

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

Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea*



Mario Rodolfo Tejada Escobar

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, febrero de 2020

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

Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea*

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Mario Rodolfo Tejada Escobar

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

Químico Biólogo

Guatemala, febrero de 2020

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Aguilar	Vocal IV
Br. Carol Menarí Caceros Castañeda	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por llevarme de la mano en este caminar.

A MIS PADRES

Lic. Rodolfo Tejada y Julia Reyna Escobar de Tejada.

Por todo su amor, apoyo y comprensión.

A MI ESPOSA E HIJO

MSc. Claudia Ivanova Mazariegos Ramírez y Daniel Sebastián Tejada Mazariegos.

Por su apoyo, comprensión y ser mis grandes amores.

A MIS HERMANAS

Karina Edith Tejada Escobar y Arq. Nancy Fabiola Tejada Escobar.

Por ser fuente de inspiración para este logro.

A TODA MI FAMILIA

En especial a mis tíos Mario Enrique del Carmen Escobar Rodríguez †, Audelina de Escobar, Rolando Rodríguez † y mi primo Dr. Rubén Escobar Archila.

Por creer en mí y sentirse orgulloso de mi desempeño profesional.

A MIS AMIGOS

Ing. Manuel Fernández, Dra. María Elena Ponce, Lic. Jennifer Ivonne Búcaro y en especial a Lic. Gardenia Muñoz Pérez.

Por ayudarme y apoyarme brindándome siempre su sincera amistad.

A MIS ASESORES

Lic. María de Carmen Bran y en especial a Lic. Roberto Agustín Cáceres Staackmann.

Por su asesoría, paciencia y ayuda sobre todo en los momentos de flaqueza.

A MI REVISOR

MSc. Osberth Morales Esquivel.

Por su revisión y sabia corrección durante la realización de esta investigación.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA, al departamento de Microbiología y a la Unidad de Biotecnología y Aprovechamiento de Hongos (BioTAH)

Por ser la casa que me acogió y me hizo el profesional que soy.

INDICE

	Página	
I	RESUMEN	1
II	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	2
III	ANTECEDENTES	3
	A. Generalidades del reino Fungi	3
	B. Hongos comestibles	3
	1. Valor nutricional	3
	2. Hongos comestibles en Guatemala	3
	C. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala	4
	D. <i>Agrocybe cylindracea</i> (DC: Fr.) Maire	4
	1. Clasificación taxonómica	5
	2. Características morfológicas	5
	3. Hábitat	6
	4. Etnomicología	6
	5. Composición nutritiva de <i>A. cylindracea</i>	6
	6. Cultivo de <i>A. cylindracea</i>	7
	7. Propiedades medicinales de <i>A. cylindracea</i>	8
IV	JUSTIFICACIÓN	10
V	OBJETIVOS	11
VI	HIPÓTESIS	12
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	13
VIII	RESULTADOS	19
IX	DISCUSIÓN	28
X	CONCLUSIONES	30
XI	RECOMENDACIONES	31
XII	REFERENCIAS	32

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas aisladas de <i>A. cylindracea</i>	19
Tabla 2. Efecto general del medio de cultivo en el crecimiento de <i>A. cylindracea</i> a dos temperaturas y dos medios	20
Tabla 3. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de cepas de <i>A. cylindracea</i>	20
Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cepas de <i>A. cylindracea</i>	21

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Análisis de conglomerados de características macroscópicas de 5 cepas de <i>A. cylindracea</i> en AEM y APD a 26°C	22
Figura 2. <i>A. cylindracea</i> en AEM a 26 °C	22
Figura 3. <i>A. cylindracea</i> en APD a 26 °C	23
Figura 4. Análisis de conglomerados de características macroscópicas de 5 cepas de <i>A. cylindracea</i> en AEM y APD a 18°C	24
Figura 5. <i>A. cylindracea</i> en AEM a 18 °C	24
Figura 6. <i>A. cylindracea</i> en APD a 18 °C	25
Figura 7. Análisis de conglomerados de características microscópicas de 5 cepas de <i>A. cylindracea</i> en AEM y APD a 26°C	26
Figura 8. Análisis de conglomerados de características microscópicas de 5 cepas de <i>A. cylindracea</i> en AEM y APD a 18°C	27

I. RESUMEN

Agrocybe cylindracea es un hongo muy apreciado por su comestibilidad, y sus propiedades bioactivas, que se cultiva en varios países a nivel mundial. En Guatemala es utilizado como alimento entre las personas de las etnias Mam y Kakchiquel en municipios de los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Chimaltenango.

Dada la importancia de *A. cylindracea* en Guatemala, se logró aislar el micelio de cinco nuevas cepas nativas (Ag, Ch, Sl, Sm y T), evaluar su crecimiento *in vitro* en dos medios de cultivo (agar extracto de malta -AEM- y agar papa dextrosa -APD-), a dos temperaturas (18° y 26°C) a través de la determinación del diámetro de crecimiento micelial, así como establecer sus características macro y microscópicas.

Al efectuar el análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$) se determinó que el mejor medio de cultivo y temperatura de incubación en las cuales las cepas evaluadas alcanzaron el mayor diámetro de crecimiento micelial fue AEM a 26°C.

En el análisis de conglomerados de las características macroscópicas y microscópicas se determinó que las colonias de las cepas evaluadas en AEM a 26°C (grupo 1) fueron las que presentaron las mejores características de crecimiento micelial con colonias algodonosas, blancas, escasamente zonadas, micelio aéreo abundante, sin exudado, con hifas entre 2 y mayores de 4 μm de diámetro, abundantes fibulas y escasos clamidoconidios.

Dado el potencial biotecnológico que representa esta especie para el país se recomienda el agar AEM a 26°C para la producción de biomasa de las cepas evaluadas.

II. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Guatemala posee gran diversidad de hongos silvestres comestibles, los cuales se consumen en diversas regiones del país. Uno de ellos es *A. cylindracea*, conocido popularmente como “hongo del sauco”, y en los idiomas Kakchiquel y Mam, se le denomina como "Rukoxil tunay che" y "Tx'yol B'aqman", respectivamente (Bran, Morales, Flores, Cáceres y Gurriarán, 2009).

En el país, se utiliza como alimento por personas de la etnia Mam de los municipios de San Juan Ostuncalco, Concepción Chiquirichapa, Cajolá y San Miguel Sigüilá (Quetzaltenango), así como en San Antonio Sacatepéquez (San Marcos). También es apreciado por su comestibilidad en la etnia Kaqchikel en el municipio de Tecpán Guatemala, (Chimaltenango) (Bran, Morales, Cáceres y Flores, 2003a; Bran et al., 2003b; Hostnig, Hostnig y Vásquez, 1998).

Debido a que *A. cylindracea* se consume en diversas comunidades del país, es de sumo interés estudiar su cultivo *in vitro*, con fines de producción de cuerpos fructíferos, lo cual contribuiría al desarrollo económico de comunidades campesinas, tanto como fuente alterna de alimento, como para su comercialización.

En la actualidad ya se han desarrollado estudios con varias cepas nativas y se han evaluado las características en diferentes medios de cultivo y temperaturas, así como la producción de inóculo y la evaluación de la producción de cuerpos fructíferos sobre diferentes sustratos, sin embargo se cuenta con muy pocos aislamientos, por lo que se hace necesario recolectar y aislar nuevas cepas para ampliar, renovar y conservar el germoplasma fúngico guatemalteco (Bran et al., 2009; Bran, Cáceres, Morales, Gurriarán y Flores, 2012; De León, Lau, Vallejo y Klee, 2012; Méndez, 2017).

Por tal razón, este proyecto de investigación tuvo como propósito recolectar nuevas cepas nativas de *A. cylindracea* para aislamiento y caracterización *in vitro* en diferentes medios de cultivo y temperaturas.

Esta investigación formó parte del proyecto macro “Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx'yol B'aqman (*A. cylindracea* (DC.: Fr.) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos”, dentro de la línea de investigación “Hongos comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula”, el cual se ejecuta en la Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos, Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades del reino Fungí

Los hongos son organismos eucariotas relativamente simples, heterótrofos, filamentosos y levaduriformes, que se pueden reproducir asexual y sexualmente. Se estima que existen 5.1 millones de especies de hongos, de los cuales solo 70,000 han sido descritos (Blackwell, 2011).

Actualmente los hongos se clasifican según análisis basados en biología molecular en los siguientes *Phyllum*: Chytridiomycota, Zygomycota I y II, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporida, Monoblepharidiomycota, Entomophthorales, Ascomycota y Basidiomycota (Blackwell, 2011).

Por su tamaño se clasifican en microhongos y macrohongos, entre los cuales se encuentran las setas (Carlile, Watkinson y Gooday, 2004). Los microhongos comprenden a mohos y levaduras, los cuales son de importancia en la elaboración de productos alimenticios, medicinales y ácidos orgánicos. Los macrohongos comprenden a las setas que están en su mayoría representados en el *Phylum* Basidiomycota y que habitan en campos y bosques. Son de importancia para el hombre debido a que poseen un alto valor nutritivo, medicinal y ecológico (Webster y Weber, 2007).

B. Hongos comestibles

En la actualidad se conocen alrededor de 7,000 especies que poseen diferentes grados de comestibilidad y más de 3,000 especies pueden ser consideradas comestibles de alta calidad, de las cuales sólo 200 especies han sido cultivadas experimentalmente, 100 de ellas con fines económicos y de estas, 10 han sido cultivadas a escala industrial (Chang y Miles, 2004).

