

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-  
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN DESARROLLO  
INDUSTRIAL –PUIDI-**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y  
BIOLÓGICAS –IIQB-**

**Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Panq'oq'  
(*Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke): caracterización *in vitro* y producción de  
cuerpos fructíferos**

**COORDINADORA**

**Licda. María del Carmen Bran González**

**INVESTIGADORES**

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

**AUXILIAR DE INVESTIGACIÓN**

**Br. Carmen Natalia Gurriarán Quiróz**

**Inicio de la Investigación: Enero de 2011  
Conclusión de la investigación: Diciembre de 2011**

**Guatemala, 10 de enero de 2012**

## ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
A. Generalidades de los hongos	3
B. Hongos comestibles	3
1. Morfología	4
2. Ciclo de vida	4
3. Valor nutricional	5
C. Cultivo de hongos comestibles	5
1. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala	6
D. <i>Lepista nuda</i> (Bull.: Fr.) Cooke	8
1. Clasificación taxonómica	8
2. Características morfológicas	8
3. Características miceliales	8
4. Hábitat	9
5. Etnomicología	9
6. Requerimientos para el cultivo de <i>L. nuda</i>	9
a. Crecimiento micelial	9
b. Producción de inóculo	9
c. Producción de cuerpos fructíferos	9
7. Propiedades nutritivas y medicinales <i>L. nuda</i>	10
IV. JUSTIFICACIÓN	11
V. OBJETIVOS	12
VI. HIPÓTESIS	13
VII. METODOLOGÍA	14
VIII. RESULTADOS	19
IX. DISCUSIÓN	31
X. CONCLUSIONES	37
XI. RECOMENDACIONES	38
XII. REFERENCIAS	39
XIII. ANEXOS	43

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### TABLAS

	Página
Tabla 1. Procedencia y registros de las cepas	14
Tabla 2. Crecimiento micelial de cepas de <i>L. nuda</i> en diferentes medios de cultivo y temperaturas	20
Tabla 3. Características macro y microscópicas de las cepas de <i>L. nuda</i> a 18°C	22
Tabla 4. Características macro y microscópicas de las cepas de <i>L. nuda</i> a 26°C	23
Tabla 5. Producción de inóculo de cepas de <i>L. nuda</i> en diferentes sustratos	27

### FIGURAS

	Página
Figura 1. Características macroscópicas de la cepa <i>L. nuda</i> 17.01	24
Figura 2. Características macroscópicas de la cepa <i>L. nuda</i> 54.02	24
Figura 3. Características macroscópicas de la cepa <i>L. nuda</i> 50.09	25
Figura 4. Características macroscópicas de la cepa <i>L. nuda</i> 4.10	25
Figura 5. Características macroscópicas de la cepa <i>L. nuda</i> 21.10	26
Figura 6. Características microscópicas de la cepa <i>L. nuda</i>	26
Figura 7. Producción de inóculo de la cepa <i>L. nuda</i>	27
Figura 8. Colonización de cepas de <i>L. nuda</i> en el Sustrato 1	29
Figura 9. Colonización de cepas de <i>L. nuda</i> en el sustrato 2	30

### GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Comportamiento general del crecimiento micelial de las cepas de <i>L. nuda</i> en diferentes medios de cultivo y temperaturas	21
Gráfica 2. Efecto general de los medios de cultivo evaluados sobre el crecimiento micelial de las cepas de <i>L. nuda</i> a diferentes temperaturas	21
Gráfica 3. Efecto general de la temperatura sobre el crecimiento micelial de las cepas de <i>L. nuda</i>	22
Gráfica 4. Comportamiento general del crecimiento micelial de las cepas nativas de <i>L. nuda</i> sobre diferentes sustratos	28
Gráfica 5. Efecto general del sustrato en la producción de inóculo de cepas nativas de <i>L. nuda</i>	28

**Hoja de firmas del informe final del proyecto**

**Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Panq'oq'  
(*Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke) caracterización *in vitro* y producción de  
cuerpos fructíferos**

**Licda. María del Carmen Bran González  
COORDINADORA/INVESTIGADORA**

**Lic. Roberto Cáceres Staackmann  
Investigador**

**Lic. Osberth Morales Esquivel  
Investigador**

**Dr. Roberto Flores Arzú  
Investigador**

**Br. Natalia Gurriarán Quiróz  
Auxiliar de Investigación II**

**Dr. Roberto Flores Arzú  
DIRECTOR  
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas  
-IIQB-**

## I. Resumen

Guatemala posee gran diversidad de hongos comestibles que se conocen desde tiempos inmemoriales, uno de ellos es *Lepista nuda*, especie que es utilizada como alimento por personas de la etnia Kaqchikel que habitan los municipios de Comalapa, San Martín Jilotepeque y Tecpán Guatemala (Chimaltenango), donde se le conoce como panq'oq' (Bran, Morales, Cáceres, y Flores, 2003a; Bran, *et al.*, 2003b; Morales, 2001), así como por la etnia Mam del municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango (Flores, *et al.*, 2002; Morales, Bran y Cáceres, 2010).

*L. nuda* es una especie comestible que crece en forma silvestre y se consume en varios países de Europa, América y Australia. La combinación de su color lila, estructura sólida, su aspecto fresco, delicioso sabor y aroma, hacen de ella una especie comestible atractiva (Stott, Broderick, & Nair, 1996). Contiene más del 40% de proteína por 100 gramos en peso seco y un alto valor energético, es rica en vitamina B<sub>1</sub> y varios minerales. Además tiene propiedades medicinales, antitumorales e hipoglucémicos (Volz, 2000).

Por tal motivo, en esta investigación se estudiaron cinco cepas nativas de *L. nuda* y se evaluó su crecimiento *in vitro* en tres medios de cultivo (agar extracto de malta –MEA-, agar papa dextrosa –PDA- y agar Sabouraud –SAB-) a dos temperaturas (18 y 26°C); la producción de inóculo en granos de trigo, cebada y sorgo, así como su fructificación sobre paja de trigo con salvado de arroz al 25% (sustrato 1) y compost de *Agaricus* (sustrato 2).

Se determinó que el medio de cultivo en el cual la mayoría de cepas de *L. nuda* obtuvieron el mejor crecimiento micelial fue agar MEA a 26°C, y la cepa 4.10 presentó el mayor diámetro de crecimiento en este mismo medio, en ambas temperaturas. La mayoría de cepas en todos los medios y temperaturas evaluados presentaron colonias de color blanco a lila, textura algodonosa, bordes irregulares, con hifas de 1 a 4 µm, fíbulas en regular cantidad a abundantes y ninguna otra estructura.

La producción de inóculo se obtuvo en todos los granos evaluados, sin embargo, fue en los granos de trigo donde las cepas de *L. nuda* presentaron mayor velocidad de colonización. No se obtuvieron cuerpos fructíferos de ninguna de las cepas en los sustratos evaluados, sin embargo, se observó colonización micelial con formación de cordones miceliares.

Se recomienda evaluar el crecimiento de las cepas a diferentes pH, así como el uso de suplementos naturales para el cultivo de *L. nuda*.

**Palabras claves:** Hongos comestibles, *Lepista nuda*, cultivo, saprobio, cepas nativas, sustrato.

## II. Introducción

Los hongos comestibles se conocen desde tiempos inmemoriales. Se estima que cerca de 7,000 especies poseen varios grados de comestibilidad, y más de 3,000 especies de 31 géneros se consideran como las principales comestibles (Chang & Miles, 2004).

Guatemala posee una gran diversidad de hongos comestibles. Uno de ellos es *Lepista nuda*, especie que es muy apreciada como alimento por personas de la etnia Kaqchikel de los municipios de Comalapa, San Martín Jilotepeque y Tecpán Guatemala (Chimaltenango), donde se le conoce como panq'oq', encontrándose de venta en los mercados de dichas localidades (Bran, *et al.*, 2003a,b; Morales, *et al.*, 2010). También la conocen los habitantes de la etnia Mam del municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, refiriéndose a ella como xew (Flores, *et al.*, 2002; Morales, *et al.*, 2010).

*L. nuda* es una especie saprobia y degradadora que crece también sobre lecho foliar de bosques de *Pinus* y *Quercus*, característica que hace factible su cultivo sobre residuos que se generan de las actividades madereras y agrícolas del país. Mediante su cultivo, se podría dar uso sustentable no sólo a la diversidad fúngica nativa, sino también al aprovechamiento de los residuos agrícolas y forestales para producir cuerpos fructíferos comestibles, creando alternativas alimenticias y económicas que contribuyan al desarrollo de las comunidades campesinas (Bran, *et al.*, 2004).

Actualmente, gracias a los fondos que la Universidad de San Carlos de Guatemala destina para la investigación, se conoce el uso tradicional y aprecio que se tiene por *L. nuda* en las comunidades de la etnia Kaqchikel. Asimismo, se han aislado a nivel de laboratorio varias cepas nativas de esta especie. Sin embargo, sus características de cultivo aún no habían sido estudiadas.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar cinco cepas nativas de *L. nuda*, evaluando su crecimiento *in vitro* en diferentes medios de cultivo y temperaturas, producción de inóculo, así como su cultivo a nivel de sustrato para fines de producción de cuerpos fructíferos.

### III. Antecedentes

#### A. Generalidades de los hongos

Los hongos forman un grupo taxonómico independiente de los vegetales y los animales, al cual se le denomina Reino Fungi. Los organismos que lo conforman son heterótrofos, inmóviles, poseen talos unicelulares o filamentosos rodeados por paredes celulares y se reproducen por esporas sexuales y asexuales. De acuerdo con el tamaño de las fructificaciones que producen, se pueden clasificar en macrohongos y microhongos, según sean macroscópicos o microscópicos, respectivamente, e incluso existen microhongos que no producen fructificaciones (Alexopoulos, 1996; Guzmán, 2003).

Actualmente, los micólogos han tenido un progreso sin precedente al elaborar una clasificación filogenética de los hongos, basada en análisis de ADN, la cual evidenció que son organismos polifiléticos con morfologías convergentes, pero que derivaron independientemente de varios linajes eucarióticos. Así, se clasifican en cuatro phyla: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Alexopoulos, 1996; Guarro, Gené & Stchigel, 1999; Galagan, Henn, Cuomo, & Birren, 2005; Hawksworth, 2006).

El número de hongos en el mundo suponen 1.5 millones de especies, de manera que, si este estimado es correcto, se han descrito menos del 5% de las especies (Hawksworth, 1991; 2001). Esto se debe a que aún se tiene información incompleta de muchas especies, ya que los hongos y los grupos parecidos a los hongos (mohos acuáticos, Reino Straminipila, mohos limosos y relacionados, Reino Protista) comprenden una asombrosa variedad de taxa, estrategias de vida y morfologías (desde las formas similares a amebas y Chytridiomycetes acuáticos unicelulares, hasta los grandes hongos Basidiomycetes) (Mueller, Bills & Foster, 2004).

Los hongos se cuentan entre los más importantes en el mundo, no solo por el papel vital en la función de los ecosistemas, sino que además son esenciales e incluso cruciales en actividades como la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente. Algunas especies son patógenas importantes de plantas y animales, mientras que otras forman simbiosis obligadas con algunas especies de plantas, algas, cianobacterias, animales y plantas (Mueller, *et al.*, 2004).

Muchos hongos también tienen una gran importancia económica, aquellos que se han domesticado se utilizan en la elaboración de cerveza, en cocina, fermentación industrial, biotecnología y algunas otras especies se cultivan o se recolectan para ser utilizadas como alimento (Guzmán, 2003).

#### B. Hongos comestibles

Los hongos comestibles se conocen desde tiempos inmemoriales. Se estima que cerca de 7,000 especies poseen varios grados de comestibilidad, y más de 3,000

especies de 31 géneros se consideran como las principales comestibles (Chang & Miles, 2004).

## 1. Morfología

Los hongos comestibles se consideran macrohongos y se pueden encontrar principalmente en el grupo Basidiomycota. Los cuerpos fructíferos de este grupo pueden ser carnosos, gelatinosos o pulverulentos y tener forma de sombrilla, oreja, repisa, trompeta, coral, etc.; y poseen basidios, que son estructuras microscópicas especializadas sobre las cuales se producen las esporas (basidiosporas) (Mata, Mueller y Halling, 2003).

El típico cuerpo fructífero posee un píleo (sombrero), himenóforo (estructura que sostiene la capa fértil, ya sea lamelas, tubos, etc.), contexto y estípote. Los cuerpos fructíferos sésiles que no tienen estípote no son comunes, como en el caso de las llamadas “orejas de palo”, que se adhieren lateralmente al sustrato; “costras” que no tienen píleo ni estípote, y unos cuantos con características únicas de ellos o típicas de la familia, género o especie a los que pertenecen (Mata, *et al.*, 2003).

## 2. Ciclo de vida

Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan cuando entran en contacto con un sustrato y encuentran una temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento. Dan origen a un micelio primario bien desarrollado, conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleos generalmente haploides. En algunas especies donde únicamente hay un núcleo por compartimiento hifal se le llama monocarión. En estos casos, los términos se utilizan como sinónimos. En la mayoría de los Basidiomycetes el micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. En ciertos tipos de hongos comestibles, puede formar esporas asexuales del tipo oidio que al germinar dan origen a micelio homocarión. En otros casos los oidios funcionan como gametos masculinos y se unen a hifas de micelio compatible para formar el micelio heterotálico, típico de la reproducción sexual (Huerta, 2002).

Para que el cuerpo fructífero se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes cada uno de los compartimentos que se fusionaron. Es a partir de estos, que por divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos y su posterior migración hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra, se forma el micelio heterocarión o dicarión. A este tipo de micelio también se le conoce como micelio secundario. En la mayoría de casos, este micelio presenta en cada septo una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula. El micelio que presenta este tipo de estructura frecuentemente se identifica como heterocarión y el que no las tiene como homocarión. Esto no es del todo verdadero, pues en un buen número de hongos el heterocarión no las forma (Huerta, 2002).



