



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CULTIVO EXPERIMENTAL DE HONGOS COMESTIBLES

SILVESTRES: *Flammulina mexicana* Y *Lyophyllum secc. Difformia*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

YOLANDA ARANA GABRIEL

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Enero 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CULTIVO EXPERIMENTAL DE HONGOS COMESTIBLES

SILVESTRES: *Flammulina mexicana* Y *Lyophyllum secc. Difformia*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

YOLANDA ARANA GABRIEL

COMITÉ DE TUTORES:

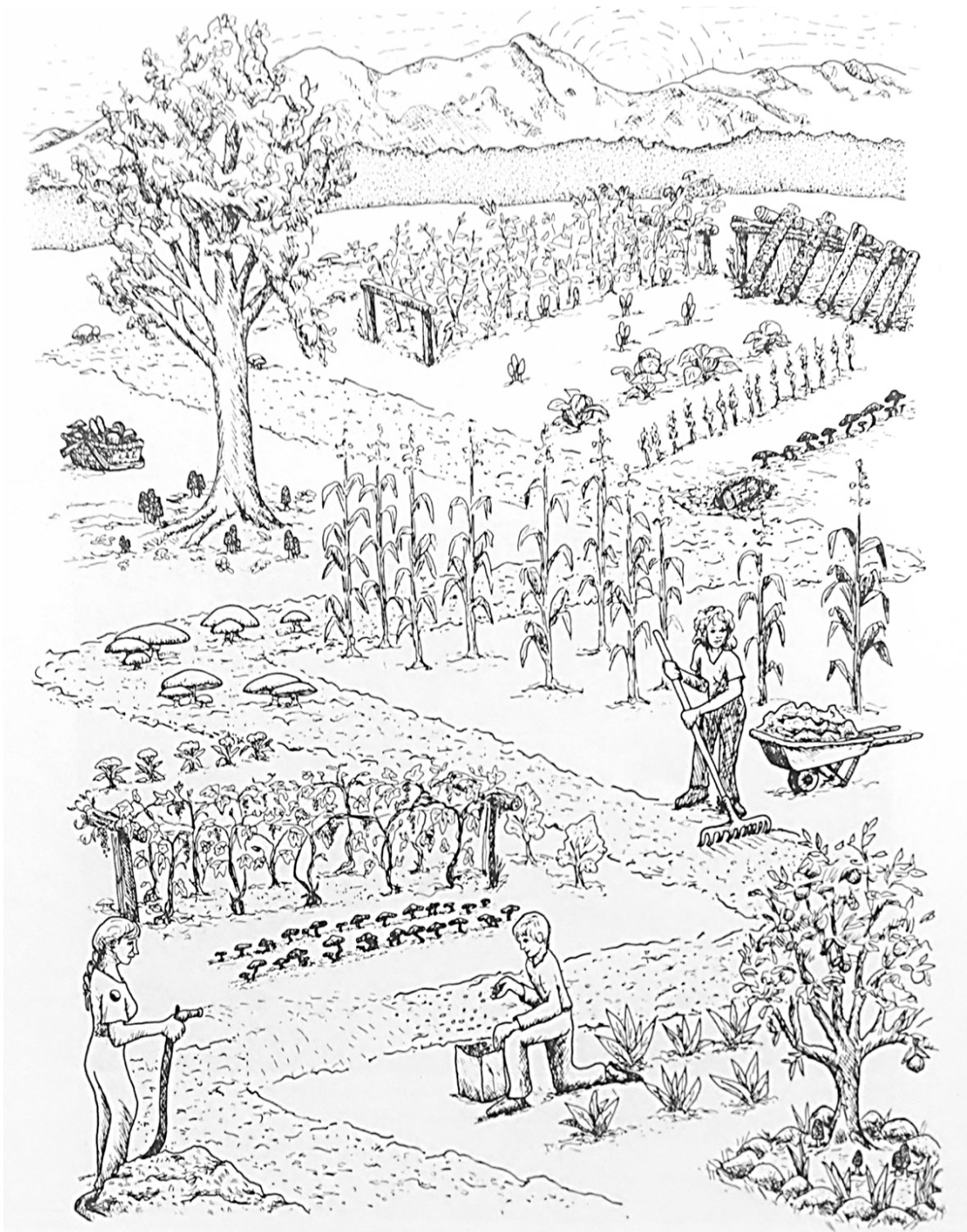
Dra. Cristina Burrola Aguilar. Tutor Académico

Dr. Sergio Franco Maass. Tutor Adjunto

Dr. Gerardo Mata. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Enero 2018

“Lo que hacemos sólo para nosotros muere con nosotros; lo que hacemos para los demás y para el mundo permanece y es inmortal ”-Albert Pike-



Tomado de Stamets 2000

DEDICATORIAS

A Dios

Por el simple hecho de vivir, por la hermosa familia que tengo, por estar siempre aquí, por ayudarnos y darnos la fortaleza necesaria que nos permitió surfear una de las etapas más difíciles de nuestras vidas y por ayudarme a seguir el camino que elegí.