1. Valor nutricional

El valor nutricional es importante en los hongos comestibles, debido a que son una fuente rica en proteínas, minerales (hierro y fósforo) y vitaminas como la tiamina, riboflavina, ácido ascórbico y niacina. Además, son ricos en carbohidratos, bajos en grasas, moderados en fibras, son una buena fuente de aminoácidos esenciales y bajos en calorías. Poseen características únicas en términos de color, sabor, aroma y textura, que los hacen atractivos para el consumo humano (Chang y Miles, 2004).

2. Hongos comestibles en Guatemala

En Guatemala, el conocimiento del uso de los hongos comestibles silvestres se ha transmitido de tiempos inmemoriales y en su mayoría se consumen por personas de las etnias Mam, Quiché y Kakchiquel. En el país, hay cerca de 83 especies comestibles reconocidas.

De ellas, las más consumidas y vendidas en los mercados locales son: *Amanita caesarea*, *Canterellus cibarius*, *Craterellus lateritius*, *Hydnum repandum*, *Lactarius deliciosus* y *L. indigo* (Morales, Bran y Cáceres, 2010).

C. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala

El cultivo de hongos en Guatemala inició en la década de 1950 con *Agaricus bisporus* y se estableció a escala comercial en la década de 1970 (De León, Guzmán y Martínez-Carrera, 1988).

En 1979, se cultivó *Pleurotus flabellatus* utilizando los subproductos del café y bagazo de citronella como sustratos. En ese mismo año se estableció también el cultivo de *Lentinula edodes*, utilizando *Quercus* sp como sustrato (De León, 2003).

Desde 1990, hay personal capacitado para la producción de *Pleurotus* sp en aldeas rurales de Guatemala, que trabajan en localidades de San Marcos y Huehuetenango, donde los productores utilizan la paja de trigo y pulpa de café como sustrato respectivamente (De León, 2003).

En 1995, se iniciaron estudios sobre el cultivo de las siguientes especies en Guatemala: *A. aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Pholiota nameko* y *Volvariella volvacea*. En 1999, se comenzó a producir *P. eryngii* en aserrín de árboles de caucho y mazorcas de maíz como sustrato (De León, 2003).

En un estudio llevado a cabo por González (2016), sobre el cultivo y producción de inóculo de *P. albidus*. Del 2007 al 2009, se llevaron a cabo investigaciones para el cultivo de cepas nativas de *A. cylindracea*, *Neolentinus ponderosus* y *Schizophyllum commune*, así como el desarrollo de tecnología para su posterior transferencia a las comunidades rurales y para contribuir a su desarrollo como alternativa económica y alimenticia (Bran, Cáceres y Morales, 2012).

Bran, Cáceres, Gurriarán, Morales y Flores (2015a,b), reportaron los resultados obtenidos de la caracterización *in vitro* y producción de inóculo de cinco cepas guatemaltecas de *Lepista nuda* así como la producción de cuerpos fructíferos en diferentes sustratos.

D. *Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire

A. cylindracea es un hongo silvestre comestible muy apreciado y apetecido por sus propiedades culinarias, así como por su agradable olor y sabor. Se cultiva en China, Tailandia, Japón, Alemania, Grecia, Italia, España, México, Perú y Argentina. Sin embargo, la poca disponibilidad de cepas comerciales y la baja productividad de las mismas ha limitado su cultivo en otras partes del mundo (Uhart y Albertó, 2007).

1. Clasificación taxonómica

Se clasifica en el Reino Fungi, *Phyllum* Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Subclase Agaricomycetidae, Orden Agaricales, Familia *Strophariaceae*. Posee más de 20 sinónimos, el más difundido y conocido es *Agrocybe cylindracea* (Kirk, Camon, Monter y Stalper, 2008).

A. cylindracea posee otras sinonimias: *Cyclocibe cylindracea*, *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer; *Agrocybe cylindracea* sensu Taylor; *Pholiota aegerita* (V. Brig.) Quél; *Pholiota capistrata* (Cooke) Sacc; *Agaricus aegerita* Fr, *Agaricus aegerita* V. Brig; *Agaricus cylindracea* (DC) Gillet; *Agaricus cylindraceus* DC; *Agaricus leochromus* (Cooke) Sacc; *Agaricus pudicus* sensu Cooke; *Agrocybe cylindrica* (De Candolle:Fr) Marie; *Pholiota cylindracea* (DC) Gillet; *Pholiota leochroma* (Cool) Sacc; *Pholiota pudica* sensu Rea; *Togaria cylindracea* (DC) Romagn (Index fungorum, 2015; Uhart y Albertó, 2007).

2. Características morfológicas

Los cuerpos fructíferos o basidiomas de esta especie presentan píleo café, generalmente más oscuro en el centro y blanquecino hacia el margen. El color es más uniforme en los primordios. La superficie del píleo es no higrofana, no viscida, glabra, eventualmente surcada o estriada en algunos especímenes, aunque usualmente es lisa. Convexo a plano, de 8.0 a 22.0 cm de diámetro. Láminas blancas o gris brillante y eventualmente se vuelven de color café ó café oscuro; moderadamente anchas, delgadas, adnadas, sinuadas o subdecurrentes, borde liso o crenado. Contexto blanco, olor agradable, afrutado, sabor excelente. Esporada café. Estípites blanco a café muy pálido, escamoso a fibriloso, cilíndrico, solido, de 10.0 a 150 x 2.0 – 25.0 cm. El velo forma un anillo ancho y persistente. Gregario (Uhart y Albertó, 2007).

Esporas de (8-) 9-16 (-17) x 5-9 (-10) μm , Q=1.8 (n=700), oblongas, lisas, algunas con gúttulas en el interior, pigmentadas de color miel, con un poro germinativo nunca truncado. Basidios (17-) 22-46 x 5-8 μm , clavados, de paredes delgadas, hialinos, 1 a 4 esporas. Pleurocistidios (18-) 21-65 x (5-) 7-17 μm , clavados a ventricosos, con ápice redondeado, mucronado o capitado, de paredes delgadas, numerosos. Queilocistidios 19-49 x (3-) 5-13 μm , similar a los pleurocistidios o más pequeños, pero entonces cilíndricos a lageniformes. Hifas con fíbulas. Trama himenoforal regular. Epicutis del píleo formado por elementos vesiculares a clavados, 14-42 x 6-25 μm , formando una pared himeniforme. Pileocistidios 17-55 x (5-) 6-13 μm , ventricosos a mucronados, algunas veces con dos constricciones hacia el ápice, lageniformes, raramente agudos. Caulocistidios 16-88 (-95) x 4-16 μm , similares en tamaño a los queilocistidios (Uhart y Albertó, 2007).

3. Hábitat

A. cylindracea, es un hongo saprobio y lignícola. Crece sobre troncos de árboles vivos o muertos, en ramificaciones o heridas, cerca de la base. Se ha encontrado sobre troncos de *Allophylus*, *Broussonetia*, *Cupania*, *Melia*, *Phebe*, *Populus*, *Quercus*, *Robinia*, *Salix* y *Ulmus* (Waltling, 1992).

En Guatemala, *A. cylindracea* se encuentra creciendo sobre troncos de árboles de Sauco (*Sambucus sp*) y Sauce (*Salix sp*) y se recolecta entre finales de mayo y principios de junio en época lluviosa (Bran et al., 2005; Hostnig et al., 1998; Morales, 2001).

4. Etnomicología

A. cylindracea es un hongo comestible conocido por diversas culturas en todo el mundo. En Japón, se nombra como “Yanagi-Matsutake” y en China popular, se le conoce como “hongo del sur” o “Zhuzhuang–Tiantougu”. En países de Europa como Italia, es nombrado como “Piopparello” y “Pioppino”. En México, se conoce como “hongo de chopo”, “hongo negro del álamo” y “seta del chopo” (Stamets, 1993).

En Guatemala, es conocido popularmente como “hongo del sauco” en el idioma español, en los idiomas mayas Kakchiquel y Mam se conoce como "Rukoxil tunay che" y "Tx'yol B'aqman", respectivamente (Bran et al., 2009).

Se ha utilizado como alimento en poblaciones de la etnia Mam de los municipios de San Juan Ostuncalco, Concepción Chiquirichapa, Cajolá y San Miguel Sigüilá (Quetzaltenango), así como en San Antonio Sacatepéquez (San Marcos). También es apreciado en la etnia Kaqchikel, principalmente en el municipio de Tecpán Guatemala, (Chimaltenango) (Bran et al., 2003a; Hostnig et al., 1998).

5. Composición nutritiva de *A. cylindracea*

Se ha reportado que *A. cylindracea* es un hongo en cuya composición se encuentran 19.23% de proteínas, 41.29% de carbohidratos, 1.24% de grasas, y 10.97% de cenizas (Manzi, Marconi, Aguzzi y Pizoferrato, 2004).

En Guatemala, Pinagel (2009), llevó a cabo el análisis proximal de una muestra de basidiomas silvestres de *A. cylindracea* colectadas en San Marcos y encontró que es una buena fuente de macronutrientes y de bajo contenido energético, similar a otros macrohongos.

Por otro lado, Bran, Cáceres, Morales, Gurriarán y Flores (2014), al determinar el análisis proximal de ejemplares cultivados de *A. cylindracea* encontraron que los contenidos de proteínas, carbohidratos, fibras crudas y grasas de las cepas evaluadas están dentro de los parámetros generales para los hongos comestibles.

6. Cultivo de *A. cylindracea*

a. Requerimientos para cultivo de *A. cylindracea*

Para el crecimiento micelial de *A. cylindracea*, los medios de cultivo recomendados son agar malta, levadura y peptona (MYPA), agar papa dextrosa (APD), agar papa dextrosa y levadura (PDYA), agar con extracto de malta (AEM), agar harina de maíz y levadura (OMYA) y agar comida para perro (DFA) (Stamets, 1993).