El micelio heterocarión es capaz de crecer vigorosamente y de multiplicarse vegetativamente en esta condición de forma indefinida. Aún cuando la inducción y la formación de los basidiocarpos o setas son regulados por la interacción de un gran número de factores, se pueden mencionar que estas son favorecidas por los cambios bruscos de humedad y concentración de CO<sub>2</sub> (Huerta, 2002).

La cariogamia de los núcleos que forman el micelio heterocariótico, se presenta en las puntas de las hifas que forman la capa fértil del basidiocarpo (himenio), dando origen a basidios monocarióticos y diploides. Posteriormente el núcleo (2n) presenta meiosis y da origen a cuatro núcleos haploides (1n) que migran hacia los esterigmas, para formar las basidiosporas generalmente haploides y con un solo tipo de núcleo (Huerta, 2002).

Las basidiosporas maduras son liberadas y pueden ser diseminadas por el viento, insectos, agua, animales y otros factores, para dar origen a hifas somáticas uninucleadas e iniciar nuevamente el ciclo de vida del hongo (Huerta, 2002).

### **3. Valor nutricional**

Los análisis de la composición de los hongos cultivados han revelado que los hongos comestibles son ricos en proteínas y carbohidratos, moderados en fibra y cenizas, y bajos en grasas. Su valor energético es bajo, y son una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. El potasio y el fósforo son dos elementos dominantes en la porción mineral. Los hongos contienen una porción sustancial de tiamina, riboflavina, niacina y de vitamina B<sub>2</sub>. En 100g de proteína cruda hay 32 a 48g de nueve aminoácidos esenciales. De estos, la lisina es la más abundante, mientras que las cantidades de triptófano y metionina son bajas (Chang & Miles, 2004).

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

Se estima que el primer intento por cultivar hongos tuvo lugar en China hace 1,400 años. La primera especie cultivada fue *Auricularia auricula*, la siguiente fue *Flammulina velutipes*, la cual se cultivó 200 a 300 años después y la tercera fue *Lentinula edodes* (Chang & Miles, 2004).

Los hongos pueden ser cultivados a través de una variedad de métodos. Algunas técnicas son simples y requieren de poca o casi nada de experiencia por parte del cultivador. Otros, demandan técnicas sofisticadas ya que incluyen procedimientos como el cultivo de tejido estéril. Los métodos simples toman poco tiempo, pero también requieren mayor paciencia por parte del cultivador. A medida que se progresa hacia métodos más técnicos la probabilidad de éxito se ve incrementada (Quimio & Chang, 1990).

El cultivo de hongos comestibles requiere el cumplimiento de diferentes fases las cuales comprenden: a) selección del hongo, b) determinación de los requerimientos

para el cultivo, c) producción de inóculo, d) preparación del sustrato, e) desarrollo del micelio y f) desarrollo de los cuerpos fructíferos (Chang & Miles, 2004; Huerta, 2002).

El uso extensivo de las técnicas mecanizadas para cultivo de hongos como alimento, en grandes cantidades, es un fenómeno del siglo XX. Actualmente en el mundo, se han estudiado para fines de cultivo, 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., *Volvarellia volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizygus 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*, *A. cylindracea*, *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).

## 1. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala

El cultivo de hongos comestibles en Guatemala comenzó en el año 1955, con la implementación del cultivo de champiñón (*A. bisporus* (Lange) Imbach) con cepas de origen norteamericano. Posteriormente, se inició con el cultivo de *Pleurotus* a nivel de laboratorio en el Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), empleando una cepa inglesa de *P. flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc., que cultivaron sobre diversos sustratos (De León, Morales, Agreda y Rolz, 1983; De León, Guzmán y Martínez-Carrera, 1988).

En el año 1977, se estableció la primera planta productora de *A. bisporus* y su actividad continúa hasta ahora. En la actualidad, cuatro compañías cultivan también este hongo y todas utilizan paja de trigo como sustrato. La producción de *Agaricus* en Guatemala es de 68,504 kg por año, el 70% de esta producción se consume en el país y el resto se exporta (De León, 2003).

La primera planta productora de *L. edodes* se estableció en 1979, utilizando troncos de *Quercus* como sustrato. La producción comercial de *Pleurotus* inició en 1986, utilizando paja de trigo y pulpa de café como sustrato. La producción anual de *Pleurotus* es de aproximadamente de 29,580 Kg y la mayoría se consume en Guatemala. Este tipo de hongo se vende en los mercados y supermercados, aunque inicialmente fue consumido por los franceses e italianos residentes en Guatemala (De León, 2003).

La producción total de hongos comestibles en Guatemala ha sido estimada en 132,104 kg por año, incluyendo *A. bisporus* y *A. bitorquis* (51.9%), *L. edodes* (25.7%), y *Pleurotus* spp. (22.4%) (De León, 2003).

En el país también 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. 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, Morales, González, Flores y Cáceres, 2006).

Se ha logrado el cultivo de cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*, utilizando como sustrato aserrín y viruta de pino, enriquecidos con salvado de arroz al 5%. Los resultados generados mostraron que es posible su cultivo a nivel artesanal en comunidades campesinas (Bran, Morales, Flores, Cáceres y Blanco, 2007).

Por otro lado se ha evaluado el crecimiento miceliar de cinco cepas nativas de *Schizophyllum commune* en diferentes medios de cultivo y temperaturas, la producción de inóculo sobre diferentes vehículos y la fructificación sobre varios desechos agrícolas y forestales. Como producto de esta investigación se establecieron las condiciones de cultivo de cada una de las cepas evaluadas determinándose que los medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y extracto de malta (MEA) incubados a 26°C son los más adecuados para el crecimiento miceliar dependiendo de las cepas. Se determinó también que la producción de inóculo debe realizarse en granos de trigo a 26° C y la fructificación en olote de maíz picado, esterilizado en autoclave con vapor a presión (Bran, Morales, Flores y Cáceres, 2008).

En un estudio reciente se estudiaron cinco cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* evaluándose su crecimiento *in vitro*, producción de inóculo, así como su fructificación sobre dos sustratos. Como resultado de esta investigación se determinó que el medio extracto de malta (MEA) incubado a una temperatura de 18°C, fue el más adecuado para el cultivo de las cepas evaluadas. En la producción de inóculo, los granos de trigo fueron los más adecuados para el crecimiento de las cepas. Asimismo, todas las cepas colonizaron el sustrato constituido por paja de trigo. Se determinó que la cepa *A. cylindracea* 638.08 fue la única que produjo cuerpos fructíferos en este sustrato, obteniéndose una eficiencia biológica de 15.23% (Bran, Morales, Flores, Cáceres y Gurriarán, 2009).

## D. *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke

*Lepista* es un género con una amplia distribución mundial, se le cita en América, Europa, Asia, África y Australia. *L. nuda* es la especie más estudiada, comúnmente se le conoce como "pie azul" (Stamets, 1993, Gaitán-Hernández & Baéz, 2008).

*L. nuda* es un hongo comestible de excelente aceptación mundial y se encuentra creciendo en forma silvestre y se consume en Europa, América y Australia. La combinación de su color lila, estructura sólida fresca, aspecto, delicioso sabor y aroma lo hace una especie atractiva como comestible (Stott, *et al.*, 1996). Su cultivo industrial se realiza en Francia y otros países de Europa. En algunos mercados de Madrid se comercializa fresca todo el año procedente de cultivos franceses (Sierra Fernández, López Díaz, y García-Garabal, 2002).

### 1. Clasificación taxonómica:

Se clasifica en el Phylum Basidiomycota, Clase Basidiomycetes, Subclase Agaricomycetidae, Orden Agaricales, Familia *Tricholomataceae*, Género *Lepista*, especie *nuda* (Hawksworth, Kirk, Sutton & Pegler, 1995).

Son sinónimos de *Lepista nuda*: *Tricholoma nudum* Quélet, *Rhodopaxillus nudus* (Bulliard ex Fries) Maire, *Tricholoma personatum* Fries y *Clitocybe nuda* (Fr.) Begeloww y Smith. Dentro de los nombres vulgares se le conoce en otros países como Pie Azul o Pimpinela Morada (Sierra Fernández, *et al.*, 2002).

### 2. Características morfológicas:

**Píleo** de 105 a 140 mm de diámetro, plano convexo a plano, centro deprimido, margen recto en jóvenes a un poco ondulado en adultos, borde entero e incurvado en jóvenes, decurvado a ondulado y finamente estriado en adultos. Superficie higrófana, lisa y cerosa en seco. Cutícula poco desprendible. Contexto lleno, 6 mm de grosor, consistencia carnosa-esponjosa, color blanquecino violáceo en el margen y rosáceo pálido en el centro y parte del margen. En adultos, color violáceo en el borde y violáceo en el margen y centro. **Himenio** con láminas adheridas, muy juntas, angostas, levemente onduladas, borde liso, color violáceo en jóvenes y rosáceo-café en adultos. Lamélulas subtruncadas. **Estípite** de 50 a 60 mm de longitud, 10 mm de diámetro en el ápice y 9 mm de diámetro en la base, cilíndrico, fibriloso longitudinalmente con superficie de color violácea con fibras blanquecinas a rosáceo. Contexto lleno, fibriloso, de color violáceo. Esporas de 6.0-10.0 x 3.0-4.0 µm, subglobosas, finamente punteadas a verrucosas, hialinas (Bran, *et al.*, 2003a).

### 3. Características miceliales:

En estudios realizados en el medio Melin-Norkrans –MMN- se han encontrado las siguientes características macro y microscópicas: Micelio pardo claro. Micelio aéreo blanco, poco abundante, distribuido por toda la superficie de la colonia. Margen irregular blanquecino. Reverso pardo claro. El diámetro de la colonia tras cuatro

semanas de crecimiento es de 2,6 cm. Hifas hialinas o ligeramente pigmentadas de paredes delgadas, de 1 a 5,2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Ramificaciones simples. Con fíbulas (Sánchez, Honrubia y Torres, 2000). En otros medios como el Agar Extracto de Malta (MEA), adicionado con 2% de extracto de levadura el micelio presenta tonalidades lilas o azuladas (Gaitán-Hernández & Baéz, 2008).

#### **4. Hábitat:**

Saprobio (Sánchez, *et al.*, 2000), crece de manera silvestre en bosque de *Pinus* y *Quercus* sobre el mantillo (Gaitán-Hernández & Baéz, 2008; Stott, *et al.*, 1996).

En Guatemala se le ha encontrado creciendo en bosque de *Pinus* y *Quercus* (Bran, *et al.*, 2003a) y bajo arbustos de café.

#### **5. Etnomicología:**

Este hongo comestible es popular en el Departamento de Chimaltenango. Es utilizada como alimento por personas de la etnia Kaqchikel que habitan los municipios de Comalapa, San Martín Jilotepeque y Tecpán Guatemala, donde se le conoce como panq'oq' (lo de adentro del chilacayote) de venta en los mercados municipales (Bran, *et al.*, 2003 a,b).

También se le conoce en el municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, donde los habitantes de la etnia Mam se refieren a ella Xew (Flores, *et al.*, 2002; Morales, *et al.*, 2010).

#### **6. Requerimientos para el cultivo de *L. nuda***

##### **a. Crecimiento micelial:**

Para el crecimiento micelial de las cepa se ha recomendado el uso de los medios de cultivo agar extracto de malta (MEA), agar extracto de malta + 2% levadura (MEA) (Stott, *et al.*, 1996), Medio de Caseína hidrolizada o con peptona, a un pH de 7 (Gaitán-Hernández & Baéz, 2008), Medio de Melin Norkrans –MMN- (Sánchez, *et al.*, 2000).

##### **b. Producción de inóculo:**

Se ha informado que el inóculo se prepara en granos de cereales (Stamets, 1993) como el arroz suplementado con  $\text{CaCO}_3$  al 0.5% (Stott, *et al.*, 1996).

##### **c. Producción de cuerpos fructíferos:**

El sustrato utilizado para la producción de cuerpos fructíferos de *L. nuda* en cultivos industriales, es el mismo compost que se emplea para la producción de champiñón (*Agaricus* sp). Se ha recomendado también para la inducción de cuerpos fructíferos aplicar choque frío (Sierra Fernández *et al.*, 2002, Stott *et al.*, 1996).

También se ha indicado que fructifica sobre aserrín o viruta de encino y aliso suplementado. También pueden utilizarse madera de sauce, álamo, chopo y maple. Se recomienda el uso de bolsas de polipropileno para contener los sustratos que se usen para la fructificación (Stamets, 1993).

### **7. Propiedades nutritivas y medicinales de *L. nuda*:**

Contiene más del 40% de proteína por 100 gramos en peso seco y un alto valor energético, es rico en vitamina B<sub>1</sub> y varios minerales (Trigos y Suárez-Medellín, 2010).

Se le considera un hongo medicinal, ya que en investigaciones previas se ha encontrado que el extracto acuoso del micelio inhibe el crecimiento de algunas bacterias, además posee propiedades antitumorales, inhibe el sarcoma 180 y el carcinoma de Ehrlich al 90 y 100% respectivamente (Ying, Mao, Ma, Zong, & Wen, 1987); también se ha reportado que actúa como hipoglucémico (Volz, 2000).

#### IV. Justificación

Es de conocimiento general que enormes cantidades de residuos lignocelulósicos y otros desechos orgánicos se generan anualmente en el mundo, como producto de las actividades agrícolas, forestales y de la industria de alimentos. Más de 3000 millones de toneladas métricas (TM) de rastrojos estaban disponibles en el mundo en el año 1999, y, alrededor de la mitad de estos residuos no se utilizaron con ningún fin. Si se considera que en el cultivo de hongos comestibles se puede obtener eficiencias biológicas del 60 al 75% en una cosecha, y si se lograra cultivar hongos comestibles sobre dichos residuos, se podrían obtener cerca de 803 TM de hongos comestibles frescos (Chang & Miles, 2004)

En tal sentido, las poblaciones silvestres de hongos representan no sólo un potencial para ser cultivados como una fuente alterna de alimento, sino también para la búsqueda de metabolitos secundarios de beneficio para la humanidad. Latinoamérica es una región fundamental en la conservación de la biodiversidad, por lo que se hace necesaria la caracterización del germoplasma fúngico nativo (Sobal, Martínez-Carrera, Morales y Roussos, 2007).

