha establecido que la concentración de  $\text{H}^+$  presentes en el medio tiene poco efecto

directo sobre el metabolismo de hongos, debido al sistema buffer (amortiguador) presentes en las hifas, pero puede influir en la ionización de las sales en solución y en la permeabilidad de la membrana plasmática de las hifas. Además, la actividad de las enzimas se ve afectada por la concentración de  $H^+$  presentes en el medio (77).

Aunque las condiciones favorables para el crecimiento vegetativo no están estrechamente relacionadas con las condiciones necesarias para la formación del cuerpo fructífero, se sugiere que el valor del pH del hábitat podría ser un factor determinante para predecir el patrón de desarrollo de los hongos (76). Por lo tanto, para evaluar el crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y pH, cobra importancia el tener conocimiento sobre el pH del medio en el cual se recolecta el hongo de estudio. En este caso, dicha información no se pudo obtener debido a que las cepas de *A. cylindracea* almacenadas en el cepario de Hongos Saprobios y Micorrícicos, no cuenta con información sobre el análisis químico de la madera donde se encontraron los hongos que dieron origen a la obtención de las distintas cepas (Anexo 11).

Además, se ha comunicado que durante la producción de cuerpos fructíferos de *A. cylindracea* sobre paja de trigo, el crecimiento de este hongo puede producir alteraciones en el pH, causando inicialmente un ligero aumento, que posteriormente se estabiliza en un pH igual a 6 (78). Se ha indicado también que *A. aegerita*, durante la degradación de paja de cebada suplementada con  $NaNO_3$ , eleva el pH de 5.5 a 6.8 (aproximadamente), por lo cual se esperaría que a un pH inicial de 6 sobre el sustrato empleado para la fructificación de *Agrocybe*, el crecimiento micelial debería verse favorecido en comparación al resto de pH inicial de los substratos a evaluar para la formación de cuerpos fructíferos (58).

En el presente trabajo de investigación, la cepa 112.02 fue la que mostró el menor crecimiento micelial, en los tres medios de cultivo y pH evaluados. Un factor que pudo haber influido fue que las cepas se almacenan en refrigeración a 4°C, la cual es una metodología no recomendada para conservación de cepas (79). En un estudio realizado en el año 2007, se reportó que de las cepas 58.2001, 59.2001, 60.2001 y 112.2002, esta última fue la que presentó un mejor crecimiento micelial (87.8 mm diámetro) (52), contrario a lo observado en este estudio. Por tal razón, se recomienda efectuar un control de viabilidad de las cepas nativas almacenadas, para determinar el tiempo en que una cepa continúa con vida y sin alterar sus características biológicas y morfológicas.

Se cuenta con antecedentes de investigaciones donde refieren, que las cepas de los basidiomicetos pueden ser conservadas por diversos procedimientos como: Cultivo periódico en tubo con agar, bajo aceite mineral, cepas liofilizadas, congelación en nitrógeno líquido, conservación de esporas en suelo, arena o silica gel y en agua destilada. Por otra parte, se ha reportado que la supervivencia de algunos hongos conservados en agua destilada por más de dos años fue de 91-98%. Similar porcentaje (87%) de supervivencia se ha informado al conservar liofilizados algunos cultivos fúngicos, mientras que existe el reporte de un 90% de supervivencia cuando se preservaron basidiomicetos en nitrógeno líquido. De ahí que se ha reportado, que el 97.7% de los basidiomicetos, lograron sobrevivir cuando se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El evitar el pleomorfismo y la contaminación con ácaros está entre las bondades que se atribuyen a algunas metodologías de conservación ya mencionadas (79).

Además, se publicó un estudio comparativo entre la metodología tradicional en tubo de agar con aceite mineral a  $4^{\circ}\text{C}$  y la crioconservación con nitrógeno líquido, donde se concluyó que el porcentaje de supervivencia de las cepas, para la metodología tradicional es de 63% luego de 2 años, versus un 97% para la crioconservación, al cabo del mismo periodo de tiempo (80).

En relación con lo anterior, se ha reportado que el micelio de *A. cylindracea*, *F. velutipes* y *P. ostreatus*, criopreservado utilizando nitrógeno líquido (proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento en cepario), era viable luego de su almacenaje por un mes (81). Para cada especie, la morfología y la tasa de crecimiento micelial fueron observadas y calculadas, utilizando el medio EMA (73) a  $25^{\circ}\text{C}$  antes y después de este procedimiento y no se encontró algún cambio significativo en la morfología y el crecimiento micelial, con excepción de *A. cylindracea*, que redujo significativamente su crecimiento micelial (81). Estos resultados muestran que el micelio de *A. cylindracea* puede afectarse luego de períodos prolongados de almacenamiento a bajas temperaturas.

La elección de los métodos para conservación de cepas, deben tener en cuenta varios factores, según sea el objetivo de la colección, en este caso la capacidad de conservar las características micro y macroscópicas del hongo, así mismo las características genéticas y celulares propias de cada género y especie. Por tal motivo el método recomendado para la

preservación de cepas es la congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en crioviales sin solución crioprotectora, con miniblocks de agar conteniendo la cepa fúngica de interés.

Por otra parte, se ha indicado también que la morfología de las colonias varía no sólo entre medios de cultivo y/o pH evaluados, sino también con las diferentes especies de hongos (82). Esto fue comprobado en el presente estudio, ya que las distintas cepas de *A. cylindracea* variaron en morfología. En general los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura respecto a que, las colonias presentan un crecimiento longitudinal y linear, de aspecto algodonoso, de color blanquecino al principio de su desarrollo y posteriormente desarrollan manchas de color café y/o marrón oscuro en agar extracto de malta. Poseen un olor dulce o afrutado, farináceo a veces no muy agradable, la única diferencia en las características morfológicas de las colonias respecto a la literatura, es que las cepas evaluadas producen abundante micelio aéreo y no escaso, como a sido reportado (42, 54).

Estudios que han evaluado cultivos miceliales han señalado que el crecimiento micelial de *Leucopaxillus giganteus*, *Lactarius deliciosus* y *Suillus luteus*, no se ve influenciado por el pH y no afecta las características morfológicas del micelio (82). Esto último pudo ser observado en este trabajo, con los resultados obtenidos en la microscopía para las cepas de *A. cylindracea* evaluadas.

Un lento y denso crecimiento micelial puede ser atribuido a condiciones favorables y explotación de los recursos nutritivos del medio de cultivo por el hongo. Una óptima temperatura de incubación para el crecimiento micelial, una alta tasa de colonización del micelio, no sólo permite establecer el modelo competitivo menos probable para su uso, sino también puede contribuir a un mejor cultivo del hongo con mayores porcentajes de eficiencia biológica (83).

En relación con las características microscópicas de las cepas, debe ser evaluada la presencia de fíbulas; por ser este un indicativo de la capacidad que poseen las mismas de llegar a formar los basidiomas, cuando se estudien con fines de producción (84). Se ha concluido que la presencia de fíbulas en las distintas cepas ya sea en escasa, regular o abundante cantidad en todos los medios y pH, indica un estado dicariótico del micelio y garantiza el mantenimiento del mismo en las puntas de las hifas, como un paso previo a la fructificación en todos los basidiomicetes (2).

El desarrollo de clamidosporas en las cepas evaluadas de *A. cylindracea*, fue proporcional al tiempo de incubación, de manera que períodos de incubación prolongados generan una mayor cantidad, lo cual puede indicar que las condiciones son desfavorables para el desarrollo del micelio (84), ya que estas estructuras de resistencia se forman cuando las condiciones ambientales son adversas (2).

La presencia de exudado puede significar la producción de metabolitos secundarios (54). Asimismo, el olor que se reporta para las colonias de *A. cylindracea* es afrutado, el cual fue percibido en todas las cepas, medios y pH evaluados.

Con respecto a presencia de pigmentos, en esta investigación pudo observarse que las cepas de *A. cylindracea* evaluadas mostraron pigmentación tanto en el micelio, como en el medio de cultivo luego de un período prolongado de incubación (>20 días aproximadamente). La presencia de coloración en el reverso del medio en cajas de petri con colonias de otras especies de hongos como *Lentinula edodes* y especies de *Pleurotus* pueden indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios, no necesarios para el crecimiento micelial y producción de basidiomas, o alguna anomalía en el crecimiento (54), por este motivo puede ser una característica no deseable en los cultivos de *Agrocybe cylindracea*.

Sin embargo, los metabolitos secundarios de los hongos durante mucho tiempo han sido de gran interés en las áreas de alimentos y productos biofarmacéuticos. Estudios recientes sobre la producción de exopolisacáridos de los hongos han demostrado muchas actividades biológicas interesantes. Hay varios agentes antitumorales producidos a partir de diferentes extractos de hongos como Lentinan de *Lentinus edodes*, Schizophyllan de *Schizophyllum commune*, y Krestin de *Coriolus versicolor* que están actualmente disponibles en el mercado internacional (85), pero no en Guatemala.

Muchos investigadores han hecho mejores esfuerzos por cultivar estos hongos en medios artificiales como los cultivos sumergidos, que poseen como ventajas potenciales, una mayor producción micelial en un espacio compacto y tiempos más cortos con menores posibilidades de contaminación (85).

