



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

DIRECCIÓN DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Trabajo de Tesis

Aislamiento *in vitro* de *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) a partir de setas comerciales

Autores

Br. Álvaro Jazael Poveda Rivas
Br. Gerson Adán Rivas Martínez

Asesores

MSc. Heedy Guadalupe Corea Narváez
MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez
MSc. Rosario del Socorro García Loáisiga

Presentado a la consideración del honorable comité
evaluador como requisito final para optar al grado de
Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Julio, 2024

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la Dirección de Ciencias Agrícolas como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

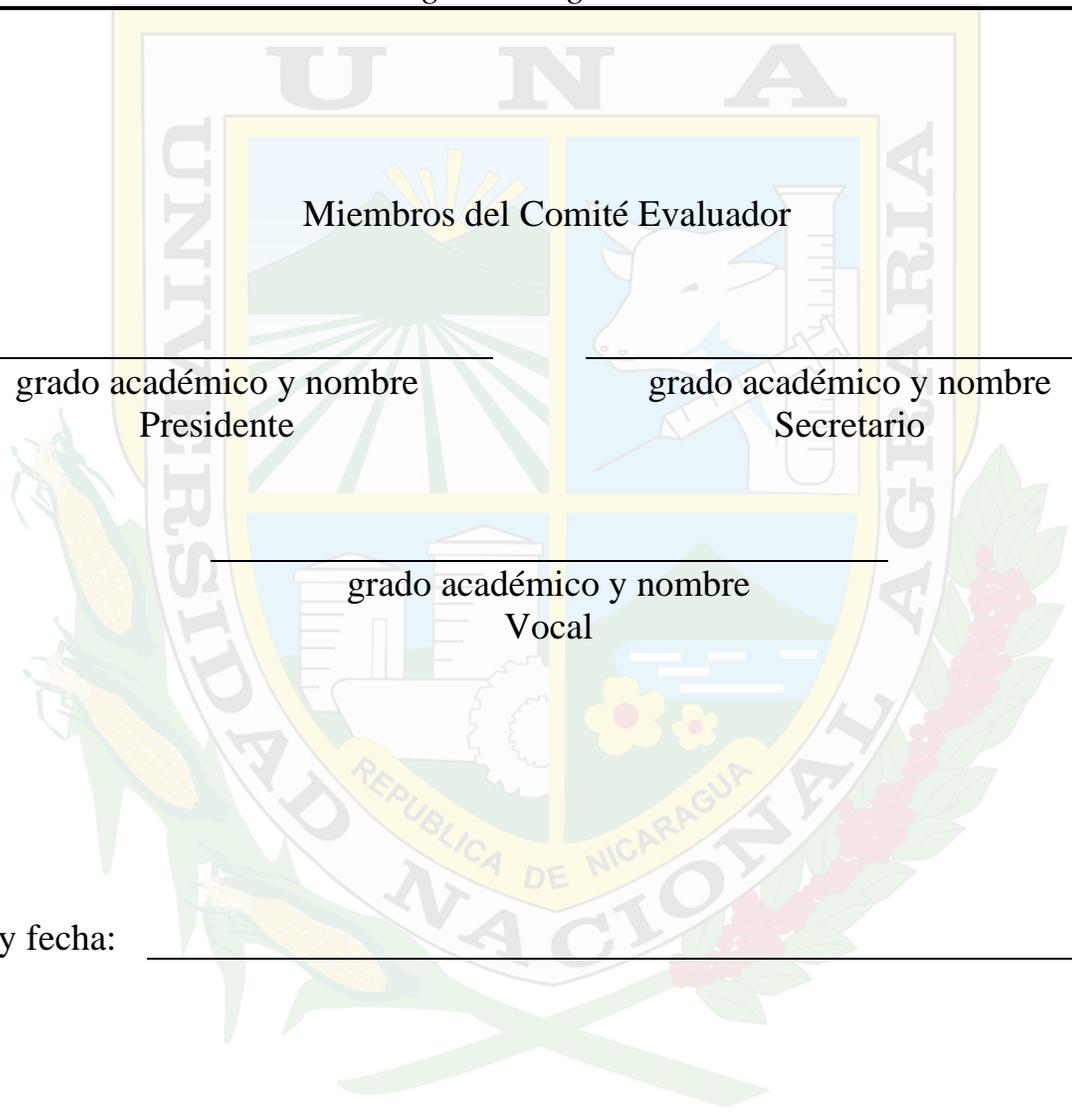
Miembros del Comité Evaluador

grado académico y nombre
Presidente

grado académico y nombre
Secretario

grado académico y nombre
Vocal

Lugar y fecha:



DEDICATORIA

El siguiente trabajo de tesis está dedicado especialmente a Dios por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mi objetivo.

A mi madre Levis Dalila Martínez Martínez por poner en mi toda su fe y su confianza de ver este sueño hecho realidad, por todo su apoyo incondicional brindado hacia mí y gracias a su motivación constante para alcanzar mi meta.

A mi padre Gerson Gamaliel Rivas Suárez por su ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha influenciado y mostrado siempre el valor para salir adelante, por su sacrificio y esfuerzo, por darme una carrera para mi futuro.

A mi hermana Crisbel Rosaura Rivas Martínez que, a pesar de no estar presente, me ha brindado todo su apoyo incondicional y consejos positivos.

Br. Gerson Adán Rivas Martínez

DEDICATORIA

A mis admirables padres, Álvaro Poveda y Celia Rivas; cuya dedicación, sacrificio y amor incondicional han sido el pilar de mi vida y la brújula que me ha guiado a este viaje académico. su constante presencia y apoyo moral han iluminado cada paso de este camino, convirtiendo los desafíos en oportunidades y las dudas en certezas.

A través de su ejemplo, he aprendido la importancia del esfuerzo, la perseverancia y la bondad. Son la razón por la cual este logro es posible y la fuente de mi inspiración para alcanzar metas más allá de lo que jamás imaginé, les dedico esta tesis como un testimonio de gratitud eterna, con la esperanza de que el futuro de este esfuerzo contribuya al bienestar de nuestra familia y al mundo en el que habitamos.

Con amor y agradecimiento infinitos.

Br. Álvaro Jazael Poveda Rivas

AGRADECIMIENTO

A mis amados padres, Levis Dalila Martínez Martínez y Gerson Gamaliel Rivas Suarez, quienes, con su amor, apoyo incondicional y sacrificio, han sido la fuente de mi inspiración y la razón de mis logros. Gracias por ser mi roca y mi guía a lo largo de este camino.

Al señor Rigoberto Ortiz y a su esposa Fátima Urbina por la amabilidad y generosidad que demostraron al brindarme alojamiento acogedor y caluroso durante todo el transcurso de mis estudios.

A los respetados asesores de tesis, la profesora Heeidy Guadalupe Corea Narváez, el profesor Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez y la profesora Rosario del Socorro García Loáisiga, quienes, con su sabiduría, paciencia y dedicación, me han brindado las herramientas y el conocimiento necesario para alcanzar este logro. Su orientación ha sido invaluable y ha dejado una huella imborrable en mi formación académica.

A todos los que de alguna manera contribuyeron en este proceso, les agradezco de corazón. Este logro no hubiera sido posible sin su apoyo y aliento constante.

Br. Gerson Adán Rivas Martínez

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Álvaro Antonio Poveda Arroliga y Celia del Socorro Rivas García, cuyo amor incondicional y orientación constante han sido el faro que ilumina mi camino. A través de su apoyo, han fortalecido mis pasos en cada etapa de este viaje académico.

A mis queridos asesores de esta tesis, la profesora Heeidy Guadalupe Corea Narváez, el profesor Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez y la profesora Rosario del Socorro García Loáisiga, les debo un inmenso agradecimiento por su dedicación y sabios consejos. Su guía experta ha sido el timón que ha guiado este proyecto hacia su culminación.

A cada persona que ha aportado de alguna manera a este proceso, les extiendo mi sincera gratitud. Su contribución ha sido un eslabón invaluable en esta cadena de logros.