En un estudio llevado a cabo en Guatemala por Bran, y colaboradores (2009), encontraron que el mejor medio para el crecimiento micelial de las cepas nativas de *A. cylindracea* evaluadas, fue (AEM) a una temperatura de 18°C. Por otro lado, Reyes, Bran y Morales (2011), encontraron que la mayoría de las cepas evaluadas obtuvieron el mejor crecimiento micelial a pH 6, en medio AEM a 26°C. Sin embargo, Méndez (2017), obtuvo el mejor crecimiento de la cepa 58.01 en AEM a 18°C y a pH 7.0 por medio del tratamiento alcalino, con menor crecimiento al aumentar el pH a 12.0.

En el medio AEM las colonias presentan color blanco, consistencia algodonosa, textura afelpada, bordes bien definidos, densidad del micelio aéreo en colonias jóvenes de regular a abundante, que se torna compacto con el envejecimiento; sin olor distintivo. Se observa además la aparición de pigmento café en el reverso de las colonias a los 15 días de incubación. Microscópicamente se observan hifas de pared delgada de 4.0-5.0 µm. de diámetro, moderadamente ramificadas, con fíbulas (Bran et al., 2009).

De León, y colaboradores (2012), estudiaron los requerimientos fisiológicos que inciden en el crecimiento micelial y la degradación de la paja de cebada por *A. aegerita*, y encontraron que el micelio produjo una mayor degradación en ese sustrato, a una relación C:N de 36.55 y 41.57.

Se ha informado que el inóculo se puede preparar en granos de cereales (centeno, trigo, mijo, sorgo) y aserrín (Stamets, 1993).

Bran, y colaboradores (2009), al estudiar cepas guatemaltecas encontraron que las semillas de trigo eran el mejor sustrato para la producción de inóculo a una temperatura de 18°C, para la mayoría de las cepas evaluadas.

Para la producción de basidiomas Stamets (1993) ha reportado que *A. cylindracea* fructifica sobre aserrín o viruta de encino y aliso suplementado, también madera de sauce, álamo, chopo y maple. Otros sustratos que se han utilizado son paja de trigo (De León, 2003); paja de trigo (29%) adicionada con CaCO₃ (1%) y humedad (70%) (Uhart y Albertó, 2007).

Bran, y colaboradores (2014), en Guatemala lograron la producción de cuerpos fructíferos de cinco cepas nativas de *A. cylindracea* y recomendaron que se use paja de trigo suplementada con harina de soya y CaCO₃ como regulador de pH.

7. Propiedades medicinales de *A. cylindracea*

Sun, Zhao, Tong, y Qi (2003), a partir de cuerpos fructíferos de *A. cylindracea*, purificaron una lectina denominada AAL, la cual tiene un efecto antitumoral inducido vía apoptosis y actividad de DNAasa. Zhao, Sun, Tong, y Qi (2003), investigaron diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos demostrando que AAL inhibe su crecimiento y que *in vivo* también inhibe la viabilidad de células tumorales S-180.5. Jiang, y colaboradores (2012), aislaron una nueva lectina de *A. cylindracea* (AAL-2) y demostraron su actividad antitumoral.

Yoshida, Kiho, Usui, Sakushima y Ukai (1996), determinaron que *A. cylindracea* tiene propiedades anti-inflamatorias e inmunoestimulantes en el organismo humano.

Taira, Miyashita, Okamoto, Arimoto, Takahashi y Negishi (2005), determinaron factores en *A. cylindracea*, capaces de suprimir los efectos mutagénicos inducidos por agentes cancerígenos sobre ADN y células somáticas de *Drosophila*, se cree que los factores podrían ser péptidos o proteínas.

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por *A. cylindracea* han mostrado actividades antitumorales (Kiho, Yoshida, Nagai, y Ukai 1989), así como hipoglucémica (Kiho, Sobue y Ukai, 1994) y de inhibición de la peroxidación lipídica (Lee, Yun y Yoo, 1998). De esta forma se ha optimizado la producción de exopolisacáridos (EPS) de *A. cylindracea*, utilizando biomasa micelial preparada por cultivo sumergido (Kim, 2005).

Ngai, y colaboradores (2005) obtuvo un péptido (Agrocibina) de 9 kDA, proveniente de los cuerpos fructíferos de *A. cylindracea*, el cual presentó actividades antifúngicas y antibacterianas. Además, mostró atenuación de la actividad de la transcriptasa reversa de VIH.

Tsai, Huang y Mau (2006), concluyeron que los extractos etanólicos obtenidos de *A. cylindracea* presentaron actividades antioxidantes.

Además de la caracterización de *A. cylindracea*, son importante los nuevos estudios realizados con fines de bioprospección, para la obtención de extractos agroquímicos, biocatalizadores, antioxidantes y elementos nutricionales. Entre estos está el estudio de Espeja (2016), en el que se ha logrado la expresión funcional de la UPO1 de *A. aegerita* de la cepa (AaeUPO1) en *Saccharomyces cerevisiae* mediante evolución dirigida. UPO1, peroxigenasa aromática es una enzima fácilmente secretada (8 mg/l) muy estable, para la transformación de naftaleno en 1-naftol, compuesto agroquímico relevante.

Fedotov (2017), en su estudio calculó y comparó el antioxidante pro oxidante (PAS) de cepas de Basidiomycetes bajo cultivo en un medio de glucosa-peptona. La cepa 960 de *A. cylindracea* se distinguió por poseer una alta actividad antioxidante en el micelio por lo cual la ha recomendado como productora de antioxidantes de origen fúngico.

Se estudiaron cepas nativas de hongos de Polonia, que revelaron diferencias en el contenido químico de especies como: *A. cylindracea*, *Laetiporus sulphureus*, *P. nameko* y *Trametes versicolor*. Se encontró que *A. cylindracea* es rica en Estroncio (15 mg/kg) sobre todas las especies estudiadas según lo presentó en su estudio (Niedzielski, et al., 2017).

Liu, y colaboradores (2016), optimizaron la extracción de polisacáridos y selenio del micelio de la cepa SL-02 sembrada en APD por 14 días. El contenido de selenio de 1.76 ± 0.10 mg/g a una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ en medio líquido y una composición de monosacáridos de ramosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa en una relación molar de 29: 3, 1: 18 y 8: 2.7. El micelio enriquecido con selenio de *A. cylindracea* representa una fuente dietética novedosa de selenio suplementario biodisponible.

En esta investigación Wong, y colaboradores (2017), recolectaron cepas de nativas de la provincia de Yunnan en China de *A. cylindracea* y extrajeron acetato de etilo que presentó actividad antifúngica en contra de *Candida albicans* ATCC 90028 de un 2 al 12%.

Wang, Wang, Zhenghong, y Zhongyang (2017), determinaron que *A. cylindracea* posee actividad biológica antioxidante ya que posee como componentes bioactivos glucosa y galactosa en una relación molar de 1:18 y 8:2.7.

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala posee una gran diversidad de hongos comestible, uno de ellos es *A. cylindracea* conocido popularmente como “hongo del soico”, “hongo del sauco”, “Rukoxil tunay che”, “Txyol b’aqman”, en los idiomas mayas Kaqchiquel y Mam, respectivamente.

En Guatemala, este hongo es utilizado como alimento por pobladores de la etnia Mam de los municipios de San Juan Ostuncalco, Concepción Chiquirichapa, Cajolá y San Miguel Sigüila (Quetzaltenango), así como en San Antonio Sacatepéquez (San Marcos). También es apreciado como comestible por personas de la etnia Kaqchiquel del municipio de Tecpán, Chimaltenango (Bran et al., 2003a,b; Hostnig et al., 1998).

Además de su uso como fuente importante de nutrientes *A. cylindracea* sobresale por sus propiedades anti-inflamatorias, antitumorales, inmunoestimulantes, antihipertensivos y antidiabéticos (Chang y Miles, 2004).

Tomando en consideración la popularidad de este hongo y su demanda se han realizado estudios donde se aislaron y evaluaron varias cepas nativas *in vitro*, utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas, así como la producción del inóculo y de cuerpos fructíferos (Bran et al., 2009; Bran et al., 2012), sin embargo, aún no se cuenta con suficientes ejemplares como recurso fúngico potencialmente nativo.

Por lo anterior se hace necesario recolectar nuevos ejemplares nativos de *A. cylindracea*, para su aislamiento, así como caracterizar su crecimiento micelial *in vitro* evaluando diferentes medios de cultivo y temperaturas. Lo anterior no solamente para incrementar la diversidad de cepas del germoplasma fúngico con que cuenta el país en la colección de hongos saprobios del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, sino también en beneficio de la conservación de la biodiversidad y el desarrollo de la industria biotecnológica en el país en la producción de inóculo y de cuerpos fructíferos, como alternativa de consumo y comercialización en comunidades campesinas y urbanas, así como para estudios de bioprospección, en beneficio de la población guatemalteca.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Aislar y caracterizar *in vitro* cepas nativas de *A. cylindracea*.

B. Objetivos específicos

1. Determinar el medio de cultivo y la temperatura de incubación donde las cepas aisladas presenten el mayor diámetro de crecimiento micelial, a través de la evaluación del diámetro de las colonias.
2. Documentar las características morfológicas de las colonias de cada una de las cepas aisladas a través de la descripción macro y microscópica de cultivo *in vitro* obtenido en los diferentes medios de cultivo y temperaturas.