El cultivo de hongos comestibles adquiere cada vez mayor importancia en el mundo por sus beneficios ecológicos, económicos y de dieta. Para Guatemala representa una alternativa que generaría ventajas bastante 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).

En el país, gracias a los estudios financiados por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han aislado cepas nativas de *L. nuda*, a partir de especímenes provenientes de las localidades donde se comercializa y se utiliza como alimento. Estas cepas nativas pueden ser utilizadas con fines de bioprospección de la diversidad fúngica y como una alternativa alimenticia y económica, mediante la producción de cuerpos fructíferos en comunidades campesinas, los cuales pueden utilizarse tanto para el autoconsumo como para la venta, así como para la producción de sustancias medicinales antitumorales e inmunoestimulantes, las cuales son de utilidad en las terapias contra el cáncer.

Por lo tanto, se hizo necesario el estudio de estas cepas nativas, para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas, producir el inóculo sobre varios sustratos como vehículos y determinar su fructificación sobre varios desechos agrícolas y forestales, con el fin de generar una tecnología que posteriormente podría utilizarse para el cultivo en regiones rurales del país, como una alternativa alimenticia, económica y medicinal.

## V. Objetivos

### General

Establecer el comportamiento de cepas nativas de *Lepista nuda* en diferentes medios de cultivo y temperaturas, producción de inóculo a nivel de laboratorio así como evaluar la productividad de las cepas sobre diversos sustratos.

### Específicos

1. Determinar el medio de cultivo y la temperatura de incubación donde las cepas presenten el mayor crecimiento miceliar, a través de la evaluación del diámetro de las colonias.
2. Describir las características macro y microscópicas de cultivo *in vitro*, obtenidas en diferentes medios de cultivo y temperaturas, para documentar las características morfológicas de las colonias y los tipos de hifas que exhiben cada una de las cepas.
3. Evaluar la producción de inóculo sobre diferentes vehículos y a una temperatura de incubación, a través de la determinación del tiempo de colonización miceliar.
4. Evaluar la productividad de las cepas sobre diferentes sustratos, a través de la cuantificación de la eficiencia biológica y tamaño del píleo.



## VI. Hipótesis

1. Las cepas de *Lepista nuda* evidencian una mayor velocidad de crecimiento micelial en por lo menos en un medio de cultivo y una temperatura a estudiar.
2. El tiempo de colonización de las cepas de *L. nuda* para la producción de inóculo es menor sobre granos de sorgo.
3. La eficiencia biológica de las cepas de *L. nuda*, presentan valores mayores al 10% en un sustrato.

## VII. Metodología

### Fase de laboratorio

**A. Revitalización de las cepas de *Lepista nuda*:** Las cepas que se utilizaron están depositadas en el Ceparío de hongos Saprobios y Micorrícicos, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). Las cepas en mención fueron las siguientes (Tabla 1):

**Tabla 1. Procedencia y registros de las cepas**

Código de la cepa	Procedencia
17.2001	Tecpán G., Chimaltenango
54.2002	Km 94 carretera interamericana, TecpánG., Chimaltenango
50.2009	Comalapa, Chimaltenango
4.2010	San Jorge Muxbal, Guatemala
21.2010	Mercado Municipal de Tecpán G. Chimaltenango

Cada una de las cepas fueron revitalizadas sembrándolas en agar PDA e incubándolas a 26°C, por 30 días.

### **B. Determinación del diámetro de las colonias de cada una de las cepas, a diferentes temperaturas y medios de cultivo:**

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier, Toriello y Ulloa (2002) y Stamets (1993).

- Se prepararon medios de cultivo con agar extracto de malta (MEA), agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabuoraud (SAB), todos fueron esterilizados por 10 o 15 minutos a 121°C.
- Luego se inocularon 20 cajas de cada uno de los medios, con cada una de las cepas revitalizadas, con un segmento de 5 mm del cultivo, cada caja fue identificada con el nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición y posteriormente selladas con papel Parafilm para evitar su deshidratación.
- Las 20 cajas de cada medio y cada cepa fueron incubadas a 18 y 26°C, durante un máximo de 21 días.
- El diámetro de las colonias fue monitoreado cada 3 días, mediante la medición de su diámetro en dos planos perpendiculares, de los cuales se obtuvo un promedio en milímetros. Esto se realizó para cada repetición en ambas temperaturas.
- Se elaboró una base de datos en el programa EXCEL<sup>®</sup>, ordenando los datos en forma vertical, incluyendo los siguientes parámetros en cada columna: Cepa (c/u de las 5 cepas), temperatura de incubación (18 y 26°C), medio de cultivo (MEA,

PDA y SAB), día de medición (día 3, 6, 9, 12, 15, 17) diámetro de la colonia de cada una de las repeticiones (mm).

- Posteriormente dicha base de datos fue importada hacia el programa estadístico SPSS 16.0<sup>®</sup>, para su análisis y elaboración de gráficos de interacción de los crecimientos miceliales.

### C. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a lo recomendado por Nobles (1965).

- Se caracterizaron macroscópicamente las colonias de las cepas con ayuda de un estereoscopio: el color del anverso y reverso, textura, consistencia, forma, olor, micelio aéreo, producción de exudado, formación de rizomorfos o agregaciones hifales.
- Además, se realizaron preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales a 400 aumentos. Observar el diámetro de las hifas ( $\mu\text{m}$ ), fíbulas, clamidosporas, hifas en espiral, apresorios y cualquier otra característica relevante.

### D. Producción de inóculo

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Coello-Castillo, Sánchez y Royse (2009).

- Los sustratos (granos de trigo, sorgo y cebada) fueron hidratados por 18 horas, hasta alcanzar aproximadamente el 80% de humedad. Luego fueron colocados individualmente en bolsas de polipapel con 20 gramos en peso húmedo y suplementarlos con 1 % p/p de  $\text{CaCO}_3$ .
- Cada uno fue esterilizado durante 30 minutos a  $121^\circ\text{C}$  y 15 lbs/pulgada<sup>2</sup> de presión, una vez se encontraron a temperatura ambiente, fueron colocados individualmente en cajas de petri de poliestireno estériles de 90 x 15 mm.
- Fueron inoculadas con un fragmento de 5 mm de diámetro del micelio producido previamente de cada una de las cepas (20 repeticiones por sustrato y cepa).
- Cada caja fue identificada con la referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, sustrato, temperatura de incubación y número de repetición, e incubadas a  $26^\circ\text{C}$ .
- El crecimiento miceliar fue monitoreado cada 7 días, hasta que se observó la colonización completa de los sustratos.
- Posteriormente con esos datos se calculó la Tasa de Extensión Radial (RER):  $\text{RER} = \frac{\text{X2} - \text{X1}}{\text{T2} - \text{T1}}$  (mm/día), donde **X1** es el diámetro inicial de la colonia y en mm, **X2** el diámetro final, **T1** el tiempo inicial y **T2** el tiempo final de incubación.
- Se elaboró una base de datos en el programa EXCEL<sup>®</sup> con los siguientes parámetros: Cepa (c/u de las 5 cepas), temperatura de incubación ( $26^\circ\text{C}$ ), sustrato (trigo, sorgo, cebada) y RER (tiempo de colonización de cada una de las repeticiones). Éstos datos luego fueron importados hacia el programa estadístico SPSS 16.0<sup>®</sup>, para su análisis y creación de gráficos de interacción del crecimiento de las cepas.

## **E. Preparación e inoculación de los sustratos para fructificación.**

Se utilizaron dos métodos tradicionales para el cultivo de hongos comestibles:

- **Sustrato 1:** Paja de trigo suplementado con salvado de arroz al 25%.
- **Sustrato 2:** Compost de *Agaricus* (fue proporcionado por cultivadores de champiñón) (Jagnow y Dawid, 1991), Sierra Fernández *et al.*, 2002, Stott *et al.*, 1996)
- Fueron preparadas 20 repeticiones por sustrato y por cepa de 1.0 Kg de cada uno, colocados en bolsas de polipropileno (polipapel) y esterilizarlos por 1 hora a 121°C.
- Los sustratos se inocularon con 200 g del inóculo previamente preparado e incubados a temperatura ambiente, hasta que el micelio colonizó totalmente, en el caso del sustrato 1, aproximadamente de 7 a 10 semanas. En el caso del compost, cuando el micelio colonizó completamente se recubrió con una capa de turba y se disminuyó la temperatura a 18°C, para producción de cuerpos fructíferos.

## **F. Determinación del porcentaje de humedad y peso seco de los sustratos:**

- Se tomaron aleatoriamente cinco muestras de los sustratos 1 y 2, el porcentaje de humedad fue determinado utilizando una balanza medidora de humedad, luego se calculó el promedio del peso seco para cada uno de los sustratos (gramos).

## **Fase de campo**

### **G. Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos**

Los módulos de producción que se utilizaron para esta fase, fueron implementados en las instalaciones del Departamento de Microbiología y de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Chang y Miles (2004).

- Los sustratos colonizados fueron colocados en un área de producción con iluminación natural difusa y ventilación para favorecer la fructificación. Los parámetros medioambientales registrados fueron temperatura y humedad.
- Se cosecharán los cuerpos fructíferos cuantificándose su peso en gramos.
- Se determinará la eficiencia biológica (EB) mediante la fórmula:  $\text{Peso fresco de los cuerpos fructíferos} / \text{peso seco de los sustratos} \times 100$ .
- Se elaborará una base de datos en el programa EXCEL<sup>®</sup> con los siguientes parámetros: Cepa (c/u de las 5 cepas), sustrato (1 y 2), eficiencia biológica (%).
- Posteriormente se importará hacia el programa estadístico SPSS 16.0<sup>®</sup>, para su análisis estadístico y elaboración de gráficos de interacción, para la productividad expresada en porcentaje de eficiencia biológica de cada una de las cepas.

- Las fructificaciones obtenidas serán cuantificadas y clasificadas según el diámetro del péleo: grupo 1 (G1) < 2.0 cm, grupo 2 (G2) entre 2.0 y 4.0 cm y grupo 3 (G3), >4.0 cm.
- Nota: En esta investigación durante el tiempo de ejecución del proyecto se logró la colonización de los sustratos con producción de cordones miceliales precursores de cuerpos fructíferos, sin embargo a la fecha de entrega del informe aún no se han producido los cuerpos fructíferos, por lo que se continúa su monitoreo (ver discusión de resultados).

## **Diseño**

El diseño general de la investigación se planteó de acuerdo con los objetivos presentados:

Objetivo 1:

Diseño factorial: 5 x 3 x 2 x 8 (5 cepas, 3 medios, 2 temperaturas, días de medición).

Réplicas: 20.

Objetivo 2: Descriptivo.

Objetivo 3:

Diseño factorial: 5 x 3 x 1 (5 cepas, 3 sustratos, 1 temperatura).

Réplicas: 20.

Objetivo 4:

Diseño factorial: 5 x 2 (5 cepas, 2 sustratos).

Réplicas: 20.

## **Análisis de la información**

Objetivo 1:

Se efectuaron análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), para evidenciar las diferencias significativas en función del crecimiento de las cepas en los medios de cultivo y temperaturas en el día 17 de crecimiento. Además se elaboraron gráficas de interacción.

Objetivo 2:

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

Objetivo 3:

Se realizó análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), para evidenciar las diferencias significativas en función del tiempo de colonización de las cepas en los sustratos en a 26°C de temperatura de incubación. Además se elaboraron gráficas de interacción.

Objetivo 4:

Se efectuarán análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), para evidenciar las diferencias significativas en función de la eficiencia biológica obtenida para cada una de las cepas en los diferentes sustratos.

Los diámetros de los píleos clasificados en los grupos G1 al 3, se analizaran por medio de la prueba de chi cuadrado ( $\chi^2$ ), además de gráficas de interacción.

## VIII. Resultados

Respecto al crecimiento micelial de las cepas de *L. nuda*, se pudo observar que a 18°C, el mayor diámetro lo obtuvo la cepa 4.10 en el medio MEA (68.14 mm). Asimismo, las cepas 17.01 y 54.02 lo obtuvieron en el medio PDA (63.78 mm y 59.02, respectivamente) y las cepas 21.10 y 50.09 lo presentaron en el medio MEA (61.12 y 57.67, respectivamente) (Tabla 2, Anexo 1).

De manera general, a esta temperatura de incubación se determinó que los mayores diámetros de las colonias se obtuvieron en el medio MEA y los menores en el medio SAB. El mayor diámetro se observó en la cepa 4.10 y el menor en la cepa 54.02 (Gráficas 1 y 2).

Se comprobó que existió diferencia significativa entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ), tomando en cuenta los resultados de crecimiento micelial de todas las cepas. Respecto al análisis del crecimiento general en todos los medios de cultivo, las cepas 4.10 y 21.10 fueron significativamente diferentes entre ellas y con respecto a las demás ( $p < 0.05$ ), en tanto que entre las cepas 17.01 y 50.09, así como entre esta última y la 54.02, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), sin embargo entre las cepas 17.01 y 54.02 si hubo diferencia ( $p < 0.05$ ).

A 26°C se observó que la cepa con el mayor crecimiento fue la 4.10 en el medio MEA (77.83 mm), de igual forma, las cepas 21.10 y 50.09 también crecieron mejor en ese mismo medio (66.14 y 59.69 mm, respectivamente). En contraste, las cepas 17.01 y 54.02 mostraron mayor crecimiento en el medio PDA (54.24 y 54.09 mm, respectivamente) (Tabla 2). De manera general, se determinó que los mayores diámetros de las colonias se obtuvieron en el medio MEA y los menores en el medio SAB (Tabla 2).

Se comprobó que existió diferencia significativa entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ), tomando en cuenta los resultados de crecimiento micelial de todas las cepas. Se encontró que las cepas 4.10, 21.10 y 50.09 presentaron diferencia significativa entre ellas y con respecto a las demás ( $p < 0.05$ ), sin embargo las cepas 17.01 y 54.02 no presentaron diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ ) (Gráfica 2).

Al comparar los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo, se comprobó que la cepa 4.10 obtuvo los mejores crecimientos a ambas temperaturas, sin embargo los resultados observados a 26 y 18°C presentaron diferencia significativa ( $p = 0.003$ ) así como con las demás cepas. Las colonias de menor diámetro se obtuvieron en la cepa 54.02 ambas temperaturas (Gráfica 1).

Al comparar los resultados observados en los medios de cultivo, se evidenció que los crecimientos miceliales de todas las cepas en el medio MEA fueron mayores en ambas temperaturas, sin embargo, existió diferencia significativa entre ellas ( $p = 0.000$ ). Además el crecimiento en el medio SAB a ambas temperaturas fue menor y no existió diferencia significativa ( $p = 0.172$ ) (Gráfica 2).

Asimismo, no existió diferencia entre el crecimiento micelial de las cepas en los diferentes medios de cultivo en ambas temperaturas ( $p=0.069$ ) (Gráfica 3).

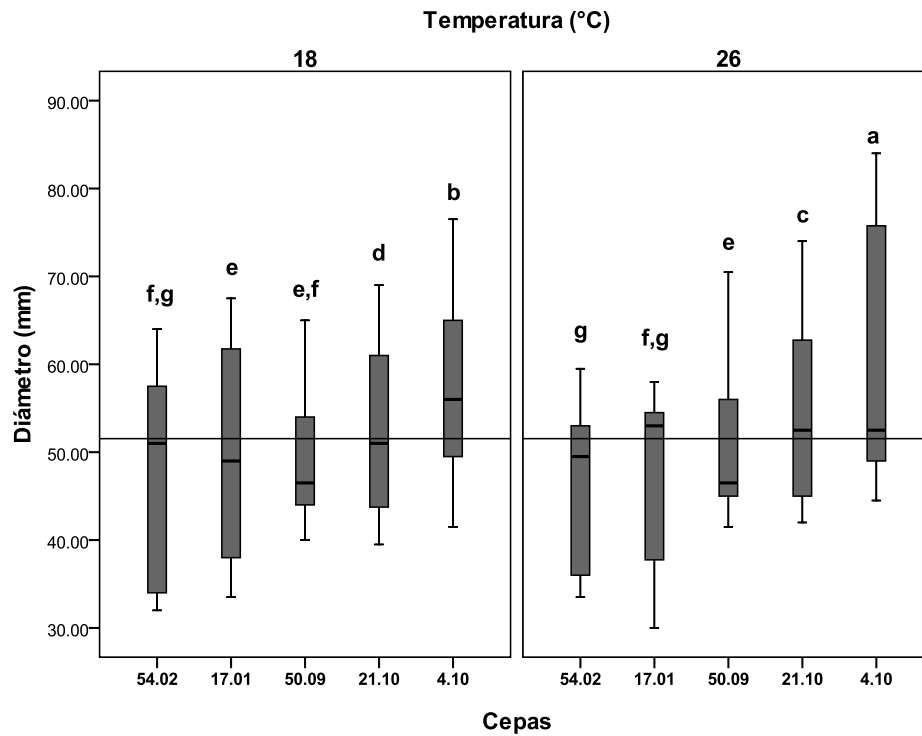
**Tabla 2. Crecimiento micelial de cepas de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo y temperaturas.**

Temperatura (°C)	Cepa	Medio	Diámetro de las colonias (mm)	
18	4.10	MEA	<b>68.14 ± 4.36</b>	b <sup>1</sup>
		PDA	55.05 ± 4.45	f,g
		SAB	48.26 ± 4.46	i,j,k,l
	17.01	MEA	49.07 ± 2.94	i,j
		PDA	<b>63.78 ± 2.35</b>	c,d
		SAB	37.21 ± 1.78	o
	21.10	MEA	<b>61.12 ± 4.25</b>	d,e
		PDA	53.88 ± 5.78	g,h
		SAB	42.19 ± 1.79	n
	50.09	MEA	<b>57.67 ± 3.79</b>	e,f
		PDA	44.65 ± 2.97	l,m,n
		SAB	45.00 ± 1.98	k,l,m,n
	54.02	MEA	51.14 ± 3.27	h,i
		PDA	<b>59.02 ± 2.43</b>	e
		SAB	33.40 ± 0.85	p
26	4.10	MEA	<b>77.83 ± 3.71</b>	a
		PDA	51.95 ± 2.35	g,h,i
		SAB	48.50 ± 2.35	i,j,k
	17.01	MEA	53.28 ± 3.38	g,h
		PDA	<b>54.24 ± 1.09</b>	f,g,h
		SAB	36.14 ± 2.04	o,p
	21.10	MEA	<b>66.14 ± 4.31</b>	b,c
		PDA	54.05 ± 4.40	f,g,h
		SAB	44.26 ± 1.54	m,n
	50.09	MEA	<b>59.69 ± 4.18</b>	e
		PDA	44.59 ± 1.84	l,m,n
		SAB	46.98 ± 3.32	j,k,l,m
	54.02	MEA	49.40 ± 3.05	i,j
		PDA	<b>54.09 ± 2.85</b>	f,g,h
		SAB	35.40 ± 1.04	o,p

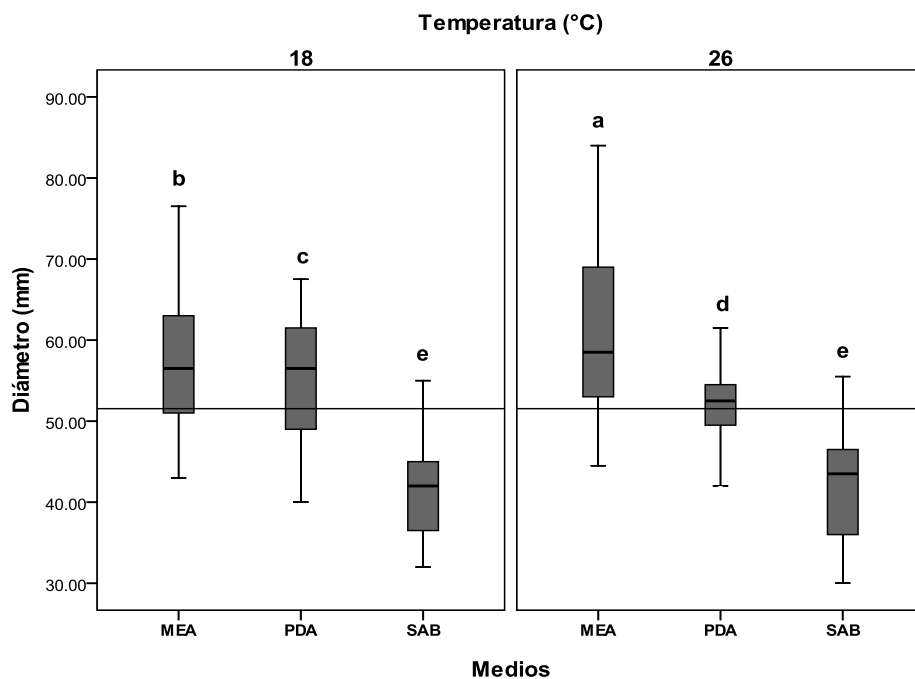
<sup>1</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )



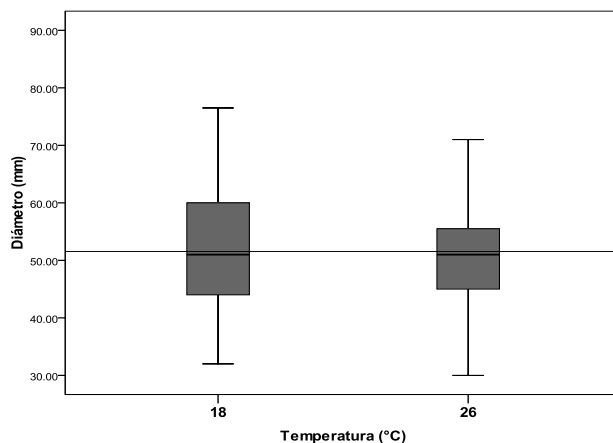
**Gráfica 1. Comportamiento general del crecimiento micelial de las cepas de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo y temperaturas.**



**Gráfica 2. Efecto general de los medios de cultivo evaluados sobre el crecimiento micelial de las cepas de *L. nuda* a diferentes temperaturas.**



**Gráfica 3. Efecto general de la temperatura sobre el crecimiento micelial de las cepas de *L. nuda*.**



Respecto a las características macro y microscópicas de las cepas evaluadas a 18°C de temperatura de incubación, se observó que todas presentaron color blanco a ligeramente lila y ninguna coloración en el reverso. La textura de las colonias fue algodonosa en todas las cepas, a excepción de la cepa 4.10 y el micelio aéreo varió de escaso a abundante (Tabla 3, Figuras 1-5). Todas las colonias presentaron bordes irregulares. Microscópicamente las hifas fueron hialinas, no ramificadas y presentaron un diámetro entre 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ . En general, la mayor parte de cepas presentó hifas con fíbulas en regular cantidad y no se observaron otras estructuras microscópicas (Tabla 3, Figura 6).

**Tabla 3. Características macro y microscópicas de las cepas de *L. nuda* a 18°C.**

Cepa	Medio	Características macroscópicas			Características microscópicas	
		Color <sup>1</sup>	Textura <sup>2</sup>	Micelio aéreo <sup>3</sup>	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Fíbulas <sup>4</sup>
17.01	MEA	L – BL	A	ES	1.0 – 3.0	RE
	PDA	BL	A	RE	1.0 – 3.0	RE
	SAB	BL-LL	A	ES	1.0 – 2.0	RE
54.02	MEA	BL	A	AB	1.0 – 3.0	RE
	PDA	BL-LL	A	RE	1.0 – 3.0	RE
	SAB	BL	A	ES	1.0 – 3.0	AB
50.09	MEA	L-BQ	A	RE	1.0 – 4.0	RE
	PDA	BL-LL	A	RE	1.0 – 3.0	RE
	SAB	L-BQ	A	ES	1.0 – 2.0	RE
4.10	MEA	BL	LA	RE	1.0 – 3.0	RE
	PDA	BL-LL	A	AB	1.0 – 3.0	RE
	SAB	BL-LL	A	RE	1.0 – 2.0	ES
21.10	MEA	BL	A	RE	1.0 – 4.0	RE
	PDA	BQ-LL	A	RE	1.0 – 3.0	RE
	SAB	BL	A	RE	1.0 – 2.0	RE

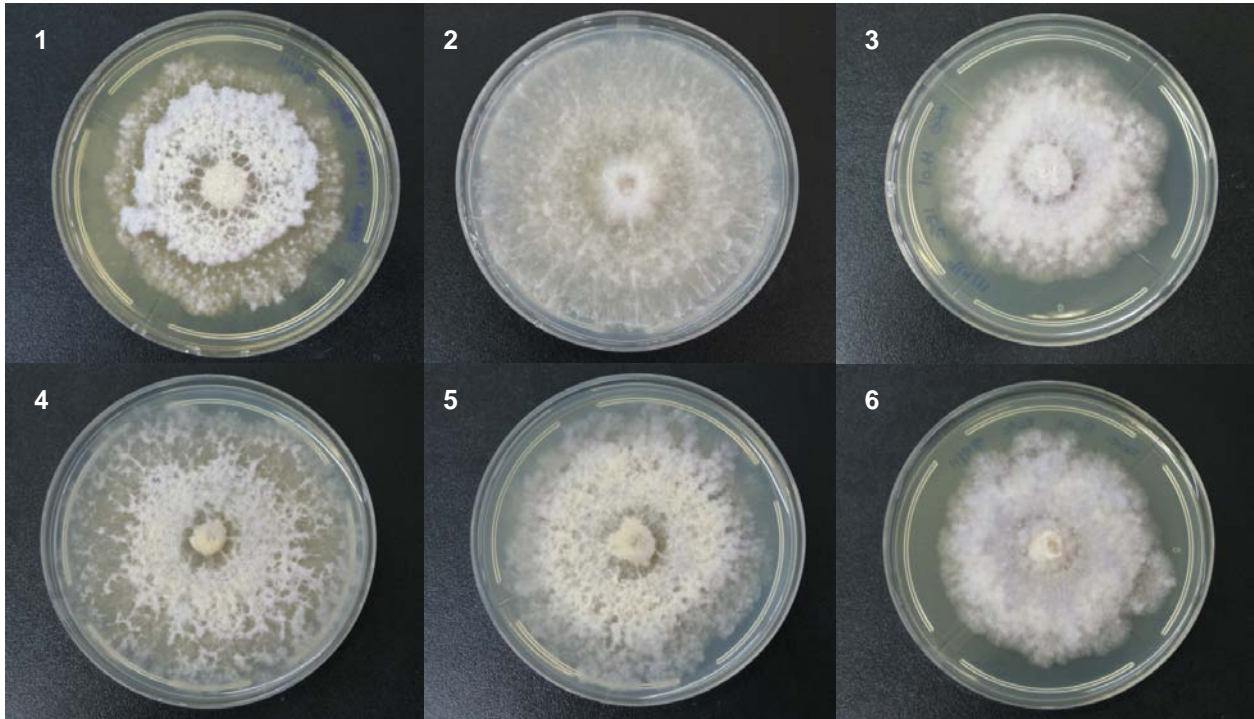
<sup>1</sup>L= lila, LL= ligeramente lila, BL= blanco, BQ=blanquecino. <sup>2</sup>A= algodonosa, LA=ligeramente algodonosa. <sup>3,4</sup>ES= escaso, RE= regular, AB= abundante.

A 26°C, las colonias presentaron bordes irregulares y el color varió de blanco a ligeramente lila ó lila y ninguna coloración en el reverso. La textura observada fue algodonosa en todas las colonias y el micelio aéreo varió de escaso a regular cantidad (Tabla 4, Figuras 1-5). Microscópicamente las hifas presentaron un diámetro entre 1.0 a 4.0  $\mu\text{m}$ , hialinas y sin ramificación. En general la mayor parte de cepas presentaron fíbulas en abundante cantidad y no se observaron otras estructuras microscópicas en las hifas (Tabla 4, Figuras 6).

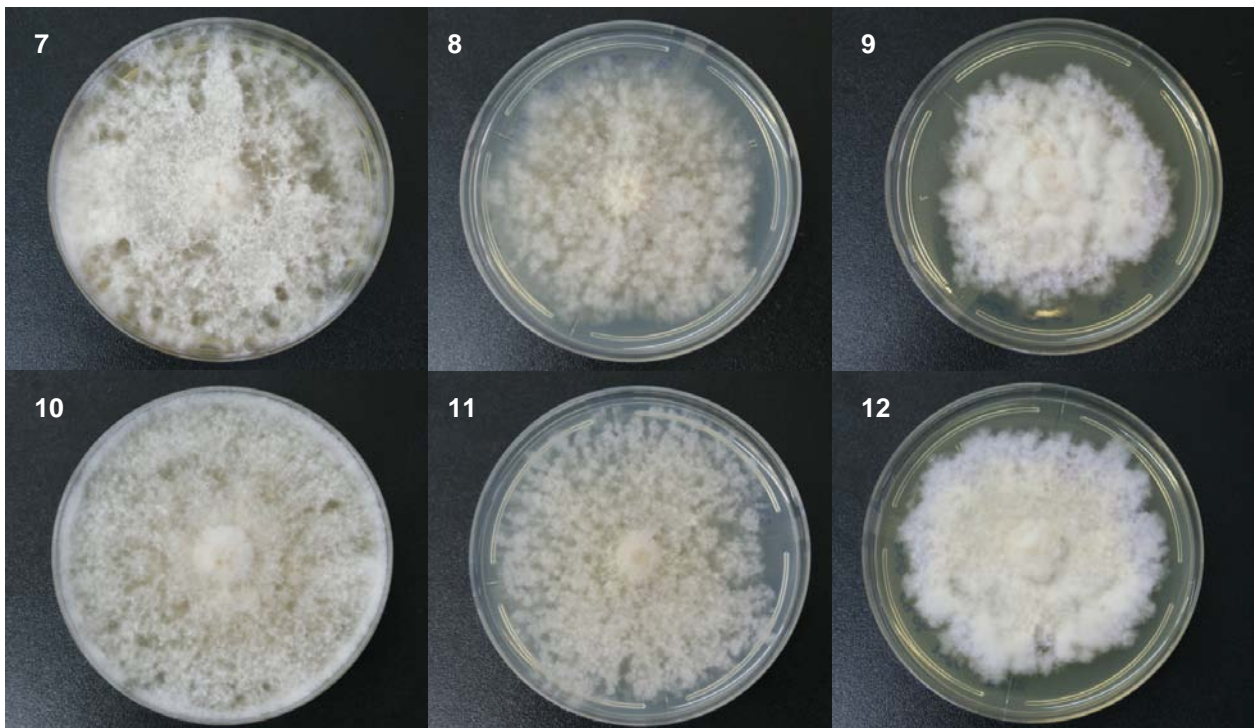
**Tabla 4. Características macro y microscópicas de las cepas de *L. nuda* a 26°C.**

Cepa	Medio	Características macroscópicas			Características microscópicas	
		Color <sup>1</sup>	Textura <sup>2</sup>	Micelio aéreo <sup>3</sup>	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Fíbulas <sup>4</sup>
17.01	MEA	BL-LL	A	ES	2.0 – 4.0	AB
	PDA	BL-LL	A	ES	1.0 – 3.0	AB
	SAB	LL-BL	A	ES	2.0 – 4.0	AB
54.02	MEA	BL-LL	A	RE	2.0 – 3.0	AB
	PDA	BL	A	RE	2.0 – 3.0	AB
	SAB	BL-LL	A	ES	1.0 – 3.0	RE
50.09	MEA	L-BQ	A	RE	2.0 – 4.0	AB
	PDA	LL-BL	A	ES	2.0 – 3.0	AB
	SAB	L-BQ	A	ES	1.0 – 3.0	AB
4.10	MEA	BL-LL	A	RE	2.0 – 4.0	AB
	PDA	LL-BQ	A	ES	2.0 – 3.0	AB
	SAB	BL-BQ	A	ES	1.0 – 4.0	RE
21.10	MEA	BL	A	RE	1.0 – 5.0	RE
	PDA	BL	A	RE	2.0 – 3.0	MA
	SAB	BL	A	RE	1.0 – 2.0	AB

<sup>1</sup>L= lila, LL= ligeramente lila, BL= blanco, BQ=blanquecino, <sup>2</sup>A= algodonosa. <sup>3,4</sup>ES= escaso, RE= regular, AB= abundante.

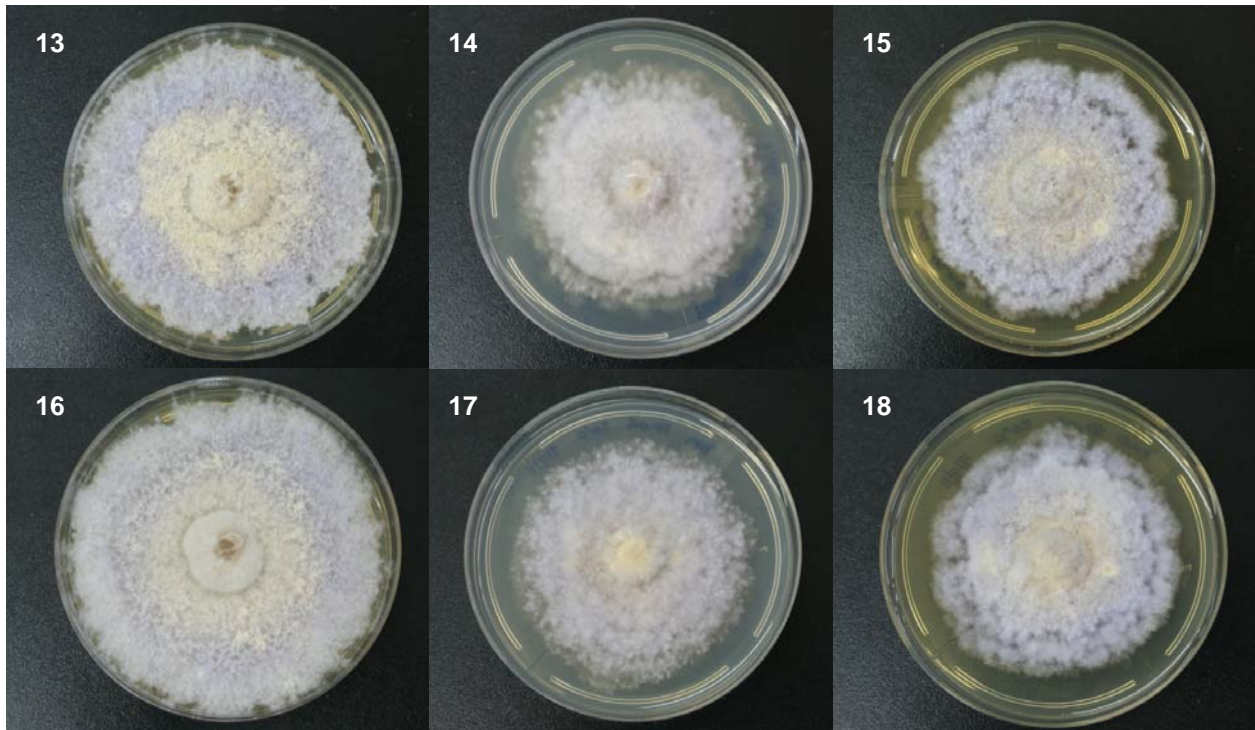


**Figura 1. 1-6.** Características macroscópicas de la cepa *L. nuda* 17.01. 1-3. Medios de cultivo MEA, PDA y SAB incubados a 18°C, mostrando colonias algodonosas. 4-6. Medios de cultivo MEA, PDA y SAB incubados a 26°C presentando colonias algodonosas.

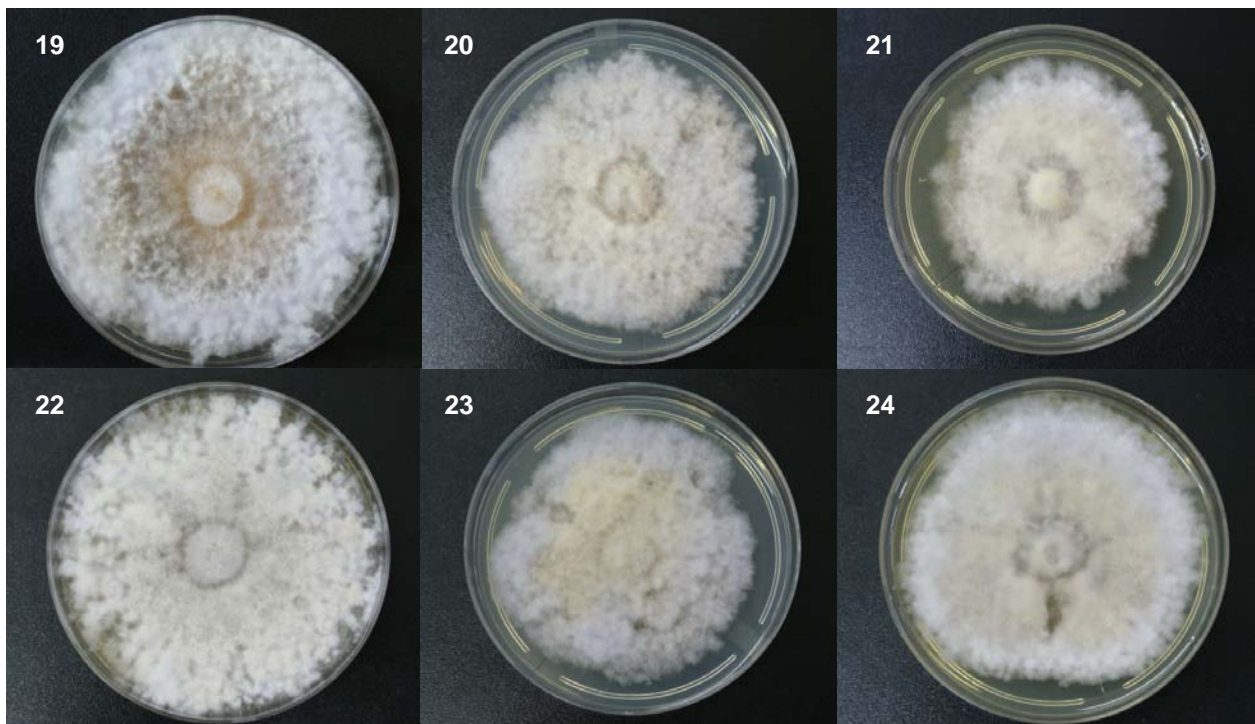


**Figura 2. 7-12.** Características macroscópicas de la cepa *L. nuda* 54.02. 7-9. Colonias algodonosas en los medios de cultivo MEA, PDA y SAB incubados a 18°C. 10-12. Colonias algodonosas en los medios MEA, PDA y SAB incubados a 26°C.

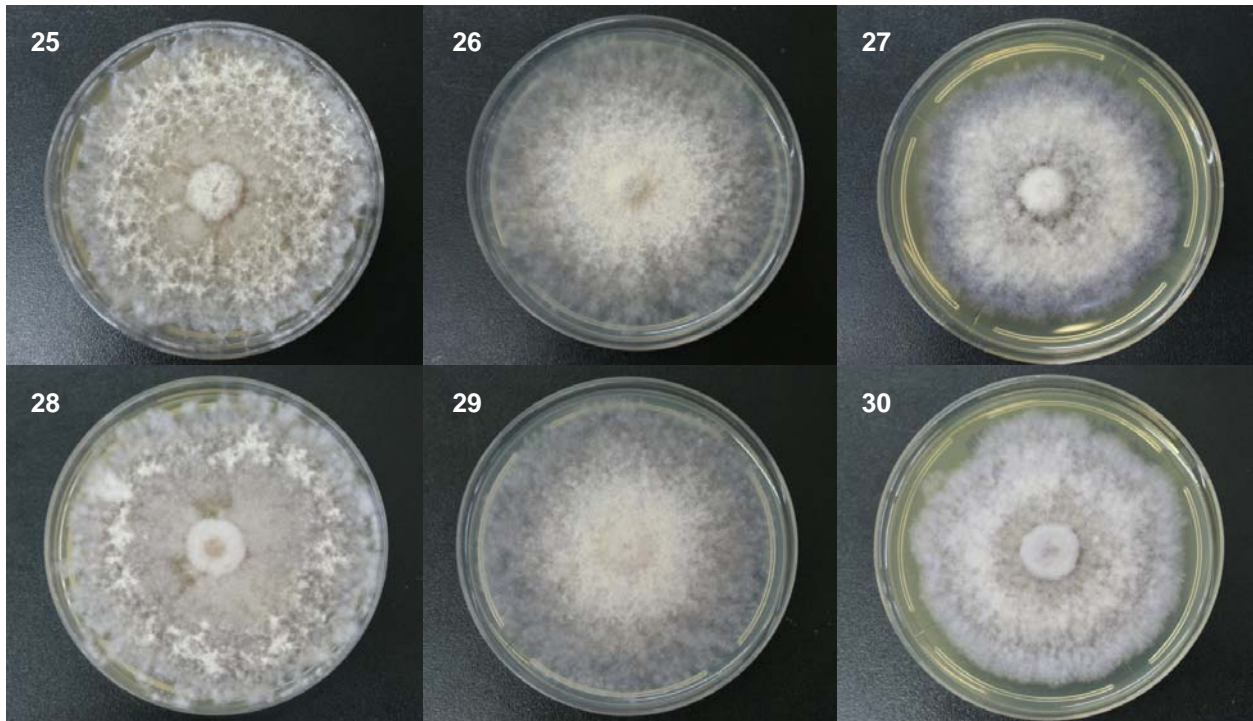




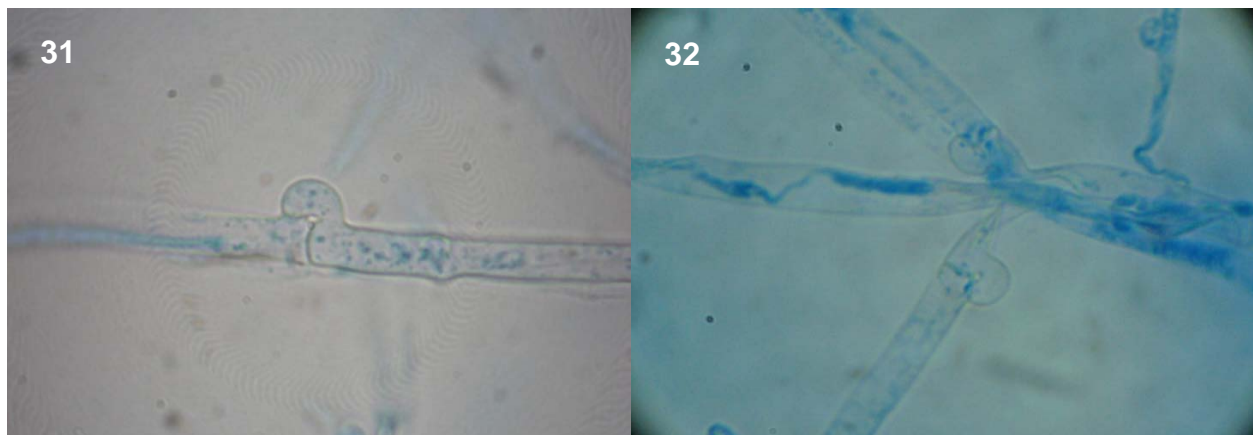
**Figura 3. 13-15.** Características macroscópicas de la cepa *L. nuda* 50.09. 13-15. Colonia algodonosa liliáceas en los medios de cultivo MEA, PDA y SAB incubados a 18°C. 16-18. Colonia algodonosa liliáceas en los medios MEA, PDA y SAB incubados a 26°C.



**Figura 4. 19-24.** Características macroscópicas de la cepa *L. nuda* 4.10. 19-21. Colonia algodonosa en los medios MEA, PDA y SAB incubados a 18°C. 22-24. Colonia algodonosa en los medios MEA, PDA y SAB incubados a 26°C.



**Figura 5. 25-30.** Características macroscópicas de la cepa *L. nuda* 21.10. 25-26. Colonia algodonosa en los medios MEA y PDA incubados a 18°C. 27. Colonia algodonosa con coloración liliácea en SAB a 18°C. 28-30. Colonia algodonosa en los medios MEA, PDA y SAB incubados a 26°C.



**Figura 6. 31-32.** Características microscópicas de las cepas *L. nuda*. 31. Hifas de 4 µm de diámetro con fíbulas en la cepa de *L. nuda* 17.01 a 18°C. 32. Hifas de 1 a 4 µm con fíbulas, en la cepa de *L. nuda* 17.01 a 26°C. (x1000).

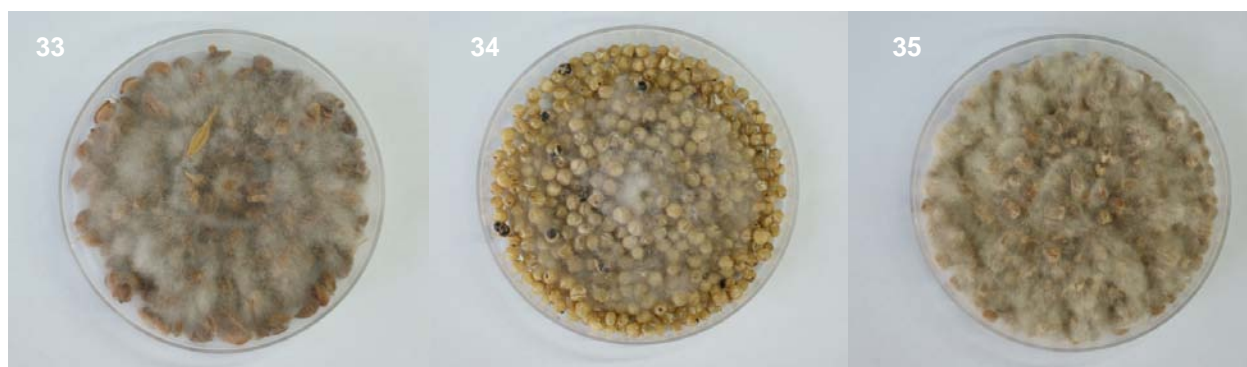
Con respecto a la producción de inóculo se determinó que las cepas 17.01 y 54.02 colonizaron más rápidamente los granos de trigo a razón de 5.58 mm/día para ambas cepas. Las cepas 50.09 y la 4.10 presentaron crecimientos de 5.55 y 5.54 mm/día, respectivamente, en el mismo sustrato. Para estas cepas el tiempo de colonización en sorgo y cebada fue menor (Tabla 5, Figura 7). Una excepción fue la cepa 21.10, la cual colonizó más rápidamente los granos de cebada (5.27 mm/día).

**Tabla 5. Producción de inóculo de cepas de *L. nuda* en diferentes sustratos.**

Cepa	Sustrato	RER (mm/día)	
4.10	Cebada	3.32 ± 1.03	e
	Sorgo	4.89 ± 0.64	b,c
	Trigo	<b>5.54 ± 0.16</b>	a
17.01	Cebada	5.25 ± 0.61	a,b
	Sorgo	4.23 ± 0.43	d
	Trigo	<b>5.58 ± 0.15</b>	a
21.10	Cebada	<b>5.27 ± 0.33</b>	a,b
	Sorgo	2.63 ± 0.41	f
	Trigo	5.04 ± 0.55	a,b
50.09	Cebada	3.85 ± 0.44	d,e
	Sorgo	4.40 ± 0.49	c,d
	Trigo	<b>5.55 ± 0.11</b>	a
54.02	Cebada	4.03 ± 0.53	d
	Sorgo	5.41 ± 0.89	a,b
	Trigo	<b>5.58 ± 0.15</b>	a

<sup>1</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

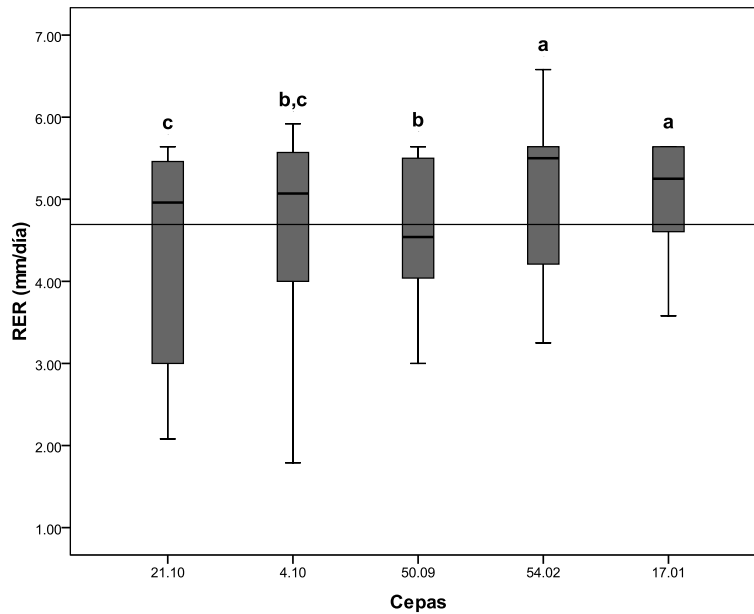
En el análisis estadístico (aunando todos los resultados obtenidos por las cepas en los tres sustratos) se observó que no existió diferencia significativa entre las cepas 21.10 y 4.10 ( $p=0.054$ ) pero sí con relación a las demás ( $p<0.05$ ), así mismo no existió diferencia estadísticamente significativa entre la 4.10 y 50.09 ( $p=1.000$ ). Entre las cepas 54.02 y 17.01 no existió diferencia significativa ( $p=1.000$ ) (Gráfica 4).



**Figura 7. 33-35.** Producción de inóculo de la cepa *L. nuda*. 33. Colonización de los granos de cebada por la cepa de *L. nuda* 21.10. 34-35. Granos de sorgo y trigo colonizados por el micelio de la cepa de *L. nuda* 17.01.

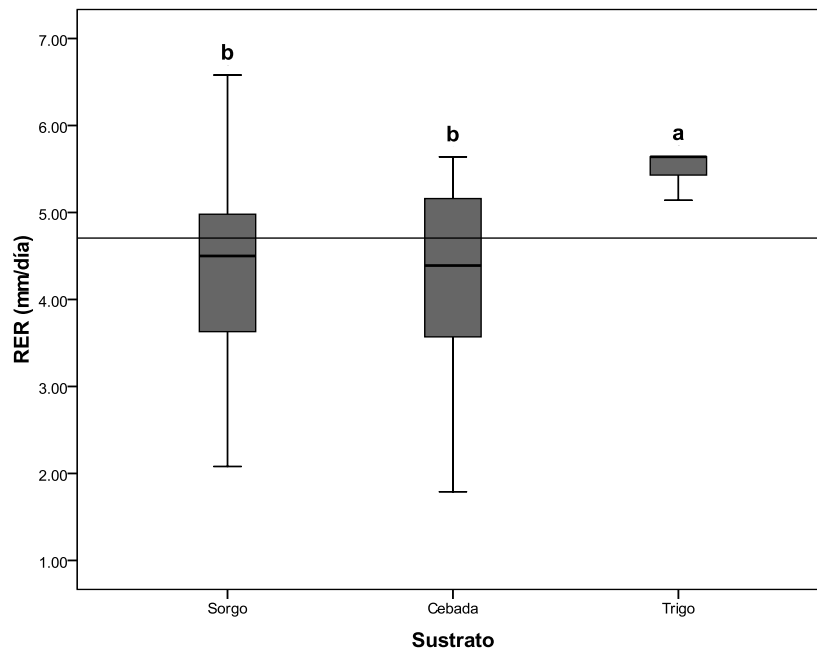


**Gráfica 4. Comportamiento general del crecimiento micelial de las cepas nativas de *L. nuda* sobre diferentes sustratos.**



Por otra parte, sin tomar en cuenta la cepa evaluada, se comprobó que existió diferencia significativa entre el trigo y los otros dos granos (cebada y sorgo) ( $p=0.000$ ), pero no existió diferencia entre éstos dos últimos ( $p=0.897$ ). En general se obtuvo la mayor velocidad de colonización en el trigo (Gráfica 5).

**Gráfica 5. Efecto general del sustrato en la producción de inóculo de cepas nativas de *L. nuda*.**





Para la producción de cuerpos fructíferos en los sustratos constituidos por paja de trigo suplementado con salvado de arroz al 25% (Sustrato 1) y compost de *Agaricus* (Sustrato 2), éstos fueron incubados a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2.75$ ) con humedad relativa de  $40.66 \pm 3.83$  %.

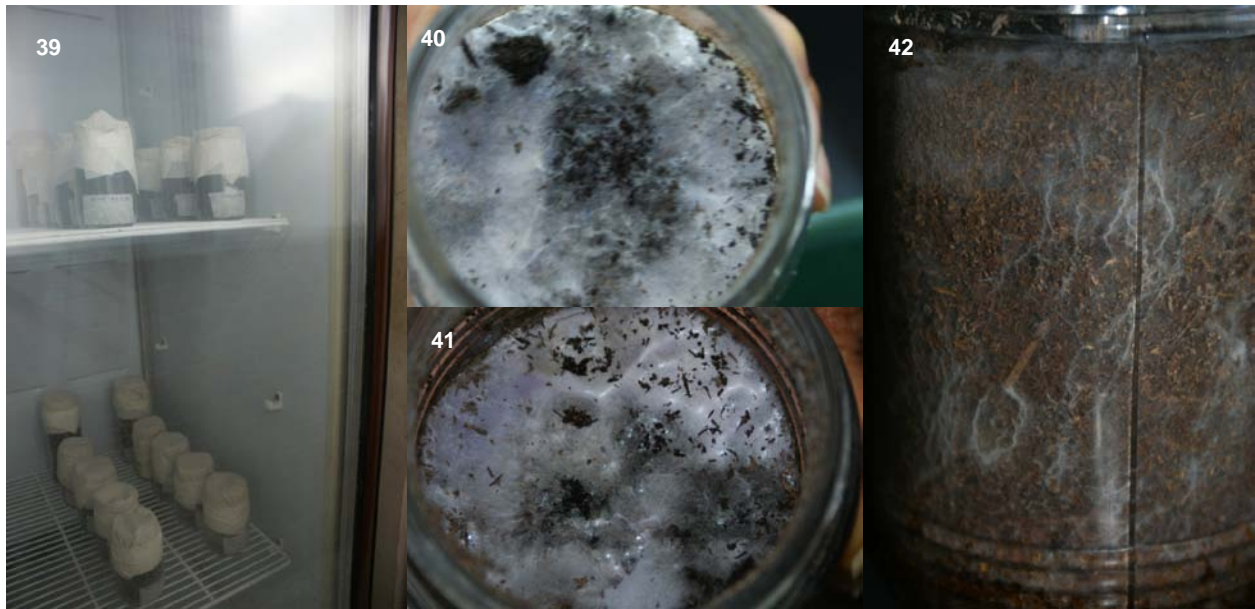
En el Sustrato 1, la mayoría de cepas de *L. nuda* lo colonizaron a los 73 días de incubación y la que más tiempo utilizó fue la cepa 21.10 (78 días). Posteriormente, los sustratos fueron colocados bajo condiciones de choque frío a  $6^{\circ}\text{C} \pm 2.62$  y a una humedad relativa de  $91 \pm 2.5\%$ , durante 24 horas. Los sustratos actualmente se encuentran bajo condiciones de fructificación a una temperatura de  $19.59 \pm 2.68^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $73.44 \pm 9.5\%$  (Figura 8).



**Figura 8. 36-38.** Colonización de cepas de *L. nuda* en el Sustrato 1. 36. Sustratos colocados en condiciones de choque frío a  $6^{\circ}\text{C}$ . 37. Sustratos en condiciones de fructificación. 38. Colonización y crecimiento de micelio liláceo de la cepa de *L. nuda* 21.10.

En el Sustrato 2 se realizaron las pruebas en frascos de vidrio de 100g, en los que crecieron y colonizaron las cepas de *L. nuda* en 35 días. Una vez colonizado el sustrato se les aplicó una capa de turba como suelo de cobertura y se incubaron por una semana a temperatura ambiente. Seguidamente se les aplicó choque frío a  $6^{\circ}\text{C} \pm 2.62$  y a una humedad relativa de  $91 \pm 2.5\%$ , durante 7 días. A continuación se colocaron en el cuarto de fructificación, donde presentaron cordones miceliares todas las cepas, actualmente se encuentran en condiciones de fructificación (Figura 9).

A la fecha ninguna de las cepas de *L. nuda* en los dos sustratos evaluados han fructificado, sin embargo se puede observar en los sustratos conglomerados hifales y cordones miceliales, indicativos de posible fructificación.



**Figura 9. 39-42.** Colonización de cepas de *L. nuda* en el sustrato 2. 39. Sustratos bajo condiciones de choque frío a 6°C. 40-41. Crecimiento y colonización del micelio de la cepa de *L. nuda* 17.01 y 50.09 sobre el suelo de cobertura. 42. Formación de cordones miceliales en la cepa de *L. nuda* 17.01.

## IX. Discusión

*L. nuda* es una especie comestible que crece en forma silvestre y se consume en varios países de Europa, Australia y en América (Stott, *et al.*, 1996). En Guatemala es utilizada como alimento por personas de la etnia Kaqchiquel que habitan los municipios de Tecpán y Comalapa en Chimaltenango (Bran, *et al.*, 2003 a,b; Morales, 2001) así como en el municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango (Flores *et al.*, 2002; Morales, *et al.*, 2010).

Las fructificaciones de este hongo son muy atractivas, debido a la combinación de su color lila, consistencia sólida, aspecto fresco, delicioso sabor y aroma, (Stott, *et al.*, 1996). Contiene además más del 40% de proteína por 100 gramos de peso seco, posee un alto valor energético, es rica en vitamina B1 y varios minerales y se considera medicinal (Volz, 2000).

Por las razones anteriores y debido a que en Guatemala no existen estudios sobre el crecimiento *in vitro* y productividad de esta especie, se hizo necesario estudiar cepas nativas de *L. nuda*, para seleccionar alguna que posea características adecuadas que posibiliten transferir el conocimiento de su cultivo a nivel artesanal e industrial.

En la primera fase de este estudio se evaluó el crecimiento micelial de las cepas en diferentes medios de cultivo y temperaturas, debido a que cuando se estudian nuevas cepas se deben realizar estudios de caracterización micelial, para determinar la velocidad de crecimiento a través del incremento lineal del diámetro de la colonia (Sánchez y Royse, 2001). Una cepa con rápida velocidad de crecimiento micelial en un medio de cultivo, puede favorecer la reducción del tiempo de los ciclos para producción de cuerpos fructíferos (Salmones, Gaitán-Hernández, Pérez y Guzmán, 1997).

En este estudio se comprobó que las cepas de *L. nuda* presentaron en general, una mayor velocidad de crecimiento a 26°C en MEA, de manera que este medio y temperatura favorecieron el desarrollo del micelio. Este comportamiento puede deberse a que éstas necesitan un medio enriquecido para su desarrollo. El medio de cultivo que reúne esta característica es el MEA, ya que entre sus ingredientes se encuentran el extracto de malta y peptona de harina de soya que proveen de nutrientes de calidad (Bridson, 2002).

En otros trabajos se ha recomendado el uso de los medios MEA, MEA suplementado con 2% de lavadura (Stott, *et al.*, 1996), con polvo de encino, caseína hidrolizada o con peptonas (Gaitán-Hernández y Báez, 2008), inclusive, se ha informado que *L. nuda* puede cultivarse en el medio Melin Norkrans (Sánchez, *et al.*, 2000). Estos medios son ricos en suplementos nutricionales para el crecimiento de los hongos comestibles en general. En particular, puede ser que las cepas silvestres de *Lepista* necesiten sustratos degradados previamente, lo que apoyaría la necesidad de las cepas de crecer en un medio enriquecido y con fácil disponibilidad de nutrientes como los contenidos en el medio MEA (Boddy, Frankland, & Van West, 2008).

El hecho que la cepa la 4.10 obtuvo el mayor crecimiento micelial a ambas temperaturas en el medio de MEA, indica su estabilidad y adaptabilidad a diferentes condiciones de crecimiento. Además, dado que la mayoría de las cepas obtuvieron el mayor diámetro de crecimiento micelial en ese medio de cultivo a ambas temperaturas, se acepta la hipótesis planteada.

Se debe resaltar que las cepas 17.01 y 54.02, crecieron mejor en el medio PDA a ambas temperaturas, lo cual puede indicar que poseen enzimas capaces de degradar almidón de forma más eficiente que las demás cepas evaluadas, debido a que este medio está constituido principalmente por este carbohidrato (Bridson, 2002). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales sobre la producción de amilasas en cada una de las cepas.

Las cepas de *L. nuda* evaluadas en este estudio proceden de localidades con predominio de clima templado a frío, esto se vio reflejado en el hecho que no existiera diferencia significativa entre el crecimiento micelial a ambas temperaturas, sin embargo sí lo hubo entre las distintas cepas. Lo anterior puede indicar que éstas poseen gran capacidad de adaptación a la temperatura, así como rápido crecimiento bajo las condiciones evaluadas, lo que las hace promisorias para su cultivo artesanal y posiblemente industrial.

En este estudio, la temperatura de incubación 26°C permitió la mejor selección de la cepas de más rápido crecimiento, no así a 18°C, debido a que la temperatura es un factor que influye en la velocidad del crecimiento micelial ya que las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular (Sánchez, 2004). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en otros trabajos realizados con hongos nativos en el país, debido a que cepas de *S. commune* y *N. ponderosus* crecieron mejor a 26°C. En contraste, cepas de *A. cylindracea* crecieron mejor a una temperatura de 18°C (Bran, *et al.*, 2007, 2008, 2009).

En un estudio del crecimiento micelial de cepas silvestres de *L. nuda* procedentes de México y Francia, cultivadas en medios con diferentes suplementos orgánicos, se encontró que las cepas crecieron a una temperatura de 20 y 25°C con resultados muy variables (Gaitán-Hernández y Báez, 2008). Stott (1998) informó de una temperatura de 25°C como la óptima para el crecimiento de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo, resultados muy cercanos a los encontrados en esta investigación.

En conclusión debido a su rápido crecimiento, adaptabilidad y estabilidad, la cepa 4.10 es promisoría para cultivo con fines de producción de masa micelial utilizando MEA a 26°C. La selección de la cepa que se debe usar en el cultivo es importante debido a que una cepa con alta habilidad para invadir el sustrato y para fructificar, disminuye los tiempos de incubación y incrementa la productividad (Sánchez, 2004).

En cuanto a las características macro y microscópicas de las colonias, el color blanco a lila y textura algodonosa así como hifas hialinas, con fíbulas abundantes, principalmente a 26°C, fueron similares a lo reportado para *L. nuda* en otros estudios, en los cuales se informó que las cepas de *L. nuda* presentaron micelio blanco, con

tintes violáceos, sin cambios de coloración en el medio de cultivo, hifas de 2-6  $\mu\text{m}$ , de paredes delgadas, lisas, septadas, hialinas y fíbulas abundantes (Arias, 1977). Asimismo, al cultivar *L. nuda* en medio MMN se encontró que ésta producía colonias con micelio pardo claro, micelio aéreo blanco poco abundante, distribuido por toda la superficie de la colonia con márgenes blanquecinos, reverso pardo claro, hifas hialinas de paredes delgadas de 1 a 5.2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sánchez, *et al.*, 2000).

Se considera muy importante resaltar que las cepas no presentaron clamidosporas, las cuales al ser estructuras de resistencia, se forman cuando las condiciones ambientales son adversas (Chang & Miles, 2004), por lo cual se puede inferir que las cepas de *L. nuda* crecieron en condiciones favorables para su desarrollo.

La presencia de fíbulas en todas las cepas es una garantía del estado dicariótico del micelio y aseguran el mantenimiento de éste estado, como un paso previo a la fructificación en los basidiomicetes (Chang & Miles, 2004).

En esta investigación la velocidad de colonización del inóculo se llevó a cabo en menor tiempo en granos de trigo, excepto en la cepa 21.10 que colonizó más rápidamente los granos de cebada. La producción de inóculo en granos de trigo ha sido utilizada con buenos resultados para otras cepas como por ejemplo *A. cylindracea* (Stamets, 1993; Philippoussis, Zevarkis & Diamantopoulou, 2001). También se ha reportado para la producción de inóculo de otras especies comestibles como *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *N. ponderosus* y *N. lepideus* (Martínez-Carrera, Soto y Guzmán, 1985; Martínez-Carrera, Morales y Sobal, 1988; Palacios, 2000). En Guatemala se han reportado los granos de trigo para producción de cepas nativas de *A. cylindracea* (Bran *et al.*, 2009) y de *S. commune* (Bran, *et al.*, 2008).

Con respecto a la producción de inóculo en granos de cebada, la cepa de *L. nuda* 21.10 fue la única que colonizó más rápidamente este cereal. Tal comportamiento se ha encontrado para otras cepas de hongos nativos estudiados en Guatemala, como *S. commune* (296.02 y 30.07) (Bran, *et al.*, 2008) y *A. cylindracea* (638.08) (Bran, *et al.*, 2009), sin embargo no se ha encontrado ninguna referencia que indique la utilización de este sustrato para la producción de inóculo a gran escala.

Con relación a la producción de inóculo, es importante señalar que el mejor sustrato o vehículo es aquel que es colonizado en mejor tiempo por una cepa determinada, ya que una prolongación en el tiempo de incubación promueve la contaminación y alarga los ciclos del cultivo (Stamets, 1993).

Debido a que la mayor velocidad de crecimiento no se presentó en granos de sorgo, se descarta la hipótesis referente al inóculo. Al respecto, se recomienda realizar ensayos aplicando la técnica de tratamiento térmico por cocción durante veinte minutos a efecto de hidratar y aumentar la disponibilidad de los nutrientes de los granos para facilitar el crecimiento de hongo (Morgado, 2011).

Respecto a la producción de cuerpos fructíferos, a la fecha de redacción del presente informe los sustratos 1 y 2 inoculados con las cepas nativas de *L. nuda* se

encuentran en proceso de fructificación, y no se han producido aún basidiocarpos, sin embargo hay presencia de cordones miceliales que son agregados hifales, indicativos de futura fructificación (Stamets & Chilton, 1983), por lo anterior no se puede establecer la productividad de las cepas evaluadas a través de la determinación del % Eficiencia Biológica y el tamaño de los píleos.

En el caso de *L. nuda* se ha informado que solo el proceso de colonización del sustrato en general, contempla un período entre 25 y 60 días. Luego la fructificación se lleva a cabo entre 24 y 52 semanas. Se ha establecido que empleando micelio inoculado en camas de estiércol de caballo y paja se produjeron cuerpos fructíferos luego de la aparición de cordones miceliales en un período comprendido entre 7 y 14 meses (Stamets & Chilton, 1983). Otros autores informan que la incubación para la colonización del sustrato a base de compost de champiñón dura de 7 a 10 semanas. Después del agregado de tierra de cobertura y el tratamiento a base de choque frío se producen una o dos cosechas con un intervalo de 14 a 20 días (Sierra, *et al.*, 2002).

Algunos autores establecen que previo a la fructificación del cultivo de *L. nuda* utilizando como sustrato compost de *Agaricus*, debe aplicarse un choque frío de entre 5 - 8°C. La fructificación debe llevarse a cabo de 10 a 15°C de temperatura con 90-95% de humedad. Los cuerpos fructíferos aparecen después de 35-45 días (Guinberteau, Olivier & Bordaberry, 1989).

En el presente estudio la colonización del sustrato 1 (paja de trigo con salvado de arroz al 25%) se llevó a cabo para la mayoría de las cepas a los 73 días de incubación, un poco más que el período que contemplan Stamets y Chilton (1983). En el sustrato 2 (compost de *Agaricus*) el micelio creció y colonizó en 35 días, que coincide con el rango de período de colonización reportado por los mismos autores.

Se ha reportado que algunos hongos basidiomicetes necesitan de sustratos degradados y con fácil disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y colonización por parte del micelio a nivel de campo (Boddy, *et al.*, 2008). Puede ser que el retraso en la colonización por las cepas de *L. nuda* en el sustrato 1 se deba a la relación carbono nitrógeno (C/N) inicial del sustrato, la cual no fue determinada, y que puede ser muy baja en cuanto a contenido de nitrógeno, aún cuando se le haya agregado un aditivo con este elemento (salvado de arroz 25%). En pajas en general se ha informado que la relación C/N oscila entre 100 - 60. Los hongos en general requieren 1 libra de nitrógeno por cada 9 libras de carbono para poder crecer (Roy, Miller y Shickluna, 1981). Se ha encontrado que la relación C/N idónea para el desarrollo del champiñón es de 15-16 (Vedder, 1996). Por lo anterior se recomienda la determinación de la relación antes mencionada en diferentes sustratos utilizados para el cultivo, especialmente de *Lepista*.

En un estudio que ejecutaron en Israel, sobre el potencial de cultivo de hongos exóticos, encontraron que *L. nuda*, se puede cultivar utilizando el sistema del cultivo que se aplica en *A. bisporus* (compost con tierra de cobertura en bolsa abierta). Esta tecnología fue aplicada tomando en consideración que *L. nuda* crece en hábitats similares a aquellos donde crece *Agaricus*, sobre suelos de bosques ricos en materia

orgánica, por lo que es considerada como un hongo que se puede cultivar utilizando el mismo sistema de cultivo. *Lepista* crece en el mismo sustrato y necesita la tierra de cobertura que necesita *Agaricus*, con un patrón de crecimiento similar a éste. Los investigadores lograron la fructificación de *L. nuda* pero con bajos rendimientos de menos del 5% en peso húmedo del sustrato y por ello recomiendan estudios adicionales para llevar a cabo su producción a nivel comercial (Danai, Ezov, Levanon & Masaphy, 2008).