A mis padres, Dante Arana y Josefina Gabriel

Por todo el amor incondicional que son capaces de brindarnos, porque son capaces de dar la luz que necesitamos en los momentos de más oscuridad; por mostrarme con el ejemplo que los héroes existen, tienen nombre y que son parte de mi vida y por el simple hecho de ser quien son. Los amo!

A mis hermanos, Alfredo Arana y María Arana

Por ser parte esencial de mi vida, por ser el par de amigos más locos que no elegí, a su lado cada situación que compartimos tiene un color que alegra mi vida, no imagino una vida sin ustedes.

RESUMEN

En México los hongos comestibles son considerados un producto del cual dependen millones de hogares para su subsistencia, permiten satisfacer necesidades nutricionales y de salud, además de proporcionar beneficios económicos. El cultivo de hongos proporciona gran parte de estos beneficios, sin embargo la mayor parte de cepas utilizadas en la industria de cultivo son provenientes de Estados Unidos, Europa o el sur de Asia y se carece de investigaciones que permitan identificar y utilizar germoplasma silvestre para diversificar las especies ya cultivadas y que permitan hacer uso de los recursos locales para su cultivo. Ante esta problemática, el objetivo general de la investigación fue establecer los ciclos de cultivo, las condiciones óptimas y los sustratos más adecuados para la producción de cuerpos fructíferos de dos especies de hongos comestibles silvestres: *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* sección *Difformia*; a partir de cepas nativas del Nevado de Toluca. Se recolectaron cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* secc. *Difformia* a partir de un muestreo dirigido a diferentes sitios de vegetación secundaria de *Senecio cinerarioides* y bosque de *Pinus* spp. y *Abies religiosa* en el Nevado de Toluca. Los ejemplares fueron determinados taxonómicamente, las cepas fueron obtenidas por aislamiento vegetativo, se les realizó caracterización morfológica y molecular, se midió la velocidad de crecimiento en medio sólido y cuantificó la producción de biomasa en medio líquido y sólido. Los medios de cultivo utilizados fueron AC (agar croquetas para perro) y EMA-PL (agar extracto de malta peptona y levadura) para *Flammulina mexicana*, PDA (agar papa dextrosa) y EMA-PL para *Lyophyllum* secc. *Difformia*. Se elaboró inóculo sólido en trigo e inóculo líquido en agitación por 20 días. Para los bioensayos de fructificación se evaluaron diferentes sustratos disponibles en la región central del Estado de México dependiendo de la especie y se determinaron diferentes parámetros ambientales para las fructificaciones como temperatura, humedad, intensidad de luz e intercambio de aire.

Para *F. mexicana* se evaluaron cuatro cepas silvestres, las cuales no presentaron diferencias morfológicas entre ellas, pero sí entre medios de cultivo. Las cepas que presentaron mayor velocidad de crecimiento fueron IE 974 e IE 986 en medio AC con 0.65 cm/día y una producción de biomasa de 6.9 y 7.7 g/l respectivamente, con un tiempo de 35 días para la

producción de inóculo sólido y 20 para inóculo líquido. Las cuatro cepas tienen capacidad de fructificar en desechos agrícolas y forestales. Las cepas IE 986 e IE 974 presentaron mayor eficiencia biológica con 34.5% y 31.9% respectivamente, en rastrojo de maíz como sustrato. El análisis nutricional de las fructificaciones obtenidas muestra un alto porcentaje de fibra (52.51%) y bajo contenido de carbohidratos (9.03 %).

Para *Lyophyllum* sección *Difformia* se evaluaron cuatro cepas las cuales se dividen en dos clados dentro de la sección *Difformia*: *Lyophyllum* sp. y *Lyophyllum* aff. *shimeji*. La velocidad de crecimiento y la producción de biomasa fueron influenciadas por los medios de cultivo y las cepas. En el medio PDA las cepas IE 975 y IE 982 tuvieron una mayor tasa de crecimiento con 0.4 cm/día, mientras que en EMA-PL la velocidad fue lenta, pero con una mayor producción de biomasa (0.3-0.38 g/caja de Petri en IE 981 y IE 982). En medio líquido de extracto de malta las cuatro cepas presentaron una producción de 9.6-11.9g/l. Las cepas IE 975 e IE 983 presentaron las condiciones óptimas de velocidad de crecimiento y producción de biomasa a 18 °C. En cuanto a los bioensayos de fructificación se requiere de más investigaciones que permitan conocer la condición saprobia o micorrízica de las especies para identificar el tipo de sustratos y condiciones ambientales a las que las cepas tienen que ser sometidas para inducir las fructificaciones.

Las especies *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum* aff. *shimeji* y *Lyophyllum* sp. pueden formar parte de la diversidad de especies que ya se cultivan a nivel nacional e internacional, para ser utilizadas como una alternativa alimenticia (autoconsumo) y/o económica (venta), mediante la producción de cuerpos fructíferos con valor nutricional en condiciones de invernadero.