VI. HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *A. cylindracea* evidencian una mayor velocidad de crecimiento micelial en por lo menos un medio de cultivo y a una temperatura a evaluar.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de Trabajo

1. Universo

Especímenes silvestres de *A. cylindracea* que se desarrollan en los Departamentos de San Marcos y Sacatepéquez.

2. Muestra

Cuerpos fructíferos de cepas nativas de *A. cylindracea* recolectados en los Municipios de San Marcos, San Pedro Sacatepéquez, Esquipulas Palo Gordo (San Marcos) así como en San Lucas Sacatepéquez (Sacatepéquez).

B. Recursos

1. Recurso humano

a. Asesores

Lic. Roberto Agustín Cáceres Staackmann
Licda. María del Carmen Bran González

b. Investigador

Br. Mario Rodolfo Tejada Escobar

2. Recursos institucionales

a. Laboratorios del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

b. Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos, Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

C. Materiales y reactivos

1. Medios de cultivo

- Agar extracto de malta (AEM)
- Agar papa dextrosa (APD)

2. Reactivos

- Alcohol al 70%
- Aceite de inmersión
- Azul de lactofenol

3. Equipo

- Balanza analítica
- Cabina de bioseguridad tipo A2
- Incinerador
- Incubadoras a 18°C y 26°C
- Autoclave
- Estufa
- Agitadores magnéticos
- Asas en forma de espátula
- Estereoscopio
- Microscopio óptico
- Deshidratadora a 26°C

4. Cristalería

- Probeta graduada de 1000 ml
- Erlenmeyer de 500 y 1000 ml
- Pipetas de 10 ml
- Tubos de ensayo con tapón de rosca de baquelita
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pipetas Pasteur
- Pipeteador

5. Otros

- Papel aluminio
- Papel parafilm ®
- Papel mayordomo
- Agua desmineralizada
- Algodón
- Cajas de Petri desechables
- Cofia
- Mascarilla
- Papel encerado

- Canasta de mimbre
- Navaja o cuchillo
- Cámara fotográfica digital
- Hielera a 10°C
- Bolsas de polipapel

6. Útiles de escritorio

- Lápiz
- Lapiceros
- Marcadores
- Masking tape
- Hoja de papel bond tamaño carta
- Borrador
- Folders tamaño carta
- Bolsas de papel manila
- Regla graduada en mm

D. Procedimiento

1. Recolección e identificación de hongos

a. Recolección de cuerpos fructíferos

La recolección de cuerpos fructíferos se realizó según lo recomendado por Chang y Miles (2004).

- Se realizó un viaje exploratorio a algunas comunidades del altiplano de los departamentos de San Marcos y Sacatepéquez, en los cuales se contactó a personas conocedoras de los hongos, a quienes se solicitó su colaboración en el estudio para recolectar los hongos.
- Se realizaron muestreos en lugares con presencia de árboles de *Salix* sp y *Sambucus* sp recolectando los hongos reconocidos por los colectores de la comunidad, denominados con los nombres vernáculos asignados a *A. cylindracea*.
- Al encontrar un hongo se registró en la libreta de campo el nombre de la localidad, tipo de vegetación, fecha de recolección, características macroscópicas relevantes del hongo, así como datos culturales relacionados.
- Se recolectó el hongo con una navaja o cuchillo, de tal manera de sacar totalmente o al menos con la base completa el cuerpo fructífero.
- Inmediatamente después, se colocó cuidadosamente el hongo sobre una hoja de papel encerado, haciendo un paquete y se depositó en la canasta.

- Se transportaron los hongos recolectados en una hielera al laboratorio para su identificación taxonómica, procediéndose luego al aislamiento de los ejemplares frescos y posterior preservación del basidioma por medio de la desecación.

2. Aislamiento de cepas de *A. cylindracea*

a. Aislamiento y cultivo axénico de cepas de hongos comestibles

El aislamiento y cultivo axénico de cepas se realizó usando las indicaciones dadas por Stamets (1993).

- Se seleccionó un ejemplar joven en buen estado, fresco, turgente y limpio.
- El cuerpo fructífero se cortó longitudinalmente con una navaja o pinzas de disección estéril.
- Se extrajo un fragmento de unos dos mm del contexto del cuerpo fructífero y se colocó en una caja de Petri con AEM. Se colocaron tres fragmentos por caja, en un total de cinco repeticiones por cepa.
- Las cajas de AEM inoculadas se sellaron con papel parafilm® para evitar la deshidratación y se incubaron a 26°C durante 21 días.
- Se monitoreó el crecimiento de las cepas cada tres días.
- Se preservaron las cepas aisladas en tubos con AEM con tapón de rosca y se almacenaron en el cepario de hongos saprobios del Departamento de Microbiología a una temperatura de 8°C hasta su utilización.

b. Determinación del diámetro micelial de las colonias de las cepas de *A. cylindracea*

Las determinaciones fueron realizadas según lo recomendado por Mier, Toriello y Ulloa (2002) y Stamets (1993).

- Se prepararon medios AEM y APD, esterilizándolos por 10 y 15 minutos respectivamente a 121°C.
- Con un segmento de 5 mm de diámetro, se inocularon 20 cajas de cada uno de los medios, por cada cepa y cada temperatura.
- Se identificaron las cajas de Petri con número referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio de cultivo, temperatura de incubación y número de repetición.
- Se sellaron las cajas inoculadas con papel parafilm®, para evitar su deshidratación.
- Se incubaron a 18 y 26°C por 21 días.

- Se determinó el crecimiento micelial de las colonias, midiendo el diámetro en dos planos perpendiculares en milímetros, sacando el promedio de cada una de las repeticiones cada 3 días.

c. Descripción macroscópica y microscópica de las colonias

La descripción macroscópica y microscópica se realizó de acuerdo a la metodología recomendada por Nobles (1965).

- Se caracterizó macroscópicamente las colonias de las cepas con ayuda de un microscopio estereoscopio.
- Se observó el color del anverso y reverso, textura, consistencia, forma, olor, micelio aéreo, producción de exudado, formación de rizomorfos o agregaciones hifales.
- Se describió microscópicamente el micelio de las colonias, realizando preparaciones con azul de lactofenol.
- Se observó las características hifales a 40x y 100x, determinando el diámetro de las hifas (μm).
- Se registró la presencia de fíbulas, clamidoconidios, hifas en espiral y cualquier otra característica relevante.

E. Análisis estadístico

1. Diseño

El diseño general de la investigación se presentó de acuerdo con los objetivos a alcanzar.

Objetivo 1 Diseño factorial: $n \times 2 \times 2 \times 20$ (n cepas, 2 medios, 2 temperaturas x 20 réplicas). Se elaboró una base de datos en el programa Excel® con los siguientes parámetros: cepa (n cepas), temperatura de incubación (18 y 26°C), medio de cultivo (AEM y APD), día de medición (cada 3 días hasta 21 días) y diámetro de la colonia de cada una de las repeticiones (mm).

Objetivo 2 Descriptivo. Se describieron las características macro y microscópicas de cultivo *in vitro*, obtenidas en diferentes medios de cultivo y temperaturas, para documentar las características morfológicas de las colonias y los tipos de hifas que exhiben cada una de las cepas.

F. Análisis de la información

Objetivo 1. Se efectuó un análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa SPSS 20®, para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento radial obtenido por cada una de las cepas en los diferentes medios y temperaturas.

Objetivo 2. Se analizó y documentó los datos obtenidos de las características macroscópicas y microscópicas de los medios de cultivo AEM y APD a diferentes temperaturas (18 y 26°C), para observar el comportamiento de las cepas. Se realizó un análisis de conglomerados con SPSS 20® para establecer una relación entre las variables y los tratamientos representándolo por medio de un dendograma.

VIII. RESULTADOS

Se recolectaron y aislaron cinco cepas nativas de *A. cylindracea* de las siguientes localidades (Tabla 1):

Tabla 1. *Cepas aisladas de A. cylindracea*

Lugar de colecta	Código	Cepas colectadas
Aldea Agua caliente, Municipio de San Marcos, San Marcos	Ag	1
Aldea San Andrés Chápil, Municipio de San Pedro Sacatepéquez, San Marcos	Ch	1
Aldea Tánil, Municipio de Esquipulas Palo Gordo, San Marcos	T	1
Zona 5, Municipio de San Marcos, San Marcos	Sm	1
Municipio de San Lucas Sacatepéquez, Sacatepéquez,	Sl	1

A. Establecimiento del mejor medio de cultivo, temperatura y cepa

Se midió el diámetro (mm) del crecimiento micelial de cinco nuevas cepas nativas de *A. cylindracea* al día 14 (punto de corte), en dos medios de cultivo (AEM y APD) y en dos temperaturas evaluadas (18 y 26°C).

El mejor medio de cultivo donde se presentó el mayor diámetro de crecimiento micelial, para todas las cepas evaluadas fue AEM a 26 °C (84.000±0.000 mm), seguido de APD (51.368±21.7872 mm), a la misma temperatura, entre los cuales existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Tabla 2).

La cepa que obtuvo el mayor diámetro de crecimiento micelial en AEM sin importar la temperatura fue la Ch (66.026±18.29302), seguida de la cepa Sm (64.789±9.52117) y la cepa T, (62.776±21.56972), sin existir diferencia significativa entre ellas ($p > 0.05$). No existió diferencia significativa entre el diámetro del crecimiento micelial alcanzado por la cepa T tanto en AEM como APD (62.776±21.56972, 58.750±25.73402, respectivamente). Las cepas Sm, Ag, Ch y Sl en APD estuvieron muy distantes del crecimiento mostrado en los otros tratamientos (Tabla 3).