Br. Álvaro Jazael Poveda Rivas

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Generalidades de los hongos	4
3.2 Hongos comestibles	4
3.3 Propiedades del champiñón <i>Agaricus bisporus</i>	4
3.4 Morfología de los hongos	5
3.5 Clasificación de los hongos	5
3.6 Genero <i>Agaricus</i>	5
3.7 Descripción del hongo <i>A. bisporus</i>	6
3.8 Antecedentes investigativos	6
3.9 Medios de cultivos utilizados	7
3.10 Condiciones de crecimiento	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 Ubicación del estudio	9
4.2 Diseño metodológico	9
4.3 Procedencia de esporóforos de <i>A. bisporus</i>	9
4.4 Medios de cultivos	10
4.5 Limpieza y preparación de las setas.	10
4.6 Métodos de aislamiento	10
4.6.1 Siembra directa	10
4.6.2 Dilución en serie	11
4.6.3 Licuado	12
4.7 Variables evaluadas	12
4.7.1 Número de platos Petri por medio de cultivo con crecimiento de <i>A. bisporus</i>	12
4.7.2 Tipo de crecimiento de <i>A. bisporus</i> en los medios de cultivos de acuerdo al método de aislamiento	12
4.7.3 Características microscópica y macroscópicas de <i>A. bisporus</i>	13
4.7.4 Velocidad de crecimiento radial	14
4.8 Análisis de los datos	15

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1 Crecimiento de <i>A. bisporus</i> en los medios de cultivos de acuerdo con el método de aislamiento.	16
5.2 Características macroscópicas y microscópica del hongo <i>A. bisporus</i>	17
5.3 Velocidad de crecimiento radial por hora	19
5.4 Velocidad de crecimiento radial acumulado	20
VI. CONCLUSIONES	22
VII. RECOMENDACIONES	23
VIII. LITERATURA CITADA	24
IV. ANEXOS	27

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Medios de cultivos utilizados en la etapa de asilamiento y reproducción del hongo comestible <i>A. bisporus</i>	10
2.	Número de platos con crecimiento de <i>Agaricus bisporus</i> en los medios de cultivo PDA, CM y SDA a partir de los métodos de aislamiento siembra directa, licuado y dilución en serie.	16
3.	Comparación de la velocidad de crecimiento radial por hora (mm/hr) entre diferentes medios de cultivos	19

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Disposición de los trozos de carpóforos de <i>A. bisporus</i> en el método de siembra directa	11
2.	Medición del crecimiento radial para el hongo <i>A. bisporus</i> , adaptado de French y Hebert (1980)	14
3.	Características macroscópicas del micelio de <i>A. bisporus</i> en diferentes medios de cultivos	17
4.	Características microscópicas de <i>A. bisporus</i> vistos a 40X, (A) conidias agrupadas, (B) hifas septadas y basidios	18
5.	Velocidad de crecimiento radial acumulado (mm/hr) en los diferentes medios de cultivo.	20

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Componentes de los medios de cultivos utilizados en el ensayo	27
2.	Procedimiento utilizado en la siembra directa de <i>A. bisporus</i>	28
3.	Proceso de dilución en serie: etapas y procedimientos para el aislamiento de <i>A. bisporus</i>	28
4.	Procedimiento de licuado para el aislamiento de <i>A. bisporus</i>	29
5.	Procedimiento para la evaluación del crecimiento radial de <i>A. bisporus</i>	29

RESUMEN

El champiñón *Agaricus bisporus* es un hongo comestible ampliamente cultivado a nivel mundial y en América Latina, es una industria importante, que genera empleo e ingresos para muchas personas, se consideran alimentos funcionales porque, además de sus propiedades nutricionales, se han demostrado efectos beneficiosos para la salud. El estudio tuvo como objetivo realizar aislamiento *in vitro* del hongo *A. bisporus* (J.E. Lange) a partir de setas comerciales. Los métodos que se emplearon para el aislamiento fueron siembra directa, dilución seriada y licuado; y se utilizaron los siguientes medios de cultivos: Corn Meal, Papa Dextrosa Agar y Sabouraud Dextrosa Agar. La mejor técnica de aislamiento fue siembra directa evidenciando crecimiento en tres platos de CM, dos platos en PDA y un plato en SDA. *A. bisporus* presentó conidias con dimensiones promedio de 8.7 μm de longitud y 8.4 μm de ancho, con hifas septadas y entrecruzadas, con basidios en su mayoría bispóricos. Se realizó la evaluación comparativa de la velocidad de crecimiento radial por hora de *A. bisporus* en tres medios de cultivo: Extracto de Malta Agar (EMA), Corn Meal (CM) y Papa Dextrosa Agar (PDA). Los mejores resultados se presentaron en los medios de cultivos EMA (4.9 mm/hr) y CM (4.18 mm/hr).

Palabras clave: medio de cultivo, velocidad de crecimiento radial, conidia, hifa.

ABSTRACT

The *Agaricus bisporus* mushroom is an edible mushroom widely cultivated worldwide and in Latin America, it is an important industry worldwide, which generates employment and income for many people. They are considered functional foods because, in addition to their nutritional properties, they have been demonstrated beneficial health effects. The objective of the study was to perform primary in vitro isolation of the fungus *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) from commercial zetas. The methods used for isolation were direct seeding, serial dilution and liquefaction. On the other hand, the following culture media were used: Corn Meal, Malt Extract Agar, Potato Dextrose Agar and Sabouraud Dextrose Agar. The best culture media were CM and SDA using serial dilution and direct seeding techniques. *A. bisporus* presented conidia with average dimensions of 8.7 μm in length and 8.4 μm in width, with septate and intersecting hyphae, with mostly bisporic basidia. On the other hand, the comparative evaluation of the radial growth rate per hour of *A. bisporus* was carried out in three culture media: Malt Extract Agar (EMA), Corn Meal (CM) and Potato Dextrose Agar (PDA). The best results were presented in the EMA (4.9 mm/hr) and CM (4.18 mm/hr) culture media.

Keywords: culture medium, radial growth speed, conidia, hypha.

I. INTRODUCCIÓN

El champiñón *A. bisporus* (J.E. Lange) es un hongo comestible ampliamente cultivado a nivel mundial y en América Latina, no solo ha mantenido su producción a lo largo de los años, sino que se incrementó el número de variedades, aparecidas recientemente en el mercado, como el Portobello y el Cremini. Esta situación ha creado un interés sostenido en el cultivo de esta especie y ha aumentado la demanda de los productores de conocimientos y tecnologías y métodos actualizados que les permitan rentabilizar los cultivos y aumentar la competitividad (Sánchez *et al.*, 2007, p.6).

Chang y Wasser (2017) menciona que “*Lentinula edodes* es la especie mayormente cultivada con el 22% de la producción mundial, especies de *Pleurotus* con el 19%, especies de *Auricularia* con el 17% y *A. bisporus* con el 15%” (Citado por Martínez, 2019, p.5)

Actualmente, los hongos más cultivados son el champiñón (*A. bisporus*), la seta (*Pleurotus* spp.), el shiitake (*Lentinula edodes*) y *Volvariella volvacea*. *Agaricus* ha sido el hongo más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México, con una producción anual de 36,500 toneladas en este último país. *Lentinula edodes* es principalmente producido en Japón, *Volvariella volvacea* en Asia y *Pleurotus* en Sudamérica y México, con una producción anual de 2,190 toneladas en este último país (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016, p.76).

Los hongos comestibles tienen un alto valor económico y gastronómico debido a las propiedades medicinales y nutricionales. Se consideran alimentos funcionales porque, además de sus propiedades nutricionales, se han demostrado efectos beneficiosos para la salud (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016, p.79).

El cultivo de *A. bisporus* es una industria importante a nivel mundial, que genera empleo e ingresos para muchas personas, es un importante producto de exportación en muchos países, lo que contribuye a la economía. *A. bisporus* tiene un sabor suave y una textura versátil, lo que lo convierte en un ingrediente popular en muchas cocinas de todo el mundo, se puede comer crudo o cocido y se utiliza en sopas, guisos, ensaladas y otros platos. Tiene beneficios potenciales para la salud (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016, p.76).

A. bisporus se ha vuelto cada vez más accesible para los nicaragüenses, quienes pueden adquirirlo en mercados locales, supermercados y otros puntos de venta de alimentos en todo el país. Su disponibilidad tanto fresco como en conserva brinda opciones para su consumo durante todo el año, lo que ha contribuido a su creciente popularidad en la dieta de las personas en Nicaragua.