Se ha señalado que *A. cylindracea* sirve como una buena fuente para la producción de

exobiopolimeros en el medio MCM (medio completo para hongos), pero se ve afectada la síntesis en tiempos muy prolongados de incubación y fermentación (85). En relación al pH medido durante el proceso de incubación en los medios evaluados, se reportó que las cepas de *A. cylindracea* presentaron un incremento en el pH del día 5 (pH 5.74) al día 15 de incubación (pH final de 6.67). Como puede observarse *A. cylindracea* presenta una mayor producción de exobiopolimeros a un pH cercano a 6, lo que correlaciona con los resultados alcanzados por las cepas de la presente investigación, pues *A. cylindracea* presentó un óptimo crecimiento micelial a un pH inicial de 6, infiriendo que a este mismo pH inicial las cepas evaluadas producirían una mayor cantidad de exo-biopolimeros en relación al pH 5 y 5.5. Todas las cepas mostraron la presencia de exudado en los diferentes medios evaluados y pH, a excepción de la cepa 638.08 en el medio CMYA, porque no se observó la presencia de exudado en los diferentes pH, lo cual no significa que no haya producción de exo-biopolimeros en este medio, únicamente se pudo determinar la presencia o ausencia de exo-biopolimeros de forma cualitativa en base a la producción de exudado por el micelio (85). Sin embargo es necesario estudiar la cantidad y composición bioquímica del exudado producido por el micelio sobre los diferentes medios de cultivo y pH, debido a que todas las cepas evaluadas presentaron su mayor crecimiento micelial en EMA o PDA a pH 6.

En general, los hongos crecen bien en condiciones ácidas, pero en algunas especies se ve favorecido su crecimiento a pH neutro o en condiciones ligeramente alcalinas (86), por lo que el efecto del pH sobre el crecimiento fúngico es bastante complejo, ya que inicialmente el pH afecta el crecimiento y subsecuentemente el crecimiento afectará el pH a través de la acumulación de metabolitos en el medio (37). Por tal motivo es importante establecer y registrar el pH óptimo de crecimiento micelial de *Agrocybe cylindracea*.

En este estudio *A. cylindracea* presentó un mayor diámetro de crecimiento micelial, cuando se utilizó un pH inicial en el medio de cultivo igual a 6, comparado con los diámetros obtenidos a pH 5 y 5.5.

Los mayores crecimientos miceliales de las cepas de *A. cylindracea*, aunando los valores obtenidos en los diferentes medios de cultivo y pH, indican que la cepa 638.08 y 58.01 fueron las que desarrollaron el mayor diámetro de crecimiento micelial; seguidos por las cepas 59.01, 60.01 y por último, la cepa 112.02, que fue la que obtuvo el menor crecimiento respecto a las todas las

anteriores.

Debido, a que el crecimiento micelial no esta siempre relacionado con la productividad (87), es necesario realizar un estudio de todas las cepas del hongo de interés, para evaluar las que presentan mayores rendimientos de crecimiento micelial, mejor producción de inóculo y mayor producción de cuerpos fructíferos sobre diferentes medios de cultivo y sustratos, con fines alimenticios y medicinales.

Entre las consideraciones importantes que debe tomarse en cuenta para evaluar posteriormente la producción de cuerpos fructíferos de *A. cylindracea*, es la de mantener una rápida velocidad de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo, lo que indudablemente favorece la reducción de los ciclos de cultivo del hongo (87). La cepa utilizada en el cultivo de hongos comestibles es crucial para el éxito en la producción y comercialización, pues una cepa con una alta capacidad de invadir el sustrato y con una mayor velocidad de crecimiento micelial disminuye el tiempo de incubación.

El cultivo de *A. cylindracea* ha cobrado importancia debido a las diferentes propiedades tanto alimenticias como medicinales. Por tal motivo, en la actualidad el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) ubicado en Bethesda, Maryland (Estados Unidos), ha codificado los genes de las principales especies de hongos (hongos comestibles y medicinales) incluyendo el género *Agrocybe* (44), el cual contiene 25 genes codificados (88), que pueden ser empleados en estudios moleculares y de biotecnología para la optimización del crecimiento micelial y desarrollo de cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea*.



## X. CONCLUSIONES

- A. El medio de cultivo en el cual la mayoría cepas de *Agrocybe cylindracea* obtuvo el mejor crecimiento miceliar fue EMA ajustado a pH 6.
- B. Las interacciones entre cepa, medio y pH con mayor crecimiento se obtuvo con las cepas 638.08 y 58.01 en los medios PDA y EMA a pH 6. Adicionalmente, la cepa 638.08 en el medio EMA puede tener buen rendimiento a pH 5 y 5.5. Al evaluar las combinaciones se mostró que no existieron diferencias significativas, entre las combinaciones compuestas por la cepa 58.01 en el medio PDA a pH 6; la cepa 58.01 en EMA a pH 6 y la cepa 638.08 en PDA a pH 6, en EMA a pH 5, 5.5 y 6 ( $p > 0.05$ ).
- C. La mayoría de cepas en todos los medio de cultivo y pH presentaron colonias con anverso de color blanco, textura algodonosa, presencia de exudado (translúcido, amarillo o ámbar), y abundante micelio aéreo, con excepción de la cepa 638.08 en el medio CMYA a los diferentes pH.
- D. Las cepas evaluadas presentaron hifas de 2.0 a 4.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (excepto las cepas 59.01 y 638.08 en el medio PDA a los distintos pH), fíbulas en regular cantidad (con excepción de las cepas 60.01 y 112.02, donde fueron escasas) y formación de clamidosporas.

## XI. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar las cinco cepas de *A. cylindracea*, en los medios EMA y PDA a pH mayor que 6.
- B. Evaluar las cinco cepas de *A. cylindracea*, en cuanto a la producción de inóculo y cuerpos fructíferos, para documentar su productividad.
- C. Realizar controles de calidad continuos de las cepas almacenadas en refrigeración a 4°C, para determinar el tiempo en que una cepa sigue siendo viable, sin alterar sus características biológicas y morfológicas.
- D. Se recomienda utilizar un congelador a -70°C y criotubos sin crioprotectores para preservar en miniblock's de agar, el micelio de los hongos que forman parte de la micoteca.
- E. No utilizar un pH menor o igual a 5 en los medios CMYA, PDA y EMA para el cultivo de cepas de *A. cylindracea*.
- F. Finalmente no se recomienda utilizar la cepa 112.02, por su mal crecimiento micelial en comparación con todas las combinaciones de cepa-medio-pH producidas, a los 14 días de incubación a 26°C.
- G. Investigar aplicaciones medicinales de las cepas de *A. cylindracea* nativas.
- H. Estudiar la cantidad y composición química del exudado producido por el micelio de *Agrocybe* en los diferentes medios de cultivo y pH.
- I. Investigar para fines de bioprospección la composición química de los metabolitos secundarios.

## XII. REFERENCIAS

1. Mueller G. *et al.* Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. USA: Elsevier Academic Press, 2004. 777p. p.1.
2. Chang S., Miles P. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2a. ed. USA: CRP. Press 2004. 451p. p.2, 6, 193.
3. Mata M. *et al.* Macrohongos de Costa Rica. Vol.1,2. Vol.2. Costa Rica: Editorial INBio. 2003. 240p. p.11-13.
4. Huerta G. Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* En Sánchez, J., Royse D. eds. México: Editorial Limusa, 2002. 294p. p.29-47.
5. Royse, D., Sanchez, J. La importancia del cultivo de *Pleurotus spp.* Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Sánchez, J., Royse D. eds. México: Editorial Limusa, 2002. 294p. p19.
6. Quimio T., Chang S. Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. Italia: FAO 1990. 102p. p.26.
7. Sommerkamp, I. Estudio de los macromicetos del Biotopo Universitario “Licenciado Mario Dary Rivera” para la conservación del quetzal. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1984. 92p.
8. De León, R. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Micol Apl Int* 2003; 15(1): 31-35
9. De León, R. *et al.* Coffee by products and citronella bagasse as substrates for *Pleurotus* production. *Mushrroom Newsletter for the Tropics* 1983; 4(1):13-16.
10. De León, R. *et al.* Planta productora de hongos comestibles de *Pleurotus ostreatus* en Guatemala. *Rev Mex Mic* 1988; 4:297-301.
11. De León, R. Adaptación de una cepa silvestre Guatemalteca de *Volvariella bakeri* (Murr.) Shaffer, a cultivo de laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1985. 36p.
12. Ovalle, J. Evaluación de cuatro sustratos de cobertura en el cultivo de champiñones (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing. var. *Avellaneus*). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1982. 46p.
13. Franco, L. Valor nutritivo de la paja de trigo tratada con el hongo Basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* como fuente de alimento para ovinos. Universidad de San Carlos de

- Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia) 1986. 50p.
14. Castillo, F. Composición y valor nutritivo de la proteína de *Pleurotus* spp cultivado sobre pulpa de café. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989. 49p.
  15. Pérez, R. Caracterización química del valor nutritivo de los anacates (*Cantharellus cibarius Fr.*). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 58p.
  16. Mairena, E. Estudio del efecto, en el rendimiento, de cuatro diferentes substratos sobre tres cepas comerciales de hongos comestibles “Shitake” (*Lentinula edodes* (berck) Plegier) bajo condiciones ambientales naturales en el municipio de Tecpán, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1994. 70p.
  17. Arriola, H. Utilización de bolsas de polipapel y celofán para el empaque de los inoculos primarios y secundarios de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) inoculada sobre sorgo (*Sorghum bicolor*). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996. 34p.
  18. Godoy, C. Cultivo de una cepa de *Pleurotus ostreatus* utilizando como sustrato aserrín de caoba y cedro, fibra de coco y olote de maíz. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 59p.
  19. García, E. Cultivo *in vitro* de cepas silvestres guatemaltecas de *Auricularia* sp. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1999. 44p.
  20. Orozco, C. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando como sustratos rastrojo, zacate y tusa. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000. 64p.
  21. García, D. Utilización de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.) y cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2000. 47p.
  22. Giron, D. Cultivo de hongos *Pleurotus ostreatus* en subproductos lignocelulosicos derivados de la agroindustria de la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2000. 53p.