La mejor temperatura en la que se obtuvo el mayor diámetro de crecimiento micelial para todas las cepas, sin importar el medio de cultivo fue 26°C, en comparación con 18°C. En general la cepa T, alcanzó el mayor diámetro de crecimiento micelial a 26°C (84.000±0.000), la que fue significativamente diferente a las otras cepas evaluadas ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 2. *Efecto general del medio de cultivo en el crecimiento de A. cylindracea a dos temperaturas y dos medios*

Temperatura	Medio	Diámetro de las colonias (mm) ²		Tasa de crecimiento (mm/día)	
18°C	AEM ¹	40.468	± 6.3005	2.89	c ³
	APD	20.395	± 9.7033	1.45	d
26°C	AEM	84.000	± 0.0000	6.00	a
	APD	51.368	± 21.787	3.66	b

¹AEM (Agar extracto de malta), APD (Agar papa dextrosa) ² Media ± la desviación estándar. ³ Letras distintas indican diferencia estadísticamente, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey significativa ($\alpha=0.05$)

Tabla 3. *Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de cepas de A. cylindracea*

Medio	Cepa	Diámetro de las colonias (mm) ²		
AEM ¹	Ch	66.026	± 18.29302	a³
	Sm	64.789	± 19.52117	a
	T	62.776	± 21.56972	a,b
	Ag	58.947	± 25.39759	b
	Sl	58.632	± 25.71798	b
APD	T	58.750	± 25.73402	b
	Sm	33.842	± 18.95446	c
	Ag	32.066	± 15.32361	c,d
	Ch	27.803	± 15.58869	d
	Sl	26.947	± 21.72798	d

¹AEM (Agar extracto de malta), APD (Agar papa dextrosa) ² Media ± la desviación estándar. ³ Letras distintas indican diferencia estadísticamente, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cepas de *A. cylindracea*

Temperatura	Cepa	Diámetro de las colonias (mm) ¹	2
18°C	T	37.5263 ± 5.17001	d
	Ch	33.8289 ± 15.07382	e
	Sm	31.9737 ± 14.92366	f
	Ag	27.2500 ± 8.13131	f
	Sl	21.5789 ± 12.55772	g
26°C	T	84.0000 ± 0.00000	a
	Sm	66.6579 ± 19.79118	b
	Sl	64.0000 ± 23.81687	b,c
	Ag	63.7632 ± 22.36483	b,c
	Ch	60.0000 ± 27.36737	c

¹Media ± la desviación estándar. ²Letras distintas indican diferencia estadísticamente, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$)

B. Características macroscópicas de las cepas de *A. cylindracea* en medios de cultivo y temperatura evaluadas

El análisis de conglomerados congregó tres grupos de cepas según sus características macroscópicas a 26°C.

El Grupo 1, formado por las cepas Ch, Sl, Sm, Ag y T en AEM, se caracterizó por mostrar colonias algodonosas, blancas, no zonadas, sin exudado marrón y micelio aéreo abundante.

El Grupo 2, formado por las cepas Ch, Sm, Sl, Ag en APD, presentaron colonias algodonosas, blancas, regularmente zonadas, exudado marrón escaso y con regular cantidad de micelio aéreo.

El Grupo 3, conformado solamente por la cepa T en APD, se caracterizó por tener colonias algodonosas, blancas, escasamente zonadas, sin exudado y regular cantidad de micelio aéreo (Figura 1, 2 y 3).

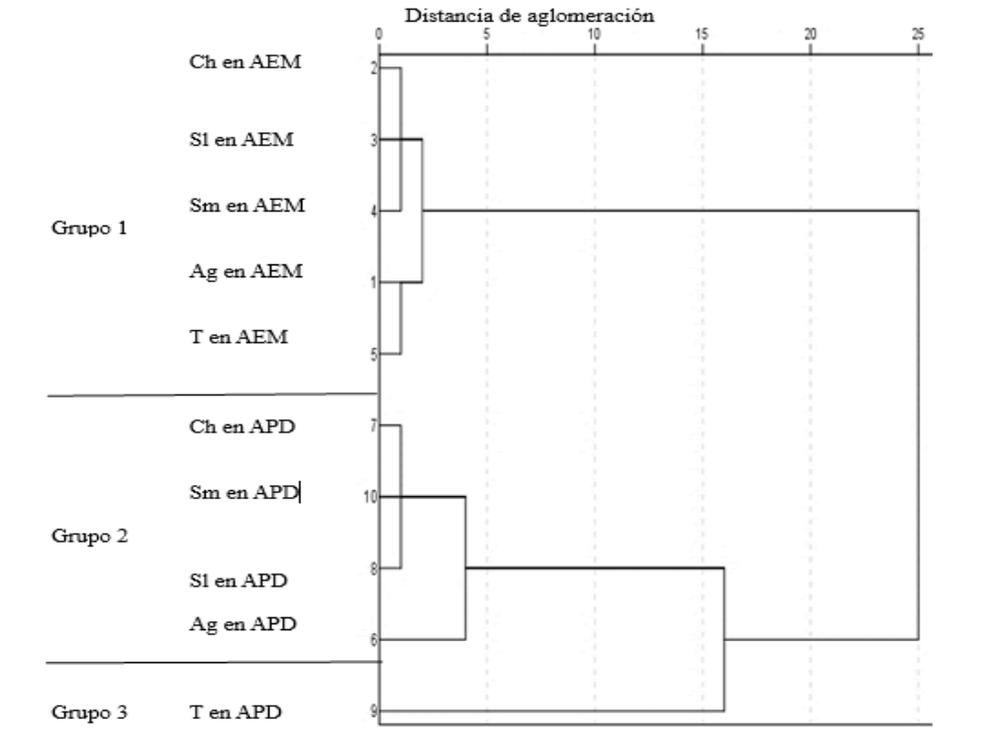


Figura 1. Análisis de conglomerados de características macroscópicas de 5 cepas de *A. cylindracea* en AEM y APD a 26°C. El dendrograma se construyó usando distancias euclidianas.

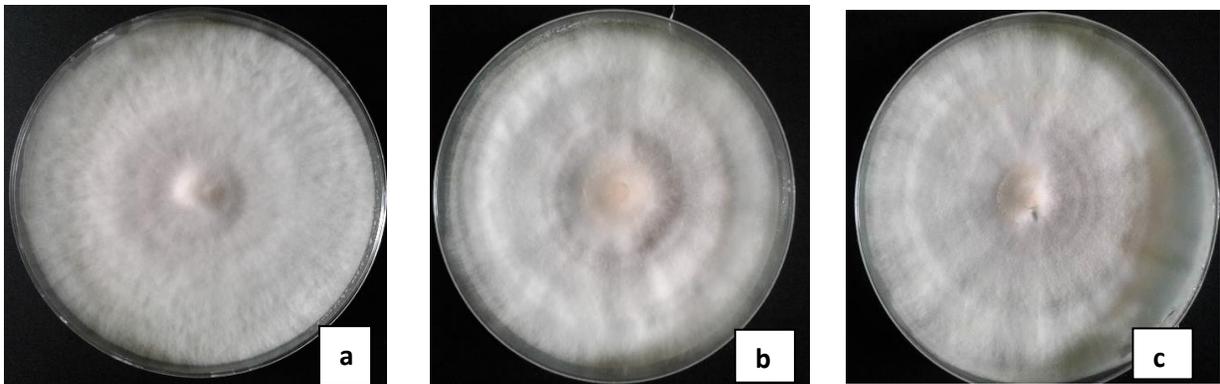


Figura 2. *A. cylindracea* en AEM a 26 °C a. Cepa T. Micelio levemente zonado y aéreo abundante. b. y c. Cepas Ch y Sm, respectivamente. Micelio zonado y aéreo regular.



Figura 3. *A. cylindracea* en APD a 26 °C d. Cepa T. Micelio levemente zonado y aéreo regular. e. Cepa Ag. Micelio abundante zonado y aéreo regular. f. Cepa Sl. Micelio abundante zonado y aéreo escaso.

El análisis de conglomerados congregó tres grupos de cepas según sus características macroscópicas a 18°C.

El Grupo 1, formado por las cepas Ch, Sl, Sm, Ag y T en AEM, mostraron colonias algodonosas en regular cantidad, blancas, regularmente zonado, con exudado marrón escaso y micelio aéreo en regular cantidad.

El Grupo 2, formado por las cepas Ch, Sm, Sl y Ag en APD, con colonias algodonosas escasas, blancas, abundantemente zonado, exudado marrón abundante y micelio aéreo escaso.

El Grupo 3, con una sola cepa T en APD, presentó colonias algodonosas en regular cantidad, blancas, abundantemente zonado, exudado marrón escaso y micelio aéreo escaso (Figuras 4,5 y 6).