Nicaragua no produce el hongo comestible *A. bisporus* por lo que no existe un protocolo de aislamiento *in vitro* del hongo e identificación de sus características macro y microscópicas, ni protocolos para la reproducción masiva del hongo con fines comerciales. No existe en el país centros donde se pueda conseguir cepas puras para este propósito, por lo que se requiere crear investigaciones dirigidas a la producción de inóculos del hongo para que estén disponibles a los productores que puedan estar interesados en la producción del hongo para fines comerciales.

El propósito de esta investigación es realizar el aislamiento *in vitro* del hongo *A. bisporus* provenientes de hongos que se distribuyen de manera comercial de tal manera que las cepas puras estén disponibles para los productores que estén interesados en realizar la producción masiva.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el aislamiento *in vitro* de *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) a partir de setas comerciales

2.2 Objetivos específicos

Comparar el crecimiento de *A. bisporus* en tres medios de cultivo a partir de tres métodos de aislamiento.

Describir las características macroscópicas y microscópicas de *A. bisporus* en tres medios de cultivo.

Estimar la velocidad de crecimiento radial por hora y acumulado de *A. bisporus* en tres medios de cultivo.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Generalidades de los hongos

Navarro (2013) menciona:

Los hongos son microorganismos vegetales inferiores, por lo que están desprovistos de clorofila, por lo tanto, son incapaces de sintetizar sus propios alimentos. Son organismos heterótrofos, ya que pueden obtener sus nutrientes de materias muertas, como los saprofitos o se nutren como parásitos de los huéspedes vivos. (p.11)

3.2 Hongos comestibles

La producción de hongos comestibles es una actividad que se encuentra en continuo desarrollo. Los hongos son alimentos apreciados desde la antigüedad por su exclusivo sabor y textura y, algunos de ellos, por sus atributos medicinales. Mucho más reciente es el reconocimiento de que los hongos son una fuente de suministro para una dieta rica en proteínas, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales, fibras y minerales que proveen beneficios nutricionales directos para la salud humana. (Lechner *et al.*, 2017, p.6)

3.3 Propiedades del champiñón *Agaricus bisporus*

Estudios han revelado que *Agaricus bisporus* posee actividad antioxidante atribuida a la presencia de aproximadamente 7 µg de compuestos fenólicos y alrededor de 3 µg de flavonoides ayudando a prevenir el envejecimiento celular, con la reducción de los efectos de las especies reactivas de oxígeno; además de poseer propiedades antiinflamatorias y ayudar a prevenir cierto tipo de cáncer. (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016, p.77).

Cano-Estrada y Romero-Bautista (2016) mencionan:

En cuanto a su composición química se reporta un contenido de humedad del 91.4% y por lo tanto 8.6 % de materia seca, de las cuales alrededor del 19% son proteínas, 23 % fibra y 12 % minerales cuyo análisis mostró altas cantidades de potasio, fosforo, cobre y hierro. (p.77)

3.4 Morfología de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos, que poseen una pared celular rígida y continua, constituida por alfa y beta glucanas, mananas, glucoproteínas, quitina y celulosa. La pared le da forma y resistencia al cuerpo del hongo, permeabilidad celular y regula la presión osmótica; además, interacciona con el sustrato de su ambiente externo. Cuando se daña la pared, puede llegar a causar la muerte celular. El núcleo puede ser haploide o diploide y los individuos pueden ser uni o multinucleados, se reproducen a través de esporas y su desarrollo da lugar al “cuerpo” del hongo denominado talo. (Segundo et al., 2019, p.7)

3.5 Clasificación de los hongos

Montes (2003) menciona:

Las diferencias de opinión entre los micólogos sobre la clasificación son numerosas y a menudo tan grandes que en la literatura se encuentran discrepancias. Inicialmente, la clasificación general de los hongos partía de dos grandes grupos: 1) Myxomycota, en el que se encontraban los mohos mucilaginosos sin pared celular, y 2) Eumycota, que comprendía los hongos verdaderos con pared (18). En los Myxomycota se agrupaban los filos Acrasiomycota, Hidromyxomycota, Myxomycota, Plasmodiophoromycota. Mientras en los Eumycota se agruparon los filos Mastigomycota (ahora Chytridiomycota), Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. (p.216)

3.6 Genero *Agaricus*

Sánchez *et al.* (2007) explica:

El género *Agaricus* se compone de especies muy populares recolectadas o cultivadas cuyo interés no es solamente alimenticio. La biodiversidad dentro del género es poco conocida, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico. Los hongos del género *Agaricus* son comúnmente recolectados en la naturaleza y frecuentemente consumidos sin que la especie sea rigurosamente determinada. El resultado es que, entre estos hongos, por ejemplo, en Francia, se encuentran

las principales especies responsables de envenenamiento. Afortunadamente ninguna especie del género es mortal por simple ingestión. Una decena de especies es cultivable, entre las cuales, *A. bisporus* es la más cultivada en el mundo. (p.19)

Martínez (2021) menciona “Taxonómicamente el champiñón (*A. bisporus*) pertenece al reino fungi, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, clase Agarycamycetes, subclase Agaricomycetidae, orden Agaricales, familia Agaricaceae, genero *Agaricus*, especie *bisporus*” (p.10).

3.7 Descripción del hongo *A. bisporus*

El champiñón común, de nombre científico *A. bisporus*, es un hongo perteneciente al Reino fungi, se caracteriza por presentar un carpóforo blanco y redondeado y tener un himenio formado por una elevada cantidad de laminillas, que irán oscureciendo con el tiempo hasta observarse de color negro. En etapas tempranas, el himenio estará protegido por una membrana llamada velo, que se romperá cuando el champiñón consiga su desarrollo completo. Finalmente, como soporte de esta estructura se encontrará el pie, de aspecto blanco y liso. (Calvo et al., 2011, p.61)

3.8 Antecedentes investigativos

El hongo conocido popularmente como champiñón, *Agaricus bisporus*, es la especie comestible más cultivada comercialmente en el mundo. A pesar de su importancia y de que se ha incluido en listados de diferentes estados de México, su presencia de forma silvestre no se había corroborado. Se realizaron recolectas en los estados de Tlaxcala y Veracruz, y se aislaron siete cepas a partir de ejemplares silvestres. Se obtuvieron basidiomas de dichas cepas cultivadas en un sustrato a base de composta. Los ejemplares silvestres que se depositaron en el Herbario XAL, y los obtenidos en cultivo, se estudiaron macro y micromorfológicamente. La cepa IE 623 se utilizó para obtener la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal. Los ejemplares revisados coinciden morfológicamente con *A. bisporus* y presentan en promedio 63.4% de basidios bispóricos. La secuencia de ADN corroboró la determinación taxonómica, y de acuerdo

con los análisis de similitud y filogenéticos se concluyó que la cepa proviene de un ejemplar silvestre y no de una cepa comercial cultivada. (Mata *et al.*, 2016, p.10)

3.9 Medios de cultivos utilizados

Para el cultivo, desarrollo y crecimiento de hongos comestibles en laboratorio, es decir el incremento del micelio en cajas petri o tubos de ensayo, se utilizan diferentes medios de cultivo, estos proporcionan al hongo los nutrientes requeridos para su crecimiento. Por lo general se utilizan medios de cultivos solidos con agar que funcionan como sustrato al solidificarse como una gelatina. (Ramos, 2021, p.14)

Stamets (1993) afirma que “Por lo regular las especies de *Pleurotus* son los más utilizados, entre los medios de cultivo destacan agar extracto de malta con levadura, agar papa glucosado (APG), agar enriquecido con avena, malta y levadura” (Citado por Ramos, 2021, p.14)

Para el aislamiento del hongo *Agaricus blazei* se utilizaron los siguientes medios de cultivos: PDA = papa, dextrosa, agar P = papa, dextrosa, levadura, agar A = avena, levadura, malta, agar T = trigo, dextrosa, malta, agar MSA = malta, sorgo, levadura y agar. (Rojas *et al.*, 2018, p.17)

3.10 Condiciones de crecimiento

El cultivo se realiza en ambientes cerrados y existen tres sistemas principales: en sacos plásticos, en cajas y en camas. Para ello, será necesario preparar un medio de cultivo nutritivo con unas características que permitan promover el crecimiento del micelio y evitar el crecimiento de organismos competidores. Es la fase conocida con el nombre de compostaje. (Calvo *et al.*, 2011, p.62)

Calvo *et al.* (2011) considera “Los parámetros ambientales que deberán controlarse durante la incubación serán la humedad relativa ambiental (de 90 a 100%), la ventilación (no es necesaria) y la temperatura en el compost (de 23 a 26°C, nunca superior a 28°C)” (p.62).

