



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS –IIQB-**

Caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*

COORDINADORA

Licda. María del Carmen Bran González

INVESTIGADORES

**Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú**

AUXILIARES DE INVESTIGACIÓN

**Br. Roberto Agustín Cáceres Staackmann
Br. Rodrigo Blanco Estrada**

**Inicio de la Investigación: Enero de 2007
Conclusión de la investigación: Diciembre de 2007**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS –IIQB-**

Caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*

COORDINADORA

Licda. María del Carmen Bran González

INVESTIGADORES

**Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú**

AUXILIARES DE INVESTIGACIÓN

**Br. Roberto Agustín Cáceres Staackmann
Br. Rodrigo Blanco Estrada**

**Inicio de la Investigación: Enero de 2007
Conclusión de la investigación: Diciembre de 2007**

ÍNDICE

	Contenido	Página
I	Resumen	1
II	Introducción	2
III	Antecedentes	3
IV	Justificación	9
V	Objetivos	10
VI	Hipótesis	11
VII	Metodología	12
VIII	Resultados	15
IX	Discusión	38
X	Conclusiones	43
XI	Recomendaciones	46
XII	Bibliografía	47
XIII	Anexos	50

I. RESUMEN

Guatemala es un país con una alta biodiversidad, sin embargo, la deforestación, el avance de la frontera agrícola y otros factores similares están contribuyendo al deterioro de los ecosistemas en los que se desarrollan las diversas especies de hongos comestibles, que es necesario proteger y mejorar para su utilización en beneficio del país.

En el país existe una gran variedad de hongos comestibles que crecen en diferentes ecosistemas. Dentro de éstos hongos comestibles, se encuentran 70 especies que se consumen en 21 localidades del país, incluyendo dos del género *Neolentinus*, siendo ellas *N. ponderosus* y *N. lepideus*.

Neolentinus ponderosus y *N. lepideus*, se desarrollan sobre madera de coníferas, especialmente de *Pinus* spp y son objeto de consumo y venta en las regiones de Huehuetenango y Totonicapán, en donde se les conoce con los nombres de kulich, xikin chaj y hongo de verano, entre otros. Sin embargo, a pesar de la factibilidad de su cultivo, utilizando para ello la gran cantidad de residuos de madera de pino que genera la industria maderera en el país, estas dos especies han sido poco estudiadas.

Actualmente en Guatemala, gracias al financiamiento otorgado por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han sentado las bases para el inicio de los estudios sobre *Neolentinus* y ya se ha trabajado su conocimiento tradicional, taxonomía, aislamiento de germoplasma (cepas) y pruebas preliminares para determinar la producción de inóculo y eficiencia biológica (Bran, *et al*, 2003a).

Por tal motivo, fue necesario describir las características miceliales de cultivo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Neolentinus* y determinar el medio y la temperatura donde éstas presentaran un mejor desarrollo. Además evaluar la producción de inóculo, determinando el mejor sustrato como vehículo y aquella temperatura donde las cepas presentaran un mejor crecimiento. Asimismo, evaluar la productividad de dichas cepas, para conocer la eficiencia biológica y tasa de producción.

Al respecto, para la cepa *N. ponderosus* 02.02, el mejor crecimiento miceliar se obtuvo en el medio EMA a 26°C. La producción de inóculo se logró en menor tiempo en el sustrato de aserrín de pino a la misma temperatura, mientras que la mayor eficiencia biológica y tasa de producción fue encontrada en el sustrato F3 (madera de pino: aserrín más viruta), enriquecida con 5% de salvado de arroz, a temperatura ambiente.

Para las cepas *N. ponderosus* 02.03, 145.02 y *N. lepideus* 90.02, el crecimiento miceliar se evidenció en el medio EMA a 26°C. La producción de inóculo se llevó a cabo en menor tiempo en granos de trigo a esa misma temperatura y la mayor eficiencia biológica y tasa de producción fue obtenida en el sustrato F3.

II. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país con una alta biodiversidad, sin embargo, la deforestación, el avance de la frontera agrícola y otros factores similares están contribuyendo al deterioro de los ecosistemas en los que se desarrollan las diversas especies de hongos comestibles, que es necesario proteger y mejorar para su utilización en beneficio del país (Bran, et al, 2002).

Aunado a ello, la pobreza y el aumento poblacional, hacen necesario crear alternativas que provean fuentes alimenticias y económicas que contribuyan al desarrollo de las comunidades campesinas y que además conlleven a la conservación de los ecosistemas donde crecen los hongos, buscando con ello, un adecuado manejo del recurso fúngico mediante el cultivo de hongos comestibles sobre desechos agroindustriales, con miras al uso de la diversidad fúngica nativa, como estrategia sostenible de los recursos naturales y como parte integral de los sistemas culturales (Bran, et al, 2002).

Los recursos genéticos de los hongos tienen un alto interés para la alimentación humana y animal. La recolecta de hongos comestibles, involucra la bioprospección, el estudio, la conservación, y el uso de cepas de este género con diferentes finalidades y objetivos, en aspectos de investigación ambiental, agrícola, farmacéutica y taxonómica (Bull, et al, 2000). En este sentido, los procesos de bioprospección, tienen características que involucran la interacción entre el conocimiento tradicional, que poseen las comunidades locales e indígenas y las actividades comerciales propias de industrias relacionadas con productos derivados de la biodiversidad. En esta interacción, emergen otra serie de actores como las Universidades y otras entidades de investigación (Duarte, et al, 2006).

Neolentinus ponderosus y *N. lepideus*, son especies de reconocida comestibilidad. La primera, se encuentra desde Guatemala hasta Estados Unidos y la segunda, en América y Europa (Pegler, 1983). En nuestro país, se encuentran creciendo sobre madera de coníferas y son objeto de consumo y venta en las regiones de Huehuetenango y Totonicapán, en donde se les conoce con los nombres de kulich, xikin chaj y hongo de verano, entre otros (Bran, et al, 2003a). A pesar de la factibilidad de su cultivo, utilizando la gran cantidad de residuos de madera de pino que genera la industria maderera en el país, estas dos especies han sido poco estudiadas.

Actualmente en Guatemala, gracias al financiamiento otorgado por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han sentado las bases para el inicio de los estudios sobre *Neolentinus* y ya se ha trabajado su conocimiento tradicional, taxonomía, aislamiento de germoplasma (cepas) y pruebas preliminares para determinar la producción de inóculo y eficiencia biológica (Bran, et al, 2003a). Sin embargo, si bien, dichos estudios han proporcionado importante información, resultan incipientes y aún es necesario conocer las cepas aisladas caracterizándolas *in vitro*, así como mejorar su productividad para fines de producción en comunidades campesinas, como una alternativa alimenticia, comercial y potencialmente medicinal.

III. ANTECEDENTES

1. Marco conceptual:

A. Los hongos

Los hongos forman un grupo taxonómico diferente a plantas y animales, al cual se le denomina Reino Fungi. Se diferencian del resto de los organismos vivos, en su estructura microscópica a base de hifas, en su carácter perenne y en sus procesos de reproducción a través de esporas sexuales y asexuales (Alexopoulos, *et al*, 1996, Guzmán, 2003). La clasificación actual de este reino, se basa en las relaciones evolutivas de los grupos de organismos correspondientes a linajes monofiléticos y se incluyen en cuatro *Phyla*: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Alexopoulos, *et al*, 1996, Guarro, *et al*, 1999).

Los hongos se cuentan entre los organismos más importantes del mundo, no solamente por su papel vital en el funcionamiento del ecosistema, sino también por su influencia en los humanos y en actividades relacionadas con él. También son esenciales en la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente. Algunas especies son patógenas de plantas y animales y otras forman simbiosis con diversas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales (Mueller, *et al*, 2004).

Se ha estimado que podrían existir 1.5 millones de especies en este reino (Hawksworth, 1991, 2001) y, de ellas, aproximadamente 140,000 producen cuerpos fructíferos de tamaño y estructura suficiente para ser consideradas macrohongos, muchas de las cuales se cultivan o se recolectan para alimento (Chang & Miles, 2004)

B. Los hongos comestibles

La comestibilidad de los hongos es conocida por los humanos 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 (Chang & Miles, 2004).

Hasta el año 2003, en Guatemala se han reportado 70 especies de hongos comestibles. Entre ellas se cuentan dos especies del género *Neolentinus*: *N. ponderosus* y *N. lepideus*, cuyo valor culinario y comercial es aprovechado por los habitantes de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango y aldeas de Totonicapán. Estos hongos pueden ser utilizados como una alternativa alimenticia, a pequeña, mediana y gran escala, aplicando una tecnología sustentable (Bran, *et al*, 2002, 2003a y 2003b).

C. Cultivo de hongos comestibles

Actualmente en el mundo, se han estudiado para fines de cultivo, alrededor 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 *Agaricus bisporus/bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.*, *Auricularia spp*, *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizyugus marmoreus*, *Pholiota nameko* y *Grifola frondosa*. En años recientes, se cultivan también varias nuevas especies de hongos comestibles,

entre ellos, *Hericium erinaceus*, *Dictyophora indusiata*, *Stropharia rugoso-anulata*, *Lepista nuda*, *Agrocybe aegerita*, *A. cylindraceae*, *Pleurotus citrinopileatus* y *Cantharellus cibarius* (Chang & Miles, 2004).

El cultivo de hongos se ha popularizado en todo el mundo. En 1999, la producción mundial de hongos cultivados fue estimada en más de 7 millones de toneladas. La producción mundial de hongos se ha incrementado durante las últimas dos décadas, de 1.2 millones de toneladas en 1981 a 6.2 en 1997, siendo China el más grande productor, consumidor y exportador de hongos (Chang & Miles, 2004).

La Argentina fue el primer país que en la década de los 50 producía hongos comestibles en Iberoamérica, habiendo mantenido su producción anual entre 1000 a 1200 toneladas en los últimos 3 años. Aunque la producción aumentó notablemente en el quinquenio 1985-1990 pasando de 700 a 1200 toneladas. Algunos estudios muy recientes del mercado argentino indican que es posible elevar esta producción a prácticamente el doble de la actual con un consumo asegurado. Como se ha indicado anteriormente en todo el mundo se observa un explosivo avance del consumo de hongos comestibles (Deschamps, 2003).

En México y particularmente en Chiapas, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. se visualiza como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la falta de alimento y la contaminación ambiental por desechos orgánicos de origen agroindustrial (Guillén-Navarro, *et al*, 1998).

El cultivo de hongos con fines comerciales ha sido poco explotado en Guatemala. En 1977 se produjo *Agaricus bisporus* (Champiñón) en pequeña escala. En la década de los setentas esta actividad se estableció en escala comercial. La producción de *Agaricus* en Guatemala, oscila alrededor de las 68,504 kg/año, el 70% de esta producción se consume en el país y el 30% se exporta a El Salvador y Honduras (De León, 2003).

En 1984 se estableció en el país el cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake), usando aserrín de encino (*Quercus*) como sustrato. Se calcula que se producen 34,020 kg/año, de los cuales se exporta el 80% y solamente el 20% se comercializa en Guatemala (De León, 2003).

La producción comercial de *Pleurotus* dio inicio en 1986, calculándose la producción en 29,580 kg/año. La mayor parte de la producción se consume en Guatemala (90%) y una pequeña proporción (10%) se exporta a El Salvador y Honduras (De León, 2003). Es importante mencionar que las cepas cultivadas son de origen extranjero y no cepas guatemaltecas.

Sobre el cultivo de cepas nativas de hongos, se han realizado estudios sobre la producción en cultivo *in vitro* de cuerpos fructíferos de una cepa guatemalteca de *Auricularia* aff. *fuscosuccinea* proveniente de una finca del municipio de San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos (12). De igual forma, se han efectuado estudios sobre la fisiología del crecimiento miceliar de cepas guatemaltecas y extranjeras de *Agrocybe aegerita* (Lau, 2001, Vallejo, 2002).

A través de las fases desarrolladas del proyecto Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad cultivo y nomenclatura vernácula (años 2001 a 2004), se han aislado más de 40 cepas de hongos comestibles nativos, entre las que se cuentan varias especies de los géneros *Pleurotus*,

Neolentinus, *Agrocybe*, *Lepista*, *Auricularia*, *Suillus*, *Lactarius*, *Polyporus*, *Schizophyllum*, entre otras. Se ha logrado producir cuerpos fructíferos de 12 cepas, entre *Neolentinus* y *Pleurotus*, determinándose que varias cepas de *Pleurotus* poseen eficiencias biológicas (EB) significativas cuando se cultivan sobre diferentes sustratos (Bran, *et al*, 2003a, 2004).

También, varias especies de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. levis*), fueron cultivadas a nivel artesanal en 205 módulos ubicados en el occidente del país, logrando producir alrededor de 1,200 libras durante el año 2005 (Bran, *et al*, 2005).

Por otra parte, a partir de dos cepas nativas de *P. djamor* y dos de *P. ostreatus*, se obtuvieron tres cruza mejoradas en cuanto a su crecimiento miceliar y eficiencia biológica sobre el sustrato de olote de maíz, a través del entrecruzamiento de micelio monocariótico. Dichas cepas mejoradas se consideran promisorias para su cultivo en comunidades rurales (Bran, *et al*, 2006).

D. El género *Neolentinus*

Anteriormente, las especies que conforman el género *Neolentinus* estuvieron incluidas dentro del género *Lentinus* (Pegler, 1983). Sin embargo, Redhead & Ginns (Redhead & Ginns, 1985), indicaron que si bien, las especies de *Neolentinus* no tienen diferencias microscópicas significativas con las de *Lentinus*, el primero causa pudrición café en la madera y el segundo causa pudrición blanca. Esta característica permitió separar ambos géneros (Redhead & Ginns, 1985).

Estudios filogenéticos indicaron además, que los hongos pleurotoides-lentinoides pueden separarse en cuatro clados, correspondientes a *Pleurotus*, *Lentinus*, *Panus* y *Neolentinus* (Lechner & Wright, 2002, Lechner, *et al*, 2004).

Neolentinus se clasifica taxonómicamente de la manera siguiente (Hawksworth, *et al*, 1995):

Reino: FUNGI
Phylum: Basidiomycota
Clase: Basidiomycetes
Subclase: Agaricomycetidae
Orden: Polyporales
Familia: *Polyporaceae*
Género: *Neolentinus* Redhead & Ginns, 1985

1. Características morfológicas:

a. Características macroscópicas y microscópicas:

La morfología del género es extremadamente variable, en la mayoría de los casos, el basidiocarpo tiene un estípite bien desarrollado, en posición central, el cual se continúa con el píleo. El basidiocarpo puede ser grande y robusto en especies tales como *N. lepideus* y *N. ponderosus* (Pegler, 1983).

La superficie del píleo está esencialmente formada por un epicutis; en muchos casos el píleo es fibriloso radialmente, escamoso o densamente piloso. El pileipellis usualmente está formado por hifas generativas, con fibulas, aunque es frecuente encontrar hifas esclerificadas especialmente hacia el centro del píleo (Redhead & Ginns, 1985).

El himenio es lamelar, decurrente al estípite. Las láminas son triangulares en sección. Muchas especies desarrollan anastomosis e intervenaciones, resultando en una condición subporoide que posiblemente indique un ancestro polyporal. Trama lamelar regular (Redhead & Ginns, 1985).

El sistema hifal generalmente es dimítico, aunque algunas especies pueden presentar un sistema trimítico. El tipo de hifas secundarias, está constituido por hifas generativas y esqueléticas o ligadoras-esqueléticas (Pegler, 1983).

Las basidiosporas generalmente son cilíndricas, hialinas, inamiloides, no dextrinoides, de pared delgada y lisa (Pegler, 1983).

2. Hábitat y distribución

a. Mundial:

Algunas especies de *Neolentinus*, son de amplia distribución. *N. lepideus* se encuentra en Europa, Asia y América del Norte, creciendo usualmente sobre troncos y raíces muertas de coníferas, especialmente sobre *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Larix* y *Sequoia*, aunque existen reportes que indican que se le ha encontrado creciendo ocasionalmente sobre *Quercus* y *Ulmus* (Pegler, 1983).

N. ponderosus, es una especie que se encuentra en la región Pacífico-Noroeste de América del Norte, también se ha reportado de México (Pegler, 1983, Moreno-Fuentes, *et al*, 1996). Se encuentra creciendo sobre troncos podridos de coníferas, especialmente sobre *Pinus ponderosa* Dougl. (Pegler, 1983). En México se ha recolectado sobre troncos de pino (*Pinus* spp) o encino (*Quercus* spp) en tiempos secos (mayo y junio), con un poco de humedad en el suelo (Moreno-Fuentes, *et al*, 1996).