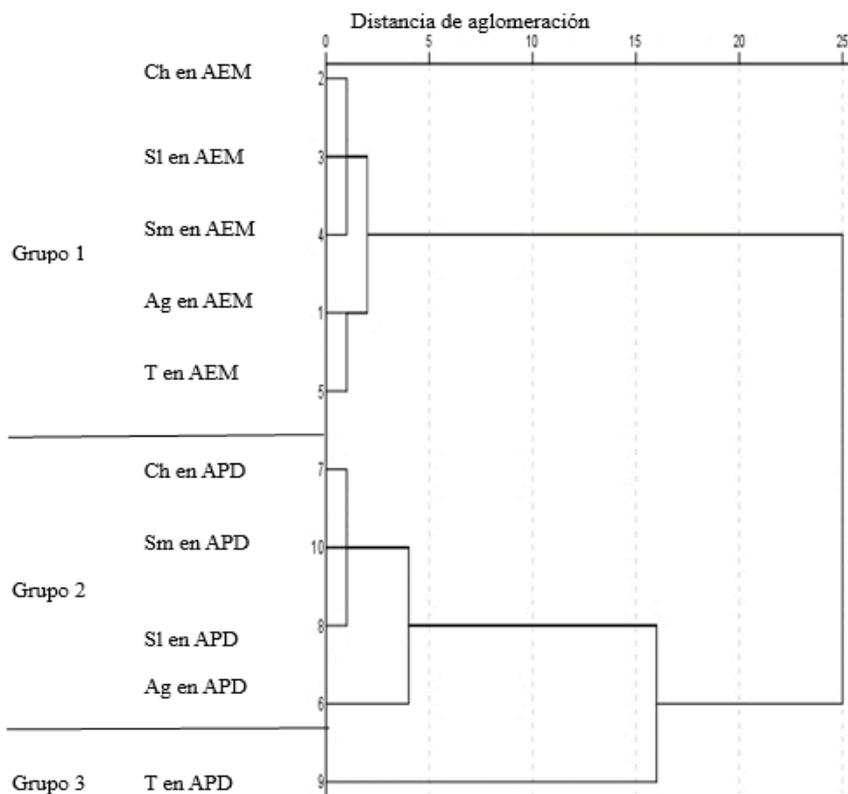


Figura 4. Análisis de conglomerados de características macroscópicas de 5 cepas de *A. cylindracea* en AEM y APD a 18° C. El dendograma se construyó usando distancias euclidianas.

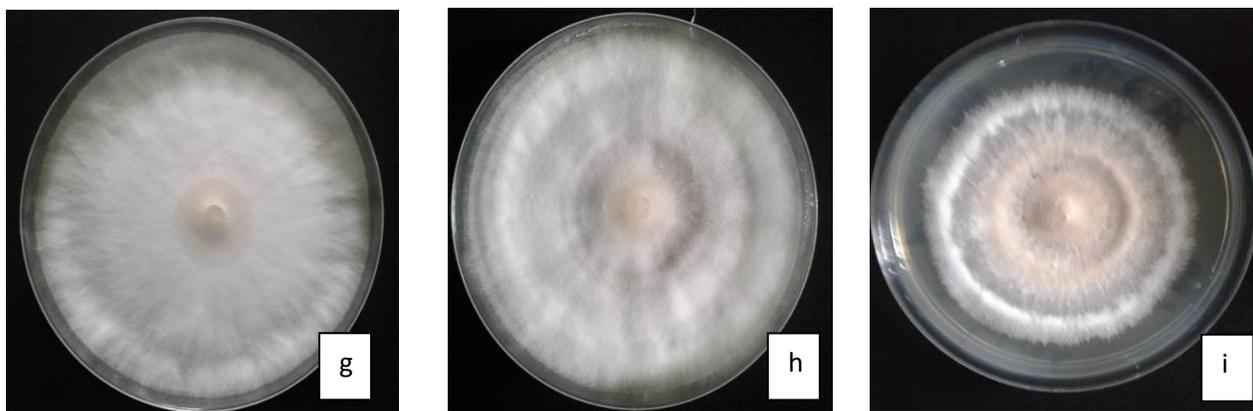


Figura 5. *A. cylindracea* en AEM a 18 °C g. Cepa T. Micelio levemente zonado y aéreo regular. h. Cepa Ag. Micelio abundante zonado y aéreo regular. i. Cepa Ch. Micelio abundante zonado y aéreo escaso.

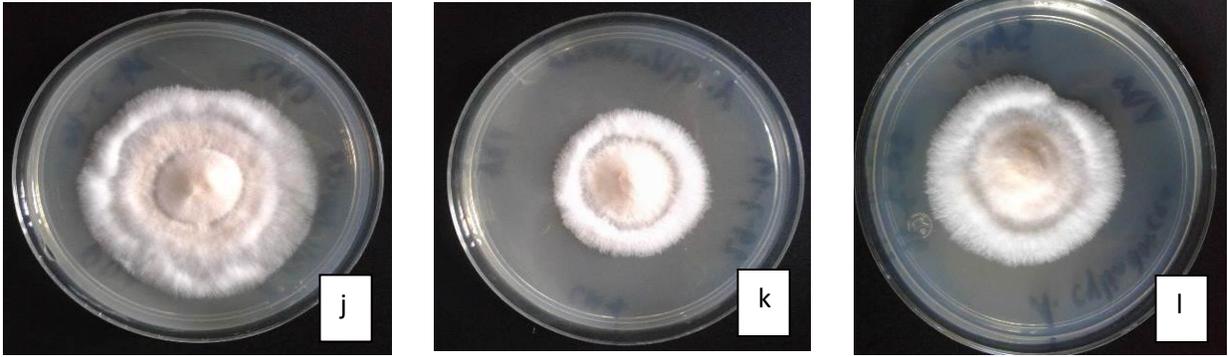


Figura 6. *A. cylindracea* en APD a 18 °C j. Cepa Ag. Micelio abundante zonado y aéreo escaso. k. Cepa Ch. Micelio levemente zonado y aéreo regular. l. Cepa Sl. Micelio levemente zonado y aéreo regular.

C. Características microscópicas de las cepas de *A. cylindracea* en medios de cultivo y temperaturas evaluadas

El análisis de conglomerados congregó tres grupos de cepas según sus características microscópicas a 26°C.

El Grupo 1, formado por las cepas Ch, Sl, Sm, Ag y T en AEM con hifas entre 3 y mayor a 4 μm , con abundantes fíbulas y clamidoconidios escasos.

El Grupo 2, formado por las cepas Ch, Sm, SL y Ag en APD presentaron hifas entre 2 y 3 μm , con regular cantidad de fíbulas y clamidoconidios en regular cantidad.

El Grupo 3, formado por las cepas T en APD, presentó hifas entre 2 y 3 μm con fíbulas en regular cantidad y clamidoconidios escasos (Figura 7).

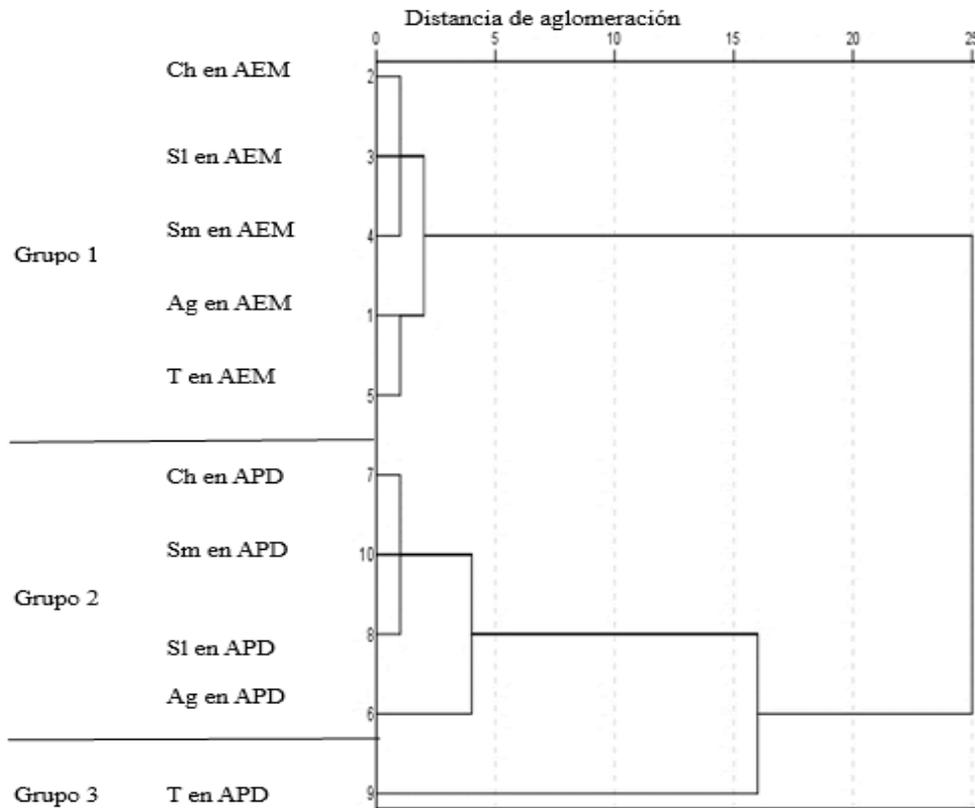


Figura 7. Análisis de conglomerados de características microscópicas de 5 cepas de *A. cylindracea* en AEM y APD a 26°C. El dendrograma se construyó usando distancias euclidianas.

El análisis de conglomerados congregó tres grupos de cepas según sus características microscópicas a 18°C.

En el Grupo 1, formado por las cepas Ag, Ch, Sl y T en AEM, mostraron hifas entre 3 y mayor a 4 μm , con regular cantidad de fíbulas y clamidoconidios.

En el Grupo 2, formado por las cepas Ch, Sm, SL y Ag en APD presentaron hifas menores de 2 y de 3 μm , con fíbulas escasas y clamidioconidios abundantes.

En el Grupo 3 formado por las cepas T en APD, presentaron hifas entre 2 y 3 μm , con fíbulas en regular cantidad y clamidioconidios escasos (Figura 8).