De dos a tres días más tarde de la etapa del compostaje, deberán cambiarse las condiciones ambientales, obteniendo unos nuevos parámetros de humedad relativa ambiental (de 90 a 95%),

ventilación (la necesaria para lograr los niveles deseados de CO₂, unos cuatro cambios por hora), temperatura del compost (de 16 a 18°C). Unos días más tarde se formarán los pines, que continuarán creciendo hasta formar los botones y por último los champiñones. (Calvo *et al.*, 2011, p.63).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional Agraria (UNA), situado en el municipio de Managua. En las coordenadas geográficas de 12° 53' 47" de latitud Norte y 85° 53' 33" de longitud Oeste.

4.2 Diseño metodológico

El diseño metodológico fue de tipo experimental, utilizando un arreglo bifactorial dentro de un Diseño Completamente al Azar (DCA). Los factores considerados fueron los métodos de aislamiento y los medios de cultivo utilizados para el crecimiento del hongo *A. bisporus*. Se utilizaron cinco platos Petri por medio de cultivo y método de aislamiento, los que correspondían a cada repetición.

El modelo aditivo lineal que se utilizó fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = La k-ésima observación del i-ésimo dosis

μ = Estima a la media poblacional

α_i = Efecto del i-ésimo nivel de los métodos de aislamiento

β_j = Efecto debido al j-ésimo de los medios de cultivo

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de interacción entre métodos de aislamiento y medios de cultivo.

ϵ_{ijk} = Efecto aleatorio de variación

4.3 Procedencia de esporóforos de *A. bisporus*

Los esporóforos fueron adquiridos de un supermercado de Managua, provenientes de Costa Rica, para llevar a cabo el presente estudio. Se seleccionaron esporóforos sin daños mecánicos, limpios y con el velo del carpóforo roto (en esporulación).

4.4 Medios de cultivos

Los medios de cultivo que se utilizaron en el ensayo están descritos en el cuadro 1. (Anexo 1)

Cuadro 1. Medios de cultivos utilizados en la etapa de aislamiento y reproducción del hongo comestibles *A. bisporus*

Medios de cultivos	Etapa utilizada	Fuente
Sabouraud Dextrosa agar (SDA)	Aislamiento	(Narrea-Cango y Malpartida-Zevallos, 2006, p.145)
Papa dextrosa Agar (PDA)	Aislamiento y reproducción	(Narrea-Cango y Malpartida-Zevallos, 2006, p.145)
Corn Meal (CM)	Aislamiento y reproducción	(Recursos Alpha, 2013)
Extracto de malta (EM)	Reproducción	(Unam, 2019)

4.5 Limpieza y preparación de las setas.

Las setas fueron sometidos a un proceso de lavado para la eliminación de partículas de polvo y residuos de material orgánico que pudieran haberse adherido durante su manipulación o recolección. El lavado se realizó utilizando agua del grifo a temperatura ambiente y durante cinco minutos.

4.6 Métodos de aislamiento

Se llevó a cabo el proceso de siembra de los hongos, los métodos de siembra utilizados para los aislamientos fueron: Siembra directa, dilución en serie y licuado a continuación se describen los tres métodos:

4.6.1 Siembra directa

Se separó el himenóforo con el fin de facilitar la realización de los cortes del hongo. Se efectuaron cortes en forma de cruz en los himenóforos para obtener cuatro trozos por hongo,

cada uno con una longitud aproximada de 3 cm². Posteriormente, se realizaron múltiples reducciones hasta alcanzar dimensiones de aproximadamente 2 mm².

Se llevó a cabo una desinfección en la cámara de flujo laminar, donde se sumergieron los trozos del hongo en una solución de cloro al 2% durante dos minutos. Luego, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel filtro durante dos horas.

Para la siembra, se dispusieron cinco trozos en cada plato Petri, asegurando que cuatro de ellos se ubicaran en los bordes del plato y uno en el centro (figura 1). Se emplearon cinco platos Petri por cada medio de cultivo (Anexo 2).

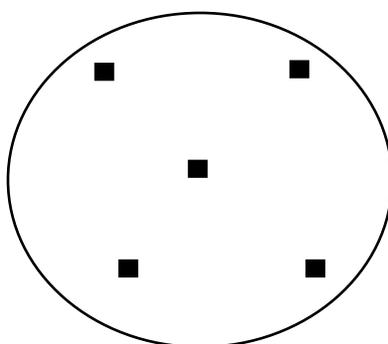


Figura 1. Disposición de los trozos de carpóforos de *A. bisporus* en el método de siembra directa

4.6.2 Dilución en serie

Se tomaron y pesaron 10 g de carpóforo, los cuales fueron macerados y luego colocados en 90 ml de agua destilada estéril para la obtención de la solución madre en volumen de 100 ml, esta se dejó reposar durante cinco minutos, tras lo cual se extrajo 1 ml de esta suspensión y se transfirió asépticamente al primer tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, lo que constituyó la dilución 1:10. Posteriormente, mediante una suave agitación, se homogeneizó el inóculo y se tomó 1 ml de la dilución 1:10 para su transferencia al segundo tubo, que contenía 9 ml de agua destilada estéril, generando así la dilución 1:100. Este proceso de dilución se repitió sucesivamente hasta alcanzar la dilución 1:10⁻⁴

De las diluciones 1:10⁻³ y 1:10⁻⁴, se tomaron 0.2 ml y se colocaron en placas de Petri con los medios de cultivo en estudio, se distribuyeron uniformemente el inóculo sobre toda la superficie del medio de cultivo utilizando un asa Drigalsky estéril (Anexo 3).

4.6.3 Licuado

Se procedió a la obtención de cortes de aproximadamente 3 cm de longitud del carpóforo del hongo, los cuales fueron dispuestos en un plato Petri para su posterior pesaje. Se tomó una muestra de 10 g y la cual fue sometida a un proceso de homogenización en una licuadora previamente esterilizada, con el fin de lograr la mayor uniformidad y finura posible en la suspensión. Posteriormente, se transfirió esta suspensión a un matraz Erlenmeyer estéril, del cual se extrajeron 0.2 ml para su aplicación en los medios de cultivo PDA, SDA y CM. Finalmente, el inóculo fue distribuido de manera uniforme sobre toda la superficie de los platos mediante el uso de un asa Drigalsky estéril (Anexo 4).

4.7 Variables evaluadas

La medición de diversas variables se llevó a cabo en los diferentes medios de cultivo de la siguiente manera:

4.7.1 Número de platos Petri por medio de cultivo con crecimiento de *A. bisporus*

Se realizó una observación y se contaron los platos Petri que contenían crecimiento de *A. bisporus*. Esta observación se realizó a los 14 días después de la inoculación a partir de los diferentes métodos de aislamiento. Para realizar el conteo se tomaron en cuenta las características macrométricas de *A. bisporus* descritas por: Arrillaga Anabitarte (2004)

4.7.2 Tipo de crecimiento de *A. bisporus* en los medios de cultivos de acuerdo al método de aislamiento

Se describió el crecimiento observado de *A. bisporus* en cada uno de los medios de cultivos utilizados en el aislamiento y según el método utilizado. Según las características observables se determinó cuál de las tres técnicas y medio de cultivo favoreció el crecimiento del hongo. Esta descripción se realizó a los 14 días después de la inoculación.

4.7.3 Características microscópica y macroscópicas de *A. bisporus*

Para evaluar las características microscópicas y realizar las mediciones de las hifas, conidios y basidios del hongo *A. bisporus*, se observó a través de un microscopio con lente de 40X su estructura y coloración y se compararon con las descritas por: Arrillaga Anabitarte (2004). Las mediciones de las características micro y macroscópicas se expresaron en micras

Para calibrar el microscopio se obtuvo el valor micrométrico, apoyándonos de un micrómetro objetivo, y un micrómetro ocular.

Se procedió a colocar en la platina del microscopio el micrómetro objetivo y el micrómetro ocular en el ocular del microscopio. Es necesario usar primero un objetivo de bajo poder o aumento para que ambas escalas sean visibles. El micrómetro ocular se gira hasta que las líneas de la escala sobre el disco aparecen y quedan paralelas a las líneas o divisiones del micrómetro objetivo. Luego observamos cuántas divisiones del micrómetro objetivo son cubiertas por una o varias del micrómetro ocular. Establecido este dato, se determina el valor micrométrico mediante la siguiente fórmula. (Gutiérrez, 2012, p.34)

$$\text{Valor micrométrico} = \frac{\text{División del micrómetro objetivo en micras}}{\text{División del micrométrico ocular}} \times 1000$$

Se debe calcular el valor micrométrico para el objetivo que se va a utilizar. Una vez encontrado este valor, se retira micrométrico de la platina, y en su lugar se coloca la preparación en la cual queremos verificar las mediciones. Para usar el micrométrico ocular, se debe enfocar sobre el objeto a ser medido (esporas de hongos) mover el porta objeto hasta que el espécimen se alinee exactamente con el extremo de la escala del ocular. Contar cuantas unidades están ocupadas por el espécimen y multiplicarlo por el valor ya calculado. (Gutiérrez, 2012, p.34)

Para la observación de las características macroscópicas, se realizó comparaciones en tres medios de cultivo distintos: PDA, CM y EMA. Se llevó a cabo la observación a simple vista de variables como el color y la abundancia de micelio, el tipo de crecimiento, la elevación y la

textura de las muestras y se compararon con las características descritas por: Arrillaga Anabitarte (2004)

4.7.4 Velocidad de crecimiento radial

Utilizando un plato Petri previamente colonizado por el micelio del hongo, se tomó un disco de 6 mm de diámetro utilizando un sacabocado. Posteriormente, se trazaron dos líneas perpendiculares con un marcador, dividiendo el plato en cuatro cuadrantes iguales (Figura 2).

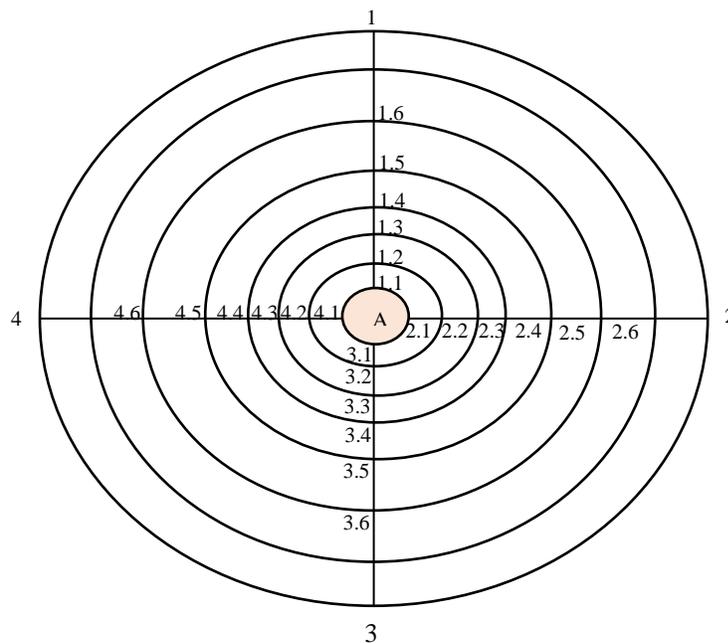


Figura 2. Medición del crecimiento radial para el hongo *A. bisporus*, adaptado de French y Hebert (1980)

Cada uno de los discos obtenidos se dispuso en el centro del plato Petri con los medios EMA, CM y PDA. Las mediciones se realizaron a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204 y 261 horas después de inocular el plato con el *A. bisporus*. Se utilizó una regla milimétrica para registrar el crecimiento radial en cada cuadrante.

Velocidad de crecimiento radial por hora: Las mediciones realizadas en cada cuadrante se promediaron y se determinó el crecimiento en mm. Se utilizó la fórmula:

$$\text{Velocidad de crecimiento radial por hora} = \frac{\text{crecimiento de } A. \text{bisporus (mm)}}{\text{número de horas de cada medición (hr)}}$$

Velocidad de crecimiento radial acumulado: se realizó la medición de cada cuadrante desde el inicio del crecimiento hasta el final cada vez que se realizaron las mediciones cada 12 horas, y se realizó un promedio de los cuatro cuadrantes.

4.8 Análisis de los datos

Los datos obtenidos de las variables velocidad de crecimiento radial por hora y acumulado fueron ingresados en el software Microsoft Excel 2013. Para la variable velocidad de crecimiento radial por hora se realizó un análisis de varianza, seguido de una separación de medias mediante Tukey, empleando el software estadístico Infostat versión 2020. Para variable velocidad de crecimiento acumulado se realizó un gráfico de líneas para representar los datos.

Para el caso de las variables: número de platos Petri con crecimiento de *A. bisporus*, tipo de crecimiento y características macro y microscópicas del *A. bisporus* se realizó un análisis descriptivo

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Crecimiento de *A. bisporus* en los medios de cultivos de acuerdo con el método de aislamiento.

A los 14 días de incubación, se observó crecimiento en los tres medios de cultivo (CM, PDA Y SDA) únicamente en siembra directa. En el medio CM se observó crecimiento en tres platos, el micelio exhibió un crecimiento rastrero y escaso, adhiriéndose a la superficie del medio, caracterizado por una textura rala, una baja densidad. En el medio SDA creció un plato se observó un crecimiento deficiente, discontinuo y de menor volumen, con una densidad muy baja y una textura notablemente rala. En el medio PDA crecieron 2 platos se observó un crecimiento con muy poca densidad, escaso y una textura rala (cuadro 2).

Cuadro 2. Número de platos con crecimiento de *A. bisporus* en los medios de cultivo PDA, CM y SDA a partir de los métodos de aislamiento siembra directa, licuado y dilución en serie.

Métodos de aislamiento	Medios de cultivo		
	PDA	CM	SDA
Siembra directa	2	3	1
Licuado	0	0	0
Dilución seriada	0	0	0

Según Galeón (2009), en su investigación, señala que el desarrollo del micelio se inició en la segunda semana en la mayoría de los tratamientos. Sus hallazgos indican que el micelio colonizó completamente el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y el medio Papa Dextrosa Levadura (PDL) entre los días 21 y 28, mientras que en el agar de malta con bifosfato potásico, este proceso ocurrió a los 35 días. Estos resultados sugieren que el medio PDA favorece un óptimo desarrollo micelial del hongo.

Durante el estudio, se observó que el único método efectivo para el crecimiento del micelio de *A. bisporus* fue la siembra directa. Mientras, tanto la dilución seriada como el método de licuado resultaron en contaminación por bacterias y diversos tipos de hongos en todos los medios de cultivo empleados.

5.2 Características macroscópicas y microscópica del hongo *A. bisporus*

El medio de cultivo PDA presentó micelio de color blanquecino, con una estructura algodonosa y con abundancia de micelio, manifestando un patrón de crecimiento concéntrico que resultaba en la formación de anillos, con una elevación plana y extendida. En contraste, el medio de cultivo EMA exhibió micelio de tonalidad blanquecina y textura farinácea, caracterizada por su aspecto harinoso y polvoriento, con una menor densidad de micelio en comparación con el PDA, y mostrando un patrón de crecimiento rastrero. Por otro lado, el medio CM mostró micelio de color hialino (Transparente o traslúcido), con una textura plana y vellosa, permitiendo la transparencia, evidenciando una menor densidad de micelio en comparación con los otros dos medios de cultivo y un patrón de crecimiento deficiente y discontinuo (figura 3).

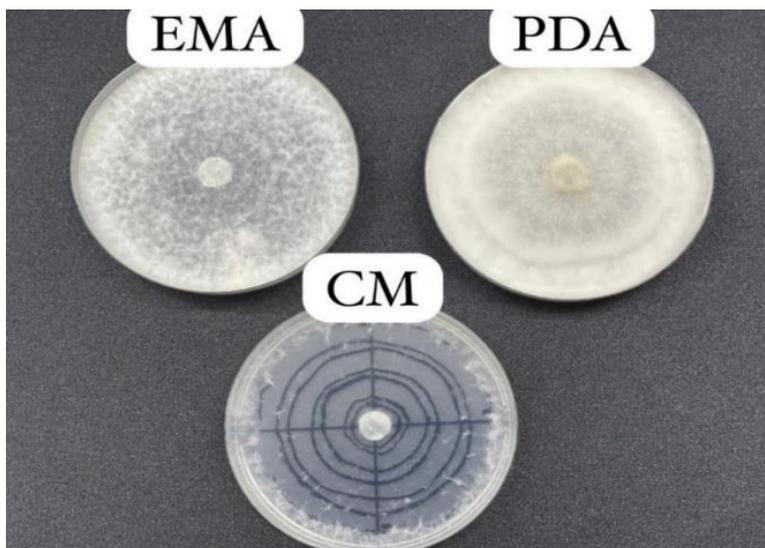


Figura 3. Características macroscópicas del micelio de *A. bisporus* en diferentes medios de cultivos

Galeón (2009) afirma:

Que las colonias generadas exhibieron las siguientes características macroscópicas del hongo *Agaricus* sp: el micelio predominaba en la parte aérea y se encontraba apenas sumergido, con una forma y tamaño irregulares, de color blanco y con bordes ondulados. La elevación de las colonias era pulvinada, con una superficie suave y algodonosa, y mostraron un desarrollo bueno. (p.49)

Las descripciones morfológicas de las cepas en distintos medios evidenciaron que predominaba un micelio blanco en la parte superior y una tonalidad crema rosácea en la inferior. La forma era irregular y plana, con un borde lobulado filiforme, una textura aterciopelada y una densidad media, con presencia moderada de hifas aéreas y una abundancia regular de rizomorfos. Ocasionalmente, el micelio se agrupaba en conglomerados densos con apariencia compacta y algodonosa, los cuales generalmente generaban exudados de color café (Aguilar *et al.*, 2023, p.37).

Entre las características microscópicas de *A. bisporus* se observaron conidias de un tono marrón, con forma elipsoidales y una variabilidad en cuanto a la presencia de uno o dos núcleos en su interior, se identificaron paredes celulares gruesas de color negro. Los conidios exhibieron dimensiones promedio de 8.7 μm de longitud y 8.4 μm de ancho. Se observaron hifas septadas con una morfología predominante cilíndrica o filamentosa, las cuales se caracterizaron por su pigmentación y su entrecruzamiento pronunciado. En cuanto a los basidios, la mayoría son de tipo bispóricos, conteniendo dos conidias en su interior (figura 4).



Figura 4. Características microscópicas de *A. bisporus* vistos a 40X, (A) conidias agrupadas, (B) hifas septadas y basidios

Según varios estudios realizados por diversos autores, se observaron las siguientes características microscópicas de conidias y basidios en *A. bisporus*. Las esporas tienen dimensiones que oscilan entre 5.5-8 μm de largo por 3-7 μm de ancho, mostrando una forma ampliamente elipsoidal a alargadas, terminadas en un pequeño apículo, y presentan un tono café oscuro. Su pared es gruesa, llegando a alcanzar hasta 0.5 μm , y no poseen un poro germinal

visible. Los basidios son de forma clavada, con un rango de medida entre 14-26 μm de largo por 6-8 μm de ancho, la mayoría con dos esporas (bispóricos), pero algunos presentan tres (trispóricos) o cuatro esporas (tetraspóricos), siendo transparentes y con una pared delgada. (Mata et al., 2016; Hernández, 2017 y Palestina, 2017)

Galeón (2009) menciona “Durante la evaluación microscópica se ha identificado un micelio blanquecino compuesto de hifas filiformes y ramificadas, las hifas son septadas y presentan orificios para facilitar el paso de sustancias nutritivas entre ellas” (p.49).

5.3 Velocidad de crecimiento radial por hora

Los medios EMA y CM exhiben los mayores promedios de crecimiento radial por hora, con 4.9 y 4.18 mm/hr, respectivamente, mientras que el medio PDA muestra la velocidad más baja de crecimiento, con un promedio de 1.7 mm/hr (cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de la velocidad de crecimiento radial por hora (mm/hr) entre diferentes medios de cultivos

Medios de cultivos	Velocidad de crecimiento radial (mm/h)							Promedio
	12	24	36	48	60	72	84	
EMA	2.5 a	2.35 a	7.6 a	3.4 a	7.35 a	3.2 a	7.65 a	4.9
CM	1.5 b	2.15 a	6.2 b	3.5 a	6.55 a	2.55 a	6.8 a	4.18
PDA	0.4 c	1.24 b	1.9 c	0.85 b	3.25 b	0.95 b	3.55 b	1.7
R ²	0.82	0.77	0.98	0.89	0.92	0.85	0.91	
p-valor ($\alpha < 0.05$)	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

En el Cuadro 3, se evidencia una mayor tasa de crecimiento micelial durante las horas nocturnas (36, 60 y 84 hrs.) en comparación con las diurnas. Este fenómeno puede asociarse a la reducción de la temperatura debido a la ausencia de exposición solar, el incremento de la humedad relativa y la disminución de la luminosidad.

A pesar de que el medio PDA demuestra una capacidad inferior para estimular el crecimiento radial rápido de *Agaricus bisporus*, promueve la formación de un micelio más compacto. Al establecer el aislamiento en condiciones de oscuridad durante los primeros días, se observa un incremento del 55.84% en el desarrollo del hongo, lo que resulta en un crecimiento del 11.25% mayor en comparación con el desarrollo bajo la presencia de luz (Durantes, 2021, p.27). Estos

resultados corroboran los hallazgos de la investigación, donde se registró un crecimiento micelial más acelerado durante las horas nocturnas.

Vaca (2009) menciona que en *Agaricus bisporus*, se observaron los mayores promedios de crecimiento micelial en los medios de cultivo Triguillo (TSC), Papa (PSC) y Sabouraud-Miel (S-M), con valores de 3.60, 3.31 y 3.07 cm respectivamente. Por otro lado, los medios Extracto de malta (EM) y Cazapek: Sales inorgánicas (Czk) registraron los menores promedios para el crecimiento radial de micelio (CRM), con medidas de 2.90 y 2.26 cm, respectivamente. Los datos presentados divergen de los resultados de este estudio, dado que, el medio EMA exhibió uno de los promedios de crecimiento más elevados, similar al observado con el medio CM. No obstante, en esta investigación adicional, se evidenció un crecimiento significativamente inferior en el medio EMA en comparación con otros medios de cultivo.

5.4 Velocidad de crecimiento radial acumulado

En el presente estudio se llevó a cabo la evaluación de la velocidad de crecimiento radial acumulado de muestras cultivadas en diferentes medios de cultivo. Se observó que los medios de cultivo CM y EMA mostraron la mayor velocidad de crecimiento acumulado, alcanzando un promedio de cobertura de 36.4 mm a las 84 horas (3.5 días) y 41.2 mm a las 84 horas (3.5 días) respectivamente. Por otro lado, el medio de cultivo PDA exhibió un crecimiento más lento, requiriendo un tiempo de 216 horas (9 días) para alcanzar un promedio de cobertura de 43.97 mm (figura 5).

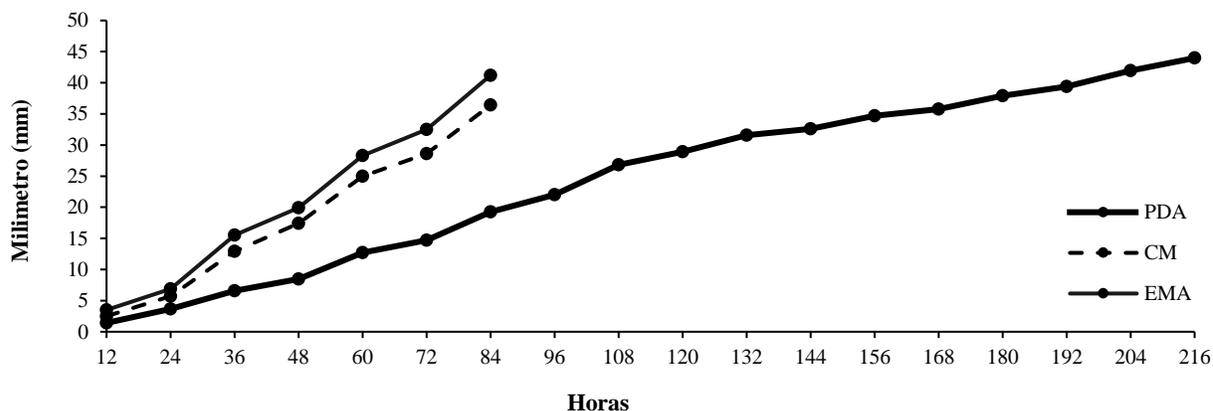


Figura 5. Velocidad de crecimiento radial acumulado (mm/hr) en los diferentes medios de cultivo.

En esta investigación se observó que el hongo exhibió una velocidad de crecimiento superior en los medios CM y EMA, alcanzando velocidades promedio de crecimiento 36.4 y 41.2 mm, respectivamente, dentro de un periodo de 84 horas. En contraste, en el medio PDA, se registró un crecimiento considerablemente más lento, extendiéndose hasta las 216 horas; con una velocidad de crecimiento promedio de 43.97 mm. Aguilar *et al.* (2023), evaluó la velocidad de crecimiento de cepas silvestres, una cepa comercial de *Agaricus bisporus*, en seis medios de cultivo: EMA exhibió la velocidad de crecimiento promedio más alta, registrando 2.66 mm/día, demostrando ser estadísticamente significativa en su superioridad respecto a los demás medios de cultivo, y arrojando los resultados más favorables para todas las cepas evaluadas. En la comparación entre cepas, se encontró que la cepa Ag03 manifestó una tasa de crecimiento promedio superior, registrando 2.40 mm/día. Además, se observó una reducción en la velocidad de crecimiento en todas las cepas cuando los medios de cultivo se suplementaron con extracto de levadura y peptona. Esta información coincide con este estudio al ser EMA uno de los medios de cultivo que exhibió la velocidad de crecimiento promedio más alta (figura 4) demostrando superioridad con respecto a los demás medios de cultivos.

VI. CONCLUSIONES

El crecimiento de *A. bisporus* fue similar en los tres medios de cultivos utilizados a partir del método de aislamiento siembra directa con crecimiento discontinuo textura rala y baja densidad.

Papa Dextrosa Agar presentó micelio abundante de color blanquecino y estructura algodonosa, Extracto de Malta Agar mostró micelio de tonalidad blanquecina y textura farinácea y Corn Meal exhibió micelio de color hialino con una textura plana y vellosa. Se encontró conidias color marrón elipsoidales de paredes gruesas color negro, con 8.7 μm de longitud y 8.4 μm de ancho con hifas septadas y cilíndrica.

Los medios de cultivo artificiales que presentaron mayor velocidad de crecimiento radial por hora y acumulado fueron Corn Meal y Extracto de Malta Agar, en Papa Dextrosa Agar el crecimiento fue más lento con mayor abundancia de micelio y más compacto.

VII. RECOMENDACIONES

Utilizar el método de siembra directa para el aislamiento primario de *A. bisporus* y otros hongos comestibles cuando el inóculo proviene de setas comerciales.

Realizar investigaciones para la reproducción masiva de *A. bisporus* con sustratos orgánicos.

Mejorar el método de aislamiento y estudiar métodos de preservación de cepas

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar Mainicta, F. B., Holgado Rojas, M. E., Cardona-Rivero, A., Villena-Tejada, M., Vera Ferchau, K., Best Cuba, I. C., Huayta Tintaya, Y. M., Portillo Guizado, K. M., Florez Huanca, G. y Flores Pérez, E.E. (2023). Aislamiento y desarrollo micelial de cepas silvestres de *Agaricus bisporus* (JE Lange) Imbach en la Región del Cusco. *Revista Q'EUÑA*, 14 (1), 35-40. <https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/RQ/article/view/1152/1390>
- Arrillaga Anabitarte, P. (2004). El género *Agaricus* L.: Fr. En el país Vasco y zonas limítrofes. *Sociedad de ciencias*.
- Calvo Torras, M. A., Rodríguez, M. y Domínguez, L. (2011). *Agaricus bisporus*: cultivo, problemas y prevención. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 15(2), 61-69. <https://www.radoctores.es/doc/1V15N2-calvo-agaricusbissporus.pdf>
- Cano-Estrada, A. y Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75-80. <https://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v43n1/art11.pdf>
- Durantes Ramos, R. (2021). *Desarrollo Micelial de Agaricus bisporus Lange con Diferentes Medios de Cultivo y Condiciones de Luminosidad* [Tesis de ingeniería, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio Uaaan. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/47902/K%2067071%20Durantes%20Ramos%2c%20%20Rolando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- French, E. R., Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Ed. IICA
- Galeón Alcón, M. V. (2009). *Establecimiento del hongo comestible (Agaricus sp.) bajo condiciones de laboratorio para su multiplicación en diferentes medios de cultivo* [Tesis de ingeniería, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio. Umsa. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5035/T-1342.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez Gaitán, Y. (2012). *Módulo práctico: Técnicas de laboratorio*. UNA. <https://repositorio.una.edu.ni/3779/1/NH20G984.pdf>
- Hernández Angeles, V. (2017). *Control Biológico de la mole húmeda en el cultivo de champiñón en las Vigas de Ramírez, Veracruz* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/a5f02c84-9b8c-4b57-a35a-8798d6076bda/content>
- Lechner, B., Rugolo, M. y Mallerman, J. (2017). *Hongos comestibles: el cultivo de flammulina velutipes (enokitake)*. Eudeba. <https://elibro.net/es/ereader/unanicaragua/119809>

- Martínez Barcena, J.A. (2019). *Análisis de las buenas prácticas en la producción de hongos comestibles, funcionales y medicinales en la región central de México* [Tesis de maestría, Colegio de postgraduados]. SCOPUS. http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/4235/1/Martinez_Barcelona_JA_MC_EDAR_2019.pdf
- Martínez Oses, R. (2021). “*Determinación de las causas de pérdidas por calidad en la etapa poscosecha de los hongos comestibles champiñón (Agaricus bisporus) y shiitake (Lentinula edodes) mediante el análisis de dos tipos de mercados costarricenses uno establecido en (San José) y uno emergente (Limón), para desarrollar una propuesta de manejo, Costa Ricas, 2019*” [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI-UCR. <https://repo.sibdi.ucr.ac.cr/bitstream/123456789/17847/1/46629.pdf>
- Mata, G., Medel, R., Callac, P., Billette, C. y Garibay-Orijel, R. (2016). Primer registro de *Agaricus bisporus* (Basidiomycota, Agaricaceae) silvestre en Tlaxcala y Veracruz, México, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.019>
- Montes, B., Restrepo, A. y McEwen, J. G. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*, 23, 213-224. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1214/1329/4835>
- Navarro Reyes, O. E. (2013). *Micología veterinaria*. 1a edición. <https://repositorio.una.edu.ni/2470/1/nl73n322.pdf>
- Palestina Villa, E. N. (2017). *Contribución al conocimiento de la diversidad morfológica y molecular del género Agaricus L. (Agaricaceae) en el estado de Veracruz, México* [Tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio institucional. <https://www.uv.mx/mcef/files/2019/04/Palestina-VEN-Contribucion-al-conocimiento-de-la-diversidad-morfologica-y-molecular-del-genero-Agaricus-L.-Agaricaceae-en-el-estado-de-Veracruz-Mexico-comprimido.pdf>
- Ramos, R. D. (2021). *Desarrollo Micelial de Agaricus bisporus Lange con Diferentes Medios de Cultivo y Condiciones de Luminosidad* [Tesis de ingeniería, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio Uaaan. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/47902/K%2067071%20Durantes%20Ramos%2C%20%20Rolando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, F., Claros, M. y Ortuño, N. (2018). Evaluación de medios de cultivo y sustratos para la producción de inóculo de hongos comestibles. *Revista de Agricultura*, 3(58), 15-24. <https://cifumss.agro.bo/rev-agric/pdf/rev58/rev58-3.pdf>
- Ruíz López, F. L. y Blandón Jarquín, A. A. (2022). *Capacidad antagónica in vitro de Trichoderma spp frente a Sclerotium spp y promotor del crecimiento vegetal en plantulas de frijol (Phaseolus Vulgaris L.) UNA, Managua 2021*[Tesis de ingeniería,