ABSTRACT

In Mexico, edible fungi are considered a product on which millions of homes depend for their subsistence, they have the satisfaction of nutritional and health needs, in addition to the economic benefits. Mushroom cultivation provides much of these benefits, however the majority of the strains used in the culture industry come from the United States, Europe and South Asia and there is no research to identify and use wild germplasm to diversify the already cultivated species and that allow the use of local resources for their cultivation. Faced with this problem, the general objective of the research was to establish the cultivation cycles, the optimal conditions and the most suitable substrates for the production of fruiting bodies of two species of wild edible fungi: *Flammulina mexicana* and *Lyophyllum* section *Difformia*; from native strains of Nevado de Toluca. Fruiting bodies of *Flammulina mexicana* and *Lyophyllum* secc. *Difformia* were collected in through directed sampling in secondary vegetation of *Senecio cinerarioides* and forest of *Pinus* spp. and *Abies religiosa* within the Nevado de Toluca. The specimens were taxonomically determined, the strains were by vegetative isolation; morphological and molecular characterization was performed, the growth rate was measured in the solid average and quantified production of biomass in liquid and solid medium. The culture media were DFA (dog food agar) and ME-PYA (malt extract-peptone and yeast agar) for *Flammulina mexicana*, PDA (potato dextrose agar) and ME-PYA for *Lyophyllum* secc. *Difformia*. Solid spawn was made in wheat and liquid spawn under agitation for 20 days. For the fruiting bioassays, different substrates available in the central region of the State of Mexico are evaluated, depending on the species and different environmental parameters were determined for the fructification such as temperature, humidity, light intensity and air exchange.

For *F. mexicana* four wild strains were evaluated, there were no morphological differences among these strains; however, the choice of culture media did produce differences. Growth rate was greatest in strains IE 974 and IE 986 at 0.65 cm/day and these strains also presented the highest biomass production at 6.9 and 7.7 g/l, respectively; with a period of 35 days in production with solid spawn and 20 days with liquid spawn. All the four strains have the capacity fructify in agricultural and forestry wastes. Strains IE 986 and IE 974 presented

greater biological efficiency, at 34.5% and 31.9% respectively, with maize stubble as a substrate. Nutritional analysis of the fructifications obtained showed a high percentage of fiber (52.51%) and low carbohydrate content (9.03%).

For *Lyophyllum* section *Difformia* four strains were evaluated which were divided into two clades within the section *Difformia*: *Lyophyllum* sp. and *Lyophyllum* aff. *shimeji*. The growth rate and biomass production were influenced by culture media and strains. In the PDA medium, strains IE 975 and IE 982 had a higher growth rate with 0.4 cm/day, while in ME-PYA, the growth rate was slow, but with a higher biomass production (0.3-0.38 g / Petri dish). in IE 981 and IE 982). In liquid medium of malt extract, the four strains present a production of 9.6-11.9g/l. Strains IE 975 and IE 983 presented the optimal conditions of growth rate and production of biomass at 18 °C. Regarding fruiting bioassays, more research is required to know the condition of the species to identify the type of substrates and the environmental conditions in which people have to be subjected to the induction of fructifications.

The species *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum* aff. *shimeji* and *Lyophyllum* sp. can be part of the species diversity that are already grown national and international, to be used as a food alternative (auto-consumption) and/or economic (sale), through the production of fruiting bodies with nutritional value under greenhouse conditions.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, a la Facultad de Ciencias y al Posgrado en Ciencia Agropecuarias y Recursos Naturales por la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la Beca CONACYT (No. de Registro: 268211) durante los tres años de Doctorado y por el Apoyo Complementario a Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2017-1, para llevar a cabo los trámites para obtención de grado.

A la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEM, por el financiamiento del proyecto de investigación “Los hongos silvestres como estrategia para el desarrollo sustentable en el Parque Ecológico Ejidal de Cacalomacán, Estado de México”, clave 3687/2014/CIA, haciendo posible el presente trabajo.

A la Red MEXBOL CONACYT proyecto 280896 por el financiamiento en la secuenciación de DNA.

A la Dra. Cristina Burrola Aguilar, por la dirección de la presente investigación y formación profesional. Crys en realidad no tengo palabras para expresarte mi más sincero respeto, admiración y agradecimiento por todo lo que me has brindado. Han sido ya muchos años de conocernos, en los cuales me has permitido aprender de este grupo de organismos tan maravilloso que son los hongos y de lo más importante, aprender de ti como persona. Gracias por tu apoyo, por la confianza y por todas las oportunidades que me has permitido tomar para crecer y desarrollarme profesionalmente. Gracias por tu amistad y por el día que me abriste las puertas y decidiste mantenerlas así por tantos años.

Al Dr. Sergio Franco Maass por sus aportes y sugerencias a la presente investigación. Gracias por su apoyo, por la confianza y por todas las oportunidades que me ha permitido

tomar para crecer y desarrollarme profesionalmente. Gracias por sus consejos y palabras de aliento, pero sobre todo muchas gracias por su amistad. Tengo hacia usted un gran respeto y admiración.

Al Dr. Gerardo Mata por su apoyo, por ser parte de mi formación profesional, por sus valiosos aportes y sugerencias que guiaron la presente investigación.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel por su apoyo e importantes contribuciones a la investigación.

A la Dra. Carmen Zepeda por su apoyo, así como por sus comentarios y aportaciones a la investigación.

A la Dra. Julieta Gertrudis Flores Estrada por el apoyo brindado en la técnica de cuantificación de fibra en sustratos.

A mis padres y hermanos que además de su apoyo emocional y paciencia participaron de manera activa durante la fase experimental del proyecto. Gracias por su cariño y por impulsarme a seguir luchando cada día para ser mejor.

A mis amigas: Azucena, Rocío, Lorena, Carmen, Gaby, Sandra, Amayda y Mary. Azu que más te puedo decir que no te haya dicho ya en estos años, gracias por tu amistad y consejos. Lore y Gaby gracias por su amistad y por esos grandes momentos que pasamos juntas en el laboratorio, fueron increíbles. Lore así como hemos reído y disfrutado grandes momentos, también hemos llorado juntas por esas cosas que desafortunadamente llegan y golpean sin avisar, pero que a pesar de eso nos han hecho crecer y adquirir una mayor fortaleza, he aprendido mucho de ti. Mary gracias por ser mi persona. A mis amig@s y compañeros de laboratorio Gris, Cesar y David gracias por su apoyo y amistad.

Al personal de recursos Bióticos gracias por todo su apoyo, Norma, Jorge, Marcelino, Letty y Nashiely.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

METODOLOGÍA

RESULTADOS

Capítulo I. Descripción de las especies: *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*

Capítulo II. Cultivo experimental de *Flammulina mexicana*

Artículo 1. Experimental cultivation of *Flammulina mexicana*: a species endemic to the high mountains of Mexico.

Artículo 2. Colonización miceliar de *Flammulina mexicana* a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales

Capítulo III. Cultivo experimental de *Lyophyllum secc. Difformia*

Artículo 3. Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains from wild edible mushrooms of *Lyophyllum* of Central Mexico

Bioensayos de fructificación de cepas nativas de *Lyophyllum secc. Difformia* de alta montaña de México

CONCLUSIONES GENERALES

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

LITERATURA CITADA

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGÍA

Fig. 1 Esquema general de la metodología, desde la obtención de cepas a la producción de cuerpos fructíferos.

CAPÍTULO I

Fig. 2 Cuerpos fructíferos silvestres de *F. mexicana*, recolectados en cuatro sitios diferentes

Fig. 3 Basidios y basidiosporas de *F. mexicana* en Rojo Congo a 100x

Fig. 4 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 1, b) basidios y basidiosporas en Rojo Congo a 100x

Fig. 5 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 2, b) basidiosporas c) basidios en Rojo Congo a 100x

Fig. 6 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 3, b) basidios, c) basidiosporas en Rojo Congo a 100x.

Fig. 7 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum*. aff. *shimeji*, b) Basidios, c) Basidiosporas en Rojo Congo a 100x.

CAPÍTULO II

Fig 1. *Flammulina mexicana*. a) Wild mushrooms growing on *Senecio cinerarioides*, b) Cultured mushrooms on maize stubble (MS).

Figura 1. Crecimiento miceliar de cuatro cepas de *F. mexicana*

Figura 2. Primordios de *F. mexicana*

CAPÍTULO III

Fig. 1. Analysis of Bayesian inference based on ITS sequence of *Lyophyllum* section *Difformia* that includes the strains and specimens of *Lyophyllum* collected in the State of Mexico.

Fig. 2. Strains of *Lyophyllum* secc. *Difformia* at 18°C

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO II

Table 1. Growth rate and biomass production in four strains of *F. mexicana* (means \pm SD)

Table 2. Size of wild and cultured mushrooms and biological efficiency of *F. mexicana* (means \pm SD)

Table 3. Fiber analysis in colonized substrates with fruit bodies production (means \pm SD)

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento miceliar en diferentes sustratos