En un estudio efectuado en Australia utilizando compost de *Agaricus* comercial así como compost de *Agaricus* más 10% de paja no compostada, para el cultivo de *L. nuda*, se encontró que el agregado de paja estimulaba el crecimiento de las hifas pero deprimía la formación de cuerpos fructíferos. En ambos sustratos se produjeron los primordios pero no cuerpos fructíferos, así mismo establecieron que las bajas temperaturas pueden ser benéficas para la fructificación inicial de los hongos en el sustrato. Además indicaron que la aplicación de un choque frío de 12°C al sustrato colonizado promovió la agregación hifal y como consecuencia la formación de primordios de los hongos. Sin embargo, no lograron la producción de cuerpos fructíferos (Stott, *et al.*, 1996).

Garbaye, Kabre, Le Tacon, Mousain & Piou (1979), publicaron datos que indican que el compost compuesto por estiércol maduro y paja, suplementado con el fertilizante mineral NPKCa, induce la formación de cuerpos fructíferos.

Algunas especies de *Lepista* requieren la aplicación de una capa de cobertura de turba o tierra para mejorar el rendimiento y calidad. Se cree que la cubierta proporciona una capa de retención de humedad por parte de las hifas, atrapa los compuestos volátiles liberados por el compost, y funciona como un sostén de los cuerpos fructíferos. Contiene incluso una microbiota diferente al sustrato (Stott & Broderick, 1996). *L. nuda* no es dependiente de la microbiota presente en la capa de cobertura, ya que se pueden producir cuerpos fructíferos en condiciones de esterilidad, pero si están presentes microorganismos en la capa, se producen más rápidamente los carpóforos (Stamets, 1993).

Cabe mencionar también que en este proyecto, el primer ensayo de colonización y producción de cuerpos fructíferos en los sustratos propuestos no fue exitosa, como consecuencia de contaminación masiva por ácaros al final del proceso de incubación. Esta infestación interfirió en la producción de cuerpos fructíferos, por lo que hubo necesidad de repetir nuevamente el ensayo y motivó el retraso del proceso.

Los cultivos de hongos a nivel de incubación pueden ser atacados por microorganismos contaminantes (hongos, bacterias, virus) por nematodos y plagas (insectos, ácaros y roedores). Los ácaros se comen el micelio, los primordios y cuerpos fructíferos y causan el deterioro de los cultivos (Stamets, 1993; Sánchez y Royse, 2001).

A pesar que en esta investigación aún no se han producido primordios y cuerpos fructíferos, se provee de información para el cultivo de *L. nuda*, un hongo nativo muy

apreciado por su comestibilidad y que a nivel mundial es considerado un "hongo exótico" de potencial comercial e industrial (Stott, *et al.*, 1996).



## X. Conclusiones

1. El medio de cultivo en el cual la mayoría de cepas de *L. nuda* obtuvieron el mejor crecimiento micelial fue agar MEA a 26°C.
2. La cepa de *L.nuda* 4.10 presentó el mayor diámetro de crecimiento en agar MEA en ambas temperaturas.
3. La mayoría de cepas en todos los medios y temperaturas evaluados presentaron colonias de color blanco a lila, textura algodonosa y bordes irregulares.
4. Las cepas evaluadas presentaron hifas de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro con fíbulas en regular cantidad a abundantes y ninguna otra estructura.
5. Las cepas de *L. nuda* presentaron mayor velocidad de colonización en los granos de trigo para la producción de inóculo.
6. No se produjeron cuerpos fructíferos sin embargo se presentó colonización de los sustratos 1 y 2 evaluados, con formación de cordones miceliares.

## XI. Recomendaciones

1. Evaluar el pH óptimo de crecimiento en el medio MEA de las cepas de *L. nuda* evaluadas.
2. Evaluar la velocidad de crecimiento de las cepas de *L. nuda*, aplicando suplementos naturales (extracto de encino).
3. Recolectar nuevas cepas nativas de *L. nuda* para su domesticación y estudio para producción de cuerpos fructíferos.
4. Evaluar la producción de metabolitos de *L. nuda*, incluyendo enzimas y otros benéficos para el hombre.
5. Con respecto a las pruebas de inóculo se recomienda realizar ensayos aplicando la técnica de tratamiento térmico por cocción durante veinte minutos a efecto de hidratar y escarificar los granos para aumentar la disponibilidad de nutrientes para el hongo.
6. Se recomienda la determinación de la relación C/N de los sustratos utilizados para la colonización y producción de cuerpos fructíferos.
7. Efectuar caracterización macroscópica, microscópica y molecular de los ejemplares de *L. nuda* colectados para la confirmación de la especie.

## XII. Referencias

1. Alexopoulos C. (1996). *Introductory Mycology*. 4<sup>a</sup>. ed. USA: John Wiley & Sons Inc. 896p.
2. Arias, R. (1977). Interacciones entre cuatro hongos ectomicorrícicos y dos especies de coníferas del cerro del Potosí, Geleana, N.L. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales. P. 60.
3. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Rodríguez, E., Salazar, J., Cáceres, R., y García, L. (2002). Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase II). Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI). Informe técnico final 2002. Guatemala, 59p.
4. Bran, M., Morales, O., Cáceres, R. y Flores, R. (2003a). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Revista Científica. Guatemala. 1 (1): 2-24.
5. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Rodríguez, E., Salazar, J., Cáceres, R., Folgar, N., Alarcón, O. y Arriola, H. (2003b). Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III). Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI). Informe técnico final 2003. Guatemala, 58p.
6. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Salazar, J., Alarcón, O., Cáceres, R., Andrade, C., Quezada, A. y Carranza, C. (2004). Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI). Informe técnico final 2004. Guatemala 60p.
7. Bran, M., Morales, O., Alvarez, G., Flores, R., Cáceres, R., Mazariegos, A. y Quan, L. (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. 55p.
8. Bran, M., Morales, O., González, M., Flores, R., Cáceres, R. (2006). Mejoramiento genético y producción de inóculo de cepas nativas de *Pleurotus* spp. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC. 44p.
9. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R., y Blanco, R. (2007). Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *N. ponderosus* y *N. lepideus*. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC. 50p.
10. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R. (2008). Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC. 59p.
11. Bran, M., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R. y Gurriarán, N. (2009). Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx'yol B'aqman (*Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire): caracterización y producción de cuerpos fructíferos. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC. 49p.
12. Bridson, E. (2002). *Oxoid Manual*. England: Ed. Wade Road.
13. Boddy, L., Frankland, J. & Van West, P. (2008). *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Amsterdam: Elsevier. p. 363

14. Chang S. & Miles P. (2004). Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2a. ed. USA: CRC Press. 451p.
15. Coello-Castillo, M., Sánchez, J. Royse, D. (2009). Producción de *Agaricus bisporus* on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. *Biores. Tech.* 100: 4488-4492.
16. Danai, O., Ezov, N., Levanon, D. & Masaphy, S. (2008). Introducción de new exotic mushroom species into cultivation in Israel. *Israel J of Plant Sciences*, 56:295-301.
17. De León, R., Morales, E., de Agreda, L., Rolz, C. (1983). Coffee by products and citronella bagasse as substrates for *Pleurotus* production. *Mush. News. Trop.* 4 (1): 13-16.
18. De León, R., Guzmán, G., Martínez-Carrera, D. (1988). Planta productora de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) en Guatemala. *Rev. Mex. Mic.* 4: 297-301.
19. De León, R. (2003). Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Micol. Apl. Int.* 15 (1): 31-35.
20. Flores, R., Bran, M., Rodríguez, E., Morales, O., Berdúo, E. y Montes, L. (2002). Hongos micorrízicos de bosques de pino y pinabete. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Guatemala. 50 p.
21. Galagan, J., Henn, M., Cuomo, C., Birren, B. (2005). Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Res.* 15: 1620-163.
22. Gaitán-Hernández, R. y Baéz Rodríguez, I. (2008). Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda* en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Rev. Mex. Micol.* 26:41-49
23. Garbaye, J., Kabre, A., Le Tacon, F., Mousain, D. & Piou, D. (1979). Production de champignon comestibles en foret par fertilisation minerale-Premiers Resultats Sur *Rhodopaxillus nudus*. *Mushroom Science X, Part I*: 810-816.
24. Guarro J., Gené J., Stchigel A. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3): 454-500.
25. Guinberteau, J., Olivier, J. avec Bordaberry, M. (1989). Dones récentes sur la culture des "pieds bleus" (*Lepista* sp). P.H.M. *Revue Horticole.* 298: 17-22.
26. Guzmán G. (2003). Los hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción a la microbiota tropical de México. México: Instituto de Ecología, 316p.
27. Hawksworth, D. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95 (6): 641-655.
28. Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105 (12): 1422-1432.
29. Hawksworth, D. (2006). Pandora's mycological box: molecular sequences vs. morphology in understanding fungal relationships and biodiversity. *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 127-133.
30. Hawksworth, D., Kirk, P., Sutton, B. & Pegler, D. (1995). *Ainsworth & Bisby's, Dictionary of the fungi.* 8<sup>th</sup> ed. United Kingdom: CAB International. 616p.
31. Huerta G. (2002). Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En: *La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp.* Sánchez J., Royse D. eds. México, Editorial Limusa. 294p.
32. Jagnow, G. y Dawid, W. (1991). Biotecnología: introducción con experimentos modelo. España: Editorial ACRIBIA, S. A. p 70-78.
33. Martínez-Carrera, D., Soto, C. y Guzmán, G. (1985). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de paja de café como sustrato. *Rev. Mex. Mic.* 1:101-108.

34. Martínez-Carrera, D., Morales, P y Sobal, M. (1988). Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada. Rev. Mex. Mic. 4:153-160.
35. Mata M. Mueller, G, Halling, R. (2003). Macrohongos de Costa Rica. Costa Rica: Editorial INBio. Vols. 2, Vol 2, 240p.
36. Mier T., Toriello C., Ulloa M. (2002). Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 34p.
37. Morales O. (2001). Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 92p.
38. Morales O., Bran M. y Cáceres R. (2010). Los hongos comestibles de uso tradicional en Guatemala. En: D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. (Eds.). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. México, Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales –COLPOS- UNS- CONACYT- AMC- UAEM- UPAEP-IMINAP-. Capítulo 25, pág. 437-464.
39. Morgado, A. (2011). Caracterización y selección de genotipos de cepas comerciales de "Setas" (*Pleurotus*), como acción estratégica para la producción rural en Cuyoaco, Puebla. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, México. Pág. 135.
40. Mueller G., Bills, G. & Foster, M. (2004). Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. USA: Elsevier Academic Press. 777p.
41. Nobles, M. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. Can. J. Bot. 43: 1097-1139.
42. Palacios, A. (2000). Investigación sobre la potencialidad del cultivo de dos cepas silvestres de *Neolentinus lepideus* y *N. ponderosus*. En: memorias de VII Confreso Nacional de Micología, Querétaro, México. P. 53-54.
43. Philippoussis, A., Zevarkis, G. & Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World J. Microbiol. Biotech. 17: 191-200.
44. Quimio T., Chang S. (1990). Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. Italia: FAO, 102p.
45. Roy, L., Miller, R. y Shickluna, J. (1981). Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. México: Prentice Hall Hispanoamericana. pp 144-146.
46. Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R. y Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. Rev. Iberoam. Mycol. 14: 173-176.
47. Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushrooms culture technology. Appl Microbiol Biotechnol, 64: 756-762.
48. Sánchez, F., Honrubia, M. y Torres, P. (2000). Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. Rev. Iberoam. Micol. 17: 127-134.
49. Sánchez, J. y Royse, D. (2001). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. México: Limusa. p 249.

50. Sierra Fernández, J., López Díaz, T. y García-Garabal, J. (2002) Lo que usted debe saber: setas cultivadas. España. Sociedad Micológica Leonesa "San Jorge". Cartilla de divulgación No. 11 p.50-51.
51. Sobal, M., Martínez-Carrera, D., Morales, P. & Roussos, S. (2007). Classical characterization of mushrooms genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micol. Apl. Int.* 19 (1): 15-23.
52. Stamets, P. & Chilton, J. (1983). The mushroom cultivator: a practical guide to growing mushrooms at home. Washington: Agarikon Press. p. 180-182.
53. Stamets, P. (1993). Growing gourmet & medicinal mushrooms. Ten Speed Press & Mycomedica. Olympia, WA, USA. 554p. p. 120.
54. Stott, K. (1998). Characteristics of australian edible fungi in the genus *Lepista* and investigation into factors affecting cultivation. Doctoral tesis, University of Western Sydney Hawkesbury, Sydney. En: Gaitán-Hernández, R. y Báez, R. (2008) Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Rev. Mex. Micol.* 26:41-49.
55. Stott, K., Broderick, A. & Nair, T. (1996). Investigation into cultivation parameters for Australian species of *Lepista*. In Mushroom Biology and Mushroom products. In: Royse, D. (Editor) Mushroom biology and mushroom products. Penn State University. pp: 285-291.
56. Trigos, A. y Suárez-Medellín, J. (2010). Los hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. En: D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. (Eds.). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. México, Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales –COLPOS- UNS- CONACYT- AMC- UAEM- UPAEP-IMINAP-. 5: 59-76.
57. Vedder, P. (1996). Cultivo moderno del champiñón. Madrid: Ediciones Mundi Prensa. p 369.
58. Volz, P. (2000). Spaw media and exudate formation in search of medicinal mushrooms. *Int. J. Med. Mushrooms* 2:81-86
59. Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. & Wen, H. (1987). Icons of medicinal fungi from China. Beijing: Science Press.

### XIII. Anexos

**Anexo 1.** Crecimiento micelial de las cepas de *L. nuda* durante 17 días en tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación.