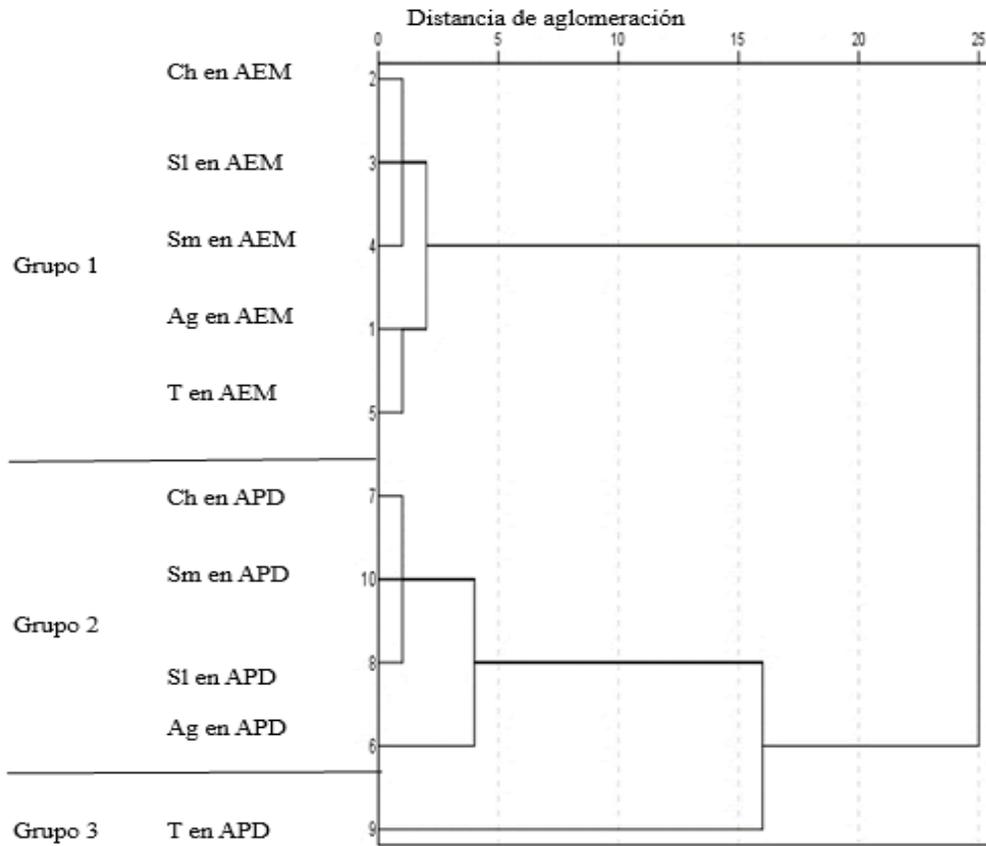


Figura 8. Análisis de conglomerados de características microscópicas de 5 cepas de *A. cylindracea* en AEM y APD a 18°C. El dendrograma se construyó usando distancias euclidianas.

IX. DISCUSIÓN

Guatemala posee gran diversidad de hongos silvestres comestibles, los cuales se consumen en diferentes regiones del país, siendo uno de ellos *A. cylindracea*, (Bran et al., 2009) el cual se utiliza como alimento por personas de las etnias Mam y Kakchiquel (Bran et al., 2003ab; Hostnig et al., 1998).

Dada la importancia de este hongo en el país, en este trabajo se logró aislar el micelio de cinco nuevas cepas las cuales enriquecen el germoplasma fúngico nativo para fines no solo de su estudio *in vitro* sino además por su potencial biotecnológico tanto para la producción de cuerpos fructíferos como para la evaluación de sus propiedades nutricionales así como su actividad biológica, contribuyendo de esta manera al desarrollo económico de comunidades campesinas como fuente alterna de alimento, comercialización y producción de sustancias que se pueden emplear en medicina.

En este estudio, el mejor medio de cultivo para el crecimiento de las cinco cepas guatemaltecas de *A. cylindracea* evaluadas fue AEM. De León, y colaboradores (2012) establecieron que en el medio AEM se produjo la mayor cantidad de micelio (g/25 ml) de las cepas nativas AAG1 y AAG2 a 26°C, por ellos evaluadas. El medio AEM posee carbono en forma de carbohidratos, lo cual ayuda a formar las células fúngicas que tienen la mitad en peso de este elemento (Landecker, 1990). También contiene peptonas que son fuente de nitrógeno requeridas para la adecuada utilización de los nutrientes del medio de cultivo (Boddy, Frankland, y van West, 2007; Bridson, 2002) lo cual en general permiten un buen crecimiento micelial.

Además, la mejor temperatura para el crecimiento micelial de *A. cylindracea* fue a 26°C similar a lo reportado en otros estudios como los realizados por De León, y colaboradores (2012); Reyes, y colaboradores (2011) y Andrade (2007). Sin embargo, contrario a lo anterior, otro estudio reportó que cepas nativas de *A. cylindracea* crecieron mejor a una temperatura de 18°C (Bran, Morales, Álvarez, Flores y Blanco 2007; Bran, et al., 2009). La temperatura es un factor que influye en la velocidad de crecimiento, ya que a 26°C ocurre la mejor selección de la cepa de más rápido desarrollo micelial no así a 18°C, debido a que las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular (Sánchez, 2004). Es posible y aún frecuente que un hongo tenga una temperatura óptima de germinación y que ésta sea diferente de su temperatura óptima de crecimiento micelial o de su temperatura óptima de fructificación (Sánchez, 2001). Cabe mencionar que cuatro cepas evaluadas (Ag, Ch, Sm y T) provienen de la región fría del altiplano del país, sin embargo, crecieron mejor a 26°C lo cual pudo deberse a una adaptación de laboratorio a esa temperatura. Además, es importante mencionar que las cepas evaluadas fueron conservadas entre 4 y 8°C en APD lo que sin embargo no afectó su adaptación a la temperatura antes indicada. La mayoría de micelios disminuye su viabilidad en almacenamiento (Labarére y Bois, 2001; Uhart y Albertó, 2007).

Las cepas Ch, Sm y T presentaron el mayor diámetro de crecimiento micelial en agar AEM, al igual que Ag y Sl, sin embargo, llama la atención que a excepción de la cepa T, no lo

hacen en PDA. Por ello para la producción de biomasa se tendría que usar con esas cepas el agar EMA mientras que con la cepa T se podrían utilizar ambos medios de cultivo, a una temperatura de 26°C. En el estudio realizado por Reyes y colaboradores (2011), concluyeron que las cepas 638.08 y 58.01 de *A. cylindracea* tuvieron una mayor tasa de crecimiento micelial en AEM, al igual que Andrade (2007), que determinó que la cepa 112.2002 de *A. cylindracea* fue la que obtuvo la mayor tasa de crecimiento micelial en el mismo medio.

El análisis de conglomerados estableció que el grupo 1 (cepas Ag, Ch, Sl Sm y T en AEM a 26°C), se caracterizó por mostrar colonias algodonosas, blancas, no zonadas, sin exudado marrón y micelio aéreo abundante, siendo estas las mejores características macroscópicas del crecimiento micelial encontrado. Las condiciones que menos favorecieron las características macroscópicas del crecimiento micelial se presentaron a 18 y 26°C en APD y a 18°C en AEM, entre ellas está el exudado marrón el cual puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios no necesarios para el crecimiento micelial (Sánchez y Royse 2001; Stamets, 1993).

En cuanto a las características microscópicas en el análisis de conglomerados, en el grupo 1 (cepas Ch, Sl, Sm, Ag y T en AEM a 26°C), se encontró que las cepas mostraron abundante cantidad de fíbulas y clamidoconidios con hifas entre 3 y mayor a 4 µm de diámetro, siendo estas las mejores características determinadas. La presencia de fíbulas en todas las cepas, indican el estado dicariótico del micelio y garantizan el mantenimiento de este estado (Chang y Milles, 2004). Las características que menos favorecieron el crecimiento micelial fueron las encontradas el Grupo 2 (cepas Ch, Sm, SL y Ag en APD a 18°C), con hifas entre menor a 2 y 3 µm, fíbulas escasas, pero con clamidoconidios abundantes. Cabe mencionar que los clamidoconidios son estructuras que se forman cuando las condiciones de cultivo son adversas (Chang y Milles, 2004).

Por lo anterior se recomienda el uso de AEM a 26°C para la producción de biomasa de las cepas evaluadas. Así mismo dado el potencial biotecnológico de *A. cylindracea* se recomienda también efectuar ensayos para establecer el análisis proximal de dichas cepas desde el punto de vista nutraceutico y además su actividad biológica.

Por otro lado, se recomienda continuar el aislamiento de nuevas cepas nativas, para asegurar la conservación y mantenimiento del germoplasma de *A. cylindracea* y aprovechar de esta manera el potencial biotecnológico que representa esta especie para Guatemala.

XI. CONCLUSIONES

- El mejor medio de cultivo y temperatura de incubación donde las cepas de *A. cylindracea* presentaron el mayor diámetro de crecimiento micelial fue AEM a 26°C.
- La cepa T de *A. cylindracea* crece bien tanto en agar AEM como en agar PDA.
- Las colonias de las cepas evaluadas en AEM a 26°C (grupo 1 del análisis de conglomerados) presentaron las mejores características de crecimiento micelial con colonias algodonosas, blancas, escasamente zonadas, micelio aéreo abundante, sin exudado, con hifas entre 2 y mayores de 4 μm de diámetro, abundantes fíbulas y escasos clamidoconidios.