CAPÍTULO III

Table 1. Strains and specimens of *Lyophyllum* studied

Table 2. Macromorphological characterization of four *Lyophyllum* strains

Table 3. Growth rate and biomass production in solid and liquid media

INTRODUCCIÓN

La recolecta de los hongos comestibles silvestres (HCS) forma parte de los patrones de subsistencia de las poblaciones que viven en zonas cercanas a los bosques durante la temporada de lluvias, por ser su principal fuente de ingresos y alimentación (Boa, 2005; Alvarado-Castillo y Benítez, 2009). En México se consumen de manera tradicional 371 especies de hongos comestibles (Garibay-Orijel y Ruan-Soto, 2014) y el conocimiento micológico tradicional es la base de todo aprovechamiento de los hongos silvestres, ya que permite identificar y conocer las especies que pueden ser potencialmente susceptibles de cultivo, con fines de consumo y comercialización, principalmente aquellas que son valoradas regionalmente. Gracias a los patrones de consumo y conocimiento tradicional detallado que tienen de los pobladores, también es posible seleccionar especies adaptadas a las condiciones ambientales de la región, brindar elementos para definir sustratos y mejorar la tecnología de la industria del cultivo de hongos, lo cual permite un mayor y mejor aprovechamiento del germoplasma propio de cada región, reduciendo así su dependencia genética y tecnológica (Garibay-Orijel *et al.*, 2010). Actualmente, la mayoría de las cepas utilizadas en el cultivo comercial provienen de regiones de América de Norte, Europa o el sur de Asia (Martínez-Carrera, 2002).

El cultivo de hongos en México se enfoca principalmente en *Pleurotus* spp. y *Agaricus bisporus*, por lo que la mayoría de investigaciones realizadas se centran en una serie de ensayos para identificar y utilizar cepas mejoradas para su cultivo. Entre las técnicas empleadas para especies de *Pleurotus* se encuentra el entrecruzamiento o hibridación, un método eficiente para obtener una combinación de características deseables. Por medio de la recombinación genética se pueden obtener características importantes de cepas, que puedan ser utilizadas en la industria de hongos comestibles. En cuanto a los programas de mejoramiento de producción de hongos desarrollados por diversos grupos de investigación, se pone énfasis en identificar o incorporar potencial genético para obtener un alto rendimiento en la producción de hongos, así como el manipular los parámetros ambientales y prácticas de manejo del cultivo (Gaitán-Hernández *et al.*, 2009). En este contexto, el cultivo de *Flammulina mexicana* y especies de *Lyophyllum* sección *Difformia* pueden constituir una importante contribución económica y alimenticia, no solo para las personas que los recolectan para autoconsumo y venta, sino también por su relación con especies cultivadas a nivel mundial. *Flammulina mexicana*, pertenece al género *Flammulina*

que es conocido por su distribución cosmopolita y por tener especies comestibles de relevancia económica, nutricional y medicinal como *F. velutipes* (Ge *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009; Suárez y Nieto, 2013).

En cuanto a las especies comestibles, *Lyophyllum shimeji*, *L. descastes*, *L. fumosum* y *L. connatum*, se encuentran clasificadas filogenéticamente dentro de la sección *Difformia*. El cultivo comercial de *Lyophyllum* spp. es un proceso largo y complejo y las investigaciones están enfocadas a su fructificación mediante la asociación simbiótica con especies arbóreas (en el caso específico de *L. shimeji*); en función de la cepa y su origen geográfico (Visnovsky *et al.*, 2014) y la obtención de cepas con la capacidad de formar cuerpos fructíferos sin micorrización (Otha, 1994). Por lo que, la mayor parte de las investigaciones se enfocan en la obtención de biomasa en cultivo sumergido (Pokhrel y Ohga, 2007).

En la presente investigación se sometieron a cultivo experimental cuatro cepas silvestres de *F. mexicana*, una de *L. aff. shimeji* y tres de *Lyophyllum* sp., con la finalidad de conocer las condiciones (nutricionales y ambientales) óptimas requeridas y el tiempo requerido en cada etapa de cultivo; así como la influencia de la cepa utilizada y tipo de inóculo (sólido y líquido) utilizado para la producción de cuerpos fructíferos.

El presente trabajo está estructurado de manera que se presentan los antecedentes como marco teórico sobre la importancia de la diversificación y el resguardo del germoplasma para su incorporación en nuevos cultivos de hongos silvestres, así como el cultivo y producción de hongos comestibles con las especies cultivadas a nivel internacional y nacional con énfasis en los beneficios que muestra esta práctica en México. De forma consecutiva se presentan los objetivos, planteamiento del problema, justificación e hipótesis que guiaron la investigación. Para la metodología se presenta un diagrama general que abarca desde obtención y caracterización de las cepas hasta los bioensayos de fructificación tanto para *F. mexicana* como para *L. secc. Difformia*. La sección de resultados se divide en tres capítulos; el primero se centra en la descripción taxonómica de las especies, los capítulos subsiguientes se presentan en formato de tres artículos, los cuales fueron enviados a Revistas Científicas para su revisión y posible publicación; dos artículos para el cultivo experimental de *F. mexicana* y uno sobre la caracterización genética, evaluación de crecimiento y producción de biomasa de cepas de *Lyophyllum* *L. secc. Difformia*. También se presentan las conclusiones generales de la investigación, consideraciones finales, la literatura que fue citada durante la sección de

introducción y antecedentes. Por último, se incluyen ocho anexos, los cuales corresponden a imágenes de los cultivos de ambas especies, las cuales no fueron incluidas en la sección de resultados, carta de resguardo de las cepas en el Cepario del Instituto de Ecología. A. C. y un informe de análisis bromatológico.

ANTECEDENTES

Conocimiento tradicional de los hongos comestibles

El conocimiento tradicional puede ser definido como el conjunto de saberes y prácticas (creencias, leyendas, mitos, etc.) generadas y acumuladas colectivamente, que se guardan en la memoria y actividades de la gente y se transmiten de generación a generación en forma oral, práctica y en algunos casos escrita (Luna-Morales, 2002).

El conocimiento tiene una organización interna y consta de un “*saber*” como de un “*conocer*”; es una fuente extremadamente rica de información sobre los usos de los recursos (Toledo, 1992). Para el caso de los hongos silvestres, la etnomicología es el área de la etnobiología que se encarga de estudiar el conocimiento tradicional y las manifestaciones e implicaciones culturales y/o ambientales que se derivan de las relaciones establecidas entre el hombre y los hongos a través del tiempo y el espacio el cual recibe el nombre de Conocimiento Micológico Tradicional (CMT).

En México el conocimiento tradicional de los hongos comestibles silvestres se ha desarrollado particularmente en el área central del país, vinculado a la herencia cultural prehispánica (Montoya *et al.*, 2001; Mariaca *et al.*, 2001; Pérez-Moreno *et al.*, 2008); más de 12 etnias han demostrado una tendencia micofílica y un profundo CMT (Ruán-Soto *et al.*, 2006). A lo largo de la historia el uso de los recursos naturales por parte de los grupos humanos ha permitido la acumulación de conocimientos sobre la biología, ecología, fenología, sistema de clasificación tradicional, nomenclatura, las concepciones acerca de los hongos y su utilización (Montoya-Esquivel *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2009; Burrola-Aguilar *et al.*, 2012). Por lo cual el CMT es el fruto de la adaptación humana al medio ambiente (Berkes *et al.*, 2000) y puede ser una herramienta clave para la elaboración y desarrollo de programas restauración ecológica y conservación tanto para diversidad biológica y cultural así como una herramienta clave en la gestión sostenible de los recursos (Huntington *et al.*, 2004).

Diversificación y resguardo de germoplasma

A nivel mundial, se estima que hasta el año 2010 se han logrado conservar *in vitro* únicamente el 1.3 % de la biodiversidad fúngica global, estimada en 1.5 millones de especies (Morales *et*

al., 2010). En cuanto a México, es considerado un país donde converge una notable diversidad biológica, ecológica y cultural. No obstante, los recursos humanos, económicos y de infraestructura que actualmente se dedican a la preservación de los recursos genéticos de los hongos comestibles y medicinales son mínimos. Se estima que para el país podrían existir más de 200,000 especies de hongos (Guzmán, 1998), lo que representa un potencial biotecnológico, económicamente factible de aprovechar y de gran importancia para el desarrollo nacional. Sin embargo, la pérdida de hábitats naturales ha repercutido desfavorablemente en las poblaciones silvestres, por lo que las colecciones de cultivos fúngicos adquieren cada vez mayor relevancia en la conservación *ex situ* de la biodiversidad y representan un importante componente en el desarrollo de investigaciones científicas y tecnológicas (Salmones y Mata, 2012).

A nivel nacional diversas colecciones resguardan 1639 cepas de especies comestibles y/o para su cultivo, como *Pleurotus*, *Agaricus*, *Lentinula*, *Ganoderma*, *Ustilago maydis*, *Volvariella*, *Agrocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus*, *Laetiporus sulphureus*, *Lepista nuda*, *Morchella* spp., *Neolentinus suffrutescens*, etc. Además de estos géneros, se tienen algunas cepas de hongos micorrízicos adscritos a los géneros *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius* y *Suillus*; así como 663 cepas de hongos silvestres. Las cepas son provenientes tanto de organismos locales, como de otros países (Salmones y Mata, 2012).

En 2004, se creó en México el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla; cuya finalidad es integrar una muestra de la diversidad, las condiciones ecológicas, y el conocimiento de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales del país estableciendo las bases para proyectar su conservación, caracterización, mejoramiento y utilización por la sociedad. Actualmente resguarda 400 cepas de diversas regiones templadas, tropicales y subtropicales del país, incluyendo cepas de otras partes del mundo. Cuenta con cepas que se han cultivado comercialmente en diversas regiones de México durante los últimos 20 años, que se han introducido en el país sin ningún control desde 1933 y que, por lo tanto, se desconoce su procedencia y se carecen de estudios comparativos sobre su crecimiento en substratos locales, requerimientos de desarrollo micelial y fructificación, rendimiento, y calidad (Morales *et al.*, 2010). Es así como el cultivo de hongos en América Latina tiene dos tendencias contradictorias. Mientras en países como México, Chile y Brasil la producción y el consumo han aumentado en conjunto a más de 500,000 toneladas al año; este desarrollo se debe casi exclusivamente a dos

hongos, *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Lo que contrasta enormemente con el desarrollo del cultivo en Asia, donde se cultivan más de 20 especies comercialmente. La influencia de este desarrollo ha llegado a E.U.A y Canadá en donde es común encontrar en los supermercados numerosas especies de hongos cultivados y otras tantas de hongos silvestres, la mayoría de origen asiático. A pesar del vasto potencial genético y de que más de 400 cepas nativas de hongos cultivados son mantenidas en instituciones de América Latina, no más de cinco especies se cultivan a escala comercial y la experimentación sobre nuevas especies es escasa (Garibay-Orijel *et al.*, 2010)

De la diversificación de germoplasma a la incorporación de nuevos cultivos de hongos silvestres

Los hongos silvestres representan un recurso biológico y genético muy importante para el sector productivo. Se trata de individuos fisiológicamente adaptados a determinados sustratos y condiciones ambientales, lo que proporciona la variación genética necesaria para potencializar las características deseables para el sector comercial.

Si se conjunta la importancia ecosistémica de los hongos con su potencial económico; la búsqueda de estrategias para su manejo sustentable adquiere gran relevancia y resulta imprescindible aprovechar y conservar adecuadamente el germoplasma silvestre (Salmones y Mata, 2012).

El cultivo de nuevas especies de hongos silvestres representa una fuente potencial de valoración real del conocimiento tradicional, así como nuevos genes y propiedades funcionales. La aplicación de la biotecnología moderna y las ciencias genómicas a los recursos genéticos nativos tendrá un notable impacto sobre los hongos comestibles y medicinales al convertirlos en fábricas microbianas para la producción de medicinas (proteínas) al combinarse, así como en sistemas microbianos para la biorremediación *in situ* y la biodegradación/bioconversión de subproductos lignocelulósicos (Morales *et al.*, 2010).

Además, es fundamental promover ampliamente la percepción que la sociedad tiene de los hongos comestibles y medicinales; ya que sólo en la medida que la sociedad perciba la trascendencia de los recursos genéticos de los hongos comestibles y medicinales, será posible canalizar mayores recursos humanos, económicos y materiales para su conservación, estudio y utilización. Simultáneamente, es indispensable fortalecer la investigación científica básica y

aplicada; mediante el desarrollo de estrategias que impliquen la conservación, investigación, innovación y el desarrollo de los recursos genéticos de hongos nativos; involucrando su recolecta, conservación, identificación, caracterización y aplicaciones biotecnológicas (Morales *et al.*, 2010). Estos factores están asociados al cuello de botella en el cultivo de nuevas especies de hongos (Mata y Savoie, 2012).

Dicho cuello de botella se debe a la carencia de conocimientos en tres aspectos fundamentales de la biología de la mayor parte de las especies de interés potencial: 1) ciclo de vida y genética, 2) factores y mecanismos responsables de la inducción de la fructificación y el desarrollo del cuerpo fructífero y 3) producción y composición de metabolitos y propiedades toxicológicas y farmacéuticas. Estos tres puntos se deben estudiar teniendo en cuenta la variabilidad intraespecífica para garantizar la calidad de los hongos que serán producidos y para poder vislumbrar el mejoramiento genético de las cepas que se destinarán al cultivo comercial. En este sentido es primordial la obtención de cepas adaptadas a los sustratos potenciales de cultivo existentes en el país, a los distintos tipos de manejo a que sean sometidas, así como a las condiciones climáticas de cada región (Mata y Savoie, 2012). El cultivo de hongos puede ser visualizado como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial. Sin embargo, para lograr éxito en la producción comercial de hongos comestibles se requiere de un mercado propicio, es decir, un público que aprecie el consumo de hongos. Existen múltiples factores culturales que pueden afectar el gusto por los hongos, desde el origen étnico y condición socioeconómica, hasta las historias recientes de intoxicación. Se puede considerar una estrategia exitosa, el impulsar el cultivo y consumo de especies valoradas regionalmente. Esto aseguraría la viabilidad comercial de nuevas empresas y, al mismo tiempo, sensibilizaría a más consumidores respecto de las bondades de estos productos. En el largo plazo, estas especies regionales podrían ir ampliando su influencia geográfica con base en un mayor número de consumidores interesados en para probar nuevos hongos.