Universidad Nacional Agraria]. Repositorio institucional.
<https://repositorio.una.edu.ni/4505/1/tnh20r934.pdf>

Sánchez, J. E., Royse, D. J. y Lara, H. L. (2007). *Cultivo, Mercadotecnia e inocuidad alimenticia de Agaricus bisporus*. ECOSUR.
https://www.researchgate.net/publication/279340093_El_genero_Agaricus

Segundo Zaragoza, C., Castañón Olivares, L. R. y Bazán Mora, E. (2019). *Generalidades de los hongos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
https://micologiaveterinaria.fmvz.unam.mx/assets/docs/temas_selectos/Generalidades_Hongos.pdf

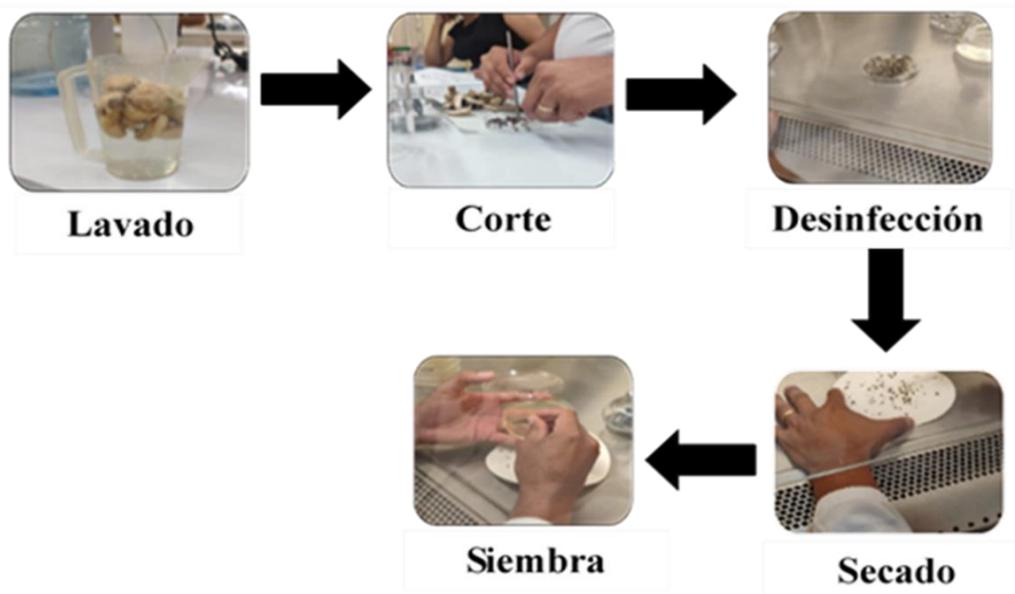
Vaca Loayza, L. (2009). *Efecto de la composición de diferentes medios de cultivo y sustratos en la reproducción de micelios y semilla de hongos comestibles (Agaricus sp. y Agaricus bisporus)* [Tesis de ingeniería, Universidad Mayor de San Andrés].
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5048/T-1356.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

IV. ANEXOS

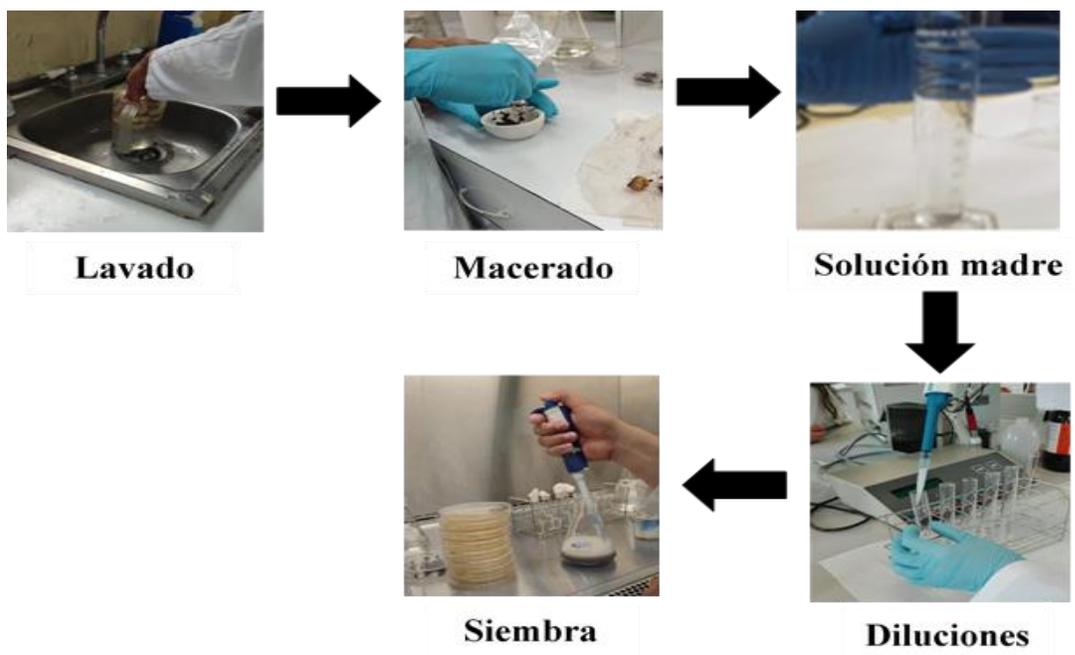
Anexo 1. Componentes de los medios de cultivos utilizados en el ensayo

Medios de cultivos	Composición del medio
Sabouraud Dextrosa agar (SDA)	peptona 10.0 g dextrosa 20 g agar 20 g.
Papa dextrosa Agar (PDA)	Papa 250 g dextrosa 20 g agar 20 g ácido láctico al 50%, 1 gota por cada 20 ml de PDA
Corn Meal (CM)	% Grasas 4.1 +/- 0.2 % Carbono (45.52) % Fibra bruta 1,89 +/-0,2 % Hidrógeno (6,3), % azúcar (3.34) % nitrógeno (1.15), % Almidón (68.47) % Azufre 0.10 +/- 0.02, % Nitrógeno 1.20 +/- 0.02 % Humedad (7.2). Análisis de minerales: % Calcio 0.05 +/- 0.01 %, Potasio 0.46 +/- 0.08, % Magnesio 0.11 +/- 0.01 % Sodio 0.04, % Fósforo 0.29 +/- 0.03, PPM Boro (1) PPM Cobre 16 +/- 9, PPM Hierro 46 +/- 9 PPM Manganeso 8 +/- 1, PPM Zinc 37 +/- 15 PPM Aluminio (125).
Extracto de malta (EM)	agar 15 g maltosa 12.75 g dextrina 2.75 g glicerol 2.35 g peptona 0.78 g

Anexo 2. Procedimiento utilizado en la siembra directa de *A. bisporus*



Anexo 3. Proceso de dilución en serie: etapas y procedimientos para el aislamiento de *A. bisporus*



Anexo 4. Procedimiento de licuado para el aislamiento de *A. bisporus*



Lavado



Licuado



Siembra

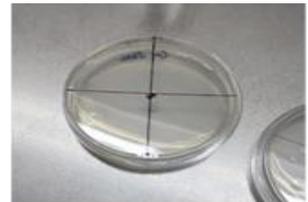
Anexo 5. Procedimiento para la evaluación del crecimiento radial de *A. bisporus*



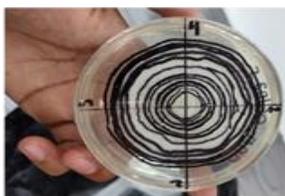
Cortes de 6 mm



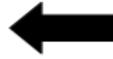
Trazado de líneas



Ubicación del corte



Toma de medidas



Cobertura total del micelio