23. Aldana, A. Comparación de la eficiencia de producción de inóculo primaria del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa ECS 0110, en cinco granos. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2000. 55p.
24. Lazo, G. Determinación de la eficiencia del rastrojo de tomate (*Lycopersicon sculentum* Miller) y la corona del fruto de piño (*Ananas comosus* (L.) Merrill) y sus mezclas en el cultivo de la cepa ESC 0110 de *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2001. 51p.
25. Barrios, R. Comparación del rendimiento de dos cepas de *Lentinula edodes* (Shiitake) utilizando cinco sustratos diferentes bajo condiciones controladas. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2002. 54p.
26. Rojas, E. Evaluación de paja de trigo, *Triticum sativum*; broza de encino, *Quercus* sp. y rastrojo de maíz, *Zea mays*; Para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones artesanales en San Rafael La Independencia, Huehuetenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2004. 82p.
27. Gómez, H. Adaptabilidad de tres cepas de hongos comestibles del género *Pleurotus*, en tres diferentes sustratos de fructificación, bajo condiciones de invernadero. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Centro Universitario de San Marcos) 2004. 55p.
28. Tuchan, O. Evaluación del efecto de la pulpa de café (*Coffea arábica*) en el incremento de la eficiencia biológica de la cepa INIREB-8 de *Pleurotus ostreatus* utilizando cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) y bambú (*Bambusa vulgaris* var. *Striata*) como sustratos. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2004. 46p.
29. Ardón, C. Evaluación de pericarpio de Jacaranda (*Jacaranda mimosaeifolia*) y pasto Estrella Africana (*Cynodon plectostachyus*), para el cultivo artesanal del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*, ECOSUR-0112). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad Agronomía) 2004. 43p.
30. Bran, M. *et al.* Producción de inóculo de cepas nativas para estimular el cultivo de hongos comestibles en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización. Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2005. 28p.
31. Bran, M. *et al.* Mejoramiento genético y producción de inóculo de cepas nativas de

- Pleurotus* spp. Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2006. 47p.
32. Mahler, J. Descripción de las características del cultivo *in vitro* y producción de inóculo de cuatro cepas nativas de *Neolentinus* spp. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 41p.
  33. Perez, B. Descripción de las características macroscópicas, de cultivos *in vitro* de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 63p.
  34. Ceballos, D. Evaluación de rastrojo de maíz (*Zea mays*) L. y hojarasca de roble (*Quercus peduncularis*) previo al cultivo artesanal del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus* Ecs 110). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad Agronomía) 2007. 42p.
  35. Cojtí, B. Cultivo de una cepa nativa de *Pleurocybella porrigens* (Pers. ex Fr.) Singer para la producción de cuerpos fructíferos *in vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2008. 40p.
  36. Mérida, E. Evaluación de la eficiencia biológica de dos variedades del hongo comestible (*Pleurotus djamor* var. *djamor* y var. *roseus*) utilizando como sustrato paja de avena, rastrojo de maíz y olote, en la aldea Los Regadillos, Chiantla, Huehuetenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Centro Universitario del Nor-Occidente) 2008. 73p.
  37. Cantrell, H. *et al.* Effects of temperature and pH on growth and composition of *Pythium irregulare* and *P. vexans*. Mycol 1971; 63:31-37.
  38. Gaitán, R., Báez, I. Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. Rev Mex Mic 2008; 26:41-49.
  39. Mendoza, C. *et al.* Manejo integrado de la pudrición blanca del manzano (*Trametes versicolor*). Rev Mex Mic 2001-2003; 17: 21-31.
  40. Mendoza C. *et al.* Comportamiento y control *in vitro* de *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát. Rev Mex Mic 1999; 15:41-48.
  41. Sánchez, J. *et al.* Efecto del pH, temperatura, humedad y tipo de sustrato sobre el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum*. Rev Mex Mic 2000; 16:37-40.
  42. Uhart, M., Albertó, E. Morphologic characterization of *Agrocybe cylindracea* (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europa and Asia. Rev Mex Mic 2007; 24:9-18.

43. Watling, R. Observations on the *Bolbitiaceae*. Some Brazilian taxa. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 1992; 28 (1-4);77-103.
44. Hawksworth, D. *et al.* Ainsworth & Bisby's, Dictionary of the Fungi. 8<sup>th</sup> ed. United Kingdom: CAB International, 1995. 616p. p.9.
45. Rodríguez, G. *et al.* Los hongos (Macromicetos) de las reservas de la biosfera de la Michilia y Mapimi, Durago. Bol Soc Mex Mic 1984; 19:159-168.
46. Morales, O. Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 92p
47. Bran, M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV). Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2004. 60p.
48. Bran, M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase I). Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2001. 90p.
49. Bran, M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase II). Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2002. 50p.
50. Hostnig, R. *et al.* Etnobotánica Mam. Guatemala: GTZ-Helvetas. 1998. 366p. p.305, 307.
51. Bran, M. *et al.* Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Rev Cient Guatemala. 2003; 1(1):3-24.
52. Andrade, C. Descripción de las características macroscópicas, de cultivo *in Vitro* y producción en paja y granos de trigo de cepas nativas de *Agrocybe aegerita* (Brigant) Singer. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 71p.
53. Bran, M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III). Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2003. 58p.
54. Stamets, P. Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms. WA, USA: Ten Speed Press & Mycomedia. Olympia 1993. 554p. p.30, 113, 126, 220.
55. MushWorld. Manual del cultivador de hongos 1: Cultivo del hongo Ostra. Seoul, Korea:

- Publicado por MushWorld – Heineart Inc. 2004. 298p. p.31, 36.
56. Sattayaphist, W. *et al.* Stability of some commercial mushrooms in Thailand after continuous subculture of mycelia for production. Oslo, Noruega: IMC7 Book of Abstracts 2002. 387p. p.355.
  57. Lau, D. Factores que afectan el crecimiento micelial y la degradación del sustrato por *Agrocybe aegerita*. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 56p.
  58. Vallejo, R. Análisis Químico de la paja de cebada sin y con suplemento para el cultivo de *Agrocybe aegerita*. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2002. 48p.
  59. Patrick, H. *et al.* Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Peptides 2005; 26(2):191-196.
  60. Yang, N. *et al.* Structural basis for the tumor cell apoptosis-inducing activity of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. J Biochem 2005; 138(2):145-150.
  61. Diyabalanage, T. *et al.* Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. Food Chem 2008; 108(1):97-102.
  62. Yoshida, I. *et al.* Polysaccharides in fungi. XXXV. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1-3)- $\alpha$ -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. Biol Pharm Bull 1996; 19:114-121.
  63. Taira, K. *et al.* Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Mut Res 2005; 586(2):115-123.
  64. Tsai, S. *et al.* Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. Food Sci Tech 2007; 40(8):1392-1402.
  65. Huang, S. *et al.* Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. Food Sci Tech 2006; 39(4):379-387.
  66. Christoph, R. *et al.* Pyridine as novel substrate for regioselective oxygenation with aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. Fed Euro Biochem Soc 2008; 582(29):4100-4106.
  67. Chupungars, K. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp CU-43 and its fluorene transformation. Int Bio Bio 2009; 63(1):93-99.
  68. Fernandez, M. Labarere, J. Cloning and sequencing of the Aa-Pril gene specifically

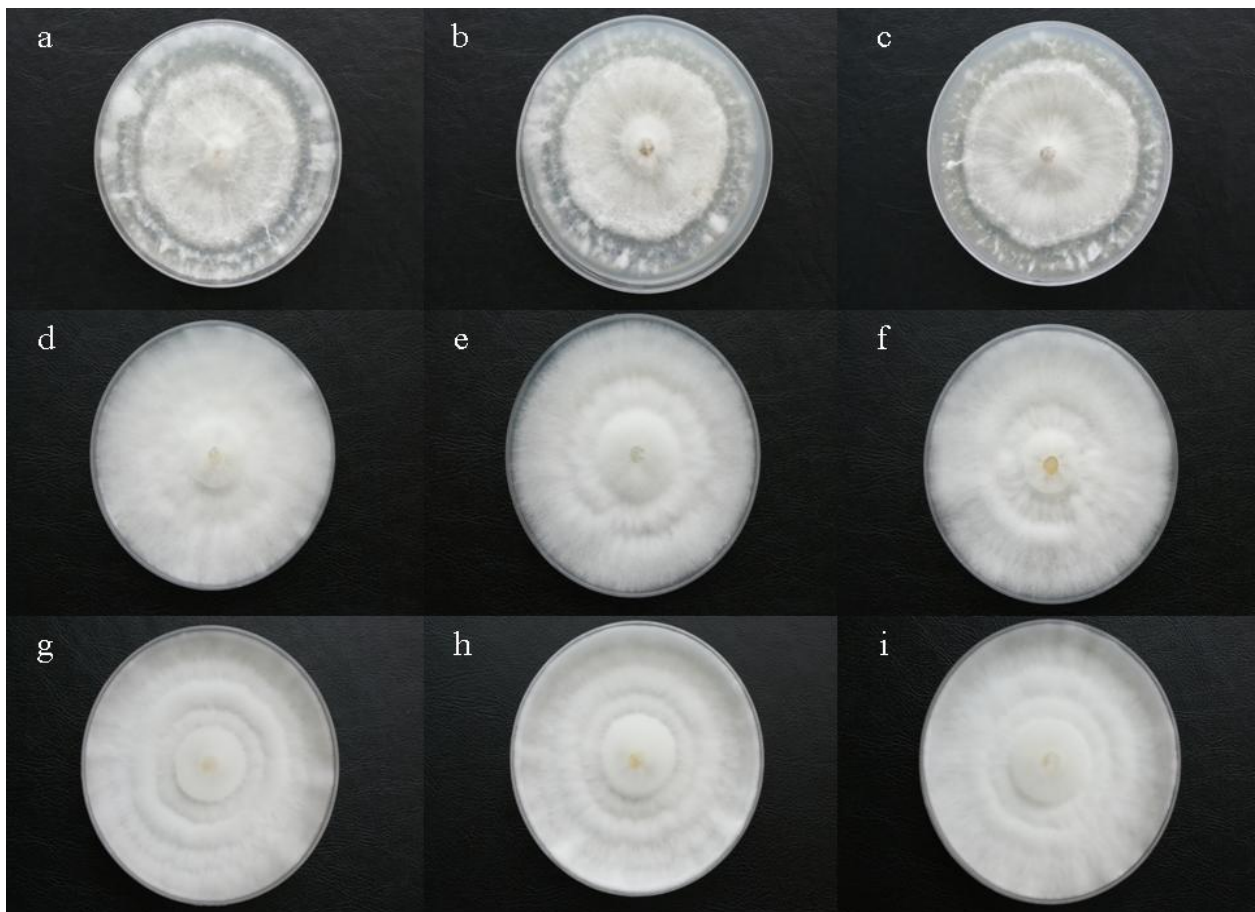


- expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino-acid sequence. *Curr Genet* 2002; 32(6):420-424.
69. Sirand-Pugnet, P. *et al.* Molecular characterization of the Pri3 gene encoding a cysteine rich protein, specifically expressed during fruiting initiation within the *Agrocybe aegerita* comple. *Curr Genet* 2002; 41:31-42.
  70. Barroso, G., Labarere, J. Genetic evidence for nonrandom sorting of mitochondria in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(12):4686-4691.
  71. Sobal, M. *et al.* Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of México. *Micol Apl Int* 2007; 19(1):15-23.
  72. Mier T., Toriello C., Ulloa, M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1ª. Ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002. 34p.
  73. Nobles, M. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. *Can J Bot* 1965; 43:1097-1139.
  74. Dudchenko, L. *et al.* Effect of pH of the medium on the production of extracellular enzymes by wood-destroying Basidiomycetes. *Rev Plant Pathol* 1989; 22(2):135-141.
  75. Mo, M. *et al.* Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. *Mycopath* 2005; 159:381-387.
  76. Yamanaka, T. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycol* 2003; 95(4):584-589.
  77. Dix, N. *et al.* Fungal ecology. London. Chapman & Hall 1995. 549p. p.186-188.
  78. Zadražil, F. The conversion of straw into feed by Basidiomycetes. *European J Appl Microbiol* 1977; 4:273-281
  79. Bueno, L. y Gallardo, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:166-168.
  80. Homolka, L. *et al.* Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: Comparison of two different freezing protocols. *Folia Microbiol.* 2003; 48(2):219-226.
  81. Maekawa, N. *et al.* Effects of liquid-nitrogen cryopreservation on stock cultures of three cultivated basidiomycetous fungi. *Rept Tottori Mycol Inst* 1990; 28:227-232.
  82. Barros, L. *et al.* Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotec* 2006; 18:165-170.
  83. Zervakis, G. *et al.* Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiol*

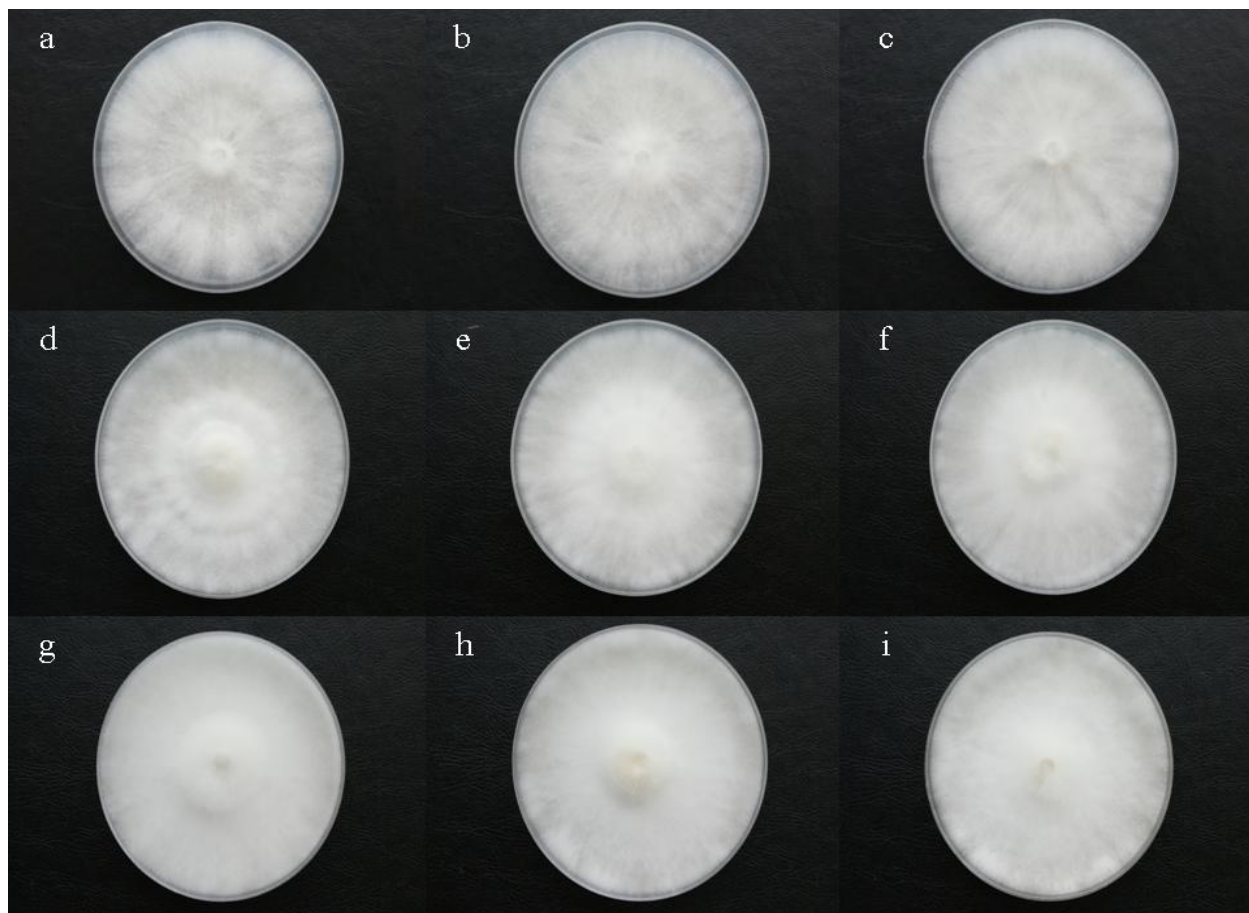
- 2001; 46(3): 231-234.
84. Huitz, P. Crecimiento micelial y caracterización macro y microscópica de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2009. 58p.
  85. Kim, S. *et al.* Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett Appl Microbiol* 2002; 34:56-61.
  86. Fries, L. Studies in the physiology of *Coprinus*. II. Influence of pH, metal factors and temperature. *Sven Bot Tidskr* 1956; 50:47-96.
  87. Salmenes, D. *et al.* Estudios sobre el género *Pleurotus*. VII. Interacción entre el crecimiento micelial y la productividad. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:173-176.
  88. Fan, L. *et al.* Advances in mushroom research, *Food Technol Biotechnol* 2006; 44(3):303–311.
  89. Bran, M. *et al.* Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx'yol B'aqman (*Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos. Informe Técnico Final. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2010. 46p. p.41.