En Argentina, recientemente se reportó *N. schaefferi*, creciendo sobre troncos de *Fraxinus* (Lechner, 2002).

b. Guatemala:

En el país se han reportado dos especies: *Neolentinus lepideus* (Fr.: Fr.) Redhead & Ginns, que fue recolectado en Chuipachec, Totonicapán, sobre troncos de *P. pseudostrobus*; y, *Neolentinus ponderosus* (Miller) Redhead & Ginns, que se recolectó en el municipio de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango, creciendo sobre troncos de *Pinus tecunumanii* y *P. pseudostrobus* (Bran, *et al*, 2003b).

3. Etnomicología

En Guatemala, las especies del género *Neolentinus* se conocen hasta ahora, con los nombres vernáculos de xikin chaj (idioma K'iche') u oreja de pino (*Neolentinus lepideus*) en Totonicapán y kulich (idioma Chuj) u hongo de verano (*N. ponderosus*) en el municipio de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango. Ambas especies se recolectan durante el final de la época seca (marzo a abril) (Bran, *et al*, 2003a). En particular, *N. ponderosus* es objeto de venta en los mercados de San Mateo Ixtatán, Bulej (San Mateo Ixtatán), Paleguá (Nentón), Santa Cruz Barillas y Santa Eulalia (Huehuetenango), a un precio de Q20.0 a Q25.0 la libra (Morales, O., comunicación personal).

Los indígenas en la región de Bacusinare, municipio de Guazapares, Chihuahua, México, conocen el hongo comestible Kuté-mo'kó-a (dialecto tarahumara) u "hongo del troncón". Se ha determinado que por sus características morfológicas corresponden a la especie de *Neolentinus ponderosus*. Este hongo se recolecta antes de las lluvias y se consume solamente el píleo (Moreno-Fuentes, *et al*, 1996).

2. Marco referencial:

a. Estudios sobre el cultivo de *Neolentinus*

Se tiene poca información sobre las características miceliarias de cultivo de las especies de *Neolentinus*, aunque se pueden mencionar las siguientes:

1. Estados Unidos:

Se estudió una cepa de *N. ponderosus*, la cual presentó un diámetro entre 78 y 89 mm a los 14 días de incubación, con textura algodonosa, color blanco, con hifas radiadas hacia el margen. Olor afrutado (Miller, 1965).

2. México:

La cepa mexicana de *N. lepideus*, IE-133, se estudió sobre tres medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud dextrosa (SDA) y agar extracto de malta (MEA), incubándolos a 20, 22.5, 25 y 27°C. El mejor crecimiento se observó a 27.5°C en el medio PDA (Gaitán-Hernández, *et al*, 1995).

Esta misma cepa, en agar ADP-IM (agar papa dextrosa con infusión de madera de *Pinus montezumae*), presentó densidad baja a muy alta, textura sedosa y flocosa y puede presentar agregaciones hifales. En algunas cepas se detectó la formación de primordios, un olor parecido al bálsamo del Perú y cambio a un color café oscuro en el agar (Gaitán-Hernández, 2000).

Se evaluó la potencialidad de cultivo de dos cepas silvestres de *N. lepideus* y *N. ponderosus* utilizando como medios de cultivo agar extracto de malta y agar papa dextrosa, se obtuvo un crecimiento adecuado de las dos cepas, en los medios utilizados. En las pruebas llevadas a cabo en semillas y otros sustratos, se observó un desarrollo miceliar adecuado en granos de trigo y crecimiento lento en paja de trigo, en ambas especies (Palacios, 2000).

También se caracterizaron y seleccionaron cepas más productivas de *N. suffrutescens*, por medio de entrecruzamiento y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. Se obtuvieron como resultado 15 cepas intraespecimen del entrecruzamiento de 12 aislamientos monospóricos, observándose crecimiento miceliar a los 12 días de incubación. La eficiencia biológica varió de 4.85 a 14.60% y la tasa de producción fue de 0.07 a 0.19% sobre madera de *Pinus* spp. Sobre viruta de *P. montezumae* Lambert se obtuvo una eficiencia biológica de 4.41 a 14.92% y una tasa de producción de 0.06 a 0.23%. Los resultados obtenidos son de importancia debido a que este hongo ha sido poco estudiado y posee una alta factibilidad de cultivo (Gaitán-Hernández, 2000).

3. Argentina:

Las colonias de *Neolentinus schaefferi*, presentaron micelio que cubre las cajas de petri de 90 mm en 4 a 5 semanas, creciendo uniformemente, color blanquecino, lisas a aterciopeladas. Después de 4 semanas, las colonias tienden a formar conglomerados en la parte media y margen. El margen es regular, compacto al principio y poco definido después de 2 a 3 semanas. Reverso sin pigmento. Olor a derivados de la urea. No produce basidiocarpos durante ese período. Hifas hialinas, con fíbulas, de 2 a 5 μm de diámetro. Clamidosporas terminales o intercalares de 11.5-19.5 x 8.0-8.5 μm (Lechner, 2002).

4. Guatemala:

Se determinó que varias cepas de *Neolentinus* tienen tiempos de producción de inóculo en un rango de 80 días (*N. lepideus*) y 241 días (*N. ponderosus*) en sorgo. Las eficiencias biológicas variaron entre el 18% (*N. lepideus*) y 32 % (*N. ponderosus*) sobre aserrín de pino, observándose que es necesaria la suplementación de este sustrato con salvado de arroz al 5%, para lograr la producción de cuerpos fructíferos en *N. ponderosus*. Sin embargo, las eficiencias fueron muy bajas (Bran, *et al*, 2003a).

b. Estudios sobre las propiedades medicinales de *Neolentinus lepideus*

A partir de un extracto de *N. lepideus* soluble en agua, se aisló el compuesto PG101, el cual incrementó los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucinas 1, 10 y 12 (IL-1, IL-10, IL-12). El PG101, demostró tener un gran potencial como inmunomodulador terapéutico (Jin, *et al*, 2003a). Este compuesto tiene también potencial biológico al modificar las actividades selectivas de citocinas *in vitro*, principalmente para controlar la transcripción del factor NF-kB, el cual controla la expresión del TNF, IL-1, IL-10, IL-12, IL-18. Estos resultados sugirieron la potencialidad del PG101 como un inmunoestimulante durante la radioterapia y/o quimioterapia (Jin, *et al*, 2003b).

IV. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de hongos comestibles adquiere cada vez mayor importancia en el mundo. Para Guatemala representa una alternativa que generaría ventajas bien definidas tanto en el campo ecológico como en el socio-económico, porque además de constituir una opción alimenticia para la población, representa un sistema de producción limpio en el cual se contribuye no sólo a utilizar los desechos agroforestales que pueden contaminar el medio ambiente, sino que además se reutilizan los residuos que quedan después del cultivo (Bran, *et al*, 2002).

Por otra parte, en el país existe una gran variedad de hongos comestibles que crecen en diferentes ecosistemas. Dentro de éstos hongos comestibles, se encuentran 70 especies que se consumen en 21 localidades del país, incluyendo dos del género *Neolentinus* siendo ellas *N. ponderosus* y *N. lepideus* (Bran, *et al*, 2003b).

Estas especies nativas, pueden ser aprovechadas para el desarrollo económico y alimenticio de comunidades rurales, para que en el futuro, los integrantes de las mismas sean capaces de generar en pequeñas unidades de producción artesanal, una fuente alterna de alimento, ya que son conocedoras y consumidoras de distintas especies de hongos silvestres, pero desconocen las técnicas de su domesticación (Palacios, 2000).

Por tal motivo, se hace muy necesario describir las características miceliares de cultivo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Neolentinus* y determinar el medio y la temperatura donde éstas presentaran un mejor desarrollo. Además evaluar la producción de inóculo, determinando el mejor sustrato como vehículo y aquella temperatura donde las cepas presentaran un mejor crecimiento. Asimismo, evaluar la productividad de dichas cepas, para conocer la eficiencia biológica y tasa de producción.

V. OBJETIVOS

2. General:

Documentar el comportamiento de cepas nativas de *Neolentinus* spp. en diferentes medios de cultivo *in vitro* y sustratos utilizados como vehículo, a diferentes temperaturas, así como evaluar su productividad.

2. Específicos:

- a. Determinar el medio de cultivo y la temperatura de incubación donde las cepas presenten un mejor crecimiento, a través de la evaluación de la tasa radial de crecimiento.
- b. Describir 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.
- c. Evaluar la producción de inóculo sobre diferentes sustratos y temperaturas, a través de la determinación del tiempo de colonización miceliar.
- d. Cuantificar la eficiencia biológica y la tasa de producción, para evaluar la productividad de las cepas sobre diferentes sustratos.

VI. HIPÓTESIS

1. Las cepas de *Neolentinus* spp evidencian una mayor tasa radial de crecimiento en por lo menos en un medio de cultivo y una temperatura a estudiar.
2. El tiempo de colonización de las cepas de *Neolentinus* spp para la producción de inóculo, es menor sobre granos de sorgo en por lo menos una temperatura a evaluar.
3. La eficiencia biológica y la tasa de producción de las cepas de *Neolentinus* spp, presentan valores mayores al 50% y 0.5 EB/día, respectivamente, al ser cultivadas sobre aserrín de pino más salvado de arroz al 10%.

VII. METODOLOGÍA

1. Revitalización de las cepas:

- Revitalización de las cepas (*N. lepideus* 90.2002, *N. ponderosus* 02.2002, 145.2002 y 02.2003), sembrándolas en agar PDA e incubándolas a 26°C, por 15 días.

2. Determinación de la tasa radial de crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas y medios de cultivo:

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Gaitán-Hernández, *et al*, (2000) y Mier, *et al*, (2002).

a. Tasa radial de crecimiento:

- Preparar los medios de cultivo: Agar papa dextrosa (PDA) y agar con extracto de malta (EMA) con infusión de madera de pino triste (PDA-P) (la infusión se preparará hirviendo 45 g de viruta de madera de *Pinus pseudostrabus* en 1500 ml de agua destilada) y agar papa dextrosa con infusión de pino rojo (PDA-T) (la infusión se preparará hirviendo 45 g de viruta de madera de *Pinus tecunumanii* en 1500 ml de agua destilada), agar papa dextrosa (PDA) y agar con extracto de malta (EMA).
- Esterilizar los medios por 15 minutos a 121°C.
- Para las cepas de *Neolentinus ponderosus*, inocular 120 cajas de cada uno de los medios PDA, PDA-P, PDA-T, EMA-P, EMA-T y EMA, con cada una de las cepas revitalizadas, con un segmento de 0.5 mm del cultivo.
- Para la cepa de *Neolentinus lepideus*, inocular 80 cajas de cada uno de los medios PDA, PDA-P, EMA-P y EMA, con un segmento de 0.5 mm del cultivo.
- Identificar 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.
- Sellar las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Incubar 10 cajas de cada medio inoculadas con cada una de las cepas a las temperaturas de 18 y 26°C.
- Anotar la velocidad de crecimiento radial determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 3 días, obtenido en cada uno de los medios y a diferentes temperaturas, durante un máximo de 15 días.
- Determinar gráficamente la tasa radial de crecimiento de las cepas, mediante la medición de los diámetros que se traspasen perpendicularmente, sumar y dividir entre dos para calcular el diámetro medio. Este diámetro se calcula cada tercer día para estimar la tasa radial de crecimiento micelial (mm/día) y el diámetro final.

3. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias de las cepas de *Neolentinus spp.*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Nobles (1965).

- Observar las características de macro y micromorfología preparando tinciones en fresco con azul de lactofenol o floxina-rojo congo a las colonias obtenidas en diferentes medios de cultivo e incubadas a diferentes temperaturas.
- Caracterizar macroscópicamente las colonias de las cepas de *Neolentinus* spp. con ayuda de un estereoscopio. Observar el color, apariencia, consistencia, pigmento en el medio, forma y crecimiento del micelio.
- Realizar la descripción microscópica del micelio de las colonias, realizando preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales a 400 aumentos.

4. Producción de inóculo

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Gaitán-Hernández, *et al*, (2000).

- Hidratar los sustrato de aserrín de pino (*Pinus* spp), sorgo y granos de trigo, por 24 horas, alcanzando aproximadamente el 80% de humedad.
- Colocar los sustratos individualmente en bolsas de polipapel con 200 gramos en peso húmedo y esterilizarlos por 45 minutos a 121°C.
- Inocular los sustratos con fragmentos de agar de aproximadamente 1.0 cm² del micelio que ha crecido en medio de cultivo, de cada una de las cepas (10 repeticiones por sustrato y cepa).
- Identificar las bolsas con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, sustrato, temperatura de incubación y número de repetición.
- Incubar los sustratos a temperaturas de 18 y 26°C.
- Observar el crecimiento del micelio sobre el sustrato cada 5 días, hasta que se observe la colonización completa de los sustratos.

5. Preparación e inoculación de los sustratos a evaluar en cuanto a fructificación

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Gaitán-Hernández, *et al*, (2000) y Bran, *et al*, (2004).

- *Sustratos*. Se emplearon cuatro formulaciones que incluyeron una mezcla de dos tipos de maderas: aserrín y viruta de *Pinus* spp. Los aserrines fueron recolectados en los departamentos de Huehuetenango y Totonicapán, donde constituyen desechos de la industria maderera.
- El tamaño de partícula del aserrín fue de de 2-3 mm y de la viruta de 7-8 mm.
- Secar la madera en horno a 75°C durante 72 h.
- La preparación de las formulaciones de los sustratos se realizó como se indica a continuación:
 - Formulación 1: Madera (1Kg), salvado de trigo (30g), harina de maíz (20g), azúcar de caña (12g), sulfato de calcio (30g), sulfato de amonio (0.4g) y superfosfato de calcio (0.6g).
 - Formulación 2: Olote de maíz (1Kg), madera (250g), salvado de trigo (312.5g), azúcar de caña (25g), pectina (0.375g) y urea (0.5g).
 - Formulación 3: 1.0 Kg de madera, más salvado de arroz al 5 %.

- Formulación 4: 1.0 Kg de madera, mas salvado de arroz al 10%.
- Determinar el porcentaje de humedad de los sustratos (Amexo 1).
- Colocar los sustratos en bolsas de polipapel por separado y esterilizarlos por 45 minutos a 121°C.
- Inocular cada uno de los sustratos con 200 g del inóculo previamente preparado (5 repeticiones por cada formulación de sustrato y cepas).
- Una vez inoculados, colocarles un respiradero de gasa previamente esterilizado para favorecer la aireación.
- Incubar a 26°C, hasta que el micelio cubra el sustrato.

6. Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos

Los módulos de producción que se utilizaron para esta fase, fueron facilitados por la Cooperativa Pueblo Unido (Zaragoza, Chimaltenango) y/o Asociación ADIFE (Tecpán, Chimaltenango), las cuales cuentan con módulos de producción cerrados y exclusivos para el cultivo de hongos comestibles.

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Gaitán-Hernández, *et al*, (2000).

- Colocar lo sustratos en un área de producción con iluminación natural difusa y ventilación para favorecer la fructificación.
- Pesar los cuerpos fructíferos cosechados.
- Evaluar con base a la eficiencia biológica (EB), la cual se determinará expresando en porcentaje la relación entre peso fresco de las fructificaciones de los hongos producidos y el peso seco del sustrato ($\%EB = (\text{Peso fresco de los hongos}/\text{peso seco del sustrato}) \times 100$).
- La tasa de producción (TP), se determinará mediante la relación de la eficiencia biológica entre el número total de días transcurridos desde la inoculación hasta la aparición de los primordios ($TP = \%EB/\text{días días transcurridos desde la siembra hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos}$).
- Medir el número y tamaño de las fructificaciones obtenidas, evaluando según el diámetro del píleo: grupo 1 (G1) < 5,0 cm, grupo 2 (G2) entre 5,0 y 10 cm y mayores a 10 cm (G3).
- Los parámetros medioambientales que se registraron durante la producción fueron, temperatura y humedad.

7. Diseño experimental y tratamiento estadístico

A los datos de todos los experimentos, se les aplicó un análisis de comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

- Los experimentos de crecimiento micelial se realizaron con 10 repeticiones y los datos registrados a los 15 días de incubación se someterán a un análisis de varianza unifactorial.
- El experimento de planta piloto se realizó con cinco réplicas/sustrato y a los datos de producción se les aplicó un análisis de varianza.

VIII. RESULTADOS

A. Crecimiento miceliar

Para la cepa *N. ponderosus* 02.02, el crecimiento miceliar en todos los medios de cultivo estudiados fue mayor cuando se incubaron a 26°C, que cuando fueron incubados a 18°C. En general, el mayor crecimiento se observó en el medio EMA y el menor crecimiento en el medio PDA-T a ambas temperaturas (Gráfica 1).

A 18°C, el mayor crecimiento miceliar de la cepa de *N. ponderosus* 02.02 se presentó en el medio EMA, donde se registró un diámetro medio de 20.9 mm y una tasa radial de crecimiento miceliar (TRC) de 2.09 mm/día. El menor crecimiento se observó en el medio PDA-T donde la cepa obtuvo un diámetro medio de 14.3 mm y una TRC de 1.43 mm/día (Tabla 1, Gráfica 1).

A esta misma temperatura de incubación, el análisis estadístico mostró que no existió diferencia significativa entre el crecimiento miceliar en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, así como tampoco entre el crecimiento en los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Por el contrario, existió diferencia significativa entre ambos grupos de medios, así los valores de significancia encontrados fueron entre los medios PDA y EMA ($p = 0.000$), PDA y EMA-P ($p = 0.024$), así como entre PDA y EMA-T ($p = 0.000$). Este mismo caso se observó entre los medios PDA-P y EMA ($p = 0.000$), PDA-P y EMA-P ($p = 0.032$), PDA-P y EMA-T ($p = 0.001$). Existió también diferencia significativa entre el medio PDA-T y EMA ($p = 0.000$), PDA-T y EMA-P ($p = 0.007$), así como entre PDA-T y EMA-T ($p = 0.000$) (Tabla 1).

El mayor crecimiento miceliar de la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 26°C, se obtuvo en el medio EMA, con un diámetro medio de 42.2 mm y una TRC de 4.21 mm/día. El menor crecimiento se observó en el medio PDA-T en el que se alcanzó un diámetro de 24.9 mm y una TRC de 2.49 mm/día.

En cuanto al análisis estadístico en este caso, mostró que no existió diferencia significativa entre el crecimiento en los medios PDA, PDA-P, EMA-P y EMA-T, así como entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$). Los valores que indicaron diferencia significativa se encontraron entre el crecimiento en PDA-T con todos los otros medios evaluados (PDA ($p = 0.032$); PDA-P ($p = 0.038$); EMA ($p = 0.000$); EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$)). El crecimiento en el medio EMA también mostró diferencia significativa con los medios PDA ($p = 0.006$), PDA-P ($p = 0.005$) y PDA-T ($p = 0.000$) (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

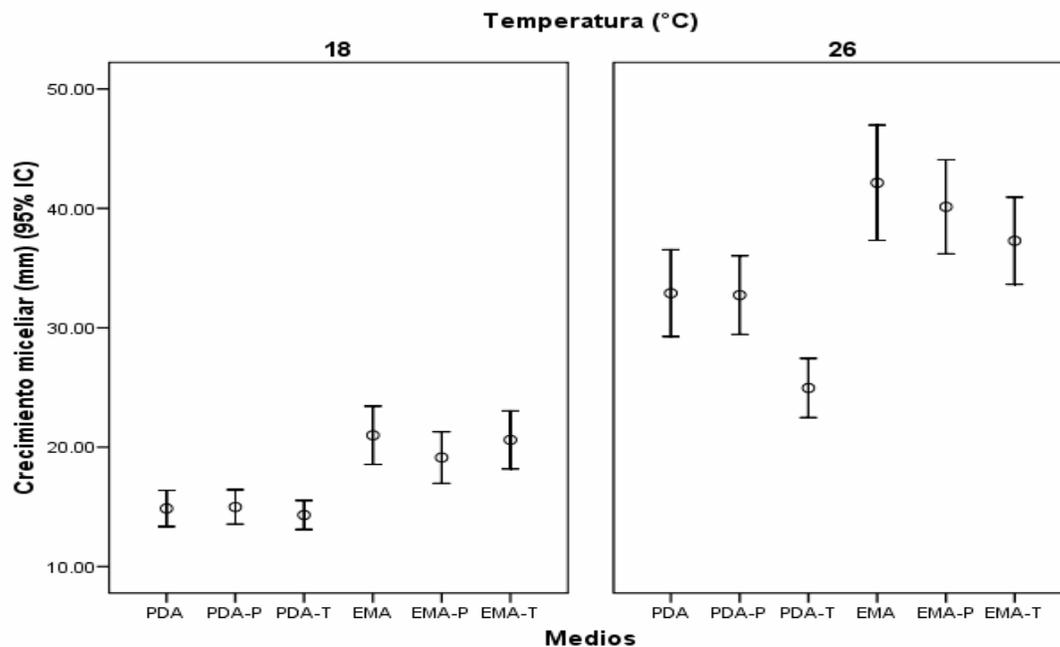
Temperatura	Medio de cultivo ¹	Diámetro medio (mm) ± DS ^{2,3}	Tasa de crecimiento radial (mm/día)
18°C	PDA	14.8 ± 7.10 a	1.48
	PDA-P	14.9 ± 6.80 a	1.49
	PDA-T	14.3 ± 5.70 a	1.43
	EMA	20.9 ± 11.4 b	2.09
	EMA-P	19.1 ± 10.2 b	1.91
	EMA-T	20.6 ± 11.4 b	2.06
26°C	PDA	32.8 ± 17.1 b	3.28
	PDA-P	32.7 ± 15.5 b	3.27
	PDA-T	24.9 ± 11.6 a	2.49
	EMA	42.1 ± 22.7 c	4.21
	EMA-P	40.1 ± 18.5 bc	4.01
	EMA-T	37.2 ± 16.9 bc	3.72

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudoatrobis*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudoatrobis*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Media de 20 repeticiones, lecturas a los 3, 5, 7 y 10 días de incubación ± la desviación estándar.

3. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 1. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.



Con respecto a la cepa *N. ponderosus* 02.03, los mayores crecimientos miceliares se obtuvieron cuando se incubó a 26°C, contrario a lo ocurrió a 18°C. Además, los mayores diámetros de las colonias y TRC se registraron en el medio EMA y los valores más bajos se observaron en el medio PDA-T a ambas temperaturas (Tabla 2, Gráfica 2).

A 18°C, el mayor diámetro de las colonias se observó en el medio EMA (26.0 mm), así como el mayor valor de TCR (2.6 mm/día). Asimismo, se estableció que el menor diámetro fue de 15.3 mm, con una TRC de 1.53 mm/día, en el medio PDA-T (Tabla 2).

Al realizar el análisis estadístico, se comprobó que no existió diferencia significativa entre el crecimiento miceliar obtenido en los medios PDA, PDA-P y PDA-T. Por otra parte, tampoco se observó diferencia significativa entre el crecimiento en los medios PDA, PDA-P y EMA-T, así como también entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$) (Tabla 2).

Se observó diferencia significativa entre los medios PDA y EMA ($p = 0.000$) y PDA y EMA-P ($p = 0.022$). Asimismo entre los medios PDA-P con los medios EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.008$), así como entre el medio PDA-T, con los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.007$) (Tabla 2).

A 26°C, el mayor diámetro medio registrado fue de 50.4 mm (TRC de 5.04 mm/día) en el medio EMA y por el contrario, el menor diámetro medio fue de 32.2 mm (TRC de 3.22 mm/día), el cual fue observado en el medio PDA-T (Tabla 2).

Estadísticamente, no se encontró diferencia significativa entre el crecimiento miceliar registrado en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, así como entre los medios PDA, PDA-P y EMA-T, entre los medios EMA-P y EMA-T y finalmente, entre los medios EMA y EMA-P ($p > 0.05$) (Tabla 2).

Las diferencias significativas se encontraron entre los medios PDA, EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.019$), así como entre el medio PDA-P con los medios EMA ($p = 0.000$) y EMA-P ($p = 0.001$). El medio PDA-T fue estadísticamente diferente a los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.022$), así como también lo fueron los medios EMA con EMA-T ($p = 0.042$) (Tabla 2).

Tabla 2. Crecimiento miceliar de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

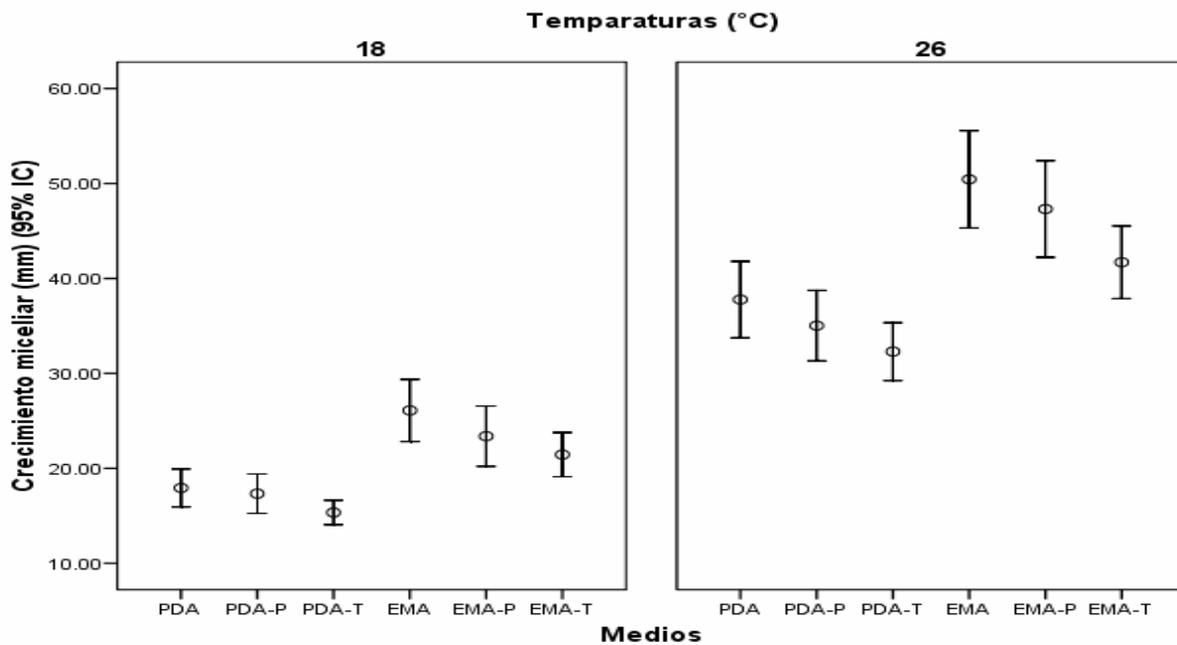
Temperatura	Medio de cultivo ¹	Diámetro medio (mm) ± DS ^{2,3}		Tasa de crecimiento radial (mm/día)
18°C	PDA	17.9 ± 9.5	ab	1.79
	PDA-P	17.3 ± 9.8	ab	1.73
	PDA-T	15.3 ± 6.0	a	1.53
	EMA	26.0 ± 15.4	c	2.60
	EMA-P	23.3 ± 14.9	c	2.33
	EMA-T	21.4 ± 10.9	bc	2.14
26°C	PDA	37.2 ± 18.9	ab	3.72
	PDA-P	35.0 ± 17.5	ab	3.50
	PDA-T	32.2 ± 14.3	a	3.22
	EMA	50.4 ± 24.1	d	5.04
	EMA-P	47.3 ± 23.9	cd	4.73
	EMA-T	41.6 ± 18.0	bc	4.16

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudoastrobus*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudoastrobus*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Media de 20 repeticiones, lecturas a los 3, 5, 7 y 10 días de incubación ± la desviación estándar.

3. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 2. Crecimiento miceliar de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.



La cepa de *N. ponderosus* 145.02, mostró un comportamiento diferente a las demás cepas de esta misma especie evaluadas a ambas temperaturas, dado que los valores de diámetro medio y TCR registrados en el medio PDA-T a 26°C, fue menor al observado en el medio EMA-P a 18°C (Tabla 3, Gráfica 3).

A 18°C, el mayor diámetro de crecimiento micelial encontrado fue de 19.7 mm (TRC de 1.97 mm/día), en el medio EMA-P, mientras tanto que el menor diámetro (1.05 mm y TRC de 1.05 mm/día), se registró en el medio PDA-T (Tabla 3).

El crecimiento micelial observado entre los medios PDA y PDA-T, no fue estadísticamente diferente, así como no lo fue el crecimiento encontrado entre los medios PDA y PDA-P. Tampoco se evidenció diferencia significativa entre los medios PDA-P, EMA y EMA-T, así como no se encontró entre los medios EMA, EMA-P y EMA-T ($p > 0.05$) (Tabla 3).

El crecimiento micelial fue estadísticamente diferente entre el medio PDA con los medios EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$). El medio PDA-P fue estadísticamente diferente a los medios PDA-T ($p = 0.025$) y EMA-P ($p = 0.014$), mientras que el medio PDA-T fue diferente a los medios PDA-P ($p = 0.025$), EMA ($p = 0.000$), EMA-P ($p = 0.000$) y EMA-T ($p = 0.000$) (Tabla 3).

En cuanto al crecimiento micelial evaluado a 26°C, se comprobó que los mayores valores de diámetro y TCR (39.5 mm y 3.95 mm/día, respectivamente) se obtuvieron en el EMA. Los valores menores (18.6 mm y 1.86 mm/día), se observaron en el medio PDA-T (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

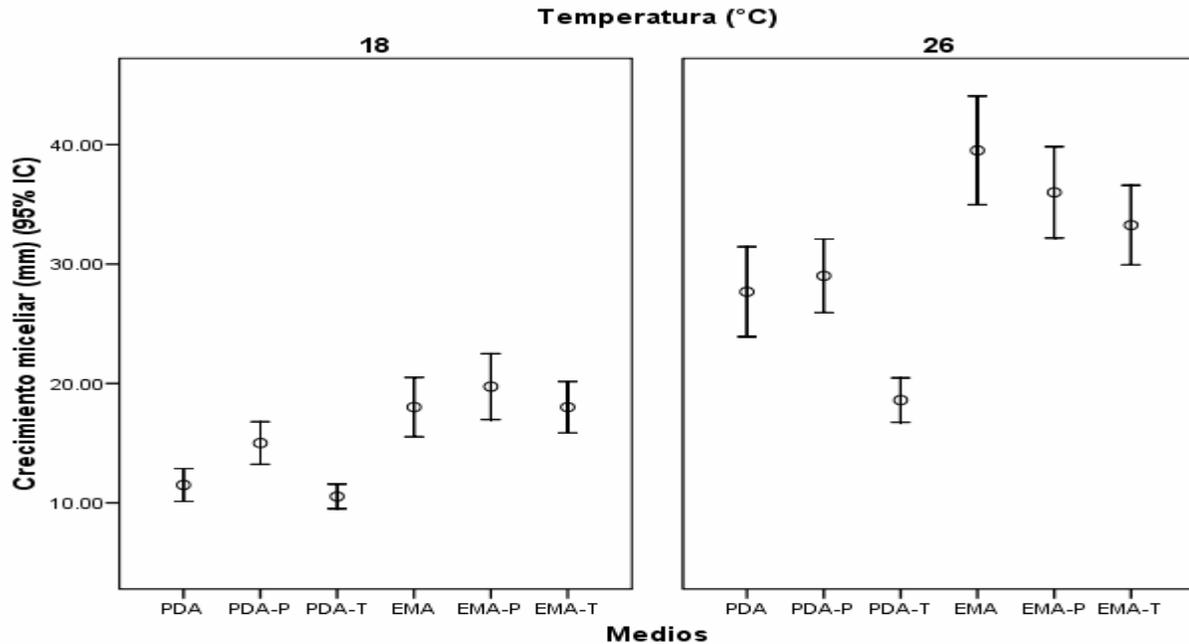
Temperatura	Medio de cultivo ¹	Diámetro medio (mm) \pm DS ^{2,3}		Tasa de crecimiento radial (mm/día)
18°C	PDA	11.4 \pm 6.4	ab	1.14
	PDA-P	15.0 \pm 8.3	bc	1.50
	PDA-T	10.5 \pm 4.8	a	1.05
	EMA	18.0 \pm 11.7	cd	1.80
	EMA-P	19.7 \pm 12.9	d	1.97
	EMA-T	18.0 \pm 10.1	cd	1.80
26°C	PDA	27.6 \pm 17.3	b	2.76
	PDA-P	29.0 \pm 14.5	bc	2.90
	PDA-T	18.6 \pm 8.7	a	1.86
	EMA	39.5 \pm 21.4	d	3.95
	EMA-P	36.0 \pm 17.6	cd	3.60
	EMA-T	30.6 \pm 17.	bcd	3.06

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudostrabus*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudostrabus*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Media de 20 repeticiones, lecturas a los 3, 5, 7 y 10 días de incubación \pm la desviación estándar.

3. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Gráfica 3. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.



Con respecto a los resultados obtenidos con la cepa *Neolentinus lepideus* 90.02, se determinó que a 18°C de temperatura de incubación, el mayor diámetro de las colonias y TCR se obtuvieron en el medio EMA (35.2 mm y 2.93 mm/día, respectivamente). Por el contrario, los menores valores de estos parámetros se observaron en el medio PDA (27.0 mm y 2.25 mm/día) (Tabla 4, Gráfica 4).

Asimismo, el análisis estadístico efectuado evidenció que no se obtuvo diferencia significativa entre el crecimiento observado en el medio EMA, con respecto al medio EMA-P. Asimismo, tampoco existió diferencia significativa entre los medios PDA, PDA-P y EMA-P (Tabla 4).

La existencia de diferencia estadísticamente significativa solamente fue evidente entre el crecimiento en el medio EMA, con respecto a los medios PDA ($p=0.007$) y PDA-P (0.028) (Tabla 4).

A 26°C, el mayor crecimiento micelial se encontró en el medio EMA-P, con un diámetro medio de las colonias de 55.9 mm y una TCR de 4.66 mm/día. El menor crecimiento se observó en el medio PDA (46.8 mm y 3.90 mm/día) (Tabla 4, Gráfica 4).

Estadísticamente, no se observó diferencia entre el crecimiento obtenido en los medios PDA, PDA-P y EMA, así como entre los medios PDA-P, EMA y EMA-P. Por el contrario, el medio EMA-P presentó solamente diferencia con el medio PDA ($p=0.030$) (Tabla 4).

Gráfica 4. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus lepideus* 90.02 durante 12 días de incubación a dos temperaturas.

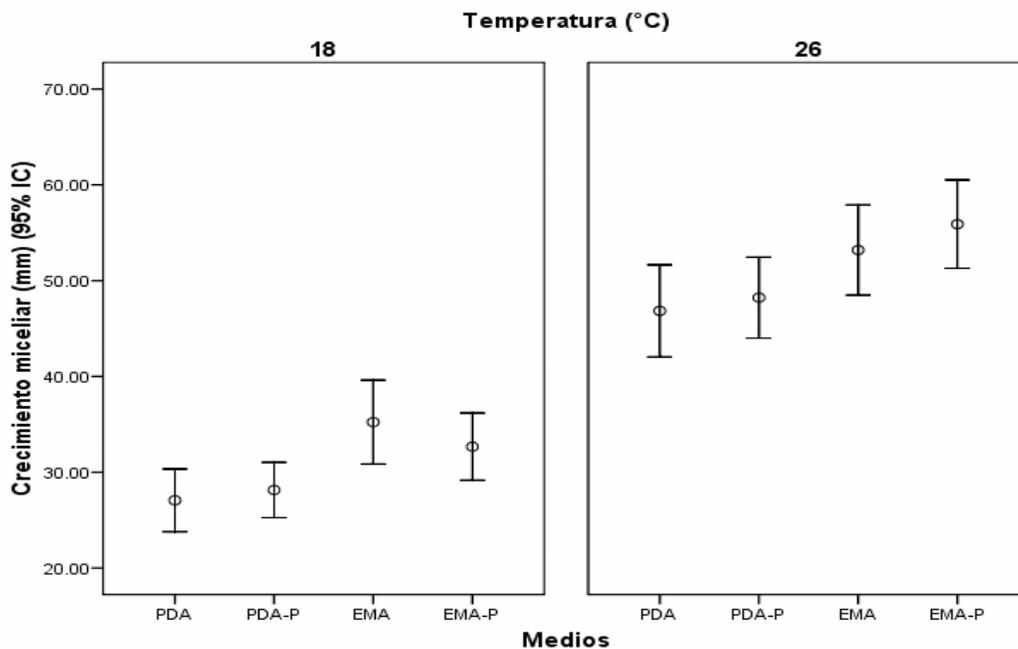


Tabla 4. Crecimiento micelial de la cepa de *Neolentinus lepideus* 90.02 durante 12 días de incubación a dos temperaturas.

Temperatura	Medio ¹	Diámetro (mm) ± DS ^{2,3}	Tasa de Crecimiento radial (mm/día)	
18°C	PDA	27.0 ± 16.4	a	2.25
	PDA-P	28.1 ± 14.5	a	2.34
	EMA	35.2 ± 22.0	b	2.93
	EMA-P	32.6 ± 17.7	ab	2.72
26°C	PDA	46.8 ± 24.2	a	3.90
	PDA-P	48.2 ± 21.3	ab	4.02
	EMA	53.1 ± 23.7	ab	4.42
	EMA-P	55.9 ± 23.2	b	4.66

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudostrabus*. EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudostrabus*.

2. Media de 20 repeticiones, lecturas a los 3, 5, 7, 10 y 12 días de incubación ± la desviación estándar.

3. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

B. Características macro y microscópicas de las colonias (Figs. 1-12)

Con respecto a estos parámetros, la cepa de *N. ponderosus* 02.02, a 18°C, evidenció color blanco en el anverso, en los medios que contenían como base el agar PDA, así como también color blanco o sin coloración en el reverso. En los medios con agar EMA como base, la coloración tanto en el reverso como en el anverso fue amarillenta (Tabla 5).

A esta misma temperatura, microscópicamente y con respecto a la presencia de fibulas, en los medios PDA y PDA-P fue donde se observó una gran cantidad de estas estructuras, mientras que en los medios EMA y EMA-P se observó una regular cantidad. Los medios con escasas fibulas fueron PDA-T y EMA-T. Por otra parte, el desarrollo de solamente hifas de 4.0-5.0 μm se presentó en los medios EMA-T y PDA-T, respectivamente. Los demás medios, presentaron hifas de entre 2.0 y 5.0 μm . En ninguno de los medios estudiados se observó la formación de clamidosporas.

En cuanto a las características observadas a 26°C, las colonias fueron de color blanco a blanquecino en el anverso en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, con reverso sin coloración o de color blanco. Los medios EMA, EMA-P y EMA-T presentaron colonias con anversos y reversos de color amarillento.

En las características microscópicas, la mayor cantidad de fibulas se produjeron en los medios PDA y EMA, mientras que en los medios restantes, se observó una regular cantidad de estas estructuras. Respecto a las hifas, en tres medios de cultivo (PDA-T, EMA-P y EMA-T) se observaron solamente hifas entre 4.0 y 5.0 μm , mientras que en los medios restantes se observaron hifas entre 1.0 y 4.0 μm . Por otra parte, a esta temperatura, tampoco se observó la formación de clamidosporas.

Tabla 5. Características coloniales de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

Temperatura	Medio ¹	Características de las colonias				
		Color (anverso)	Color (reverso)	Fibulas	Diámetro Hifas (μm)	Clamidosporas
18°C	PDA	Blanco	Sin color	+++ ³	2.0 – 3.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Sin color	+++	2.0 – 4.0	Ausentes
	PDA-T	Blanco	Blanco	+ ⁴	5.0	Ausentes
	EMA	Amarillento	Amarillento	++ ⁵	2.0 – 5.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Amarillento	++	2.0 – 5.0	Ausentes
	EMA-T	Amarillento	Amarillento	+	4.0	Ausentes
26°C	PDA	Blanco	Sin color	+++	1.0 – 4.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Sin color	++	1.0 - 4.0	Ausentes
	PDA-T	Blanco	Amarillento	++	5.0	Ausentes
	EMA	Amarillento	Amarillento	+++	1.0 – 4.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Amarillento	++	5.0	Ausentes
	EMA-T	Amarillento	Amarillento	++	4.0	Ausentes

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudostrobis*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudostrobis*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

3. Abundantes. 4. Escasas. 5. Regular cantidad.

La cepa *N. ponderosus* 02.03 cuando se incubó a 18°C presentó colonias con anverso de color blanco en los medios PDA, PDA-P, PDA-T, EMA y EMA-T, con reverso del mismo color, con excepción del medio EMA, en el cual el reverso fue de color amarillento. Colonias con el anverso y reverso de color amarillento solamente se observaron en el medio EMA-P (Tabla 6).

Microscópicamente, a esta misma temperatura de incubación, solamente en los medios PDA y EMA se observó la formación de regular cantidad de fíbulas, en el resto, las fíbulas fueron escasas. En todos los casos se observaron hifas entre 4.0 y 6.0 µm y ausencia de clamidosporas (Tabla 6).

A 26°C, todos los medios de cultivo, con excepción del medio EMA, presentaron anverso de color blanco. Sin embargo, presentaron diferencias en la coloración de reverso, el cual varió desde un color amarillento en los medios PDA, PDA-T, EMA, EMA-P y EMA-T, hasta un color blanco en el medio PDA-P. El medio EMA, tanto en el reverso como en el anverso presentó color amarillento (Tabla 7).

Microscópicamente, en el medio EMA-P se observó abundante cantidad de fíbulas, mientras que en los medios PDA-P y PDA-T estuvieron presentes en regular cantidad. En los medios PDA, EMA y EMA-T, las fíbulas fueron escasas. Respecto al diámetro de las hifas, en todos los medios de cultivo fueron de 4.0-6.0 µm y no se observó la formación de clamidosporas.

Tabla 6. Características coloniales de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

Temperatura	Medio ¹	Características de las colonias				
		Color (anverso)	Color (reverso)	Fíbulas	Diámetro Hifas (µm)	Clamidosporas
18°C	PDA	Blanco	Blanco	++ ²	4.0 – 5.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Blanco	+ ³	5.0	Ausentes
	PDA-T	Blanco	Blanco	+	4.0	Ausentes
	EMA	Blanco	Amarillento	++	4.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Amarillento	+	5.0	Ausentes
	EMA-T	Blanco	Blanco	+	4.0	Ausentes
26°C	PDA	Blanco	Amarillento	+	4.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Blanco	++	4.0	Ausentes
	PDA-T	Blanco	Amarillento	++	5.0	Ausentes
	EMA	Amarillento	Amarillento	+	6.0	Ausentes
	EMA-P	Blanco	Amarillento	+++ ⁴	5.0	Ausentes
	EMA-T	Blanco	Amarillento	+	4.0	Ausentes

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudostrobis*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudostrobis*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Regular cantidad. 3. Escasas. 4. Abundantes.

La cepa de *N. ponderosus* 145.05 incubada a 18°C presentó una gran variación en cuanto a la coloración de las colonias. En el medio PDA y PDA-T, las colonias fueron de color blanco en el anverso, pero presentaron colores amarillento y blanco, respectivamente en el reverso. En las colonias de los medios de cultivo PDA-P, EMA, EMA-P y EMA-T, el anverso fue de color amarillento, sin embargo, el reverso varió desde un color amarillento en los medios PDA-P, EMA y EMA-T, hasta un color café en el reverso del medio EMA-P (Tabla 7).

Microscópicamente a esta misma temperatura, se comprobó que se formaron regular cantidad de fíbulas en los medios PDA y PDA-P, mientras que en los medios restantes las fíbulas fueron escasas. Las hifas fueron de 4.0-5.0 µm de diámetro en la mayoría de los medios, notándose que esta cepa produjo las hifas más anchas de todos las cepas de *N. ponderosus* evaluadas en este estudio, alcanzando un diámetro de 7.0 µm en el medio EMA-P. En este caso, tampoco fue posible observar la formación de clamidosporas.

Respecto a las características distintivas de esta cepa a 26°C, se pudo observar que en todos los medios de cultivo ensayados, el color de las colonias fue amarillento, mientras que el color del reverso varió desde amarillento en los medios PDA, PDA-P, PDA-T y EMA, hasta color café en los medios EMA-P y EMA-T (Tabla 7).

Microscópicamente y a la temperatura de incubación anteriormente indicada, se verificó que en todos los medios de cultivo estudiados se produjo escasa cantidad de fíbulas, hifas de 4.0-5.0 µm y ausencia de clamidosporas.

Tabla 7. Características coloniales de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02 durante 10 días de incubación a dos temperaturas.

Temperatura	Medio ¹	Características de las colonias				
		Color (anverso)	Color (reverso)	Fíbulas	Diámetro Hifas (µm)	Clamidosporas
18°C	PDA	Blanco	Amarillento	++ ²	5.0	Ausentes
	PDA-P	Amarillento	Amarillento	++	5.0	Ausentes
	PDA-T	Blanco	Blanco	+ ³	4.0 - 5.0	Ausentes
	EMA	Amarillento	Amarillento	+	4.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Café	+	7.0	Ausentes
	EMA-T	Amarillento	Amarillento	+	5.0	Ausentes
26°C	PDA	Amarillento	Amarillento	+	5.0	Ausentes
	PDA-P	Amarillento	Amarillento	+	4.0	Ausentes
	PDA-T	Amarillento	Amarillento	+	4.0	Ausentes
	EMA	Amarillento	Amarillento	+	4.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Café	+	5.0	Ausentes
	EMA-T	Amarillento	Café	+	5.0	Ausentes

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudostrobis*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudostrobis*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Regular cantidad. 3. Escasas.

Con relación a las características macroscópicas observadas en las colonias de la cepa *N. lepideus* 90.02 a 18°C, se comprobó que en todos los medios de cultivo el anverso de las colonias fue de color blanco, mientras que el reverso fue de color amarillento en los medios EMA y EMA-P y sin ninguna coloración en los medios PDA y PDA-P.

Microscópicamente a 18°C, una abundante cantidad de fíbulas se observaron en el medio PDA-P, regular cantidad en el medio PDA y escasas en los medios EMA y EMA-P. Asimismo, presentaron hifas de 1.0-5.0 µm de diámetro y se pudo corroborar la presencia de clamidosporas solamente en el medio PDA-P.

A 26°C, el anverso de las colonias fue principalmente de color blanco, en los medios PDA, PDA-P y EMA, no presentando el reverso ninguna coloración en los dos primeros medios, mientras que en el último de los mencionados, el reverso fue de color amarillento. En el medio EMA-P, tanto el anverso como el reverso fueron de color amarillento (Tabla 8).

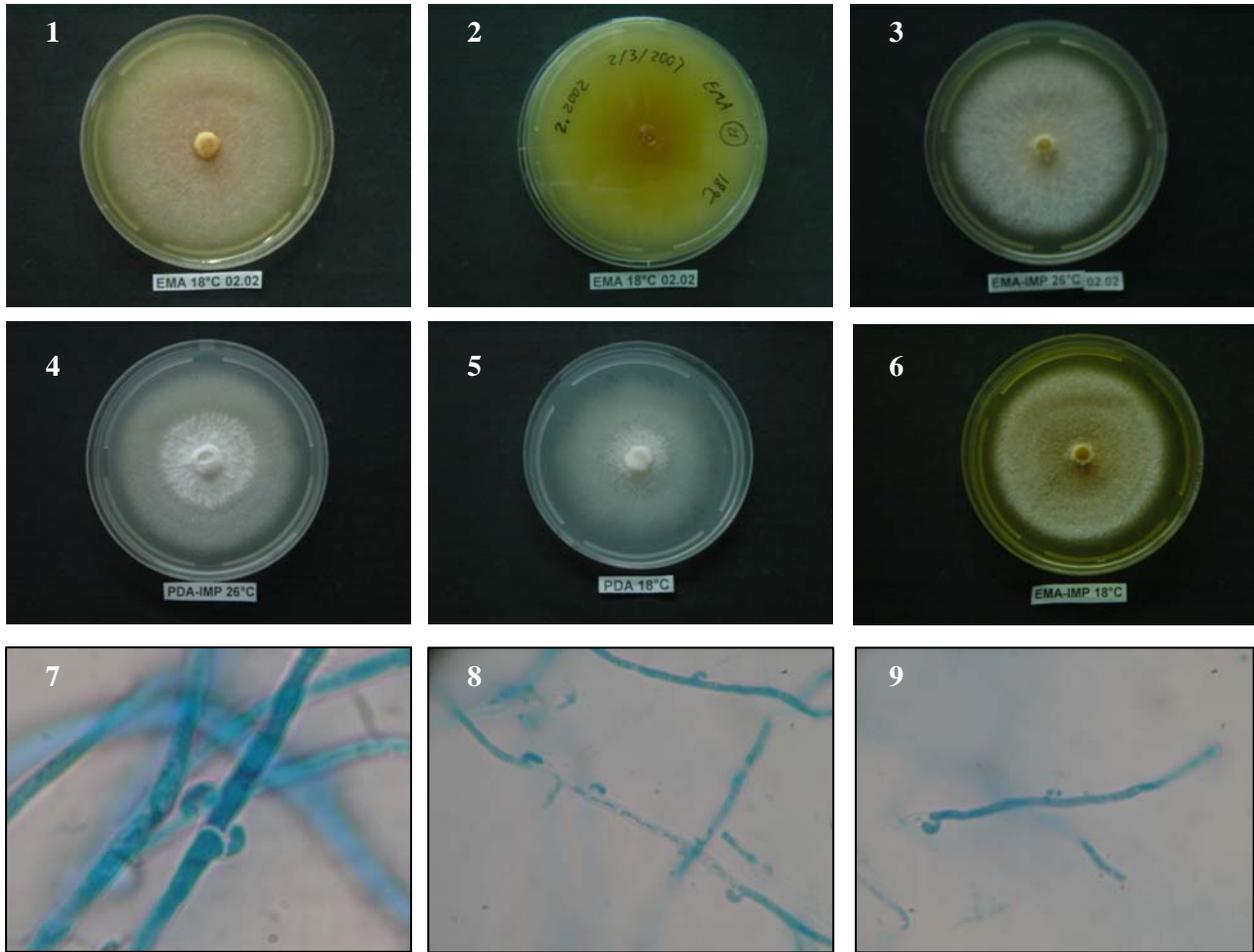
Microscópicamente presentaron regular cantidad de fíbulas, con excepción del medio EMA-P que presentó escasas. De igual forma, mostraron hifas de 2.0-5.0 µm y ausencia de clamidosporas.

Tabla 8. Características coloniales de la cepa de *Neolentinus lepideus* 90.02 durante 12 días de incubación a dos temperaturas.

Temperatura	Medio ¹	Características de las colonias				
		Color	Color del reverso	Fíbulas	Diámetro Hifas (µm)	Clamidosporas
18°C	PDA	Blanco	Sin color	++ ²	1.0 – 4.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Sin color	+++ ³	1.0 – 4.0	Presentes
	EMA	Blanco	Amarillento	+ ⁴	2.0 – 5.0	Ausentes
	EMA-P	Blanco	Amarillento	+	2.0 – 4.0	Ausentes
26°C	PDA	Blanco	Sin color	++	2.0 – 3.0	Ausentes
	PDA-P	Blanco	Sin color	++	2.0 - 4.0	Ausentes
	EMA	Blanco	Amarillento	++	2.0 – 4.0	Ausentes
	EMA-P	Amarillento	Amarillento	+	2.0 - 5.0	Ausentes

1. PDA: agar papa dextrosa; PDA-P: agar papa dextrosa con infusión de *P. pseudo-strobilus*; PDA-T: agar papa dextrosa con infusión de *P. tecunumanii*; EMA: agar extracto de malta; EMA-P: agar extracto de malta con infusión de *P. pseudo-strobilus*; EMA-T: agar extracto de malta con infusión de *P. tecunumanii*.

2. Regular cantidad. 3. Abundantes. 4. escasas.



Figuras 1-9. Características macro y microscópicas de las cepas de *N. ponderosus*. 1-3. Ceba *N. ponderosus* 02.02. 1-2. Color amarillento desarrollado en el anverso y reverso de las colonias creciendo sobre agar EMA a 18°C. 3. Anverso de la colonia creciendo en agar EMA a 26°C, nótese el color amarillento. 4-5. Ceba *N. ponderosus* 02.03. 4. Colonia de color blanco desarrollada en agar PDA-P (anverso). 5. Colonia de color blanco (anverso) en agar PDA a 18°C. 6. Colonia de color amarillento de la cepa *N. ponderosus* 145.02 en agar EMA-P a 18°C. 7. hifas de 4.0 a 5.0 μm de diámetro con fibulas en la cepa *N. ponderosus* 02.03 (x400). 8-9. Hifas de 1.0 a 2.0 μm con fibulas en la cepa *N. ponderosus* 02.02 (x400).



Figuras 10-12. Características macro y microscópicas de la cepa *N. lepideus* 90.02. 10. Colonia de color blanco (anverso) en el medio PDA a 26°C. 11. Colonia de color blanco en el anverso en agar EMA a 26°C. 12. Clamidospora desarrollada en el medio PDA-P a 18°C (x400).

C. Producción de inóculo (Figs. 13-15)

En cuanto al inóculo elaborado a partir de la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 18°C, el sustrato de aserrín de pino necesitó 54 días para la producción del mismo, evidenciando además diferencia estadísticamente significativa con el tiempo observado en el trigo y sorgo ($p=0.000$). En estos dos últimos, fueron necesarios alrededor de 61 días para lograr la colonización completa de ambos sustratos. Como es notorio, no existió diferencia estadísticamente significativa entre ambos (Gráfica 5, Tabla 9).

Para esta misma cepa pero a una temperatura de incubación de 26°C, los resultados fueron similares a los obtenidos a 18°C. El aserrín de pino solamente necesitó 40 días para producir el inóculo, mostrando además diferencia significativa con el trigo ($p=0.000$) y sorgo ($p=0.003$). El tiempo de producción del inóculo en estos dos últimos fue de 46 y 44 días respectivamente, no existiendo diferencia significativa entre ambos (Gráfica 5, Tabla 9).

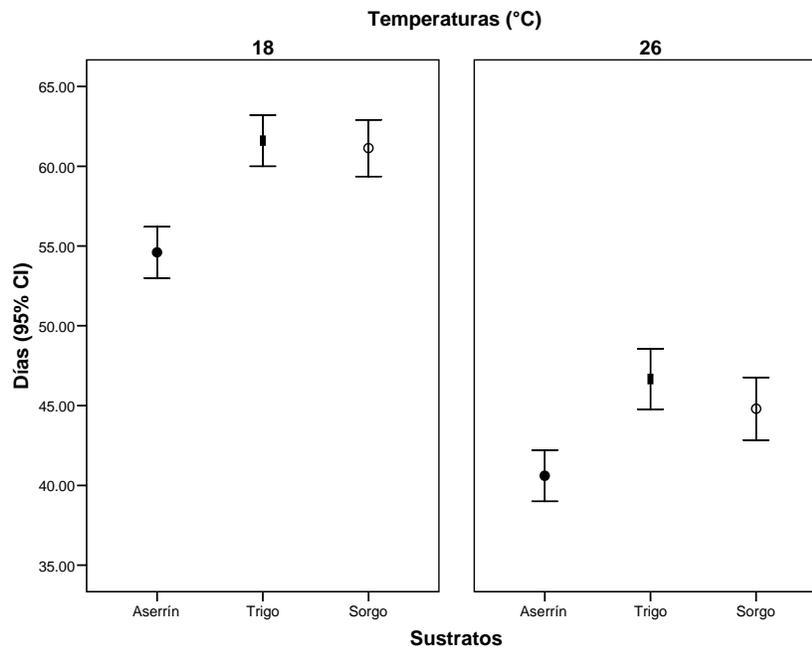
Tabla 9. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02, sobre diferentes sustratos y temperaturas.

Temperatura	Sustrato	Días \pm DS ^{1,2}
18°C	Aserrín de pino	54.60 \pm 2.90 a
	Granos de trigo	61.60 \pm 2.90 b
	Granos de sorgo	61.13 \pm 3.20 b
26°C	Aserrín de pino	40.60 \pm 2.90 a
	Granos de trigo	46.67 \pm 3.41 b
	Granos de sorgo	44.80 \pm 3.54 b

1: Tiempo de colonización micelial de los sustratos para la producción de inóculo.

2: Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 5. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.02, sobre diferentes sustratos y temperaturas.



Para la cepa de *N. ponderosus* 02.03, el inóculo elaborado en trigo e incubado a 18°C, se produjo en 55 días, mientras que en aserrín de pino se produjo en 62 días y en sorgo en 63 días. El tiempo para la producción de inóculo en aserrín de pino fue significativamente diferente al obtenido en trigo y sorgo ($p=0.000$), pero no existió diferencia entre estos dos últimos (Tabla 10, Gráfica 6).

A 26°C, en esta misma cepa, el inóculo obtenido en granos de trigo se produjo en 41 días, mientras que el tiempo de producción en el aserrín de pino fue de 42 días y en sorgo fue de 46 días. No existió diferencia significativa entre el tiempo de producción del inóculo en granos de trigo y aserrín de pino, pero si se observó diferencia entre la producción del inóculo en sorgo, comparado con la producción en trigo ($p=0.000$) y aserrín de pino ($p=0.001$) (Tabla 10, Gráfica 6).

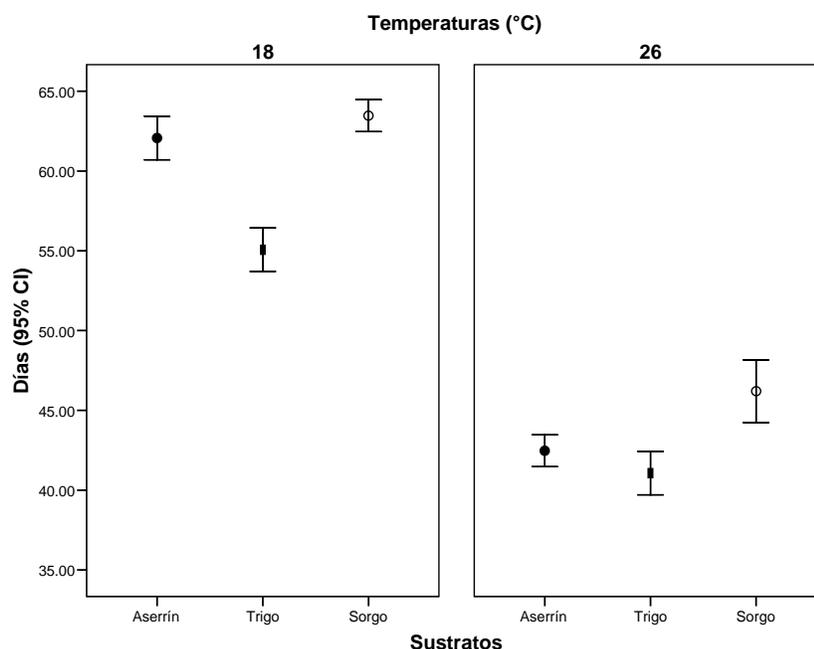
Tabla 10. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03, sobre diferentes sustratos y temperaturas.

Temperatura	Sustrato	Días \pm DS ^{1,2}
18°C	Aserrín de pino	62.07 \pm 2.46 a
	Granos de trigo	55.07 \pm 2.46 b
	Granos de sorgo	63.47 \pm 1.81 a
26°C	Aserrín de pino	42.47 \pm 1.81 a
	Granos de trigo	41.07 \pm 2.46 a
	Granos de sorgo	46.20 \pm 3.54 b

1: Tiempo de colonización micelial de los sustratos para la producción de inóculo.

2: Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 6. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 02.03, sobre diferentes sustratos y temperaturas.



Respecto a la cepa de *N. ponderosus* 145.02, a 18°C, el inóculo en trigo se produjo en 56 días, tiempo que mostró diferencia significativa con respecto a lo observado en el aserrín de pino y sorgo ($p=0.000$), en los cuales el inóculo se produjo en 63 días, sin diferencia significativa entre ellos (Tabla 11, Gráfica 7).

A 26°C, el inóculo en trigo se produjo en 40 días, en tanto que en aserrín de pino el tiempo demorado fue de 42 días, sin evidenciar diferencia significativa entre ellos. En sorgo, el tiempo de producción de inóculo fue de 48 días, existiendo diferencia significativa con relación al trigo y aserrín de pino ($p=0.000$) (Tabla 11, Gráfica 7).

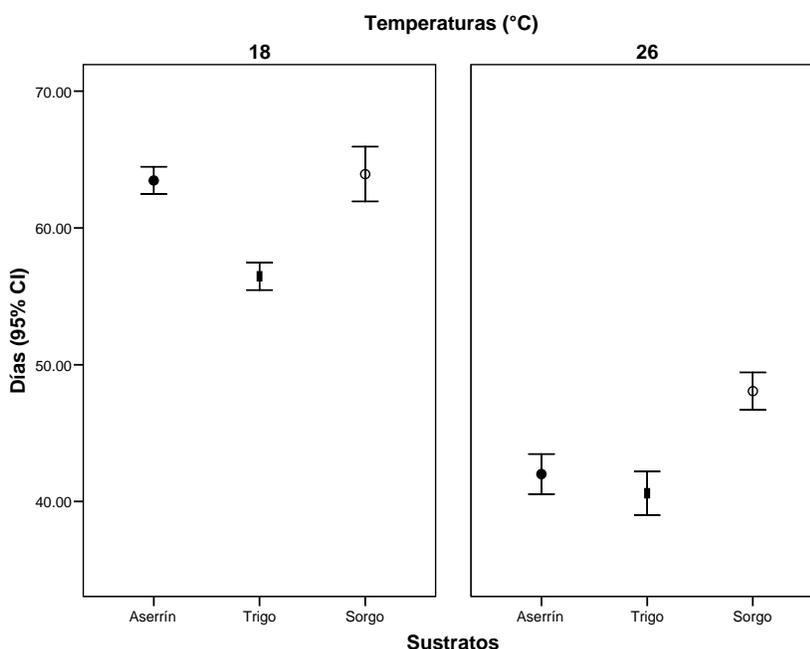
Tabla 11. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02, sobre diferentes sustratos y temperaturas.

Temperatura	Sustrato	Días \pm DS ^{1,2}
18°C	Aserrín de pino	63.47 \pm 1.81 a
	Granos de trigo	56.47 \pm 1.81 b
	Granos de sorgo	63.93 \pm 3.61 a
26°C	Aserrín de pino	42.00 \pm 2.64 a
	Granos de trigo	40.60 \pm 2.89 a
	Granos de sorgo	48.07 \pm 2.46 b

1: Tiempo de colonización micelial de los sustratos para la producción de inóculo.

2: Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 7. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus ponderosus* 145.02, sobre diferentes sustratos y temperaturas.



Referente a la cepa de *N. lepideus* 90.02, al evaluar la elaboración de inóculo a 18°C, en trigo tardó 42 días en la producción, mientras que en aserrín de pino y sorgo el tiempo observado fue de 50 y 51 días, respectivamente. Estadísticamente, solamente existió diferencia significativa entre el tiempo advertido en trigo, comparado con el aserrín de pino y sorgo (p=0.000).

A 26°C, el inóculo en trigo se produjo en 30 días, en tanto que en aserrín de pino el tiempo registrado fue de 33 días, sin presentar diferencia significativa entre ellos. Por el contrario, dado que el tiempo de producción en sorgo fue de 40 días, éste sustrato presentó diferencia significativa con el trigo y el aserrín de pino (p=0.000).

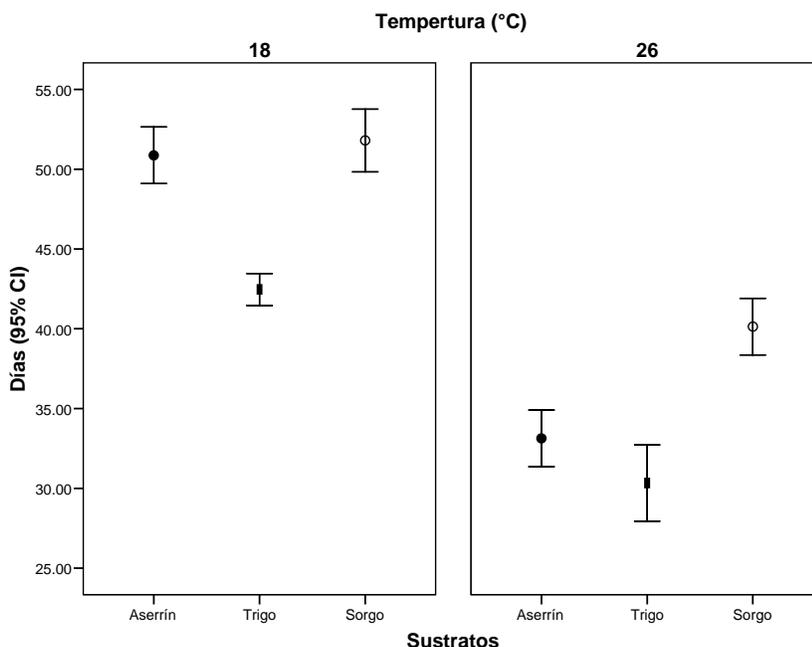
Tabla 12. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus lepideus* 90.02 sobre diferentes sustratos y temperaturas.

Temperatura	Sustrato	Días ± DS ^{1,2}
18°C	Aserrín de pino	50.87 ± 3.20 a
	Granos de trigo	42.47 ± 1.81 b
	Granos de sorgo	51.80 ± 3.54 a
26°C	Aserrín de pino	33.13 ± 3.20 a
	Granos de trigo	30.33 ± 4.32 a
	Granos de sorgo	40.13 ± 3.20 b

1: Tiempo de colonización micelial de los sustratos para la producción de inóculo.

2: Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$).

Gráfica 8. Producción de inóculo de la cepa de *Neolentinus lepideus* 90.02 sobre diferentes sustratos y temperaturas.