XII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de AEM a 26°C para la producción de biomasa de las cepas evaluadas.
- Establecer el pH a la cual las cepas presentan el mejor crecimiento en AEM a 26°C.
- Evaluar el potencial de las cepas estudiadas para la producción de inóculo y de basidiomas a nivel de sustrato.
- Determinar el análisis proximal de las cepas nativas evaluadas para establecer su potencial nutracéutico.
- Evaluar el potencial biotecnológico de las cepas estudiadas en cuanto a la producción de metabolitos y su utilidad bioactiva (antioxidantes, anti hipertensivos, hipoglucemiantes).
- Continuar con el aislamiento de nuevas cepas nativas de *A. cylindracea* para enriquecer de esta manera el germoplasma fúngico de esta especie en Guatemala.

XIII. REFERENCIAS

- Andrade, C. (2007). *Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro y producción de inóculo en paja y granos de trigo de Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1,2,3..... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Boddy, L., Frankland, J., & van West, P. (2007). *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Amsterdam: Academic Press.
- Bridson, E. (2002). *Oxoid Manual*. Liverpool: Wade Road.
- Bran, M., Morales, O., Cáceres, R. y Flores, R. (2003a). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. *Revista Científica*, 1(1), 2-24.
- Bran, M., Morales, O., Flores, R., Rodríguez, E., Salazar, J., Cáceres, R.,...Arriola, H. (2003b). *Hongos comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III)* (Inf-2003-030). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Morales, O., Cáceres, R., Flores, R., Álvarez, G., Mazariegos, A. y Quan, L. (2005). (Inf-2005). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. *Producción de inóculo de cepas nativas para estimular el cultivo de hongos comestibles en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización* (Inf-2005). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Morales, O., Álvarez, G., Flores, R. y Blanco, R. (2007). *Caracterización in vitro y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de Neolentinus ponderosus y N. lepideus comercialización* (Inf-2007-019). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R. y Gurriarán, N. (2009). *Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx'yol B'aqman (Agrocybe cylindracea (DC.: Fr.) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos* (Inf -2009-045). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Cáceres, R., Morales, O., Gurriarán, N. y Flores, R. (2012). *Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos de cepas guatemaltecas del hongo comestible Rukoxil Tunay Che' (Agrocybe cylindracea (DC.: Fr.) Maire) en diferentes sustratos*

- (Inf- 2012-035). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Cáceres, R. y Morales, O. (2012). Cultivo de hongos comestibles silvestres en Guatemala: Investigación y transferencia de tecnología. (Pp de 269-280). En Sánchez, J. y Mata, G.(Eds.) *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. Tapachula: El colegio de la frontera sur- El Instituto de Ecología.
- Bran, M., Cáceres, R., Morales, O., Gurriarán, N. y Flores, R. (2014). Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos de cepas guatemaltecas del hongo comestible Rukoxil Tunay Che' (*Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire) en diferentes sustratos. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 1(1), 35-42.
- Bran, M., Cáceres, R., Gurriarán, N., Morales, O. y Flores, R. (2015a). *Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Panq'ooq' (Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke) (Inf-2014-037). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Bran, M., Cáceres, R., Gurriarán, N., Morales, O. y Flores, R. (2015b). Caracterización *in vitro* y producción de inóculo de cepas guatemaltecas de *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke. *Ciencia, tecnología y salud*, 2(2), 95-104.
- Carlile, M., Watkinson, S. & Gooday, G. (2004). *The Fungi*. (4th Ed). London: Academic Press.
- Chang S. & Miles P. (2004). *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. (2nd ed). Boca Raton: CRC Press.
- De León, R., Guzmán, G. y Martínez-Carrera, D. (1988). Planta productora de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) en Guatemala. *Revista Mexicana de Micología*, 4, 297-301.
- De León, R. (2003). Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Micología Aplicada Internacional*, 15(1), 31-35.
- De León, R., Lau, D., Vallejo, R. y Klee, C. (2012). Requerimientos fisiológicos que inciden en el crecimiento micelial y la degradación del sustrato por *Agrocybe aegerita*. (pp de 241-254). En Sánchez, J. y Mata, G. (Eds). *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. Tapachula: El colegio de la frontera sur- El Instituto de Ecología.
- Espeja, P. (2016). *Diseño de la peroxidasa inespecífica de Agrocybe aegerita mediante evolución dirigida: Expresión funcional en levaduras y síntesis de 1-Naftol*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, España.

- Fedotov, O. (2017). Condition of the peroxidant-antioxidant system of some strains of Basidiomycetes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 77–83.
- González, F. (2016). *Determinación de las características de cultivo in vitro y producción de inóculo de una cepa guatemalteca de Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Hostnig, R., Hostnig, R y Vásquez, L. (1998). *Etnobotánica Mam*. Guatemala: GTZ.
- Index Fungorum (2015): Recuperado de <http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=550605>
- Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Panm Y., Bianli, G... Sun, H. (2012). A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochemical Journal*, 443(12), 369-378.
- Kiho, T., Yoshida, I., Nagai, K. & Ukai, S. (1989). (1-3)-a-D-Glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its o-carboxymethylated derivatives. *Carbohydrate Research*, 189, 273-279.
- Kiho, T., Sobue, S., Ukai, S. 1994. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. *Carbohydr. Res.* 251: 81–87.
- Kim, H. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*, 96, 1175-1182.
- Kirk, P., Camon, P., Monter, D., & Stalper, J. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th.Ed). Trowbringe. Cromwell Pres.
- Labarére, J. y Bois, F. (2001). La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* (En Sanchez, J & Royse, D. La biología y el cultivo de *Pleurotus* sp. México: ECOSUR-UTHEA. 114.
- Landecker, E. (1990). *Fundamentals of the fungi*. 3rd ed.: Prentice-Hall. 171, 213, 275-303.
- Liu, M., Jing, J., Zhang, J., Che, G., Zhou, M., Gao, Z., ...Liu, Y. (2016). Optimization of mycelia selenium polysaccharide extraction from *Agrocybe cylindracea* SL-02 and assessment of their antioxidant and anti-ageing activities. *PlosOne*, 11(8), e0160799.
- Lee, I., Yun, B. & Yoo, I. (1998). A nucleoside with lipid peroxidation inhibitory activity from *Agrocybe cylindracea*. *Korean Society for Applied Microbiology*, 26(6), 558-561.

- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A. & Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84,201-206.
- Méndez, L. (2017). *Evaluación del cultivo de cepas nativas de Agrocybe cylindracea en agar extracto de malta a pH 7-12*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. (2002). Hongos microscópicos saprobios y parásitos: *métodos de laboratorio*. Cd. de México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales, O. (2001). *Estudio etnomicológico de la municipalidad de Tecpán Guatemala, Chimaltenango*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala
- Morales, O., Bran, M. y Cáceres, R. (2010). Los hongos comestibles de uso tradicional en Guatemala. En D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, V. Mora (Eds.). *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción – consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el Siglo XXI*. (pp. 437-464). Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales.
- Niedzielski, P., Mleczek, M., Budka, A., Rzymiski, P., Siwulski, M., Jasińska, A., Gąsecka, M., Budzyńska, S. (2017). A screening study of elemental composition in 12 marketable mushroom species accessible in Poland. *Eur Food Res Technol*.243: 1759
- Nobles, M. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 43(9), 1097-1139.
- Ngai P.H.K., Zhao, Z.,Ng, T.B. (2005). Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26(2), 191-196.
- Pinagel, D. (2009). *Nutracéutica de Agrocybe cylindracea (DC.:Fr.) Maire*. (Tesis de Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Reyes, C., Bran, M. y Morales, O. (2011). Evaluación del crecimiento miceliar de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH. *Revista Científica*, 21(2), 56-61.
- Sánchez, J. y Royse (2001). Crecimiento y fructificación. *En: La biología y el cultivo de Pleurotus spp*. Ed. Limusa, S. A. México. 294p. p59.
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushrooms culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 756-762.
- Stamets, P. (1993). *Growing gourmet & medicinal mushrooms*. Berkeley: Ten Speed Press & Mycomedia.

- Sun, H., Zhao, C., Tong, X & Qi Y. (2003). A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2), 214-222.
- Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, K. & Negishi, T. (2005). Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 586(2), 115-123.
- Tsai, S., Huang, S. & Mau, J. (2006). Antioxidant properties of hot water extracts for *Agrocybe cylindracea*. *Food Chemistry*, 98,670-677.
- Uhart, M. & Albertó, A (2007). Morphologic characterisation of *Agrocybe cylindracea* (basidiomycetes agaricales) from America, Europe and Asia. *Revista Mexicana de Micología*, 24, 9-18.
- Wang, Q., Wang, F., Zhenghong, X., Zhongyang D. (2017). Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. *Molecules*, 22, 955.
- Watling, R., (1992). Observations on the *Bolbitiaceae* – 30. Some Brazilian taxa. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 28(1-4), 77-103.
- Webster, J., & Weber, S. (2007). Introduction of fungus. Cambridge. University Press.
- Wong, W., Ng, T., Hui, M., Cheung, R., Chan, Y., Dan, X., & Wang, H.(2017). Screening of aqueous and organic extracts from a variety of fungi for their ability to antagonise the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Hong Kong Medical Journal*, 22(7), 26-9.
- Yoshida, I., Kiho, T., Usui, S., Sakushima, M., & Ukai, S. (1996). Polysaccharides in fungi. xxxv. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1-3)- α -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1(19), 114- 121.
- Zhao, C., Sun, H., Tong, X. & Qi, Y. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*, 374, 321-327.

Mario Rodolfo Tejada Escobar
Autor

Lic. Roberto Agustín Cáceres Staackmann
Asesor

Lic. María del Carmen Bran González
Asesor

Msc. Osberth Morales
Revisor

Msc. Osberth Morales
Director de Escuela de Química Biológica

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano