

Guatemala, 31 de octubre, 2019

Señor Director  
Dr. Félix Aguilar Carrera  
Director General de Investigación  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Adjunto a la presente el informe final “**Cultivo y caracterización de cepas del hongo del guachipilín (*Pseudofistulina radicata* (Scwein.) Burds.), bajo condiciones controladas fase I**” con partida presupuestal 4.8.63.6.72, coordinado por el Ing. Agr. Julio Ernesto Peralta Rivera y avalado por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Así mismo, el coordinador(a) del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico**.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

Firma  
Coordinador(a) del proyecto de investigación

Firma y sello  
Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA)

Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial

Informe final

**Cultivo y caracterización de cepas nativas del hongo del guachipilín (*Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds.), bajo condiciones controladas fase I**

Equipo de investigación

**Ing. Agr. Julio Ernesto Peralta Rivera**  
**Coordinador e investigador del proyecto**

Guatemala, 31 de octubre de 2019

Instituto de Investigaciones Agronómicas  
Facultad de Agronomía

Otras instituciones participantes  
Facultad de Farmacia

Dr. Félix Aguilar Carrera  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Inga. Liuba Cabrera  
Coordinador del Programa de Investigación

Julio Ernesto Peralta Rivera  
Coordinador e investigador del proyecto

Colaboradores

Dr. Roberto Flores Arzú  
Cecilia Castellanos  
Jorge Luis Peralta  
Carlos Peralta

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.6.72, durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación de Producción Industrial

Financiamiento aprobado por Digi: Q74,367.61 Financiamiento ejecutado: Q 69,747.24

## Índice

1. Resumen.....	1
2. Palabras clave.....	1
3. Abstract and keywords.....	1
4. Introducción.....	2
5. Planteamiento del problema.....	3
6. Preguntas de investigación.....	3
7. Delimitación en tiempo y espacio.....	4
8. Marco teórico.....	4
9. Estado del arte.....	9
10. Objetivo general.....	10
11. Objetivos específicos.....	10
12. Hipótesis.....	10
13. Materiales y métodos.....	11
14. Vinculación, difusión y divulgación.....	16
15. Resultados:.....	16
16. Análisis y discusión de resultados:.....	25
17. Conclusiones.....	27
18. Impacto esperado.....	28
19. Referencias.....	28
20. Apéndice.....	31

## Contenido general

1. Resumen.....	1
2. Palabras clave.....	1
3. Abstract and keywords.....	1
4. Introducción.....	2
5. Planteamiento del problema.....	3
6. Preguntas de investigación.....	3
6.1. General.....	3
6.2. Específicas.....	3
7. Delimitación en tiempo y espacio.....	4
7.1. Delimitación en tiempo.....	4
7.2. Delimitación espacial.....	4
8. Marco teórico.....	4
8.1. Hongos basidiomicetos.....	4
8.2. Pseudofistulina radicata.....	4
8.3. Descripción de la especie.....	5
8.4. Taxonomía de Pseudofistulina radicata.....	6
8.5. Nombres comunes.....	6
8.6. Hábitat.....	7
8.9. Usos de Pseudofistulina radicata.....	7
8.10. Propiedades nutritivas y medicinales de Pseudofistulina radicata.....	7
8.11. Cultivo de Pseudofistulina radicata.....	8
8.11.1. Obtención de micelio de hongos comestibles.....	8
8.11.2. Selección de cepas.....	8
8.11.3. Medios de cultivo.....	8
8.11.4. Evaluación y caracterización de cepas de hongos para cultivo.....	9
8.11.5. Producción de inóculo de hongos comestibles.....	9
9. Estado del arte.....	9
10. Objetivo general.....	10
11. Objetivos específicos.....	10
12. Hipótesis.....	10

13.	Materiales y métodos .....	11
13.1.	Enfoque y tipo de investigación.....	11
13.2.	Recolección de información.....	11
13.3.	Investigación cuantitativa .....	11
13.4.	Investigación cualitativa .....	12
13.5.	Técnicas e instrumentos:.....	12
13.5.1.	Revitalización de las cepas de Pseudofistulina radicata.....	12
13.5.2.	Determinación del diámetro de las colonias de las cepas de Pseudofistulina radicata	12
13.5.3.	Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias .....	13
13.5.4.	Producción del inóculo.....	13
13.6.	Operacionalización de las variables o unidades de análisis:.....	14
13.7.	Procesamiento y análisis de la información:.....	15
14.	Vinculación, difusión y divulgación .....	16
14.1.	Vinculación.....	16
14.2.	Estrategia de difusión y divulgación.....	16
15.	Resultados: .....	16
15.1.	Evaluación de la RER en medios de Cultivo .....	16
15.2.	Evaluación de la RER en granos.....	19
15.3.	Caracterización macroscópica de las cepas .....	22
15.4.	Caracterización microscópica de las cepas .....	24
16.	Análisis y discusión de resultados:.....	25
17.	Conclusiones .....	27
18.	Impacto esperado.....	28
19.	Referencias .....	28
20.	Apéndice.....	31

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos del hongo seco <i>Pseudofistulina radicata</i> (media $\pm$ SD).....	10
<b>Tabla 2.</b> Operacionalización de las variables o unidades de análisis .....	14
<b>Tabla 3.</b> Tasa de extensión radial en medios de cultivo.....	17
<b>Tabla 4.</b> Tasa de extensión radial para la producción de inóculo.....	19
<b>Tabla 7.</b> Datos del análisis de varianza y prueba de Tukey de la RER de las cepas de <i>P. radicata</i> en distintos medios y dos temperaturas.....	31
<b>Tabla 8.</b> Datos del análisis de varianza y prueba de Tukey de la RER de las cepas de <i>P. radicata</i> en distintos medios y dos temperaturas.....	32

## Índice de figuras

Figura. 1. Efecto de las cepas sobre RER en diferentes medios de cultivo.. .....	17
Figura. 2. Efecto de los medios de cultivo sobre RER.....	18
Figura. 3. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la RER en diferentes medios de cultivo. Las barras indican la media. ....	18
Figura. 4. Efecto de las cepas sobre RER en diferentes granos.. .....	20
Figura. 5. Efecto de la temperatura sobre RER en diferentes granos.. .....	20
Figura. 6. Efecto de los granos con respecto a RER sin tomar en cuenta las cepas evaluadas.. .....	21
Figura. 7. (1) Micelio de <i>P. radicata</i> creciendo en granos de sorgo (2) micelio de <i>P. radicata</i> creciendo en granos de trigo.....	21
Figura. 8. (3) Crecimiento de <i>P. radicata</i> en .....	22
Figura. 9. Micelio de <i>P. radicata</i> creciendo en medios de cultivo. (4) Crecimiento.....	23
Figura. 10. Cambio de coloración del micelio de <i>P. radicata</i> . (6) cambio de coloración .....	23
Figura. 11. (8) Crecimiento circular de la cepa PRCEDA-02 en medio AEM a 23°C. (9).....	24
Figura. 12. Formación de agregados miceliares de <i>P. radicata</i> (10) cepa PRA-01 y (11).....	24

## **Cultivo y caracterización de cepas nativas del hongo del guachipilín (*Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds.), bajo condiciones controladas fase I**

### **1. Resumen**

*Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds., es un hongo comestible que se encuentra en asociación con algunos árboles tropicales, especialmente en el de guachipilín (*Diphysa americana* (Mill.)) en Guatemala y El Salvador, razón por la cual recibe el nombre de “hongo u oreja de guachipilín”. Esta especie no ha sido muy estudiada, y hasta hace poco se conocieron sus propiedades nutricionales y medicinales. A pesar de estas características y su demanda como comestible, no existe información sobre su cultivo e incluso no hay certeza de su condición como saprobio, patógeno o micorrícico. Por esta razón, la presente investigación tuvo como fin generar información sobre aislamiento y cultivo de cepas guatemaltecas de *P. radicata*. Para ello se aislaron tres cepas PRA-01 de Amatitlán, PRCEDA-01 de la ciudad de Guatemala y PRF-01 de Sacatepéquez, de las cuales se analizó su crecimiento en dos medios de cultivo (PDA y AEM) a dos temperaturas (23°C y 25°C). Posteriormente se produjo inóculo utilizando distintos granos (sorgo, trigo y semillas de *Leucaena*) a las mismas temperaturas que para los medios y se calculó la tasa de extensión radial (RER). El análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas entre las cepas, medios de cultivo y temperaturas ( $P > .05$ ), pero si para los granos ( $P < .05$ ), siendo las semillas de *Leucaena* el mejor sustrato para la elaboración del inóculo. Los micelios formaron colonias con bordes circulares e irregulares y micelios aéreos abundantes. No presentaron fíbulas, presentaron exudados y formaron primordios lo cual da indicios de que la especie sea saprobia.

### **2. Palabras clave**

Agaricales, inóculo, hongos comestibles, Neotrópico

### **3. Abstract and keywords**

*Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds. is an edible fungus that is found in association with some tropical trees, especially that of guachipilín (*Diphysa americana* (Mill.)) In Guatemala and El Salvador, which is why it is called "Mushroom or guachipilín ear". This species has not been very studied, and until recently its nutritional and medicinal properties were known. Despite these characteristics and its demand as edible, there is no information about its cultivation and there is even no certainty of its condition as a saprophyte, pathogen or mycorrhizal. For this reason, the present investigation was aimed at generating information on isolation and cultivation of Guatemalan strains of *P. radicata*. For this, three strains PRA-01 from Amatitlán, PRCEDA-01 from Guatemala City and PRF-01 from Sacatepéquez were isolated, from which their growth was analyzed in two culture media (PDA and AEM) at two temperatures (23°C and 25 ° C). Subsequently, inoculum was produced using different grains (sorghum, wheat and *Leucaena* seeds) at the same temperatures as for the media and the radial extension rate (RER) was calculated. Statistical analysis showed that there were no significant differences between strains,



culture media and temperatures ( $P > .05$ ), but for grains ( $P < .05$ ), *Leucaena* seeds being the best substrate for inoculum processing. The mycelia formed colonies with circular and irregular borders and abundant aerial mycelia. They did not present fibulae, presented exudates and formed primordia which gives indications that the species is saprophyte.

**Keywords:** Agaricales, inoculum, edible fungi, Neotropic

#### 4. Introducción

Existen muchos hongos comestibles en el mundo y el interés por aumentar su producción y consumo ha llevado al cultivo exitoso de ciertas especies de hongos saprobios. A muchos de estos hongos se les han realizado pruebas para conocer su contenido nutricional y potencial como medicamento, encontrándose principios que pueden beneficiar la salud del ser humano por su consumo y del ambiente por el cultivo de ellos.

*Pseudofistulina radicata* (Scwein.) Burds., es un hongo americano que se encuentra distribuido desde Estados Unidos hasta Brasil (Guzmán, 1987). Es una especie comestible que vive asociada a raíces de algunos árboles tropicales, especialmente con *Diphysa americana* (Mill.) M. Sousa, una leguminosa frecuente en México y Centroamérica. En Guatemala y El Salvador este árbol se conoce con el nombre de guachipilín, razón por la cual al hongo se le conoce como “hongo de guachipilín u oreja de guachipilín” (Guzmán, 1987; Sommerkamp & Guzmán, 1990). Este hongo se consume en las áreas rurales donde se distribuye, siendo parte de la dieta estacional y sirve para generar ingresos a las personas que lo recolectan en el campo. En El Salvador se conoce como “tenquique” (Escobar y Toledo, 1977) y se le ha llegado a conocer como “la Trufa salvadoreña” (Flores, 2010) y en Guatemala se puede hallar también con el nombre de azadón, particularmente en bosques templados y cálidos de la zona central y suroriental del país. A pesar de su demanda como alimento, ha sido muy poco estudiada y hasta hace poco se desconocían sus propiedades nutricionales, medicinales, anti-cancerígenas y anti-tumorales (Castañeda, 2017). A pesar de estos hallazgos, no existe información sobre su cultivo, ni existen estudios que confirmen la cualidad saprófita o micorrícica. Por tal razón se realizó la presente investigación con la cual se espera proporcionar información valiosa sobre el comportamiento de este hongo a su cultivo de forma artificial. Para ello se realizó el aislamiento de tres cepas nativas PRA-01 proveniente de Amantitlan, Guatemala, PRCEDA-02 proveniente de la ciudad capital de Guatemala y PRF-01 proveniente de Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez. Para el aislamiento se utilizaron dos medios de cultivo (PDA y AEM) los cuales se cultivaron a dos temperaturas (23°C y 25°C) durante 15 días. Posteriormente se cultivaron las cepas en tres granos (sorgo, trigo y semillas de *Leucaena*), a las mismas temperaturas que los medios y para ambos experimentos se calculó la tasa de extensión radial (RER). El análisis estadístico

mostró que no existen diferencias significativas entre cepas, medios de cultivo y temperaturas ( $P > .05$ ). Sin embargo, si hubo diferencia significativa del crecimiento del hongo en los granos ( $P < .05$ ), siendo las semillas de *Leucaena* el mejor sustrato para elaborar el inóculo de *Pseudofistulina radicata*. Los micelios formaron colonias con bordes circulares e irregulares y micelios aéreos abundantes. No presentaron fíbulas, presentaron exudados y formaron primordios lo cual da indicios de que la especie sea saprobia.

## 5. Planteamiento del problema

El hongo de guachipilín (*Pseudofistulina radicata*) es una especie comestible muy apreciada por su delicado sabor en distintas regiones del continente americano, principalmente en El Salvador y Guatemala (Guzmán, 1987; Sommerkamp & Guzmán, 1990). Aunque muy recientemente se encontró que tienen propiedades nutricionales y medicinales importantes (Castañeda, 2017), aún no se sabe nada acerca de su cultivo *in vitro* ni para producción de cuerpos fructíferos. Uno de los problemas principales que afronta la especie es la destrucción de su hábitat y su notoria explotación para consumo, lo cual está llevando al hongo a estar en peligro de extinción, como ha sido reportado en El Salvador (Ministerio de Agricultura y Ganadería, & Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, 2016).

Hasta el momento no se conoce información relevante sobre el cultivo de *P. radicata*, lo cual sería de mucha importancia para países como México, Guatemala y El Salvador, por su mercado y demanda. Por tal razón se realizó la presente investigación, esperando sentar las bases para iniciar el cultivo de esta especie y generar información importante para quienes deseen cultivarlo. El cultivo del hongo podría también contribuir a la restauración de las áreas donde naturalmente existe o existía, reducir la sobreexplotación del hongo en remanentes boscosos y áreas naturales para así permitir su conservación y evitar que siga en la lista de especies en peligro de extinción.

## 6. Preguntas de investigación

### 6.1. General

¿Cómo será el comportamiento de *Pseudofistulina radicata* al ser cultivada a nivel de laboratorio evaluando diferentes medios de cultivo y para producción de inóculo?

### 6.2. Específicas

- ✓ ¿Cuál será el mejor medio de cultivo para el crecimiento de cepas de *P. radicata* y cuál producirá la mayor tasa de extensión radial?

- ✓ ¿Cuál será el mejor grano para el desarrollo micelial de *P. radicata* y producción de inóculo?
- ✓ ¿Cómo serán las características macro y microscópicas del micelio y colonias de *P. radicata* en condiciones *in vitro*?

## 7. Delimitación en tiempo y espacio

### 7.1. Delimitación en tiempo

El proyecto tuvo una duración de seis meses, de junio a octubre, durante los cuales se obtuvieron resultados importantes sobre el aislamiento, cultivo y producción de inóculo de *Pseudofistulina radicata*.

### 7.2. Delimitación espacial

El lugar donde se realizó el experimento fue el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en el tercer nivel del edificio T8 de la Ciudad Universitaria, zona 12, de la Ciudad de Guatemala.

Las cepas de *P. radicata* tienen distintas proveniencias: unas fueron aisladas de cuerpos fructíferos comprados en el mercado de Amatitlán, otras de cuerpos fructíferos recolectados en el Centro Experimental Docente de Agronomía de la USAC, ciudad de Guatemala y otra recolectada en Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez en los años 2017 y 2018. Las cepas se encuentran en mantenimiento en el laboratorio arriba mencionado.

## 8. Marco teórico

### 8.1. Hongos basidiomicetos

Los basidiomicetos son un grupo de hongos que se caracterizan por producir cuerpos fructíferos macroscópicos en su mayoría, en los cuales se encuentran estructuras reproductivas llamadas basidios, que contienen esporas que son liberadas al ambiente para la multiplicación de las especies. Estas esporas son llamadas basidiosporas y los cuerpos fructíferos, basidiocarpos, los cuales tienen por lo general forma de sombrillas y repisas.

### 8.2. *Pseudofistulina radicata*

*Pseudofistulina radicata* es un hongo comestible que vive asociado a las raíces de varias especies de árboles forestales, especialmente árboles de guachipilín (*Diphysa americana*,

Fabaceae), una especie de leguminosa ampliamente distribuida en América. (ref) Algunos autores consideran a este hongo como micorrízico y otros lo consideran saprófito (Guzmán, 1987). Esta especie se consume como alimento en México, Guatemala y es muy apreciada en El Salvador, por su delicado sabor (semejante a la carne animal). Los cuerpos fructíferos, que tienen forma de azadón, de color café claro a rosado-grisáceo, con un estípote muy largo que permanece enterrado, aparece principalmente en la época lluviosa y se recolecta tanto para consumo como para la venta en los mercados locales (Bran, Morales, Cáceres y Flores, 2003; Morales, Bran & Cáceres, 2010; Sommerkamp & Guzmán, 1990). Recientemente se constató que posee propiedades medicinales (Castañeda, 2017)

### 8.3. Descripción de la especie

Guzmán (1987), describe a *P. radicata* de la siguiente forma:

Fructificaciones erguidas en forma de alcañata, estipitadas lateralmente. Píleo de (10) 40-60 (-130) x (5-) 30-50 x 2-15 mm, en forma de abanico acostado (flavaliforme), en ángulo recto respecto al estípote, margen liso, regular o algo lobulado, a veces varios píleos irregularmente imbricados nacidos de un solo estípote; la superficie velutinada o finamente granulosa, lisa a irregularmente surcada o arrugada radialmente, blanquecina o de color café-cuero claro, castaño claro, ceniciento o café achocolatado claro, con el margen a veces más claro. Himenio constituido por una capa porosa blanca, rosa, café-amarillento pálido; se mancha tenue e irregularmente de café-canela al maltratarse. Posee tubos pequeños, de 5-7 mm de longitud por 0.5 mm de diámetro mm, pequeños (1-3 por mm), libres entre sí, subadheridos a subdecurrentes, velutinosos, concoloros con la superficie porosa. Estípote de (30)80-140(185) mm de longitud x (1)5-10(23) mm de diámetro, lateral, falsamente excéntrico por el crecimiento radial del píleo; forma una protuberancia o papila en el sitio de inserción con el píleo, con superficie lisa a velutinosa sobre todo en el ápice, surcado con la edad, enterrado las 3/4 partes de su longitud en el substrato, cilíndrico regular o irregularmente, muy atenuado en la base, que se prolonga en una larga pseudorriza; superficie concolora con el píleo en el ápice (color café achocolatado grisáceo o negruzco hacia la base). Contexto de 1-10 mm de grosor, blanquecino a amarillento, subcarnoso en fresco a fibroso, correoso cartilaginoso en seco, más compacto en el estípote; con olor fuerte, algo aromático, sabor ligero agradable. Al aplicar KOH los tejidos se manchan de color café claro u oscuro en el píleo y estípote, pero amarillento en el contexto.

Esporas globoso-papiladas, de 3-4 $\mu$ m de largo x 2-3.5  $\mu$ m de ancho, con pared lisa y delgada, hialinas en KOH, inamiloides. Basidios de (11)13-16  $\mu$ m de largo x 4-

5(6)  $\mu\text{m}$  de ancho, ventricosos o claviformes, tetraspóricos o a veces bispóricos, hialinos, con contenido granular. Tubos cubiertos por acantofisas, de (25) 45-75 $\mu\text{m}$  x 5-8 $\mu\text{m}$  de ancho, hialinas, subamiloides y con incrustaciones dextrinoides. Cutícula del píleo cubierta con acantofisas, de (23) 45-65 (110)x 4-8 $\mu\text{m}$ , muy apretadas entre sí, con ornamentación de 3-7  $\mu\text{m}$  de alto, hialinas y fuertemente amiloides. Sistema hifal monomítico. Píleo formado por tres capas, la más externa pseudoparenquimatosa, de 45-65  $\mu\text{m}$  de grosor, con hifas hialinas, de 6-12 $\mu\text{m}$  de ancho, pared delgada a moderadamente gruesa; la capa interna 375-1500  $\mu\text{m}$  de grosor, constituida por hifas entremezcladas, de 2-5  $\mu\text{m}$  de ancho, hialinas de pared delgada a algo gruesa y la capa más profunda, en contacto con los tubos, es de 60-85  $\mu\text{m}$  de grosor, con hifas entremezcladas, de 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho, hialinas y con paredes delgadas a un poco gruesas. En la capa media existen dispersos esferocistos de hasta 70  $\mu\text{m}$  de diámetro, hialinos y de paredes moderadamente gruesas. Los tubos están formados por hifas en arreglo paralelo a la superficie de los mismos, hialinas, de 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho y con las paredes engrosadas; subhimenio formado por hifas hialinas, de pared delgada, de 2-3  $\mu\text{m}$  de ancho. Estípites con el mismo arreglo hifal del píleo. Fíbulas no observadas.

#### **8.4. Taxonomía de *Pseudofistulina radicata***

Actualmente la taxonomía de *P. radicata*, utilizando la clasificación moderna basada en el Dictionary of Fungi, décima edición (Kirk, Kannon, Minter, & Stalpers, 2008), se presenta a continuación:

Reino: Fungi

Phyllum: Basidiomycota

Subphyllum: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Fistulinaceae

Género: *Pseudofistulina*

Especie: *Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds.

#### **8.5. Nombres comunes**

Hongo de guachipilín, orejas de guachipilín, azadones, (Guatemala) (Sommerkamp & Guzmán, 1990). Tenquique (El Salvador) (Guzmán, 1987).

## 8.6. Hábitat

Principalmente vive en bosques tropicales asociada a las raíces de distintas especies de árboles, encontrándose comúnmente en Guatemala y El Salvador en el árbol conocido comúnmente como guachipilín (*Diphysa americana*) (Sommerkamp & Guzmán, 1990). Guzmán (1987), menciona que existen registros sobre el crecimiento del hongo al pie de árboles de conacaste o guanacaste, (*Enterolobium cyclocarpum* (Jaco.) Griseb. 1860), Fabaceae.

## 8.7. Distribución

*P. radicata* tiene una amplia distribución desde el sureste de Estados Unidos (Bates, Golday, Kunnen &, Pilla, 2017; Burdsall, 1971), norte y sureste de México (Guzmán, 1987; Romero & Valenzuela, 2008; Vázquez & Valenzuela, 2010), Costa Rica (Ruiz-Boyer, 2012), Guatemala (Flores, Comandini & Rinaldi, 2012) y El Salvador (Castañeda, 2017), hasta Brasil (Sao Paulo)(Guzmán, 1987).

## 8.8. Hábitos de la especie

Algunos autores consideran a esta especie como micorrízica, otros como xilófaga, aunque es más probable que sea saprófita lignícola ya que, según Guzmán (1987), esta especie está estrechamente relacionada con la especie *Fistulina*, la cual es lignícola al igual que la mayoría de los miembros de esa familia.

## 8.9. Usos de *Pseudofistulina radicata*

Comestible, consumido por personas de las áreas rurales, quienes también lo destinan para la venta en los mercados en Guatemala y El Salvador principalmente (Morales, Bran & Cáceres, 2010; Sommerkamp & Guzmán, 1990).

## 8.10. Propiedades nutritivas y medicinales de *Pseudofistulina radicata*

Al igual que la mayoría de hongos comestibles, *P. radicata* ha sido objeto a diversos estudios para conocer su valor nutricional y medicinal con lo cual se ha descubierto que posee excelentes propiedades nutricionales y medicinales (Castañeda, 2017).

## 8.11. Cultivo de *Pseudofistulina radicata*

Hasta el momento no se tienen reportes concretos sobre el cultivo de *P. radicata*. Sin embargo en El Salvador se han hecho aislamientos de micelio e inoculando rodajas de árbol de guachipilín, pero los resultados de esos ensayos no han sido publicados (Castillo & Parada, 2017). Por otro lado, en Guatemala, el autor realizó pruebas de cultivo del hongo en granos de sorgo, trigo y paja, observándose el apareamiento de primordios en los granos y paja de trigo, lo cual podría ser un indicio de que el hongo es saprobio lignícola.

### 8.11.1. Obtención de micelio de hongos comestibles

López (2016), describe varios métodos de obtener micelio de hongos comestibles los cuales se describen a continuación:

**A partir de una cepa.** Se toma un fragmento de medio de cultivo con micelio y se coloca sobre el sustrato. Este proceso al principio es lento.

**A partir de esporada.** Se obtiene la esporada del hongo para luego ser colocada directamente en el sustrato. La esporada debe humedecerse en el sustrato y su desarrollo es un tanto lento en un principio.

**A partir de esporada en dilución.** Las esporas extraídas de los hongos se diluyen en agua estéril y luego se vierte el agua con las esporas en el sustrato. El micelio se desarrolla y crece vigorosamente debido a los múltiples puntos de crecimiento.

**A partir de micelio madre.** Este es el mejor método para extraer micelio para elaborar inóculo debido a que estese encuentra activado (creciendo vigorosamente) sobre un sustrato y es capaz de adaptarse rápidamente uno nuevo.

### 8.11.2. Selección de cepas

Para la selección de cepas, es necesario elegir hongos sanos, libres de plagas y enfermedades, en el medio de cultivo. Se deben elegir las cepas que tengan un crecimiento rápido y vigoroso para garantizar un buen desarrollo en el sustrato final para el cultivo (Ardón, 2007).

### 8.11.3. Medios de cultivo

Existen varios medios de cultivo que se pueden utilizar para el aislamiento del micelio de hongos saprobios, entre ellos se encuentra el medio papa, dextrosa y agar (PDA), agar

extracto de malta (AEM), medio Sabouraud (SAB), entre otros (Gaitán-Hernández, Salmones, Pérez-Merlo & Mata, 2006). Estos medios mencionados han sido utilizados para aislamientos de cepas de hongos comestibles a nivel mundial, los cuales han dado resultados exitosos.

#### **8.11.4. Evaluación y caracterización de cepas de hongos para cultivo**

Antes de realizar el cultivo de un hongo comestible que no se ha cultivado anteriormente, es necesario estudiar su microscopía y evaluar sus características adaptativas de temperatura, crecimiento en medios de cultivo y sustratos para producción de inóculo, con el fin de conocer el comportamiento del hongo y garantizar su reproducción en sustratos definitivos (Ardón, 2007).

#### **8.11.5. Producción de inóculo de hongos comestibles**

La producción de inóculo o semilla de hongos comestibles, por lo general se realiza con semillas de gramíneas, con las que se ha tenido mucho éxito en la mayoría de países productores (Staments, 1993). En Guatemala se han cultivado especies de hongos silvestres comestibles utilizando granos de sorgo y trigo, con los cuales se han obtenido buenos resultados en la producción y comercialización de inóculo (Bran et al., 2012; Peralta & Orozco, 2017).

## **9. Estado del arte**

Hasta el momento no existe información publicada sobre el cultivo de *Pseudofistulina radicata*.

Castillo y Parada (2017), mencionan el aislamiento del micelio de esta especie, el cual siembran en rodajas del árbol de guachipilín, sin embargo no se menciona los medios de cultivo ni el sustrato para la elaboración del inóculo, ni los resultados obtenidos de esos ensayos.

Castañeda (2017), realizó un estudio donde estudió la composición nutricional y propiedades medicinales de *P. radicata*, donde encontró datos interesantes del valor nutricional como los que se presentan en la tabla 1, además de propiedades antitumorales, anticancerígenas y antiinflamatorias.



**Tabla 1.** Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos del hongo seco *Pseudofistulina radicata* (media  $\pm$  SD).

<i>P. radicata</i>	
<b>Valor nutricional</b>	
Cenizas (g/100 g dw)	6,0 $\pm$ 0,4
Proteínas (g/100 g dw)	10,1 $\pm$ 0,1
Grasas (g/100 g dw)	0,524 $\pm$ 0,004
Carbohidratos (g/100 g dw)	83,4 $\pm$ 0,3
Energía (kcal/100 g dw)	379 $\pm$ 1
<b>Glúcidos</b>	(g/100 g dw)
Fructosa	0,73 $\pm$ 0,08
Manitol	9,5 $\pm$ 0,2
Trehalosa	8,36 $\pm$ 0,03
<b>Total</b>	18,6 $\pm$ 0,3
<b>Ácidos orgánicos</b>	(g/100 g dw)
Oxálico	0,03 $\pm$ 0,01
Málico	1,17 $\pm$ 0,03
Fumárico	Tr
<b>Total</b>	1,21 $\pm$ 0,04

## 10. Objetivo general

Aislar y cultivar el hongo *Pseudofistulina radicata* a nivel de laboratorio en bajo diferentes temperaturas, medios de cultivo y producción de inóculo.

## 11. Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento del hongo en distintos medios de cultivo (PDA, AEM y SAB).
2. Evaluar el desarrollo micelial de *P. radicata* en distintos granos (sorgo, trigo, semillas de *Leucaena* y semillas de guachipilín) para la producción de inóculo.
3. Describir las características macro y microscópicas del micelio de *P. radicata*.

## 12. Hipótesis

*Pseudofistulina radicata* responde positivamente a condiciones de cultivo *in vitro* en al menos un medio de cultivo, un grano y una temperatura, lo cual se refleja en un crecimiento vigoroso del micelio.

## 13. Materiales y métodos

### 13.1. Enfoque y tipo de investigación

El enfoque de la investigación será mixta, ya que se realizó un experimento cuantitativo tomaron datos de temperatura, tasa de extensión radial y otro cualitativo donde se describió la forma de crecimiento del micelio, color, presencia/ausencia de estructuras aéreas, fíbulas y otras características de interés.

### 13.2. Recolección de información

La recolección de la información se realizó luego de que inició el crecimiento del hongo tanto en medios de cultivo como en granos midiendo dos planos perpendiculares X y Y con la ayuda de reglas graduadas de 30 cm, tomando lecturas cada tres días hasta que el micelio cubrió totalmente la placa. Para la caracterización macro y microscópica de las cepas se realizó un montaje de los micelios de *P. radicata* con azul de lactofenol y se observó en un microscopio para observar las características de interés. Se realizó también la observación de las colonias en un estereoscopio para observar el tipo de borde, color en el adverso y reverso, micelios aéreos, etc. Esto se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, ambos de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### 13.3. Investigación cuantitativa

Se seleccionaron tres localidades: Amantitlan, Guatemala, USAC, Guatemala y Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez, ya que en cada localidad existen condiciones climáticas distintas y hay abundancia de estos hongos. Se realizó un análisis estadístico realizando un diseño experimental completamente al azar, con un arreglo factorial de  $3 \times 2 \times 2$  (tres cepas, dos medios y dos temperaturas) para los medios de cultivo y  $3 \times 3 \times 2$  (tres cepas, tres granos y dos temperaturas) para la obtención del inóculo. Para los datos obtenidos se calculó la tasa de extensión radial. Se realizó un total de diez réplicas por tratamiento para cada experimento haciendo un total de 120 unidades experimentales para los medios y 180 unidades experimentales para los granos, con las cuales es suficiente para reducir el error experimental.

### **13.4. Investigación cualitativa**

Para los datos de microscopía del hongo se realizaron observaciones en microscopio, donde se describieron las características de los micelios como color, textura, forma, producción de micelio aéreo, exudados, agregados hifales y otras características de interés. Para obtener y comparar esta información se consultaron bibliografías de estudios de hongos silvestres de Guatemala realizados en la Dirección General de Investigación de la USAC.

### **13.5. Técnicas e instrumentos:**

#### **13.5.1. Revitalización de las cepas de *Pseudofistulina radicata***

Para la revitalización de las cepas de *P. radicata* estas fueron sembradas en medio PDA e incubadas a una temperatura de 25°C, durante 30 días. Las cepas que se utilizaron se encuentran resguardadas en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la USAC.

#### **13.5.2. Determinación del diámetro de las colonias de las cepas de *Pseudofistulina radicata***

Para este procedimiento se siguió la metodología recomendada por Stamets (1993) y adaptada por Bran y colaboradores (2012). Se prepararon medios de cultivo con agar extracto de malta (MEA) y papa, dextrosa y agar (PDA), éstos se esterilizaron por 15 minutos a 121-°C en una autoclave. Posteriormente se inocularon 10 cajas de Petri, desechables, con las cepas de *P. radicata* revitalizadas, introduciendo un segmento de 5 mm de diámetro del cultivo. Cada caja fue identificada con el nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición. Posteriormente las cajas fueron selladas con papel film® para evitar su deshidratación. Las 10 cajas de cada medio y cada cepa fueron incubadas a temperatura ambiente (23°C) y a (25°C) durante un máximo de 15 días. El diámetro de las colonias fue monitoreado cada 3 días, mediante la medición en dos planos perpendiculares X y Y, de los cuales se obtuvo un promedio en milímetros. Luego se elaboró una base de datos en el programa Excel® con los datos recopilados, los cuales fueron ordenados elaborando un cuadro vertical con los parámetros: cepa (3 cepas), medio de cultivo (PDA y AEM), día de medición, diámetro de las colonia por cada repetición (mm).

Luego todos los datos se importaron al programa estadístico Infostat®, para ser analizados y se elaboraron gráficas de interacción de los crecimientos miceliales.

### **13.5.3. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias**

Para la caracterización macro y microscópica de los micelios de *P. radicata*, se siguieron las recomendaciones de Nobles (1965), adaptadas por Bran y colaboradores (2012).

Se utilizó un estereoscopio para la caracterización macroscópica de las colonias de cada cepa. Se determinó el color del anverso y reverso de cada caja, la textura de la colonia, su consistencia, forma, producción de micelio aéreo, producción de exudado, formación de rizomorfos o agregaciones hifales.

Se realizó también preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características de las hifas. Se observó la presencia de fíbulas, clamidosporas, y otras características de de interés.

### **13.5.4. Producción del inóculo**

Para realizar el inóculo se siguieron las recomendaciones de Coello-Castillo, Sánchez y Royse (2009) adaptados por Bran y colaboradores (2012) y Peralta y Orozco (2017). Los granos (sorgo, trigo y semillas de *Leucaena*) fueron hidratados por 18 horas, hasta alcanzar aproximadamente el 80% de humedad. Luego se colocarán en cajas de petri de vidrio de 9 cm de diámetro con 30 gramos en peso húmedo y agregándoles 1 % p/p de CaCO<sub>3</sub>. Las cajas con granos se esterilizaron durante 30 minutos a 121°C y 15 lbs / pulgada<sup>2</sup> de presión. Luego se enfriaron a temperatura ambiente.

Posteriormente fueron inoculadas con un fragmento de 5 mm de diámetro del micelio producido previamente de cada una de las cepas (10 repeticiones por sustrato y cepa). Las cajas fueron identificadas con el nombre de la cepa, fecha de inoculación, tipo de sustrato, temperatura de incubación y número de repetición. Luego se incubaron a dos temperaturas (23°C y 25°) al igual que los medios de cultivo. Después fue monitoreado el crecimiento micelial cada 3 días, hasta que el micelio colonizó totalmente los granos. Luego de tomar los datos de crecimiento micelial, se realizó el cálculo de la tasa de extensión radial (RER) utilizando la siguiente fórmula:  $RER = \frac{X_2 - X_1}{T_2 - T_1}$  (mm/día),

Donde:

X1 es el diámetro inicial de la colonia en mm,

X2 es el diámetro final,

T1 el tiempo inicial

T2 el tiempo final de incubación.

Finalmente se elaboró una base de datos en el programa Excel con los siguientes parámetros: Cepa (3 cepas), temperaturas de incubación (23°C y 25°C), sustrato (sorgo, trigo y semillas de *Leucaena*) y RER (tiempo de colonización de cada una de las repeticiones). Los datos obtenidos se importaron programa estadístico Infostat®, para su análisis y creación de gráficos de interacción del crecimiento de las cepas.

### 13.6. Operacionalización de las variables o unidades de análisis:

**Tabla 2.** Operacionalización de las variables o unidades de análisis

Objetivos específicos	VARIABLES o unidades de análisis que fueron consideradas	Forma en que se midieron, clasificaron o cualificaron
1. Evaluar el crecimiento del hongo en distintos medios de cultivo (PDA, AEM y SAB).	Crecimiento micelial en mm del hongo en los medios de cultivo a dos temperaturas.	Medición en dos planos perpendiculares X y Y con una regla graduada de 30 cm. Se calculó de la tasa de extensión radial (RER) con la fórmula $RER = \frac{X2 - X1}{T2 - T1}$ . Las temperaturas se midieron con un termómetro para 23°C y graduación de incubadora para 25°C.
2. Evaluar el desarrollo micelial de <i>P. radicata</i> en distintos granos (sorgo, trigo, semillas de <i>Leucaena</i> y semillas de guachipilín) para la	Crecimiento micelial en mm del hongo en los granos a dos temperaturas.	Medición en dos planos perpendiculares X y Y con una regla graduada de 30 cm. Se calculó de la tasa de extensión radial (RER) con la fórmula $RER = \frac{X2 - X1}{T2 - T1}$ . Las temperaturas se midieron con un termómetro para 23°C y

producción de inóculo.		graduación de incubadora para 25°C.
Describir las características macro y microscópicas del micelio de <i>P. radicata</i> .	Características morfológicas macroscópicas y microscópicas del hongo.	Observación de los micelios de los hongos con estereoscopio para las características macroscópicas. Teñido de los micelios con azul de lactofenol para observar las características microscópicas del hongo con la ayuda de un microscopio.

### 13.7. Procesamiento y análisis de la información:

1. Se llevó un registro de los datos obtenidos en un formato donde se anotaron las variables evaluadas.
2. Se midió el diámetro de las colonias de las cepas estudiadas en dos planos perpendiculares X y Y, luego se sacó un promedio y se anotaron los datos en un cuadro de EXCEL donde posteriormente se calculó la RER.
3. Se determinó mediante los resultados obtenidos, el mejor medio de cultivo y grano para el cultivo de *P. radicata* observando el crecimiento micelial en ellos a dos temperaturas.
4. Plan de análisis: para el análisis de los datos se realizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones. A los datos obtenidos se les calculó la media aritmética, la variación y la desviación estándar. Además se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para los dos experimentos (crecimiento micelial en medios de cultivo y granos). Se realizó una transformación de los datos para la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de los experimentos. El nivel de significancia fue de 0.05, y el nivel de confiabilidad del 95%. Los datos fueron procesados con el programa Infostat<sup>®</sup>, con el cual se generaron gráficas de barras de error, andeva y la prueba múltiple de medias de Tukey. Para el estudio macro y microscópico de los micelios se hizo de forma descriptiva anotando las características observadas.

## 14. Vinculación, difusión y divulgación

### 14.1. Vinculación

Los resultados de la presente investigación estarán vinculados a instituciones como el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (Marn), Fundación de la Caficultura para el Desarrollo Rural (Funcafe), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (Maga), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, entre otros.

### 14.2. Estrategia de difusión y divulgación

Realización de exposiciones en cursos, talleres, conferencias, etc. relacionados con los resultados de la investigación. Publicar artículo en revistas científicas de la DIGI o en otras revistas relacionadas al tema. Elaborar un protocolo para el cultivo del micelio y producción de inóculo de *Pseudofistulina radicata*.

## 15. Resultados:

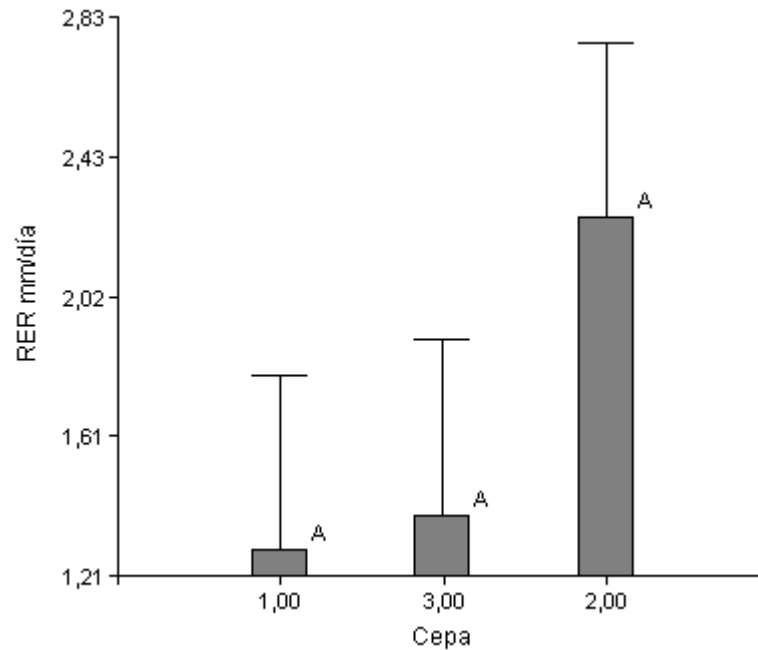
### 15.1. Evaluación de la RER en medios de Cultivo

Los micelios de *P. radicata* crecieron en dos medios de cultivo evaluados PDA y AEM a dos temperaturas, temperatura ambiente (23°C) y temperatura controlada 25°C (Fig. 3). En los resultados obtenidos se observó que el dato mas alto de la RER se obtuvo en AEM a temperatura ambiente (23°C) con la cepa PRCEDA-02 (4,78 mm/día), seguido por la misma cepa a 25°C en el mismo medio de cultivo (2,53 mm/día), los menores datos también se obtuvieron con la misma cepa (0,76 mm/día) a 25°C y (0.91 mm/día) a 23°C. Según el análisis estadístico realizado se observó diferencias entre los datos de la RER (Tabla 3), sin embargo no existieron diferencias significativas entre las cepas (Fig. 1), los medios (Fig. 2) y las temperaturas (Fig. 3). El tiempo en que se evaluó el crecimiento de las cepas medios de cultivo fue de 15 días, en la que la cepa PRCEDA-02 logró colonizar las placas de Petri de 8.5 cm, mientras que las otras cepas no lograron completarlas.

**Tabla 3.** Tasa de extensión radial en medios de cultivo.

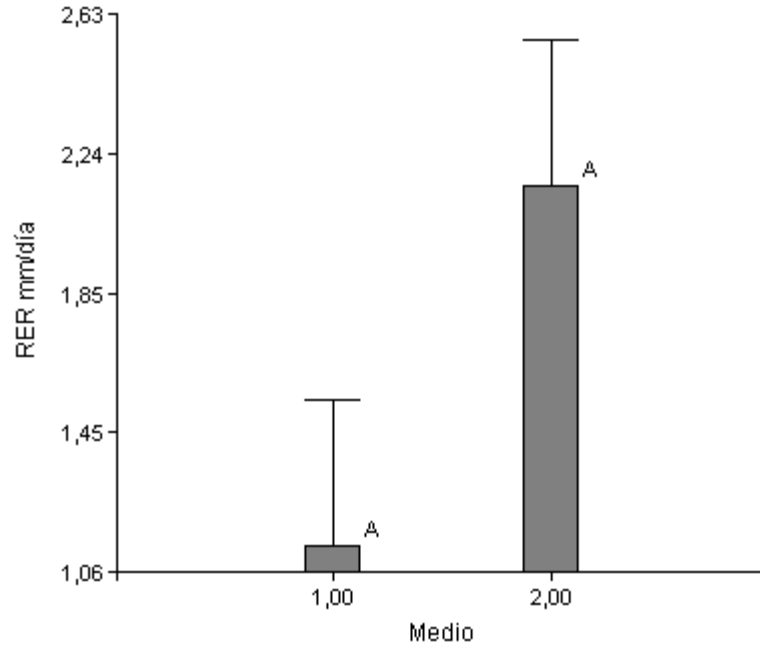
Temperatura	Cepa	Medio	RER mm/día	
25°C	PRA-01	PDA	1,08	a*
		AEM	1,64	a
	PRCEDA-02	PDA	0,76	a
		AEM	2,53	a
	PRF-01	PDA	1,10	a
		AEM	1,26	a
23°C	PRA-01	PDA	1,01	a
		AEM	1,39	a
	PRCEDA-02	PDA	0,91	a
		AEM	4,78	a
	PRF-01	PDA	1,90	a
		AEM	1,27	a

\*Letras distintas demuestran diferencias significativas

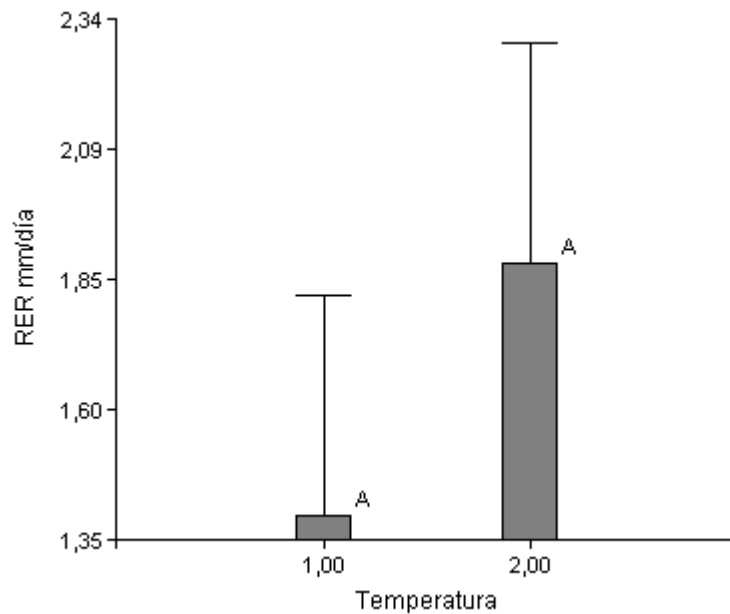


**Figura. 1.** Efecto de las cepas sobre RER en diferentes medios de cultivo. Las barras indican la media. Las barras de error muestran  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < .05$ ).





**Figura. 2.** Efecto de los medios de cultivo sobre RER. Las barras indican la media. Las barras de error muestran  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < .05$ ).



**Figura. 3.** Efecto de las diferentes temperaturas sobre la RER en diferentes medios de cultivo. Las barras indican la media. Las barras de error muestran  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < .05$ ).

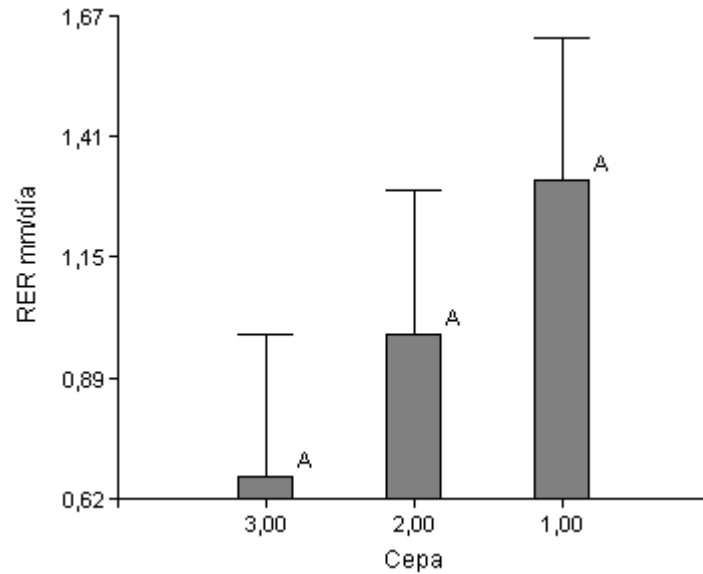
## 15.2. Evaluación de la RER en granos

En cuanto el crecimiento de las cepas en los granos, se observó que la RER fue más alta en las semillas de *Leucaena* que en sorgo y trigo tanto a temperatura ambiente (23°C) como a temperatura controlada (25°C). Los datos mas altos de la RER en los granos fue para la cepa PRCEDA-02 (3.73 mm/día), seguido por la cepa PRF-01 (3.35 mm/día), ambas a 25°C y la cepa PRA-01 (3.34 mm/día) a 23°C. Asimismo los datos mas bajos fueron para los granos de sorgo a ambas temperaturas (0.00 mm/día). Según el análisis estadístico hubieron diferencias entre los tratamientos (Tabla 4), sin embargo no fueron significativos entre cepas y temperaturas evaluadas ( $P > .05$ ), pero si lo fueron para los granos ( $P < .05$ ), siendo las semillas de *Leucaena* las mejores para la elaboración de inóculo para *P. radicata* (Fig. 4, 5 y 6). El tiempo en que se evaluó el crecimiento de las cepas fue de 20 días, en la que la cepa PRCEDA-02 logró colonizar las placas de Petri de 9 cm, mientras que las otras cepas no lograron completarlas.

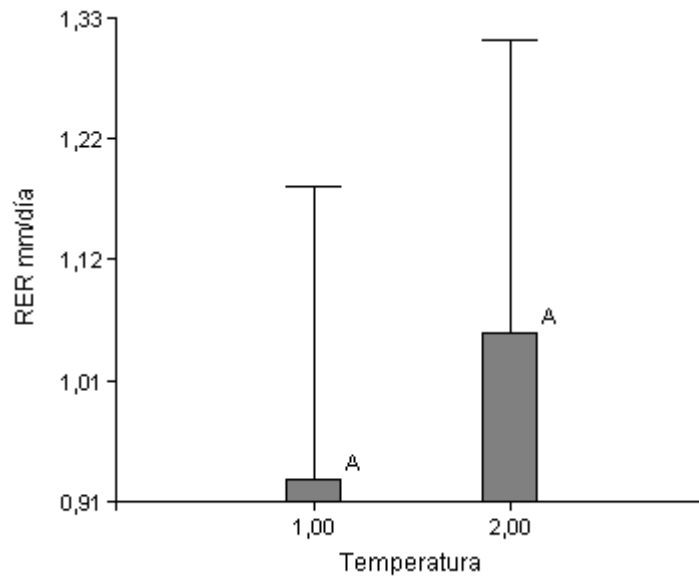
**Tabla 4.** Tasa de extensión radial para la producción de inóculo.

Temperatura	Cepa	Granos	RER mm/día	
25°C	PRA01	Sorgo	0,6	a*
		Trigo	0,29	a
		<i>Leucaena</i>	3,34	b
25°C	PRCEDA-02	Sorgo	0	a
		Trigo	0	a
		<i>Leucaena</i>	3,73	b
25C	PRF-01	Sorgo	0	a
		Trigo	0	a
		<i>Leucaena</i>	0,37	b
23C	PRA01	Sorgo	0	a
		Trigo	0,48	a
		<i>Leucaena</i>	3,18	b
23C	PRCEDA-02	Sorgo	0	a
		Trigo	0	a
		<i>Leucaena</i>	2,16	b
23C	PRF-01	Sorgo	0,09	a
		Trigo	0,21	a
		<i>Leucaena</i>	3,35	b

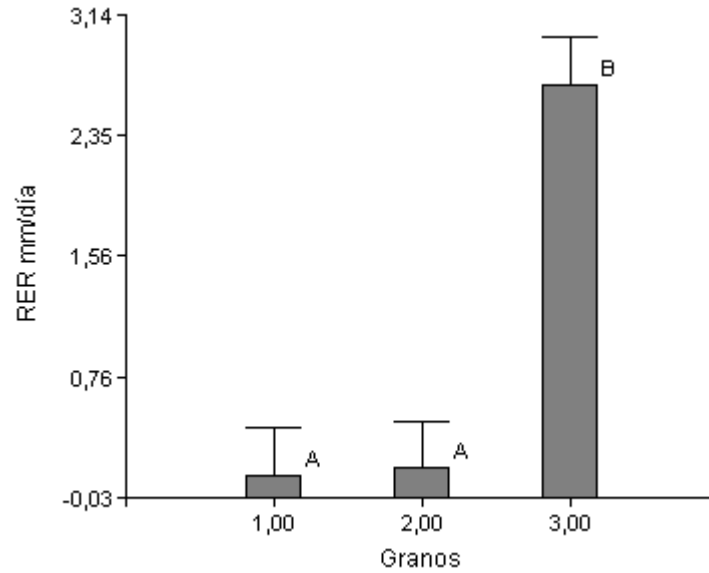
\*Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos



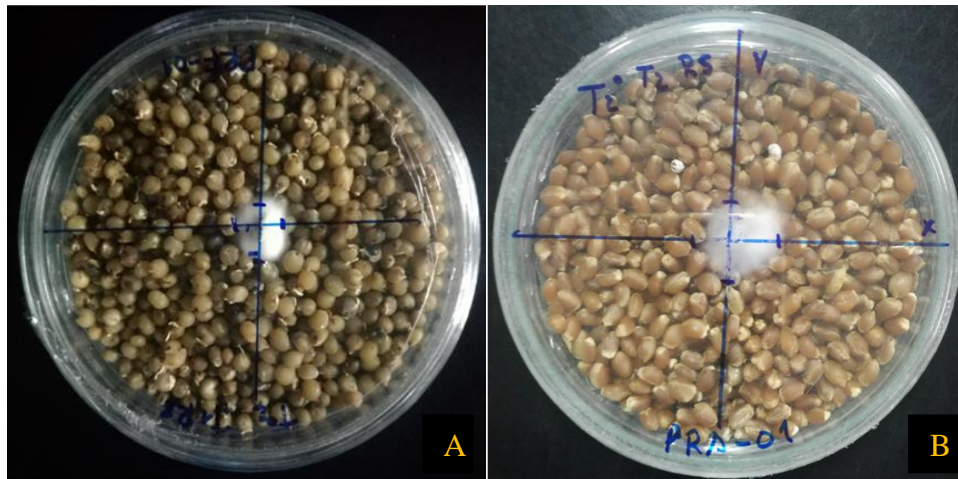
**Figura. 4.** Efecto de las cepas sobre RER en diferentes granos. Las barras indican la media. Las barras de error muestran  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < .05$ ).



**Figura. 5.** Efecto de la temperatura sobre RER en diferentes granos. Las barras indican la media. Las barras de error muestran  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < .05$ ).



**Figura. 6.** Efecto de los granos con respecto a RER sin tomar en cuenta las cepas evaluadas. Las barras indican la media. Las barras de error muestran la desviación estándar.



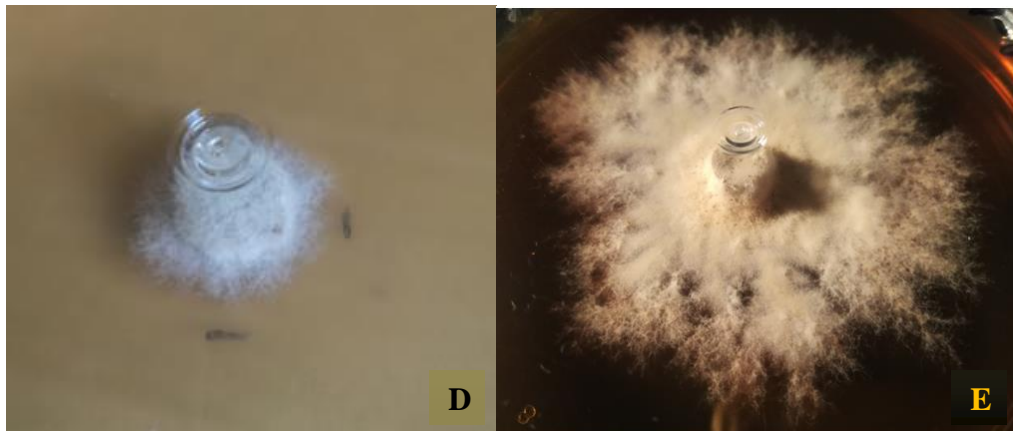
**Figura. 7. A.** Micelio de *P. radicata* creciendo en granos de sorgo **B.** micelio de *P. radicata* creciendo en granos de trigo.



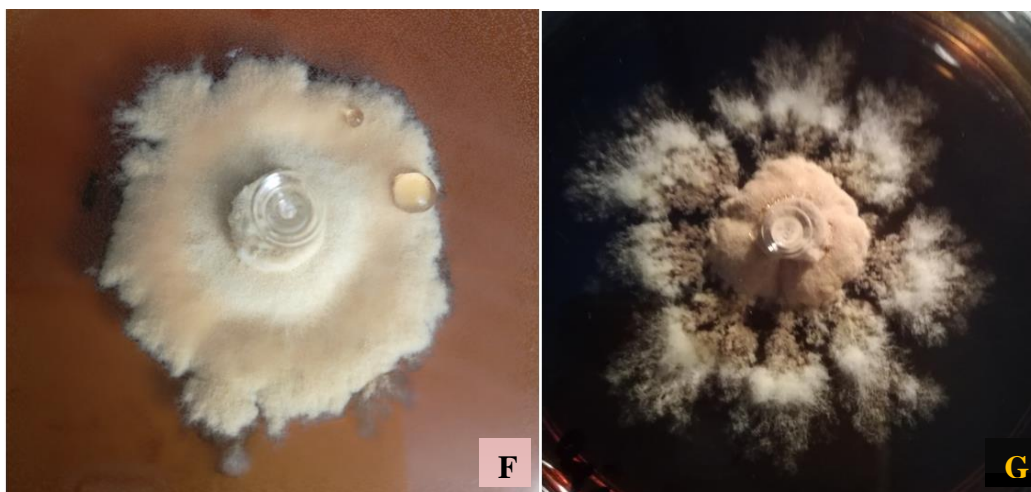
**Figura. 8. C.** Crecimiento de *P. radicata* en semillas de *Leucaena*

### 15.3. Caracterización macroscópica de las cepas

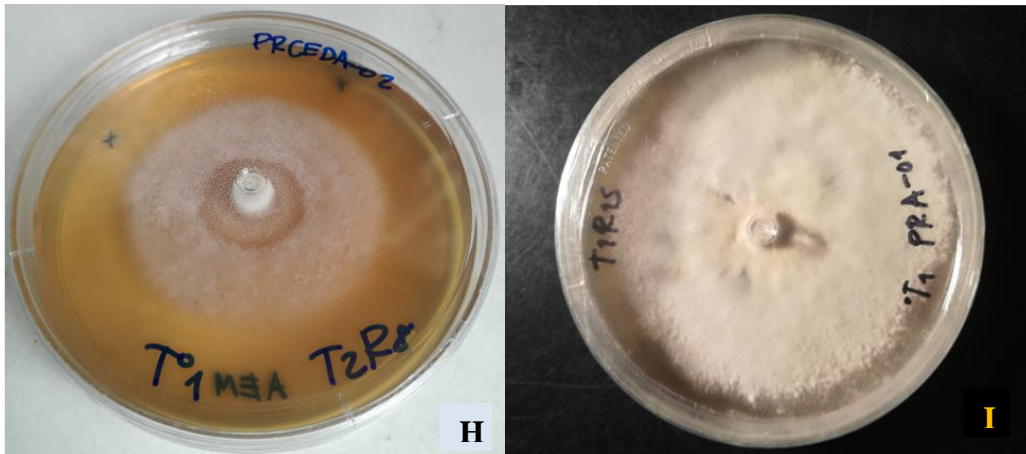
Se analizaron los micelios de las tres cepas y se observó que presentaron formas de crecimientos circulares e irregulares. En cuanto a la coloración se observaron colonias transparentes al inicio y blancas conforme se iba compactando el micelio que en algunos casos se tornaron de color café claro al detener su crecimiento (Fig.10). La cepa PRA-01 presentó bordes más o menos circulares en ambos medios y temperaturas mientras que la cepa PRCEDA-02 produjo colonias circulares en AEM a 23°C y en PDA a la misma temperatura produjo colonias con bordes irregulares y ramificados. Tanto la cepa PARA-01 como la PRCEDA-02 colonizaron la totalidad de las cajas de Petri a dicha temperatura (Fig. 11) mientras que las otras cepas no lo hicieron en el tiempo evaluado. La cepa PRF-01 produjo bordes irregulares en las dos temperaturas y los dos medios de cultivo. En medio PDA a 25°C todas las cepas produjeron colonias con bordes irregulares (Fig. 9 (E), 10 (G) y 12 (K)). A temperatura de 23°C la cepa PRCEDA-02 formó agregados miceliarios en AEM después de colonizar el medio (Fig. 12). La textura de las cepas fue algodonosa, y formaron micelio aéreo abundante (Fig. 10), también hubo producción de pequeños exudados en todas las cepas en los dos medios y en las dos temperaturas de color café a ámbar. En los granos se observó un micelio algodonoso color blanco en sorgo y trigo mientras que en semillas de *Leucaena* hialino y simple (Fig. 7 y 8).



**Figura. 9.** Micelio de *P. radicata* creciendo en medios de cultivo. **D.** Crecimiento Inicial. **E.** Crecimiento intermedio.



**Figura. 10.** Cambio de coloración del micelio de *P. radicata*. **G.** Cambio de coloración al detener el crecimiento. **H.** Crecimiento del micelio luego de cambiar de color.



**Figura. 11.** I. Crecimiento circular de la cepa PRCEDA-02 en medio AEM a 23°C. J. Caja de petri con medio PDA totalmente cubierta de micelio de la cepa PRA-1 a 23°C



**Figura. 12.** Formación de agregados miceliales de *P. radicata*. **K.** Cepa PRA-01. **L.** cepa PRF-01 en medios AEM.

#### 15.4. Caracterización microscópica de las cepas

Se realizó un montaje del micelio de las cepas de *P. radicata* utilizando azul de lactofenol en un porta objetos y se observó al microscopio. Se observó un micelio septado el cual es característico de los basidiomicetos, color hialino sin ramificaciones. No se observó la presencia de fíbulas pero si se observaron clamidosporas en los micelios en los dos medios de cultivo a ambas temperaturas.

## 16. Análisis y discusión de resultados:

Las cepas de *Pseudofistulina radicata* lograron crecer en los dos medios de cultivo evaluados obteniendo los mayores crecimientos en el medio AEM lo cual es similar a lo obtenido por los datos son similares a los obtenidos con otros hongos guatemaltecos como *Neolentinus ponderosus*, *Neolentinus lepideus*, *Lepista nuda*, *Schizophyllum commune* (Bran, Morales, Flores, Cáceres, & Blanco, 2007; Bran, Morales, Flores & Cáceres 2009; Bran, Cáceres, Gurriarán, Morales & Flores, 2015) en donde obtuvo buen crecimiento en este medio de cultivo. Esto puede deberse a que el hongo requiere medios de cultivo que sean altamente nutritivos. El medio de cultivo AEM posee esta característica, ya que entre sus ingredientes se encuentran el extracto de malta y peptona de harina de soya que proveen de nutrientes de calidad (Bran, et al., 2015). Además que la soya es una leguminosa que podría proveer de algún nutriente requerido por el hongo ya que este se desarrolla de forma natural en un árbol dentro la misma familia de plantas.

El hongo logró colonizar la caja de Petri en 15 días, especialmente la cepa PRCEDA-02 similar a los tiempos obtenidos con la cepa 46.02 de *Schizophyllum commune* en medio PDA reportado por Bran et al. (2009), con la diferencia que para *P. radicata* fue en medio AEM. Este es un tiempo relativamente largo comparado con otras especies de hongos silvestres comestibles de Guatemala como *Volvariella bombycina*, donde las cepas colonizaron en un tiempo de 7 a 8 días (Peralta-Rivera, Morales, Bran, Flores, & Orozco, 2019).

A pesar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, se observó que las cepas crecieron mejor en medio de cultivo AEM, puesto que el desarrollo de los micelio fue mejor para todas las cepas, en ambas temperaturas, especialmente para la cepa PRCEDA-02 a 23°C. Cabe mencionar que la cepa PRCEDA-02 fue colectada en el campus central de la USAC en donde las temperaturas son similares a las evaluadas para su crecimiento artificial, por lo que eso pudo influenciar su mejor crecimiento respecto a las otras cepas. La temperatura es un factor influyente en el crecimiento de los hongos ya que a menor temperatura el hongo crece mas lento debido ya que ésta reduce su metabolismo (Chang & Miles, 2004). La sensibilidad a la temperatura también varía entre cepas, según su etapa de desarrollo (Bran, et al., 2009).

En cuanto a la producción del inóculo, las cepas se comportaron distintas a la mayoría de hongos comestibles tanto nativos como extranjeros, ya que la mayoría crecen bien en semillas de gramíneas como sorgo, trigo, cebada, arroz, etc. (Bran et al., 2007; Bran et al., 2009; Bran et al., 2015; Peralta-Rivera et al., 2019; Stamets, 1993). En el caso de *Pseudofistulina radicata* se observó que prefirió semillas de una planta leguminosa que en este caso fue *Leucaena sp.* la cual es una planta comúnmente utilizada como forraje para ganado por su alto contenido de nutrientes (Sheti & Kulkarni, 1995). Esto puede ser también



un motivo por el cual el hongo prefirió este tipo de grano ya que se reporta que las semillas de *Leucaena* contienen gran cantidad de nutrientes lo cuales podrían haber favorecido el crecimiento rápido y vigoroso del micelio en comparación con los otros granos. Con estos resultados también se abre el camino para nuevas investigaciones donde conviene realizar estudios de semillas de otras plantas leguminosas que estén estrechamente relacionadas con el árbol de guachipilín para la producción de inóculo.

Al realizar la caracterización macro y microscópica de *P. radicata* se observó que en el adverso las colonias eran de un color transparente a blanco y con textura algodonosa y con abundante micelio aéreo las cuales en el caso de las cepa PRCEDA-02 cambió a un color café claro a 25°C. Las colonias además variaron en su forma ya que en medio PDA a las dos temperaturas presentaron bordes irregulares y ramificados las cepas PRCEDA-02 y PRF-01. A este tipo de forma de las colonias en la literatura se le define como “micelio caótico” que es un micelio laxo y con bordes no definidos (Bran, et al., 2009). La formación de este tipo de colonias está influenciada por la presencia de luz, y se reportan solamente cuando los cultivos se incuban en presencia de luz y no en oscuridad (Kein, Landry, Friesen, & Larimer, 1997). Sin embargo debido a que el medio de cultivo PDA es menos nutritivo, y aunque la cepas se hayan incubado en oscuridad, también pudo haber influido en la formación de este tipo de micelio, tal y como lo reportó Bran et al. (2009) para *Schizophyllum comune* con el medio CZD (sacarosa, hidrato de sodio, sulfato magnésico, cloruro de potasio, sulfato de hierro e hidrógeno fosfato dipotásico) el cual poseía poca concentración de nutrientes. La cepa PRA-01 presentó bordes casi circulares en medio PDA a 23°C contrario de las otras cepas, esto pudo deberse a que esta cepa pudo adaptarse a este medio de cultivo. La cepa PRCEDA-02 formo agregados miceliareos o primordios después de colonizar totalmente el medio a temperatura de 23°C, lo cual da indicios de que la especie pueda ser saprófita-lignícola como lo menciona Guzmán (1987) ya que tiene está estrechamente relacionada con la especie *Fistulina* la cual posee esos hábitos y pertenece a la misma familia que *P. radicata*.

En el reverso las cepas se observó una coloración café claro, lo cual podría ser por la formación de metabolitos secundarios o alguna anomalía en el crecimiento (Stamets, 1993).

Los micelios de las tres cepas no presentaron fíbulas en los dos medios y las dos temperaturas lo cual concuerda con la descripción realizada por Guzmán (1987) de esta especie en donde tampoco observó dichas estructuras. La presencia de fíbulas indica el estado dicariótico del micelio con el cual garantizan el mantenimiento de este estado en las puntas de las hifas, previo a la producción de cuerpos fructíferos los hongos del Phylum Basidiomycota (Chang & Miles, 2004).

La presencia de clamidosporas también fue observado en las cepas, lo cual indica que los dos medios no fueron muy favorables para el hongo, ya que la formación de estas estructuras solo se dan cuando los hongos se encuentran en condiciones adversas, utilizándolas como modo de supervivencia (Chang & Miles, 2004).

## 17. Conclusiones

1. Las cepas de *Pseudofistulina radicata* crecieron en dos medios de cultivo evaluados PDA y AEM, observándose mejor desarrollo en AEM, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas.
2. No se pudo evaluar el medio de cultivo agar sabouraud (SAB) debido a que no se obtuvieron a tiempo los materiales solicitados para realizar la presente investigación, por tal razón solo se evaluaron los medios de cultivo PDA y AEM.
3. Para la elaboración de inóculo las semillas de *Leucaena* fueron las mejores para el desarrollo del inóculo de *P. radicata*, comparado con los otros granos en los que no creció casi nada en un tiempo de 20 días.
4. No se pudo evaluar las semillas de guachipilín debido a que el árbol produce pocas semillas, por tal motivo no es rentable comercialmente su utilización.
5. Las colonias de las cepas de *P. radicata* crecieron de diferentes formas tanto circulares como con bordes irregulares lo cual fue influenciado por los medios y las temperaturas, además produjeron abundante micelio aéreo y exudados.
6. La cepa PRCEDA-02 cambió a color café claro y posteriormente al igual que la cepa PARA-01 produjo primordios lo cual indica que *P. radicata* tiene tendencia a ser saprobia ya que al formar esos agregados miceliares en el medio de cultivo, pueden ser capaces de formar cuerpos fructíferos en sustratos artificiales.
7. A los micelios de las cepas de *P. radicata* no se les observó presencia de fíbulas pero si la presencia de clamidosporas, que son estructuras de sobrevivencia las cuales los hongos forman bajo condiciones adversas, lo cual indica que los medios utilizados no son del todo agradables para el hongo por lo cual deberá buscarse un medio mas nutritivo.
8. Con los datos obtenidos en la presente investigación se acepta parcialmente la hipótesis planteada, ya que estadísticamente no hubieron diferencias significativas entre las cepas, los

medios y las temperaturas ( $P > .05$ ), pero si las hubieron para los granos ( $P < .05$ ), siendo las semillas de *Leucaena* el mejor sustrato para hacer inóculo de *P. radicata*.

## 18. Impacto esperado

Con la información generada se espera aportar al mundo un nuevo concepto en cuanto al hábito de alimentación de *P. radicata*, ya que en algunos casos se cree que es una especie micorrízica o parasítica. Con la presente investigación se demostró que este hongo tiene más tendencia a ser saprobia por lo que es necesario realizar estudios para la producción de cuerpos fructíferos y así iniciar su cultivo a nivel artesanal e industrial.

## 19. Referencias

- Ardón, C. (2007). *La reproducción de los hongos comestibles* (Tesis de maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades, Guatemala.
- Bates, S. T., Golday, J., Kunnen, R. L., & Pilla, N. J. (2017). Checklist of Indiana fungi I: Macrofungi. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 26(1), 12–34.
- Bran, M., Cáceres, R., & Morales, O. (2012). Cultivo de hongos comestibles silvestres en Guatemala: investigación y transferencia de tecnología. En J., Sánchez, & G., Mata, Eds.), *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (pp. 269-280). México: Comité Editorial de El Colegio de la Frontera Sur y Comité Editorial de El Instituto de Ecología.
- Bran, M., Cáceres, R., Gurriarán, N., Morales, O., & Flores, R. (2015). *Caracterización in vitro y producción de inóculo de cepas guatemaltecas de Lepista nuda (Bull.: Fr) Cooke. Ciencia Tecnología y Salud*, 2(2), 95-104.
- Bran, M.C., Morales, O., Flores, R., & Cáceres, R. (2009). *Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam (Schizophyllum commune Fr.)* (Inf-2008-084). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bran, M.C., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R., & Blanco, R. (2007). *Caracterización in vitro y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de Neolentinus ponderosus y N. lepideus* (Inf-2007-019). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Burdsall, H. H. (1971). Notes on some lignicolous Basidiomycetes of the southeastern United States. *The Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 4(87), 238-245.

- Castañeda, B. C. (2017). Aspectos químicos y bioactivos de dos matrices naturales originarias de El Salvador: “chipilín” y “tenquique” (Tesis de maestría). Universidad de Salamanca. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Castillo, B. E., & Parada, R. Y. (2017). *Hongos de El Salvador 2009-2013*. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.
- Coello-Castillo, M.M., Sánchez, J.E., & Royse, D.J. (2008). Production of *Agaricus bisporus* on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. *Bioresource Technology*, 100(2009), 4488–4492.
- Chang, S., & Miles, P. (2004). *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. USA: CRC Press.
- Escobar, G. y Toledo, J. (1977). El “tenquique”, hongo comestible de El Salvador. *Comunicaciones*, 1(1):15-22
- Flores, R., Comandini, O., & Rinaldi, A.C.(2012). A preliminary checklist of macrofungi of Guatemala, with notes on edibility and traditional knowledge. *Mycosphere*, 3(1), 1-21. doi 10.5943/mycosphere/3/1/1.
- Flores, M. (2010). Las “Trufas de El Salvador”. *Take a Cook; Cocina y Buen Vivir*. Tomado de: <http://takeacookblogspot.com/2010/06/las-trufas-de-el-salvador.html?m=1>
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez-Merlo, R., & Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción*. Xalapa, Instituto de Ecología.
- Guzmán, G. (1987). Distribución y etnomicología de *Pseudofistulina radicata* en Mesoamérica, con nuevas localidades en México y su primer registro en Guatemala. *Revista Mexicana de Micología*, 3, 29-38.
- Kein, K. Landry, J., Friesen, T., & Larimer, T. (1997). Kinetics of asymmetric mycelia growth and control by dikaryosis and light in *Schizophyllum commune*. *Mycologia*, 89(6): 916-923.
- López, M. A. (2016). *Manual de producción de micelio de hongos comestibles*. Xalapa: Instituto de Investigaciones Forestales.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería, & Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. (2016). *El Salvador: Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura*. San Salvador: Autor.
- Morales, O., Bran, M., & 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* (pp. 437-464). México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo.

Nobles, M. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 43(9),1097-1139.

Peralta, J. E., & Orozco, E. F. (2017). *Evaluación del cultivo de Volvariella bombycina (Schaeff) bajo condiciones controladas utilizando cepas nativas en diferentes sustratos considerados como desechos agroindustriales (Inf-2017-04)*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Agronomía.

Romero, L., & Valenzuela, R. (2008). Los hongos poliporoides en las Áreas Naturales Protegidas del estado de Hidalgo. En G., Pulido-Flores, A., López-Escamilla, & M., Pulido-Silva (Eds.), *Estudios biológicos en las áreas naturales de Hidalgo* (pp. 29-39). . México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Ruiz-Boyer, A. (2012). Los Hongos Poliporoides (Basidiomycetes) de El Rodeo, Costa Rica. *Brenesia*, 77, 165-180.

Sethi, P., & Kulkarni, P. R. (1995). *Leucaena leucocephala* A nutrition profile. *Food and Nutrition Bulletin*, 16(3), 1-16.

Sommerkamp, I., & Guzmán, G. (1990). Hongos de Guatemala, II. Especies depositadas en el herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista Mexicana de Micología*, (6),179- 197.

Stamets, P. (1993). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Berkeley: Ten Speed Press & Mycomedia.

Vázquez, S., & Valenzuela, R. (2010). Macromicetos de la Sierra Norte del Estado de Puebla, México. *Naturaleza y Desarrollo*, 1(8), 43-58.

## 20. Apéndice

**Tabla 5.** Datos del análisis de varianza y prueba de Tukey de la RER de las cepas de *P. radicata* en distintos medios y dos temperaturas

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RER	12	0,45	0,14	62,50

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,06	4	1,51	1,45	0,3135
Temperatura	0,70	1	0,70	0,67	0,4411
Cepa	2,25	2	1,13	1,08	0,3911
Medio	3,11	1	3,11	2,97	0,1285
Error	7,33	7	1,05		
Total	13,38	11			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,39661

Error: 1,0465 gl: 7

Temperatura	Medias	n	E.E.
1,00	1,40	6	0,42 A
2,00	1,88	6	0,42 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,13036

Error: 1,0465 gl: 7

Cepa	Medias	n	E.E.
1,00	1,28	4	0,51 A
3,00	1,38	4	0,51 A
2,00	2,25	4	0,51 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,39661

Error: 1,0465 gl: 7

Medio	Medias	n	E.E.
1,00	1,13	6	0,42 A
2,00	2,15	6	0,42 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 6.** Datos del análisis de varianza y prueba de Tukey de la RER de las cepas de *P. radicata* en distintos medios y dos temperaturas

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RER	18	0,80	0,71	77,29

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27,32	5	5,46	9,35	0,0008
Temperatura	0,07	1	0,07	0,12	0,7313
Cepa	1,25	2	0,62	1,07	0,3740
Granos	26,00	2	13,00	22,26	0,0001
Error	7,01	12	0,58		
Total	34,33	17			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,78500**

Error: 0,5841 gl: 12

Temperatura	Medias	n	E.E.
1,00	0,93	9	0,25 A
2,00	1,05	9	0,25 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,17723**

Error: 0,5841 gl: 12

Cepa	Medias	n	E.E.
3,00	0,67	6	0,31 A
2,00	0,98	6	0,31 A
1,00	1,32	6	0,31 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,17723**

Error: 0,5841 gl: 12

Granos	Medias	n	E.E.
1,00	0,12	6	0,31 A
2,00	0,16	6	0,31 A
3,00	2,69	6	0,31 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Listado de los integrantes del equipo de investigación

### Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Dr. Roberto Flores Arzú	
Cecilia Castellanos	
Jorge Luis Peralta	

### Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
<b>Julio Ernesto Peralta Rivera</b>		<b>20170575</b>	<b>X</b>		

Guatemala 31 de octubre de 2019

**Ing. Agr. Julio Peralta**  
Proyecto de Investigación

**Inga. Liuba Cabrera**  
Programa Universitario de Investigación

**Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar**  
Coordinador General de Programas