### XIII. ANEXO

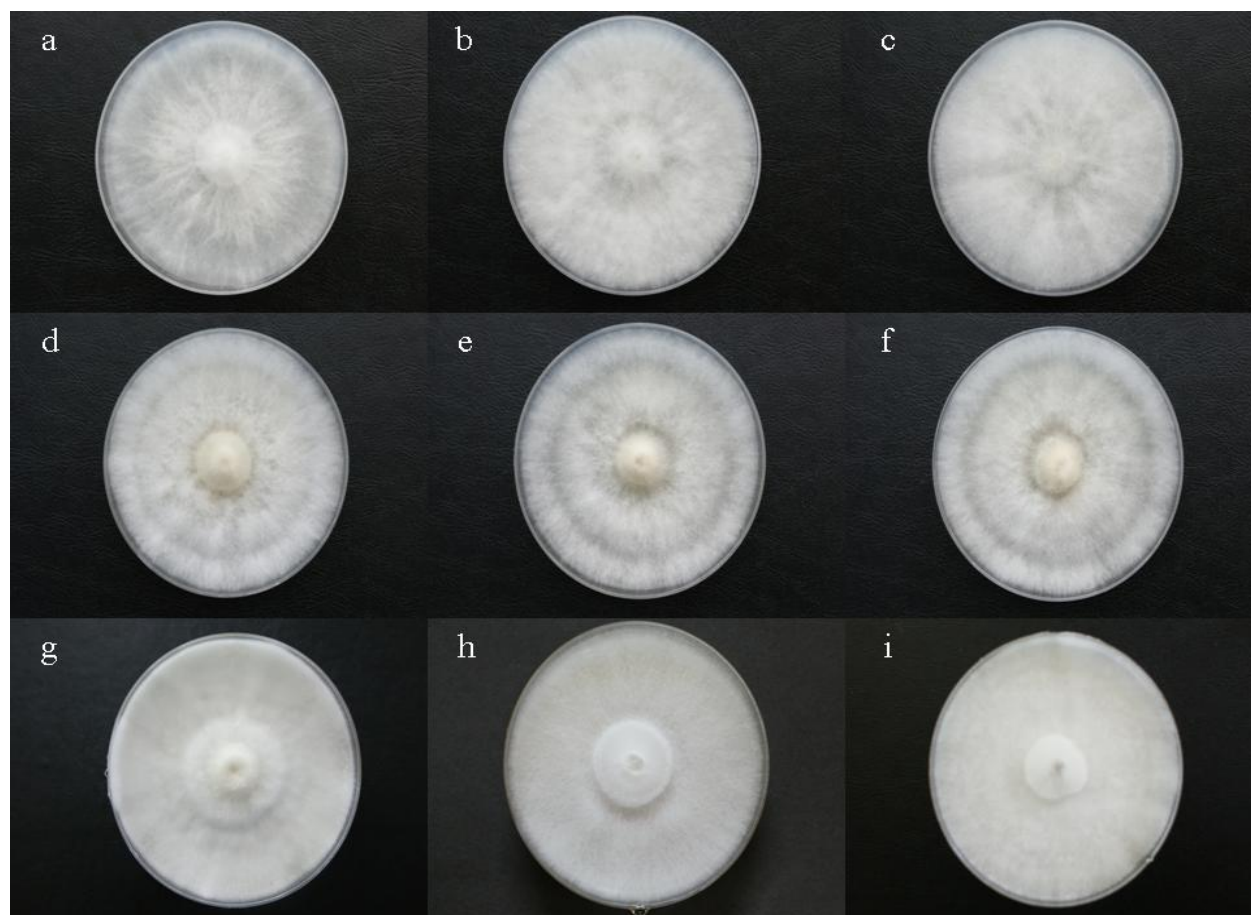
**Anexo 1. Características macroscópicas de las colonias de la cepa 58.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH.** a-c. Colonia de la cepa 58.01 en CMYA, color del anverso blanco con textura algodonosa-zonada, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido. a. pH 5. b. pH 5.5. c. pH 6. d-f. Colonias de la cepa 58.01 en PDA, color del anverso blanco con textura algodonosa-zonada (con excepción del pH 5), abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/amarillento. d. pH 5. e. pH 5.5. f. pH 6. g-i. Colonias de la cepa 58.01 en EMA, color del anverso blanco con textura algodonosa-zonada, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/ámbar. g. pH 5. h. pH 5.5. i. pH 6.



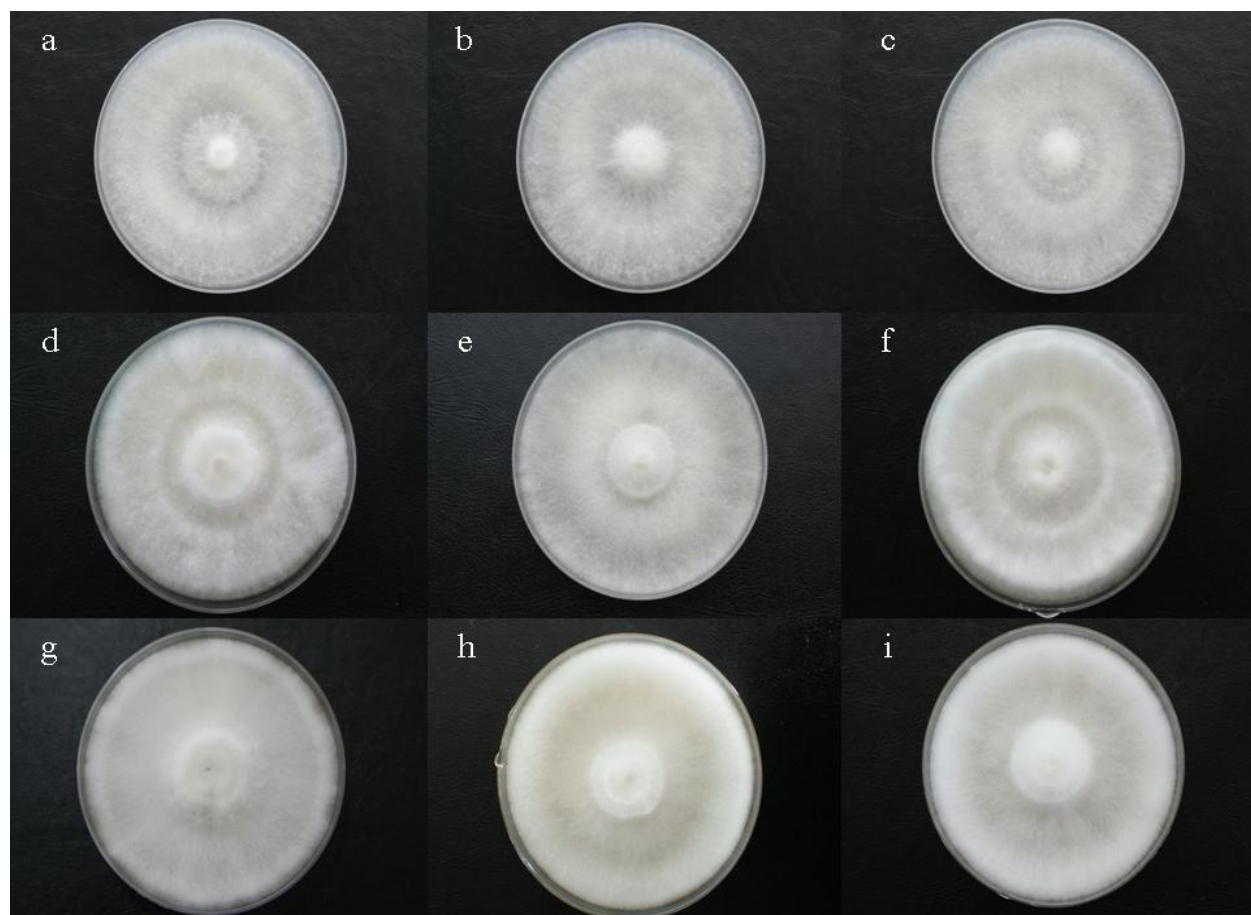
**Anexo 2. Características macroscópicas de las colonias de la cepa 59.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH. a-c. Colonia de la cepa 59.01 en CMYA, color del anverso blanco con textura algodonosa-zonada, con excepción del pH 6 que presenta únicamente textura algodonosa, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido.. a. pH 5. b. pH 5.5. c. pH 6. d-f. Colonias de la cepa 59.01 en PDA, textura algodonosa-zonada a pH 5 y algodonosa para el resto, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/amarillento. d. pH 5. e. pH 5.5. f. pH 6. g-i. Colonias de la cepa 59.01 en EMA, textura algodonosa, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/ámbar. g. pH 5. h. pH 5.5. i. pH 6.**



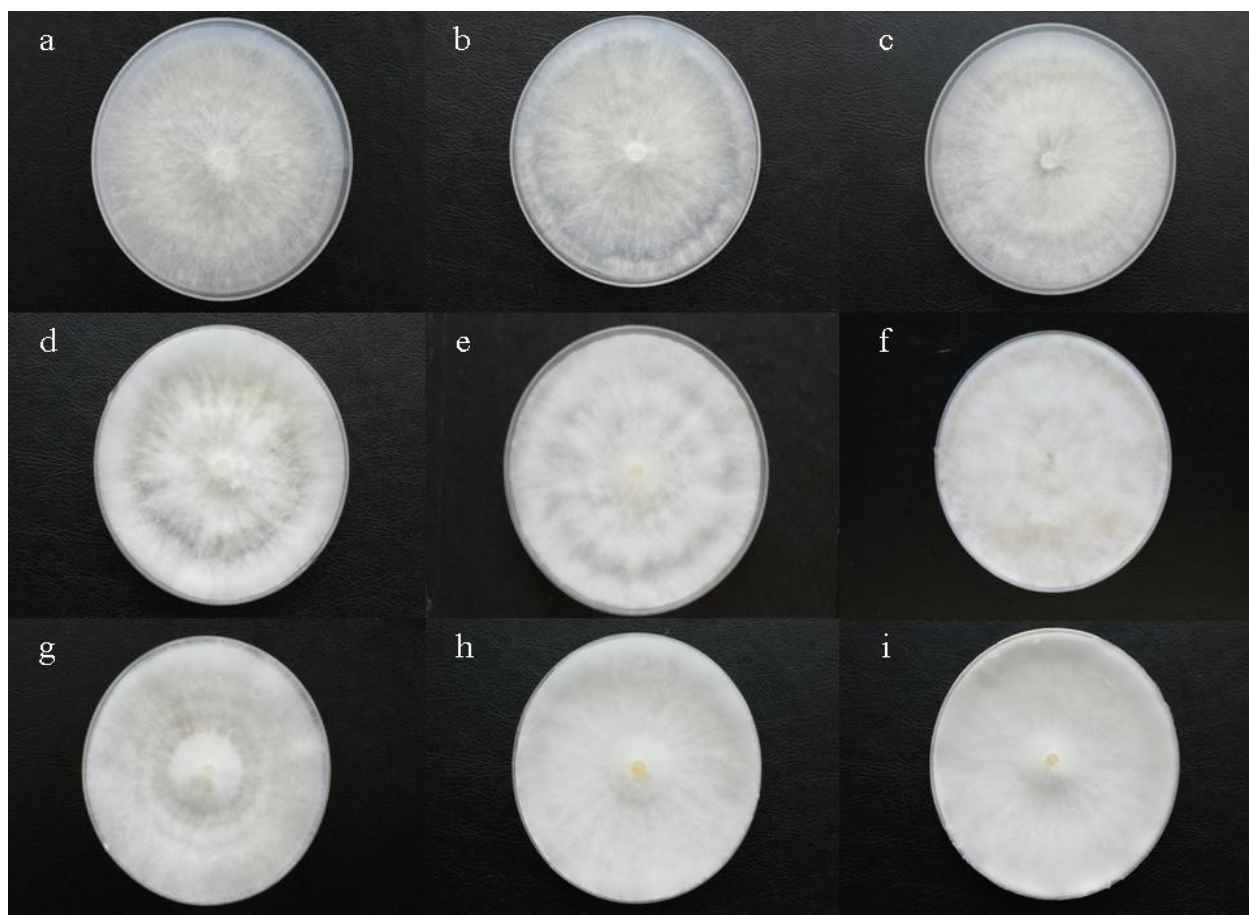
**Anexo 3. Características macroscópicas de las colonias de la cepa 60.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH.** a-c. Colonia de la cepa 60.01 en CMYA, textura algodonosa-zonada a pH 5 y algodonosa para el resto, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido. a. pH 5. b. pH 5.5. c. pH 6. d-f. Colonias de la cepa 60.01 en PDA, textura algodonosa-zonada, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/amarillento. d. pH 5. e. pH 5.5. f. pH 6. g-i. Colonias de la cepa 60.01 en EMA, textura algodonosa-zonada a pH 5 y algodonosa para el resto, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/ámbar. g. pH 5. h. pH 5.5. i. pH 6.



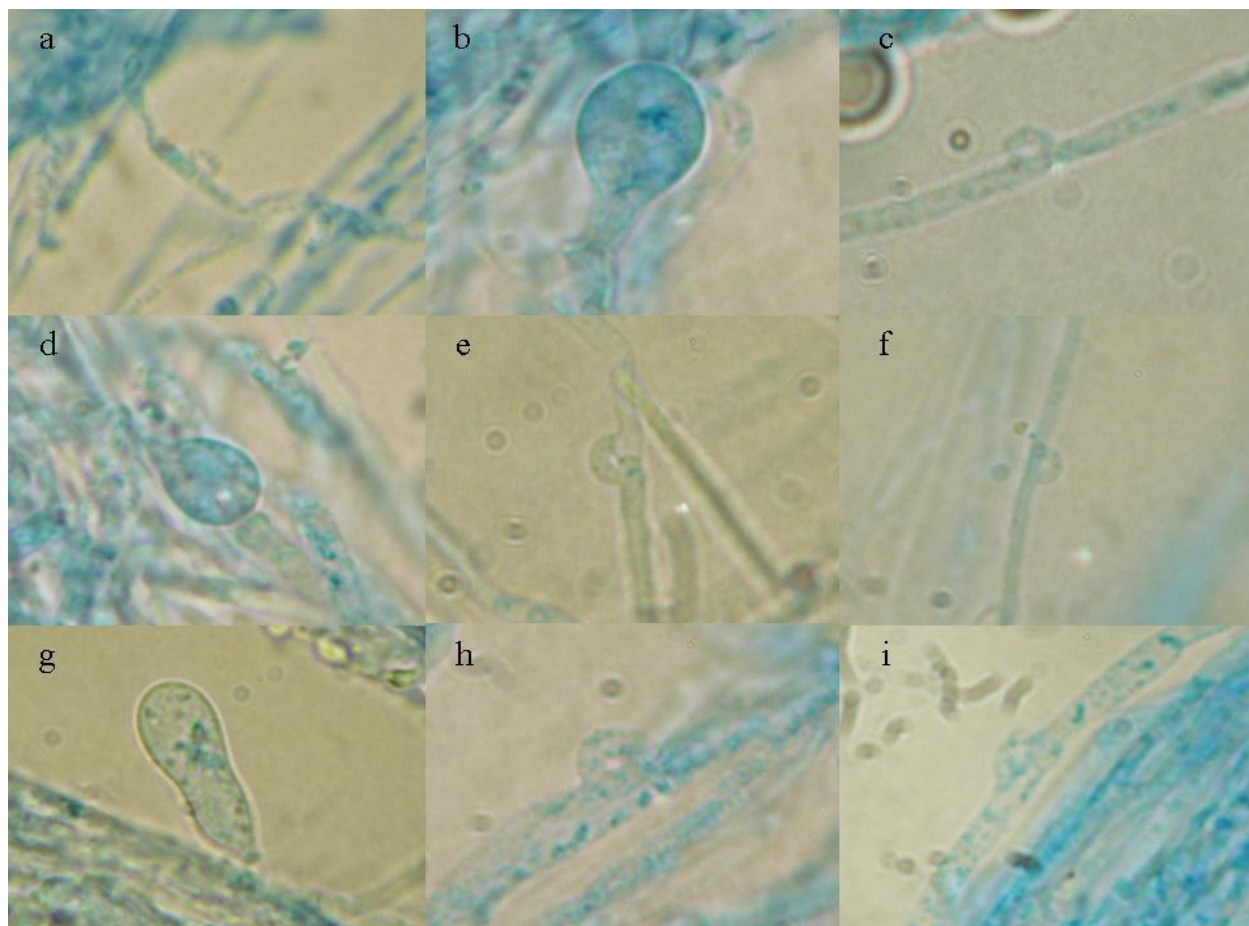
**Anexo 4. Características macroscópicas de las colonias de la cepa 112.02 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH.** a-c. Colonia de la cepa 112.02 en CMYA, textura algodonosa-zonada, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido. a. pH 5. b. pH 5.5. c. pH 6. d-f. Colonias de la cepa 112.02 en PDA, textura algodonosa-zonada a pH 5, pH 6 y algodonosa a pH 5.5, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/amarillento. d. pH 5. e. pH 5.5. f. pH 6. g-i. Colonias de la cepa 112.02 en EMA, textura algodonosa, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/ámbar. g. pH 5. h. pH 5.5. i. pH 6.



**Anexo 5. Características macroscópicas de las colonias de la cepa 638.08 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH.** a-c. Colonia de la cepa 638.08 en CMYA, textura algodonosa a pH 5, algodonosa-zonada a pH 5.5 y pH 6, escaso micelio aéreo y exudado ausente. a. pH 5. b. pH 5.5. c. pH 6. d-f. Colonias de la cepa 638.08 en PDA, textura algodonosa-zonada a pH 5, pH 5.5 y algodonosa a pH 6, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/amarillento. d. pH 5. e. pH 5.5. f. pH 6. g-i. Colonias de la cepa 638.08 en EMA, textura algodonosa-zonada a pH 5 y algodonosa para el resto, abundante micelio aéreo y exudado traslúcido/ámbar. g. pH 5. h. pH 5.5. i. pH 6.