D. Eficiencia biológica y tasa de producción (Figs. 16-26)

Durante el período de incubación de los sustratos, para el crecimiento de las cepas, la temperatura se mantuvo entre los $26 \pm 4^\circ\text{C}$, mientras que la humedad estuvo entre el 50-80 %. Para la inducción y desarrollo de las fructificaciones, las muestras se colocaron bajo iluminación natural (12 h luz/oscuridad), con ventilación, humedad (75-90%) y temperaturas entre los 15 a 25°C . Para todas las cepas se obtuvo una sola cosecha en todos los sustratos.

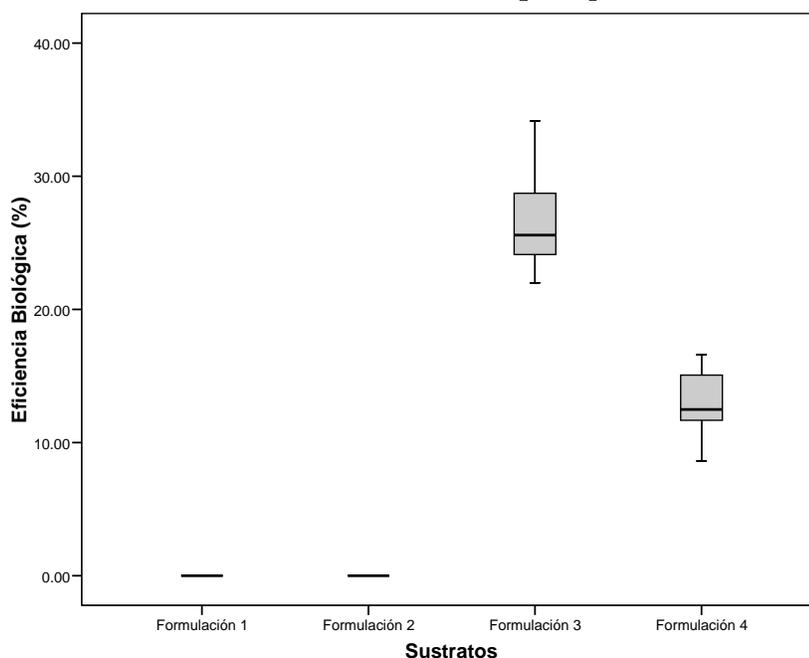
Para la cepa *N. ponderosus* 02.02, hubo crecimiento y colonización en los sustratos con las formulaciones 1 y 2 (F1, F2), sin embargo, no se desarrollaron los cuerpos fructíferos, por lo que se indica solamente que la cepa colonizó ambos en 48 días. En el sustrato con formulación 3 (F3), la eficiencia biológica fue la mayor obtenida para esta cepa (29.91%), con una tasa de producción de 0.52, además, el mayor porcentaje de cuerpos fructíferos estuvieron entre 5 y 10 cm de diámetro de píleo. En el sustrato con formulación 4 (F4), la eficiencia biológica fue menor, con 12.89% y una tasa de producción de 0.25; asimismo, el mayor porcentaje de cuerpos fructíferos fue menor a 5 cm de diámetro de píleo. Estadísticamente hubo diferencia significativa de la eficiencia biológica obtenida en los sustratos F3 y F4 ($p=0.000$) (Tabla 13, Gráfica 9).

Tabla 13. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 02.02

Formulación de sustrato	% EB \pm DS ^{1,2}		T ³ (días)	TP ⁴	Producción de cuerpos fructíferos por grupos de tamaños de píleos ⁶			
					Peso ⁵ (g)	G1 (<5 cm)	G2 (5-10 cm)	G3 (>10 cm)
F1	0		48	0	---	---	---	---
F2	0		48	0	---	---	---	---
F3	29.91 \pm 4.73	a	58	0.52	47.98	22.1 %	59.5 %	18.4 %
F4	12.89 \pm 3.09	b	50	0.25	28.58	59.3 %	40.7 %	---

1. Porcentaje de eficiencia biológica \pm la desviación estándar. 2. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$). 3. Tiempo en días transcurrido desde la siembra hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos. 4. Tasa de producción. 5. Peso total de las fructificaciones. 6. Porcentaje calculado a partir del peso total de las fructificaciones.

Gráfica 9. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 02.02.



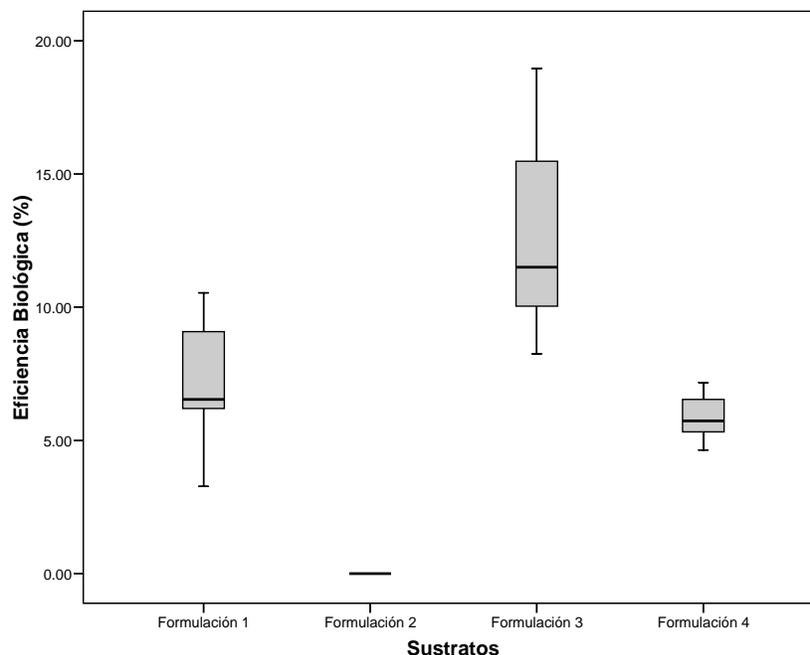
La cepa *N. ponderosus* 02.03 fructificó en tres de los sustratos (F1, F3 y F4), obteniéndose la mayor eficiencia biológica en el sustrato F3 (12.84%) y la menor en el sustrato F4 (5.88 %). En cuanto al tamaño de las fructificaciones, los tres sustratos produjeron cuerpos fructíferos de menos de 5 cm de diámetro de píleo y solamente los sustratos F1 y F3, desarrollaron píleos de 5 a 10 cm de diámetro, aunque en menor porcentaje. El análisis estadístico mostró que existió diferencia significativa entre el sustrato F3, comparado con los sustratos F1 ($p=0.016$) y F4 ($p=0.003$), sin embargo, no existió diferencia entre estos dos últimos.

Tabla 14. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 02.03.

Formulación de sustrato	% EB \pm DS ^{1,2}	T ³ (días)	TP ⁴	Producción de cuerpos fructíferos por grupos de tamaños de píleos ⁶				
				Peso ⁵ (g)	G1 (<5 cm)	G2 (5-10 cm)	G3 (>10 cm)	
1	7.12 \pm 2.80	a	48	0.14	12.64	71.9 %	28.1 %	---
2	0	-	48	---	---	---	---	---
3	12.84 \pm 4.33	b	58	0.22	22.90	62.6 %	37.4 %	---
4	5.88 \pm 0.99	a	50	0.11	13.04	100 %	---	---

1. Porcentaje de eficiencia biológica \pm la desviación estándar. 2. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$). 3. Tiempo en días transcurrido desde la siembra hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos. 4. Tasa de producción. 5. Peso total de las fructificaciones. 6. Porcentaje calculado a partir del peso total de las fructificaciones.

Gráfica 10. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 02.03.



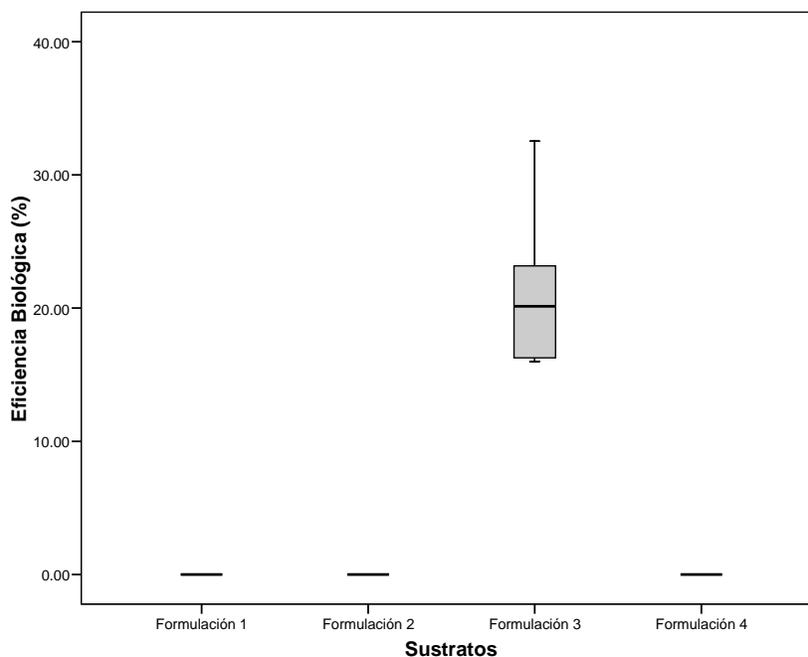
La cepa *N. ponderosus* 145.02 solamente fructificó en el sustrato F3. En este sustrato se obtuvo una eficiencia biológica de 21.62 % y una tasa de producción de 0.37. El mayor porcentaje de cuerpos fructíferos fue menor a 5 cm de diámetro del píleo, no obstante, también se obtuvieron más de 60 % de píleos de 5 a 10 cm y mayores a 10 cm (Tabla 15, Gráfica 11).

Tabla 15. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 145.02.

Formulación de sustrato	% EB \pm DS ^{1,2}	T ³ (días)	TP ⁴	Producción de cuerpos fructíferos por grupos de tamaños de píleos ⁶			
				Peso ⁵ (g)	G1 (<5 cm)	G2 (5-10 cm)	G3 (>10 cm)
1	0	48	---	---	---	---	---
2	0	48	---	---	---	---	---
3	21.62 \pm 6.78	58	0.37	38.54	38.8 %	31.1 %	30.1 %
4	0	50	---	---	---	---	---

1. Porcentaje de eficiencia biológica \pm la desviación estándar. 2. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$). 3. Tiempo en días transcurrido desde la siembra hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos. 4. Tasa de producción. 5. Peso total de las fructificaciones. 6. Porcentaje calculado a partir del peso total de las fructificaciones.

Gráfica 11. Productividad de la cepa *N. ponderosus* 145.02.



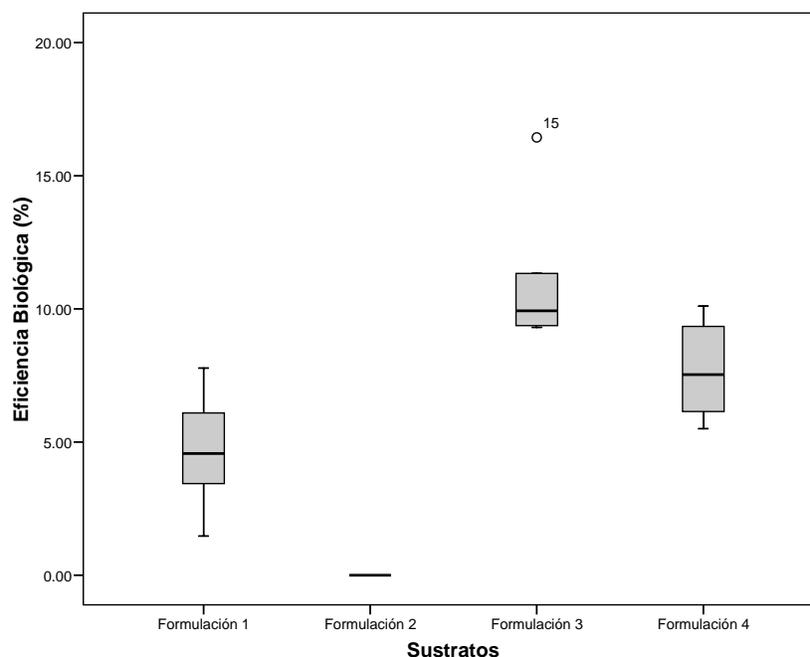
La cepa de *N. lepideus* 90.02, fructificó en los sustratos F1, F2 y F3. En el sustrato F3 alcanzó la mayor eficiencia biológica con 11.27 % y una tasa de producción de 0.21. La menor eficiencia biológica se obtuvo en el sustrato F1 con 4.67 % y una tasa de producción de 0.1. En cuanto al tamaño de los cuerpos fructíferos, el sustrato F1 produjo la totalidad de fructificaciones menores a 5 cm de diámetro de píleo, mientras que el sustrato F3 desarrolló el mayor porcentaje de píleos de esta dimensión. Por el contrario, el sustrato F4 produjo un mayor porcentaje de píleos entre 5 y 10 cm. Estadísticamente, existió diferencia significativa entre los F3 y F1 ($p=0.001$), pero no existió diferencia entre los sustratos F3 y F4, así como entre los sustratos F1 y F4.

Tabla 16. Productividad de la cepa *N. lepideus* 90.02.

Formulación de sustrato	% EB \pm DS ^{1,2}	T ³ (días)	TP ⁴	Producción de cuerpos fructíferos por grupos de tamaños de píleos ⁶				
				Peso ⁵ (g)	G1 (<5 cm)	G2 (5-10 cm)	G3 (>10 cm)	
1	4.67 \pm 2.42	a	48	0.1	8.28	100 %	---	---
2	0		48	---	---	---	---	---
3	11.27 \pm 2.99	b	54	0.21	20.10	68.1 %	31.9 %	---
4	7.72 \pm 1.98	ab	50	0.15	17.14	32.1 %	67.9 %	---

1. Porcentaje de eficiencia biológica \pm la desviación estándar. 2. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$). 3. Tiempo en días transcurrido desde la siembra hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos. 4. Tasa de producción. 5. Peso total de las fructificaciones. 6. Porcentaje calculado a partir del peso total de las fructificaciones.

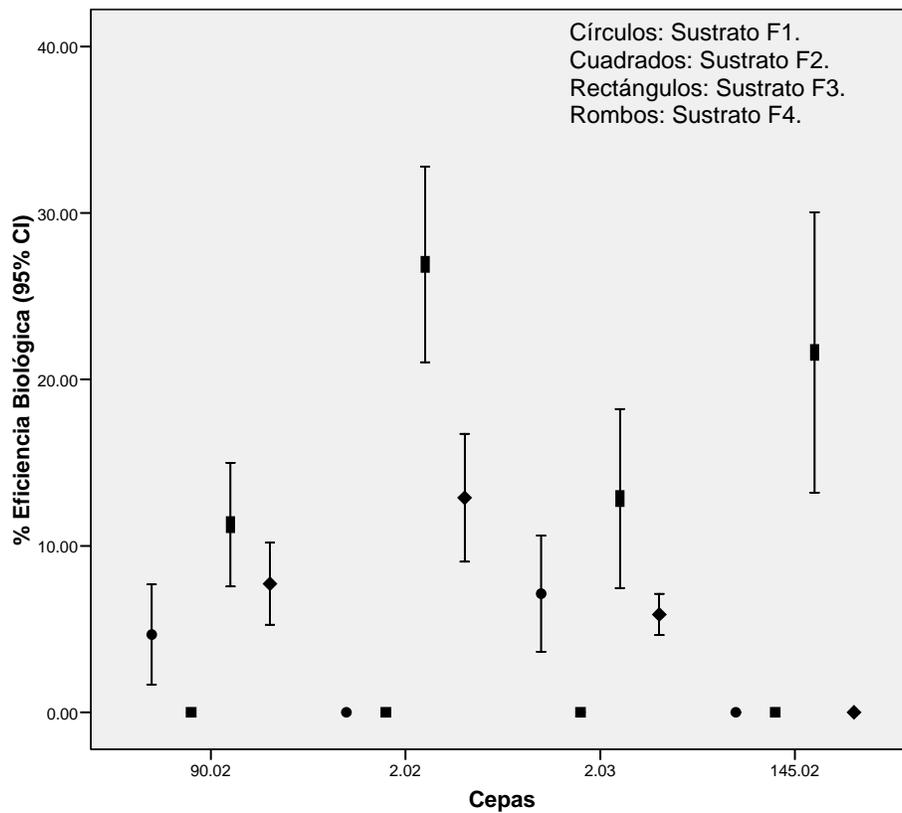
Gráfica 12. Productividad de la cepa *N. lepideus* 90.02.



Finalmente, la mayor eficiencia biológica de todas las cepas estudiadas fue obtenida por la cepa *N. ponderosus* 02.02 en el sustrato F3, seguido de la cepa *N. ponderosus* 145.02 en este mismo sustrato y fue también en esta misma formulación donde todas las cepas obtuvieron cada una la mayor eficiencia biológica, ya que todas fructificaron en ella (Gráfica 13).

Por otra parte, las cepas *N. ponderosus* 02.03 y *N. lepideus* 90.02, fructificaron en los tres sustratos (F1, F3, F4), la cepa *N. ponderosus* 02.02 fructificó en dos sustratos (F3 y F4) y la cepa *N. ponderosus* 145.02 solamente fructificó en un sustrato (F3) (Gráfica 13).

Gráfica 13. Comparación de la eficiencia biológica de todas las cepas estudiadas, sobre diferentes sustratos.

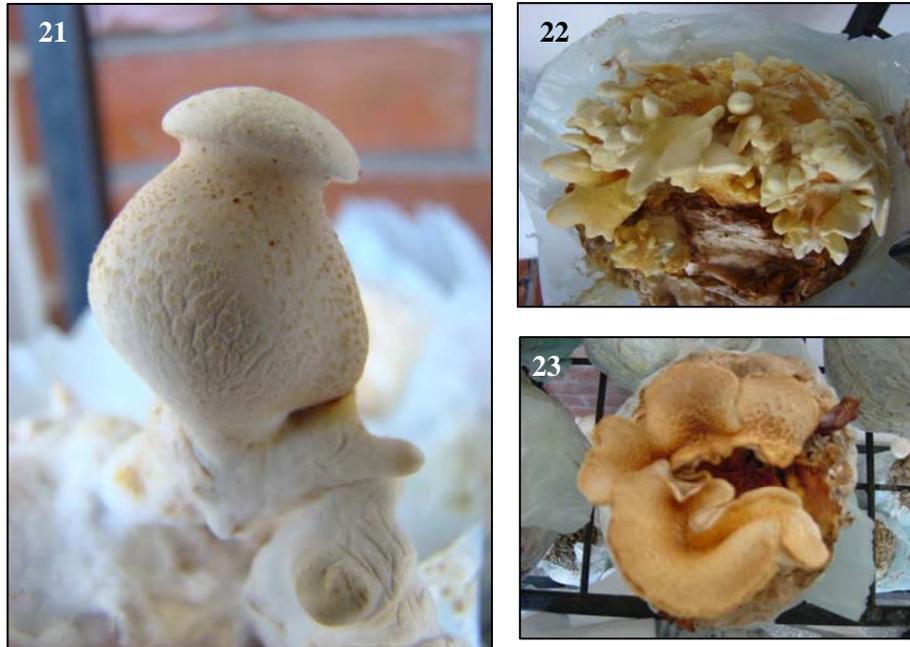




Figuras 13-15. Inóculo producido por las cepas de *N. ponderosus*. 13. Inóculo de la cepa *N. ponderosus* 02.02, sobre sorgo a 18°C. 14. Inóculo de la cepa *N. ponderosus* 02.03 sobre aserrín de pino a 18°C. 15. Inóculo de la cepa *N. ponderosus* 145.02 sobre trigo a 18°C.



Figuras 16-20. Fructificación de cepas de *N. ponderosus*. 16-18. Cepa *N. ponderosus* 02.02 sobre el sustrato F3. 16. Primordios. 17. Cuerpos fructíferos jóvenes. 18. Vista general de los cuerpos fructíferos maduros, donde se pueden observar hongos con pileos entre 1.0 a más de 10 cm de diámetro. 19. Cepa *N. ponderosus* 02.02 sobre el sustrato F4. 20. Cuerpos fructíferos de la cepa *N. ponderosus* 02.03 sobre el sustrato F4.



Figuras 21-23. Fructificación de la cepa *N. ponderosus* 145.02 sobre el sustrato F3. 21. cuerpo fructífero en etapa temprana de formación. 22. Grupo de primordios. 23. Cuerpos fructíferos maduros y de más de 10 cm de diámetro en el píleo.



Figuras 24-26. Fructificación de la cepa *N. lepideus* 90.02. 24. Vista general de los sustratos F3 en fructificación. 25. Primordios y cuerpos fructíferos jóvenes en el sustrato F3. 26. Cuerpos fructíferos sobre el sustrato F4.

IX. DISCUSIÓN

Respecto al comportamiento general de las cepas de *Neolentinus* evaluadas, se demostró que el crecimiento miceliar en todos los medios de cultivo estudiados fue mayor en los que contenían agar EMA como base, que los que contenían agar PDA. Este comportamiento colectivo de las cepas puede atribuirse a la mejor utilización y mayor cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo EMA. Este medio consiste en extracto concentrado de malta, hexosas (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa y sucrosa), trisacáridos (maltotriosa) y dextrinas, así como sustancias nitrogenadas, tales como proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas (Crueger, 1984); mientras que el medio PDA, consiste en básicamente en almidón de papa y glucosa, lo que hace de él un medio notoriamente menos enriquecido que el EMA (Stamets, 1993).

Otro aspecto a destacar es que el crecimiento miceliar fue menor cuando las cepas y medios de cultivo se incubaron a 18°C que cuando se incubaron a 26°C. Esta característica puede obedecer a que todas las cepas evaluadas en este estudio, han sido adaptadas a condiciones de laboratorio (26°C) durante varios años, por lo que no es de extrañar que expresaran mejor crecimiento a esta temperatura.

Específicamente, con relación al crecimiento de la cepa *N. ponderosus* 02.02 a 18°C, debido a que el mayor crecimiento se presentó en el agar EMA, se recomendaría su cultivo bajo estas condiciones. Sin embargo, ya que no existió diferencia significativa con el crecimiento en los medios EMA-P y EMA-T, también podrían ser utilizados, puesto que el crecimiento fue similar. En este caso, la suplementación de los medios de cultivo con infusión de dos distintas clases de madera que constituyen el hábitat natural de la especie (*Pinus pseudostrobus* y *P. tecunumanii*), no mostró evidencia de estimulación del crecimiento miceliar, por el contrario, el crecimiento decreció debido probablemente a una mayor cantidad de sustancias de difícil degradación (como celulosa y lignina), adicionados al medio. A 26°C, el comportamiento de esta cepa fue similar, con la salvedad que los diámetros de crecimiento de las colonias fueron mayores.

La cepa en mención, en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, tanto a 18 como a 26°C, en el anverso de las colonias el micelio fue de color blanco, mientras que el color del reverso fue fundamentalmente sin coloración o blanco. Por el contrario, en los medios EMA, EMA-P y EMA-T a ambas temperaturas, el anverso y reverso de las colonias fue de color amarillento, lo cual podría no ser una característica deseable, ya que el apareamiento de esta coloración en colonias de otras especies de hongos, como las de *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp, puede indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios (no necesarios para el crecimiento y reproducción) o alguna anomalía en el crecimiento (Crueger, 1984; Stamets, 1993).

Para esta misma cepa, microscópicamente puede decirse que la estimación de la cantidad de fíbulas presentes, no estuvo relacionada con el medio de cultivo o la temperatura, no obstante, la presencia de estas estructuras garantiza la condición dicariótica del micelio, la cual es de vital importancia en la formación de los cuerpos fructíferos (Alexopoulos, 1996). Aparentemente, si existió relación entre el diámetro de las hifas y los medios de cultivo, ya que en los medios que contenían infusiones de maderas promovieron la formación de hifas de diámetros mayores a 4.0 µm, debido a que muchas especies de hongos degradadores de madera, forman las denominadas

hifas fibrosas, para poder penetrar dentro de la estructura leñosa de los árboles (Nobles, 1965). La ausencia de clamidosporas es favorable para los cultivos si se considera la pigmentación amarillenta observada en algunos medios de cultivo, debido a que estas estructuras de resistencia se forman ante condiciones ambientales adversas (Alexopoulos, 1996).

En el caso de la cepa *N. ponderosus* 02.03, también obtuvo el mayor crecimiento en los medios EMA a las dos temperaturas de incubación, sin embargo, si se desea cultivar la cepa a 18°C, se recomiendan los medios EMA y EMA-P, ya que no existió diferencia significativa entre ellos. Si la cepa debe ser trabajada a 26°C, debe ser inoculada en el medio EMA o en EMA-P, puesto que en ellos se obtuvieron los mayores crecimientos, además de existir diferencia significativa con respecto a los otros medios de cultivo evaluados. La importancia de estudiar el medio de cultivo y temperatura donde las cepas logren su mayor crecimiento miceliar reside en que se reduce el ciclo de cultivo del hongo, cuando se estudia con fines de productividad (Salmones, *et al.*, 1997).

Respecto a las características macroscópicas de las colonias, en este caso se observó que fueron de color blanco en casi todos los medios de cultivo y temperaturas de incubación, con excepción de los medios EMA-P a 18°C y EMA a 26°C. Los reversos de las colonias fueron de color amarillento principalmente a 26°C que a 18°C, sin embargo, puesto que en el anverso casi no se presentó dicha coloración, podría interpretarse como una característica provechosa por la poca producción de metabolitos secundarios como se indicara anteriormente. Por aparte, la estimación de las fíbulas no estuvo relacionada con los medios de cultivo o temperaturas, así como tampoco con el crecimiento miceliar, sin embargo como se citó con anterioridad, éstas garantizan el estado dicariótico del micelio. En esta cepa también se observó que en todos los medios de cultivo y temperaturas las hifas fueron mayores a 4.0 µm dada su naturaleza de hongo degradador de la madera (Miller, 1965).

La cepa *N. ponderosus* 145.02 obtuvo su mayor crecimiento en el medio EMA-P a 18°C, mientras que a 26°C, el mejor crecimiento se observó en el medio EMA, por lo que se sugiere que se utilicen estas condiciones en futuros cultivos de esta cepa. Como alternativa, pueden utilizarse también el medio EMA-T, a ambas temperaturas, ya que no existió diferencia significativa entre el crecimiento en estos medios.

Respecto a las características de las colonias de esta cepa, en su mayoría presentaron color amarillento en el anverso y reverso, e incluso en los medios EMA-P a 18°C y EMA-P y EMA-T a 26°C el reverso fue de color café. Solamente el medio PDA-T a 18°C no presentó coloración amarillenta en el anverso y reverso de las colonias. Como se indicó con antelación, este tipo de pigmentación no es deseable en el crecimiento miceliar de las colonias, puesto que pueden ser indicativos de anomalías (Stamets, 1993). Microscópicamente, en la mayoría de cultivos no fue posible observar abundante cantidad de fíbulas, sino que por el contrario, fueron escasas en casi todos los medios de cultivo y temperaturas, lo cual no es una característica favorable para la fructificación (Alexopoulos, 1996). Además, las hifas también fueron de un diámetro mayor a 4.0 µm y no se observaron clamidosporas.

En general, las tres cepas de *N. ponderosus* (02.02, 02.03 y 145.02), obtuvieron sus máximos crecimientos en el medio EMA a 26°C y los menores valores de crecimiento se observaron en el medio PDA-T a 18°C. De las tres cepas, *N. ponderosus* 02.03 fue la más

vigorosa en su desarrollo (50.4 mm), seguida de la 02.02 (42.1 mm) y 145.02 (39.5mm). Estos resultados fueron inferiores a lo reportado para esta especie (colonias de entre 78 y 89 mm de diámetro a los 14 días de incubación), en el medio EMA (Miller, 1965).

Es importante resaltar que la presencia de coloración amarillenta o café indistintamente en el anverso o reverso de las colonias influyó en el crecimiento miceliar de las cepas, puesto que esta característica estuvo más acentuada en la cepa 145.02, seguido de la 02.02 y la que menos la presentó fue la cepa 02.03.

Respecto a la cepa de *N. lepideus* 90.02, ésta obtuvo su mayor crecimiento en el medio de cultivo EMA-P a 26°C (55.9 mm), por lo que se sugiere el cultivo de esta cepa bajo estas condiciones. En este caso en particular, el uso de madera estimuló el crecimiento ya que el hábitat natural de esta especie es entre otros, *P. pseudostrobus*.

A manera de comparación, en estudios anteriores se ha reportado que esta especie crece 45.14 mm en medio PDA, durante 19 días a 25°C (Sobal, *et al*, 2007), 56.89 mm en medio EMA a 25°C y 58.12 mm en medio PDA, durante 12 días (Gaitán-Hernández, 1995) y 90 mm a temperatura ambiente en el medio EMA durante 21 días, por lo que los valores obtenidos en este estudio (Tabla 4), son similares. Sin embargo, fueron inferiores a los 70.7 mm observados en la cepa mexicana (ATCC 96535) al final de 12 días sobre el medio PDA-IM (infusión de madera de *P. montezumae*) a 27°C (Gaitán-Hernández, 2000).

Respecto a las características microscópicas de esta cepa, se resalta que solamente en el medio EMA-P a 26°C se observó coloración amarillenta de las colonias y sin embargo en este medio se obtuvo el mayor crecimiento, esta característica también ha sido descrita por varios autores (Nobles, 1965; Gaitán-Hernández, *et al* 1995; Sobal, *et al*, 2007). Por otra parte, el diámetro de las hifas, las fíbulas y la presencia de clamidosporas en el medio PDA-P, ha sido ampliamente informado para esta especie (Nobles, 1965; Gaitán-Hernández, *et al* 1995).

Por otra parte, dado que las cepas evidenciaron un mayor crecimiento (diámetro de las colonias y TCR) en el medio EMA a 26°C, se acepta la hipótesis referente al crecimiento miceliar.

Respecto a la producción del inóculo o “semilla”, se considera que el mejor sustrato es el que es colonizado por una cepa determinada, en menor tiempo, debido a que los prolongados tiempos de producción del mismo, promueven la contaminación y alargan los ciclos de cultivo (Stamets, 1993).

En la cepa de *N. ponderosus* 02.03 el sustrato donde se produjo el inóculo en menor tiempo fue el aserrín de pino a ambas temperaturas, siendo la mejor temperatura 26°C, por el menor tiempo empleado, y, por tanto, se recomienda la elaboración del inóculo en estas condiciones, puesto que existe una diferencia de aproximadamente una semana, con relación a los otros sustratos. La elaboración de inóculo en aserrín de pino ha sido exitosa para otras especies como *N. lepideus* (Gaitán-Hernández, 2000) y además el aserrín es más barato que cualquier otro grano y permite la producción de grandes cantidades de inóculo a bajo costo (Quimio, 2001).

La producción de inóculo de las cepas *N. ponderosus* 02.03 y 145.02 fue similar. En ambas, el menor tiempo fue observado en los granos de trigo tanto a 18 (55 y 56 días, respectivamente) como a 26°C (41 y 40 días, respectivamente). No obstante, a 26°C puede ser utilizado alternativamente el aserrín de pino, debido a que no mostró diferencia significativa con el trigo. Existe un reporte publicado de la producción de inóculo de una cepa mexicana de *N. ponderosus* (L18), en el cual se recomienda el uso de granos de trigo porque en ellos se obtuvo el mejor crecimiento con respecto a los granos de mijo (Palacios, 2000a).

En la cepa *N. lepideus* 90.02, el inóculo fue obtenido en menor tiempo en el trigo (42 días) a 18°C, así como a 26°C (30 días), aunque a esta última temperatura de incubación, también puede ser utilizado el aserrín de pino por no haber tenido diferencia significativa con el trigo. Comparativamente, se comenta que en Oaxaca, México, se utiliza trigo para la producción de inóculo de *N. lepideus*, el cual se usa posteriormente en el “taller de cultivo de hongos para niños indígenas” (Palacios, 2000b).

Puesto que el tiempo para la producción del inóculo de las cepas de *Neolentinus* spp, no fue menor sobre granos de sorgo en por lo menos una temperatura a evaluar, se rechaza la hipótesis concerniente a este aspecto.

Con relación a la productividad de las cepas, inicialmente se indica que el sustrato con formulación 2, el cual constituía básicamente por olote, madera, azúcar, urea y pectina, no promovió la formación de cuerpos fructíferos. El micelio de todas las cepas colonizó este sustrato, sin embargo, los nutrientes probablemente no fueron degradados y asimilados adecuadamente (posiblemente el olote), lo cual no permitió que el micelio formara las fructificaciones.

Por otra parte, en el caso particular de la cepa *N. ponderosus* 02.02 la cual fructificó en los sustratos con formulaciones 3 y 4, se recomienda su cultivo sobre el sustrato F3, debido a que no solo se obtiene una eficiencia biológica considerable (29.91%) sino que se obtiene un alto porcentaje de púleos de más de 5 cm de diámetro. Lamentablemente, no existe alguna publicación accesible donde se indiquen parámetros de productividad de cepas de *N. ponderosus*, por lo que no es posible efectuar correlación alguna con los datos obtenidos en este estudio.

En el caso de la cepa *N. ponderosus* 02.03, también se recomienda su cultivo en el sustrato con formulación F3, debido a que la eficiencia biológica obtenida fue la mayor para esta cepa (12.84 %), y además se obtienen púleos de entre 1 y 10 cm de diámetro. Es importante mencionar que esta cepa durante el transcurso del presente estudio ha evidenciado resultados satisfactorios, puesto que no solo presentó colonias con el mayor crecimiento miceliar (de las cepas de *N. ponderosus*) y poca pigmentación amarillenta, sino que fue la única de las cepas de *N. ponderosus*, que fructificó en tres sustratos, incluyendo el sustrato F1.

La cepa *N. ponderosus* 145.02 solamente fructificó en el sustrato F3, donde obtuvo una eficiencia biológica considerable (21.62 %) y cuerpos fructíferos con púleos de incluso mayores a 10 cm de diámetro. Por estas características, se considera promisoría para futuros estudios a nivel de campo. Se resalta que en los resultados de crecimiento miceliar, esta cepa presentó abundante pigmentación y poca evidencia de fíbulas, por lo que estas características pudieran estar relacionadas con su fructificación en solamente uno de los sustratos.

La cepa de *N. lepideus* 90.02 fructificó en tres sustratos (F1, F3 y F4), sin embargo, la mayor eficiencia biológica fue mayor en el sustrato F3 (11.27 %). Confrontando los resultados obtenidos en este estudio con los reportados en la literatura, se puede decir que son similares, ya que las eficiencias biológicas de 15 cepas mexicanas de *N. lepideus* fluctuaron entre 4.85 y 14.60 % (Gaitán-Hernández, 2000).

Debido a que todas las cepas fructificaron en el sustrato con formulación F3 con eficiencias biológicas aceptables, se reconoce su efectividad para el cultivo de las mismas. Por otra parte, siendo el sustrato menos enriquecido de todas las formulaciones evaluadas en este trabajo, se advierte la capacidad de las cepas de fructificar en este sustrato de bajo costo, lo que haría aún más factible el cultivo de *N. ponderosus* y *N. lepideus* en condiciones artesanales.

Respecto a la hipótesis planteada para esta parte del estudio, esta debe ser rechazada, debido a que la eficiencia biológica y la tasa de producción de las cepas de *Neolentinus* spp, no presentaron valores mayores al 50% y 0.5, respectivamente, al ser cultivadas sobre aserrín de pino más salvado de arroz al 10%.

A manera de recapitulación de los resultados obtenidos en este estudio, a continuación se indican las mejores condiciones de cultivo de cada una de las cepas:

Para la cepa *N. ponderosus* 02.02, se recomienda que el crecimiento miceliar se efectúe en el medio EMA a 26°C, la producción de inóculo deberá realizarse en aserrín de pino a la misma temperatura y la fructificación deberá realizarse en el sustrato F3 (madera de pino: aserrín más viruta), enriquecida con 5% de salvado de arroz, a temperatura ambiente.

Para las cepas *N. ponderosus* 02.03, 145.02 y *N. lepideus* 90.02, el crecimiento miceliar deberá efectuarse en el medio EMA a 26°C, el inóculo deberá elaborarse en granos de trigo a esa misma temperatura y la producción de los cuerpos fructíferos deberá realizarse en el sustrato F3.

X. CONCLUSIONES

1. Las colonias de la cepa *N. ponderosus* 02.02 presentaron el mayor crecimiento miceliar en el medio EMA a 26°C, con un diámetro de 42.2 mm y una TRC de 4.21 mm/día, a los 10 días de incubación.
2. La colonias de la cepa *N. ponderosus* 02.03 evidenciaron el mayor crecimiento miceliar en el medio EMA a 26°C, con un diámetro de 50.4 mm y una TRC de 5.04 mm/día, a los 10 días de incubación.
3. Las colonias de la cepa de *N. ponderosus* 145.02 presentaron su mejor crecimiento en el medio EMA a 26°C, con un diámetro de 39.5 mm y una TCR de 3.95 mm/día de a los 10 días de incubación.
4. Las colonias de la cepa *Neolentinus lepideus* 90.02, presentaron su mejor desarrollo en el medio EMA-P a 26°C, con un diámetro de 55.9 mm y una TCR de 4.66 mm/día, a los 12 días de incubación.
5. Macroscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 02.02, a 18°C, en los medios que contenían como base el agar PDA, evidenció colonias de color blanco en el anverso, así como también color blanco o sin coloración en el reverso. En los medios con agar EMA como base, la coloración tanto en el reverso como en el anverso fue amarillenta.
6. Microscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 18°C reveló la presencia de fibulas en todos los medios, desarrollo de hifas de 2.0-5.0 μm y ausencia de clamidosporas.
7. Macroscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 26°C presentó colonias de color blanco a blanquecino en el anverso en los medios PDA, PDA-P y PDA-T, con reverso sin coloración o de color blanco. Los medios EMA, EMA-P y EMA-T presentaron colonias con anversos y reversos de color amarillento.
8. Microscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 26°C presentó fíbulas, hifas de 1.0 y 4.0 μm y ausencia de clamidosporas.
9. Macroscópicamente, en la cepa *N. ponderosus* 02.03 a 18°C presentó colonias con anverso de color blanco en los medios PDA, PDA-P, PDA-T, EMA y EMA-T, con reverso del mismo color, con excepción del medio EMA, en el cual el reverso fue de color amarillento. El medio EMA-P presentó colonias con el anverso y reverso de color amarillento.
10. Microscópicamente, en la cepa *N. ponderosus* 02.03 a 18°C se observaron fíbulas, hifas 4.0 y 6.0 μm y ausencia de clamidosporas.
11. Macroscópicamente, la cepa *N. ponderosus* 02.03 a 26°C en todos los medios de cultivo, con excepción del medio EMA, presentaron anverso de color blanco, con diferencias en la coloración de reverso, el cual varió desde un color amarillento en los medios PDA, PDA-T,

- EMA, EMA-P y EMA-T, hasta un color blanco en el medio PDA-P. El medio EMA, tanto en el reverso como en el anverso presentó color amarillento.
12. Microscópicamente, la cepa *N. ponderosus* 02.03 a 26°C presentó fíbulas, hifas de 4.0-6.0 µm y ausencia de clamidosporas.
 13. Macroscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 145.05 a 18°C en los medios PDA y PDA-T, las colonias fueron de color blanco en el anverso, pero presentaron colores amarillento y blanco, respectivamente en el reverso. En las colonias de los medios de cultivo PDA-P, EMA, EMA-P y EMA-T, el anverso fue de color amarillento, con el reverso que varió desde un color amarillento en los medios PDA-P, EMA y EMA-T, hasta un color café en el reverso del medio EMA-P.
 14. Microscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 145.05 a 18°C presentó fíbulas, hifas de 5.0 a 7.0 µm y ausencia de clamidosporas.
 15. Macroscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 145.05 a 26°C en todos los medios de cultivo ensayados, el color de las colonias fue amarillento, mientras que el color del reverso varió desde amarillento en los medios PDA, PDA-P, PDA-T y EMA, hasta color café en los medios EMA-P y EMA-T.
 16. Microscópicamente, la cepa de *N. ponderosus* 145.05 a 26°C se verificó la presencia de fíbulas, hifas de 4.0-5.0 µm y ausencia de clamidosporas.
 17. Macroscópicamente, la cepa *N. lepideus* 90.02 a 18°C, presentó colonias con anverso de color blanco, mientras que el reverso fue de color amarillento en los medios EMA y EMA-P y sin ninguna coloración en los medios PDA y PDA-P.
 18. Microscópicamente, la cepa *N. lepideus* 90.02 a 18°C, mostró fíbulas de 1.0-5.0 µm de diámetro y presencia de clamidosporas en el medio PDA-P.
 19. Macroscópicamente, la cepa *N. lepideus* 90.02 a 26°C, el anverso de las colonias fue principalmente de color blanco, en los medios PDA, PDA-P y EMA, no presentando el reverso ninguna coloración en los dos primeros medios, mientras que en el último de los mencionados, el reverso fue de color amarillento. En el medio EMA-P, tanto el anverso como el reverso fueron de color amarillento.
 20. Microscópicamente, la cepa *N. lepideus* 90.02 a 26°C, presentó fíbulas, hifas de 2.0-5.0 µm y ausencia de clamidosporas.
 21. El inóculo de la cepa de *N. ponderosus* 02.02 a 18°C se produjo en menor tiempo (40 días) en aserrín de pino a 26°C.
 22. En la cepa de *N. ponderosus* 02.03, el inóculo se produjo en menor tiempo en granos de trigo (41 días) a 26°C.

23. En la cepa de *N. ponderosus* 145.02, el inóculo se produjo en menor tiempo en granos de trigo (40 días) a 26°C.
24. En la cepa de *N. lepideus* 90.02, el inóculo se produjo en menos tiempo en granos de trigo (30 días) a 26°C.
25. La cepa *N. ponderosus* 02.02, obtuvo su mayor eficiencia biológica en el sustrato F3 (29.91%), con una tasa de producción de 0.52 y con cuerpos fructíferos entre 5 y 10 cm de diámetro en el píceo, fructificando también en el sustrato F4.
26. La cepa *N. ponderosus* 02.03 fructificó en tres de los sustratos (F1, F3 y F4), obteniéndose la mayor eficiencia biológica en el sustrato F3 (12.84%), con una tasa de producción de 0.22 y con cuerpos fructíferos de 1 a 10 cm de diámetro en el píceo.
27. La cepa *N. ponderosus* 145.02 solamente fructificó en el sustrato F3, alcanzando una eficiencia biológica de 21.62 %, una tasa de producción de 0.37 y cuerpos fructíferos entre 1 a más 10 cm de diámetro en el píceo.
28. La cepa de *N. lepideus* 90.02, fructificó en los sustratos F1, F2 y F3, obteniendo en el sustrato F3 la mayor eficiencia biológica con 11.27 %, una tasa de producción de 0.21 y cuerpos fructíferos menores a 5 cm de diámetro en el píceo.

XI. RECOMENDACIONES

1. Estudiar las cepas de *Neolentinus* con colonias de color amarillento o café, para evaluar su capacidad de producción de posibles metabolitos secundarios.
2. Realizar más estudios sobre el sustrato conformado por madera de pino y salvado de arroz al 5% (F3), a efecto de incrementar la productividad de las cepas.
3. Estudiar las cepas sobre otras clases de sustratos, tales como aserrín y troncos de encino o troncos de pino para evaluar su productividad.
4. Recolectar más cepas nativas de *Neolentinus* para ampliar el banco genético actual.
5. Identificar otras especies de *Neolentinus* presentes en Guatemala no solo para conocer su diversidad sino además para su bioprospección.
6. Transferir la tecnología generada en este estudio a personas del área rural del país, para beneficio alimenticio y económico a través del cultivo de este hongo comestible.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos C. *et al.* 1996. Introductory Mycology. 4^a. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América; 880p. p50, 221.
2. Bran M.C., *et al.* 2002. Hongos comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase II). Informe Técnico Final, Dirección General de Investigación.
3. Bran M.C., *et al.* 2003a. Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación.
4. Bran M.C., *et al.* 2003a. Hongos Comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación.
5. Bran M.C., *et al.* 2003b. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en Guatemala. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Edición Especial, Revista Científica. Vol 1 (1): 1-24.
6. Bran M. *et al.* 2004. Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI). Informe de Avance 2004. Guatemala 60p.
7. Bran M.C., *et al.* 2005. 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. Dirección General de Investigación. USAC. 75p.
8. Bran M.C., *et al.* 2006. Mejoramiento genético y producción de inóculo de cepas nativas de *Pleurotus* spp. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC. 65p.
9. Bull, A. *et al.* 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64 (3): 573–606.
10. Chang S., Miles, P. 2004. Mushrooms, cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2a. Ed. CRC Press. USA.
11. Crueger, W., Crueger, A. 1984. Biotechnology. A text book of industrial microbiology. Sunderland & Sinauer Associates, Madison, Wisconsin, USA. 308p. p50-51.
12. De León R. 2003. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. Micol. Apl. Int. 15(1): 31-35.
13. Deschamps J. 2003. Producción y comercialización de hongos comestibles. 1^a. Ed. Orientación Gráfica Editora S.R.L. Buenos Aires, Argentina; 210p.
14. Duarte, O. *et al.* 2006. La bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de bioprospección. Resúmenes de las VI Jornadas Latinoamericanas de estudios sociales de la ciencia y la tecnología –ESOCITE-. Bogotá, Colombia, Abril de 2006.
15. Gaitán-Hernández R. 2000. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. Rev. Iberoam. Micol. 17:20-24.
16. Gaitán-Hernández, R., Mata, G., Guzmán, G. 1995. Behavior of a mexican strain of *Lentinus lepideus* on three solid media. Rev. Mex. Mic. 11:23-27.

17. García E. 1999. Cultivo de *in vitro* de cepas silvestres guatemaltecas de *Auricularia* sp. Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 43p.
18. Guarro J., Gené J., Stchigel A. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3): 454-500.
19. Guillén-Navarro G., Márquez-Rocha F., Sánchez-Vásquez J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 302-306.
20. Guzmán G. 2003. Los hongos de El Edén, Quintana Roo. Introducción a la micobiota tropical de México. INECOL y CONABIO, Xalapa, Veracruz, México; p7.
21. Hawksworth, D. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95 (6): 641-655.
22. Hawksworth, D. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105 (12): 1422-1432.
23. Hawksworth, D., *et al.* 1995. Ainsworth & Bisby's, dictionary of the fungi. 8th ed. CAB International. United Kingdom. p310. 616p.
24. Jin, M., *et al.*, 2003a. Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp. Biol. Med.* 228:749-758.
25. Jin, M., *et al.* 2003b. Enhancement of Repopulation and Hematopoiesis of Bone Marrow Cells in Irradiated Mice by Oral Administration of PG101, a Water-Soluble Extract from *Lentinus lepideus*. *Exp. Biol. Med.* 228:759-766.
26. Lau Bonilla D. 2001. Factores que afectan el crecimiento miceliar y la degradación del sustrato por *Agrocybe aegerita*. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 48 p.
27. Lechner B, Wright, J. 2002. First record of *Neolentinus schaefferi* in the Americas. *Mycotaxon* 82:281-287.
28. Lechner, B., Wright, J., Albertó, E. 2004. The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia.* 96 (4): 845-858.
29. Mier T., Toriello C., Ulloa M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1^a. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México p34.
30. Miller, O. K. Jr. 1965. Three new species of lignicolous agarics in the *Tricholomataceae*. *Mycologia* 57: 933-945.
31. Moreno-Fuentes A. *et al.* 1996. Kuté-mo'kó-a: Un hongo comestible de los indios Rarámuri de México. *Rev. Mex. Mic.* 12:31-39.
32. Mueller G. *et al.* 2004. Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. USA. 777p. p1.
33. Nobles, M. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Botany* 43: 1097-1139.
34. Palacios, A. 2000a. Investigación sobre la potencialidad de cultivo de dos cepas silvestres de *Neolentinus lepideus* y *N. ponderosus*. En: Memorias del VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, México, p53-54.
35. Palacios, A. 2000b. Evaluación de un filtro de fibra sintética para el intercambio de gases en el desarrollo de *Neolentinus lepideus* (Fr.: Fr.) Fr. en viruta de *Pinus* spp pasteurizada, en condiciones rústicas. En: Memorias del VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, México, p54-55.
36. Pegler D. 1983. The genus *Lentinus*: A world monograph. 1^a. ed. Kew Bulletin Additional Series X. London, 1738p.

37. Quimio, T. 2001. VII. Preparación de la semilla. En: Sánchez, J., Royse, D., (Eds.). La Biología y cultivo de *Pleurotus* spp. Editorial Limusa, México. 294p. p152-153.
38. Redhead S., Ginns J. 1985. A reappraisal of agaric genera associated with brown rots of woods. Trans. Mycol. Soc. Japan 26: 349-381.
39. Salmones, D., *et al*, 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*.VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. Rev. Iberoam. Micol. 14: 173-176.
40. Sobal, M., *et al*. 2007. Classical characterization of mushrooms genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. Micol. Apl. Int. 19 (1): 15-23.
41. Stamets, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press & Mycomedia. Olympia, WA, USA. 554p. p90, 113.
42. Vallejo R. 2002. 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). 48p.

XIII. ANEXOS

Anexo 1.

Porcentaje de humedad y peso seco de los sustratos formulados para la producción de cuerpos fructíferos.

Formulación de sustrato	Peso total húmedo del sustrato	% humedad	Peso seco del sustrato
1	1000 g	64.54	354.46 g
2	1000 g	61.13	388.70 g
3	1000 g	64.35	356.65 g
4	1000 g	55.66	443.40 g