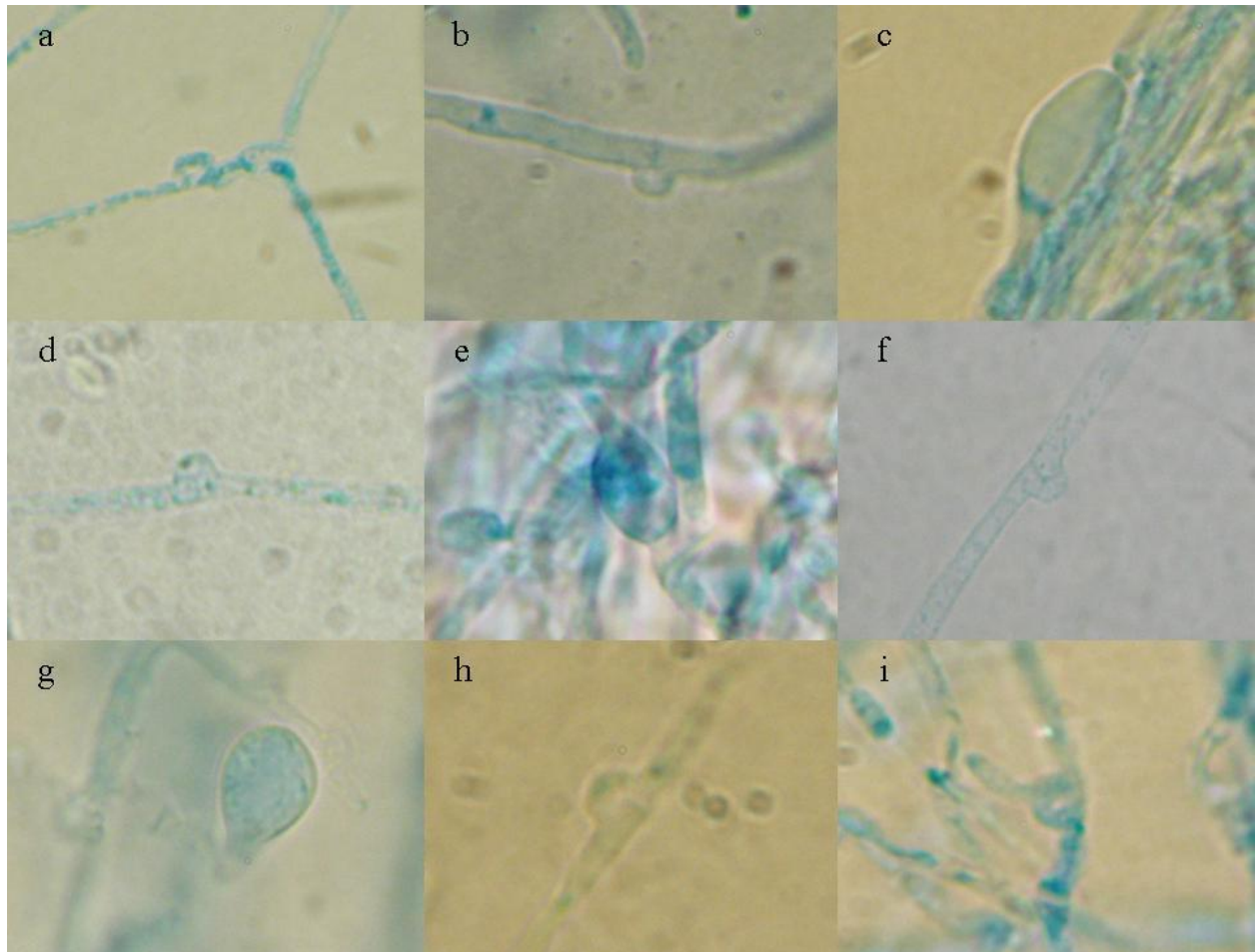


**Anexo 6. Características microscópicas de las colonias de la cepa 58.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH (tinción azul de lactofenol).** a-c. Colonia de la cepa 58.01 en CMYA. a. pH 5, Fíbula (x1000). b. pH 5.5, Clamidospora (x1000) c. pH 6, Fíbula (x1000). d-f. Colonias de la cepa 58.01 en PDA. d. pH 5, Clamidospora (x1000). e. pH 5.5, Fíbula (x1000). f. pH 6, Fíbula (x1000). g-i. Colonias de la cepa 58.01 en EMA. g. pH 5, Clamidospora ampuliforme (x1000). h. pH 5.5, Fíbula (x1000). i. pH 6, Fíbula (x1000).

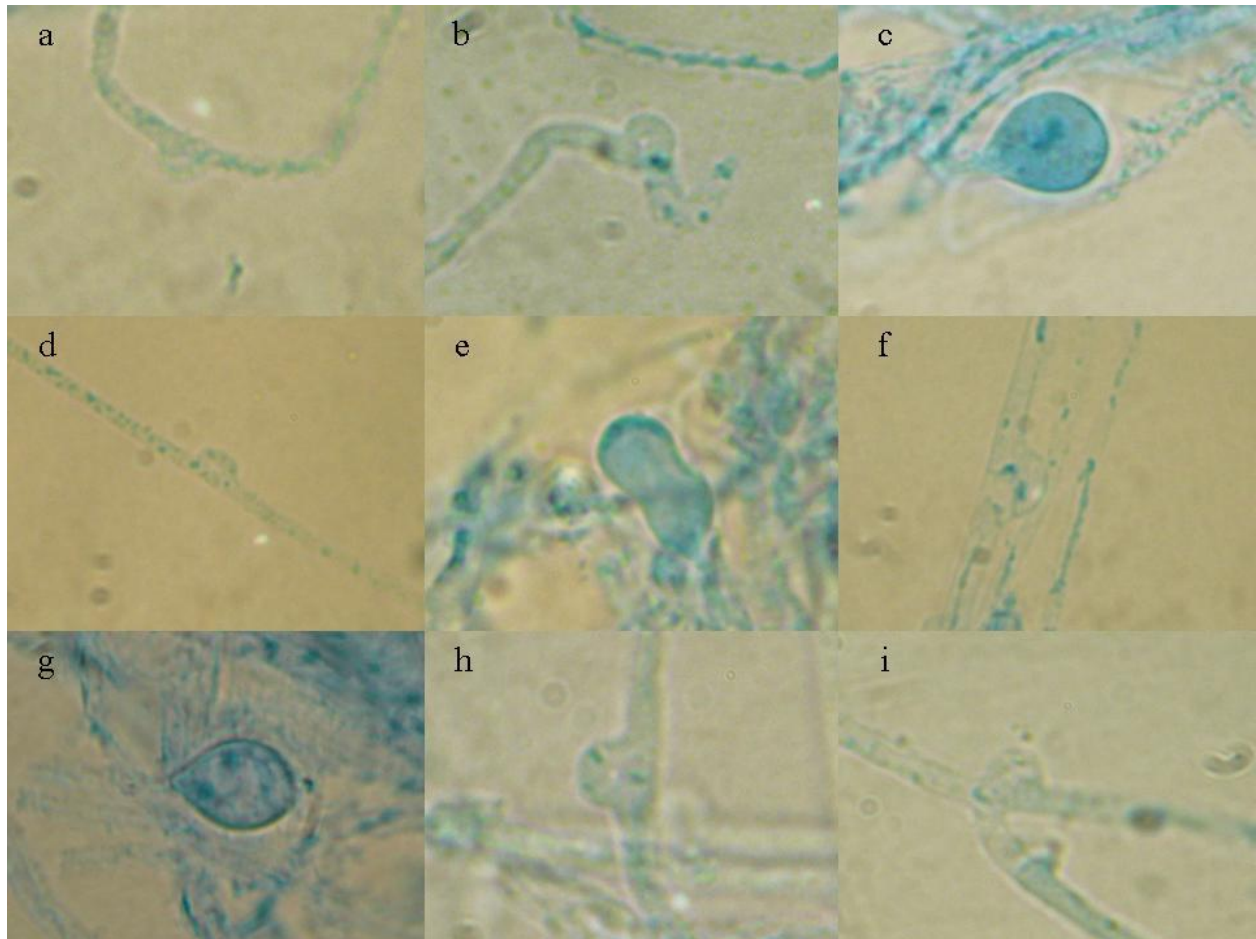




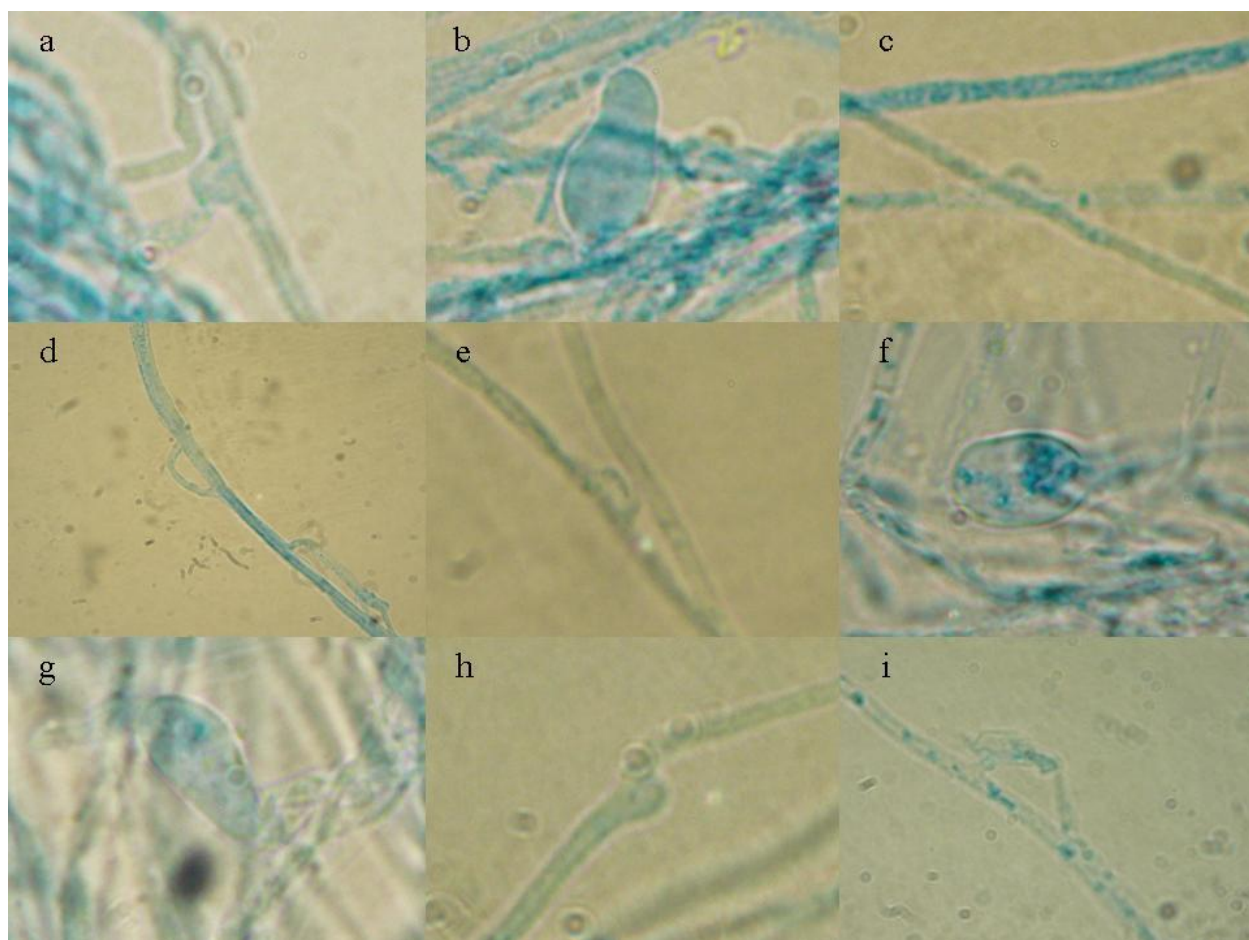
**Anexo 7. Características microscópicas de las colonias de la cepa 59.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH (tinción azul de lactofenol).** a-c. Colonia de la cepa 59.01 en CMYA. a. pH 5, Fíbula (x1000). b. pH 5.5, Fíbula (x1000). c. pH 6, Clamidospora (x1000). d-f. Colonias de la cepa 59.01 en PDA. d. pH 5, Fíbula (x1000). e. pH 5.5, Clamidospora (x1000). f. pH 6, Fíbula (x1000). g-i. Colonias de la cepa 59.01 en EMA. g. pH 5, Clamidospora (x1000). h. pH 5.5, Fíbula (x1000). i. pH 6, Fíbula (x1000).



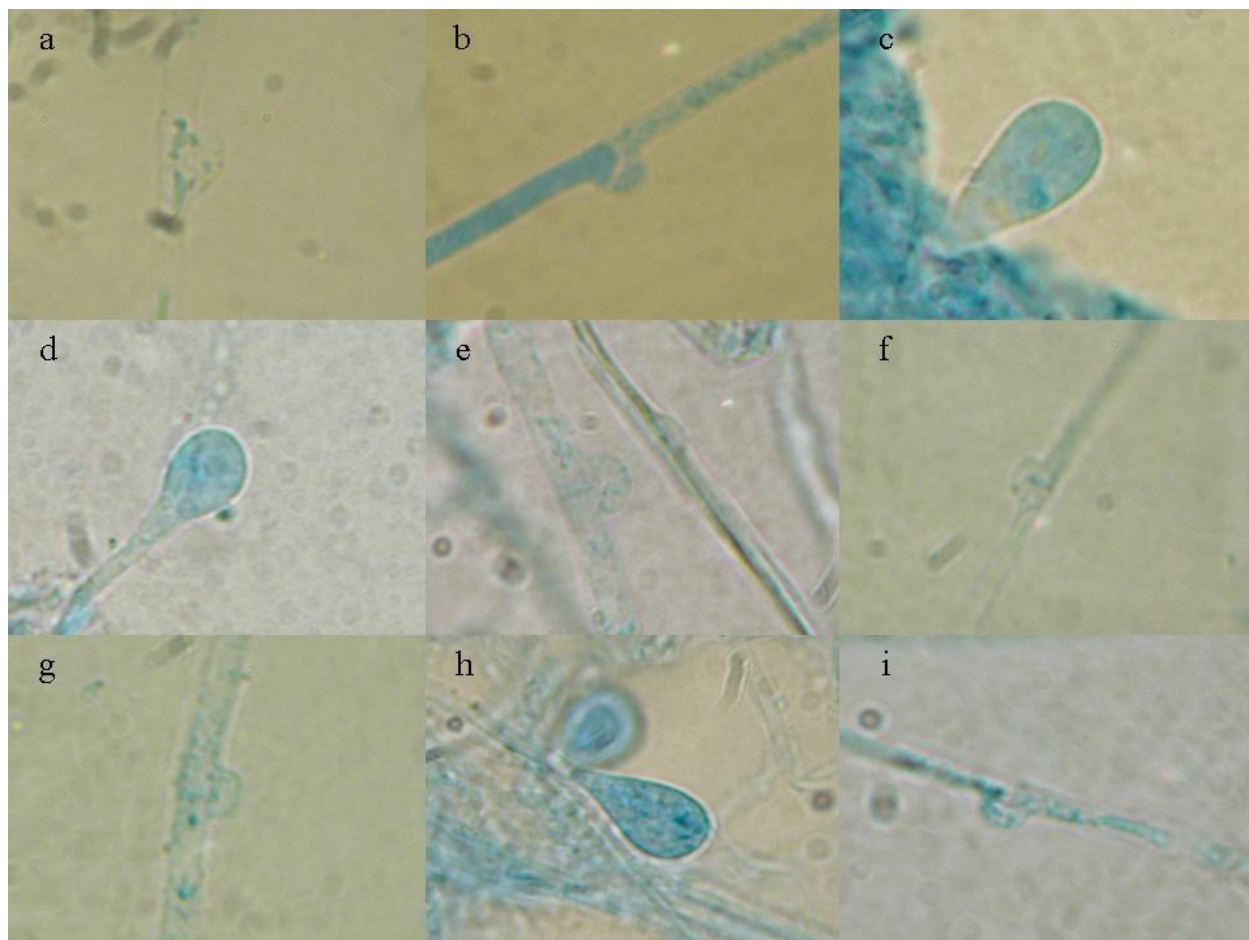
**Anexo 8. Características microscópicas de las colonias de la cepa 60.01 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH (tinción azul de lactofenol).** a-c. Colonia de la cepa 60.01 en CMYA. a. pH 5, Fíbula (x1000). b. pH 5.5, Fíbula (x1000). c. pH 6, Clamidospora (x1000). d-f. Colonias de la cepa 60.01 en PDA. d. pH 5, Fíbula (x1000). e. pH 5.5, Clamidospora ampuliforme (x1000). f. pH 6, Fíbula (x1000). g-i. Colonias de la cepa 60.01 en EMA. g. pH 5, Clamidospora (x1000). h. pH 5.5, Fíbula (x1000). i. pH 6, Fíbula (x1000).



**Anexo 9. Características microscópicas de las colonias de la cepa 112.02 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH (tinción azul de lactofenol).** a-c. Colonia de la cepa 112.02 en CMYA. a. pH 5, Fíbula (x1000). b. pH 5.5, Clamidospora (x1000). c. pH 6, Fíbula (x1000). d-f. Colonias de la cepa 112.02 en PDA. d. pH 5, Fíbula (x1000). e. pH 5.5, Fíbula (x1000). f. pH 6, Clamidospora (x1000). g-i. Colonias de la cepa 112.02 en EMA. g. pH 5, Clamidospora (x1000). h. pH 5.5, Fíbula (x1000). i. pH 6, Fíbula (x1000).



**Anexo 10. Características microscópicas de las colonias de la cepa 638.08 de *A. cylindracea* a 26°C, al final del período de incubación en los diferentes medios de cultivo y pH (tinción azul de lactofenol).** a-c. Colonia de la cepa 638.08 en CMYA. a. pH 5, Fíbula (x1000). b. pH 5.5, Fíbula (x1000). c. pH 6, Clamidospora (x1000). d-f. Colonias de la cepa 638.08 en PDA. d. pH 5, Clamidospora (x1000). e. pH 5.5, Fíbula (x1000). f. pH 6, Fíbula (x1000). g-i. Colonias de la cepa 638.08 en EMA. g. pH 5, Fíbula (x1000). h. pH 5.5, Clamidospora (x1000). i. pH 6, Fíbula (x1000).



**Anexo 11.** *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, fotografía de primordios saliendo del sustrato (tronco) de *Sambucus* sp.



Fotografía del Proyecto de investigación “Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx’yol B’aqman (*Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos”. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI) (89).

**Anexo 12.** *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, fotografía del cuerpo fructífero.



Fotografía del Proyecto de investigación “Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx’yol B’aqman (*Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos”. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI) (89).

**Anexo 13.** *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, fotografía de basidiomas maduros recién recolectados.



Fotografía del Proyecto de investigación “Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx’yol B’aqman (*Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos”. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI) (89).