Cultivo y producción de hongos comestibles

La producción de Hongos Comestibles Silvestres es una actividad que presenta altas posibilidades de desarrollo a nivel de unidades de producción rural (UPR), con un alto impacto social, económico y ecológico en el campo mexicano; gracias a factores como, la creciente

demanda interna y externa de los HCS, la abundancia en México de subproductos subutilizados de la actividad agrícola, agroindustrial y forestal, posible de utilizarse a nivel de UPR, la disponibilidad de una biotecnología de producción rural de HCS factible de adaptarse a las condiciones específicas de la UPR (Martínez-Carrera y Nava-López, 2003). Los hongos comestibles (HC), funcionales y medicinales representan un proceso biotecnológico, rentable, controlado, eficiente en la utilización de agua y energía, adaptable al cambio climático y desarrollado a pequeña (rústico) y gran escala (alta tecnología), con importantes repercusiones sociales, ecológicas y económicas. En los últimos años, dicha tecnología se ha convertido en una alternativa para la obtención de alimentos de consumo humano de alto valor nutritivo; por la posibilidad de obtener grandes cantidades en pequeñas áreas mediante técnicas sencillas, a bajo costo, en cortos períodos de tiempo y empleando residuos agrícolas, agroindustriales y forestales como sustrato para su cultivo (Martínez-Carrera y Nava-López, 2003).

El primer registro científico de un hongo comestible en México fue realizado por Patouillard y Hariot en 1896, quienes registraron a *Agaricus campestris* en la Península de Baja California, sin mencionar datos de su consumo como alimento (Villarreal y Pérez, 1989). En cuanto al cultivo de Hongos Silvestres Comestibles (HSC) es una actividad que se comenzó a desarrollar desde hace más de doscientos años en Europa con el cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus*) y en Asia desde hace más de mil años (Chang y Miles, 2004) con el cultivo de shiitake (*Lentinula edodes*) y oreja de negro (*Auricularia* spp.) (Rodríguez, 2007).

Actualmente en el mundo, se han estudiado para fines de cultivo, alrededor de 200 especies, de las cuales aproximadamente 60 se cultivan comercialmente y cerca de 10 se cultivan a escala industrial (Martínez-Carrera *et al.*, 2010). Las 10 especies cultivadas más populares a nivel mundial son *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fusciformis*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota nameko* y *Grifola frondosa*. En años recientes, también se ha desarrollado el cultivo de otras especies de hongos comestibles, como *Hericium erinaceus*, *Dictyophora indusiata*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Lepista nuda*, *Agrocybe cylindracea* y *Pleurotus citrinopileatus* (Chang y Miles, 2004).

En 2011, la producción comercial en México se estimó en 62,374 toneladas anuales de hongos comestibles, funcionales y medicinales, frescos y procesados. México es el mayor productor de Latinoamérica y cuenta con los desarrollos tecnológicos más avanzados, ya que genera

alrededor del 80.8 % de la producción total de esa región, seguido por Brasil (7.7 %) y Colombia (5.2 %), ubicándose como el 13° productor a nivel mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 500,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer los ciclos de cultivo, las condiciones óptimas y los sustratos más adecuados para la producción de cuerpos fructíferos de dos especies de hongos comestibles silvestres: *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*; a partir de cepas nativas del Nevado de Toluca.

Objetivos específicos

1. Diversificar el germoplasma de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia* para determinar las cepas viables en el cultivo de ambas especies.
2. Determinar la influencia de la fermentación líquida y sólida con dos medios de cultivo para la producción de biomasa y velocidad de crecimiento de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*.
3. Evaluar la influencia del inóculo (líquido y sólido) en la colonización del sustrato y producción de cuerpos fructíferos para *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*.
4. Determinar el tipo de sustrato y parámetros ambientales adecuados para la producción de cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia* mediante la eficiencia biológica, tasa de producción y análisis bromatológico de los cuerpos fructíferos.
5. Determinar la capacidad de biodegradación de hemicelulosa, celulosa y lignina que tienen ambas especies en diferentes sustratos para fructificación.
6. Establecer los períodos de incubación y fructificación para el cultivo de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es considerado como uno de los 12 países megadiversos de gran interés biológico y etnográfico; en su territorio se localiza el 10% de todas las especies terrestres del planeta (González, 2003). En cuanto a la diversidad fúngica, se estima que existen cerca de 200,000 especies de hongos, de las cuales únicamente el 3.5% han sido descritas (7,000 especies) (Guzmán, 1998). Al poseer México un vasto potencial genético, una enorme tradición micófaga y el resguardo de aproximadamente 663 cepas de hongos silvestres, ofrece amplias posibilidades de diversificar a las especies cultivadas comercialmente, utilizando especies nativas. Al aprovechar cepas nativas, se cuenta con los organismos fisiológicamente adaptados a determinados sustratos y condiciones ambientales que proporcionan la variación genética necesaria para potencializar las características deseables (Salmones y Mata, 2012).

Sin embargo, pese a este panorama; no más de cinco especies se cultivan en México a escala comercial y la experimentación sobre nuevas especies es relativamente reciente y escasa (Garibay-Orijel *et al.*, 2010). La incorporación de nuevos cultivos requiere investigación que involucre su recolecta, caracterización, identificación, conservación de germoplasma, cultivo *in vitro*, identificación de tipos de sustratos y de condiciones ambientales adecuadas para su fructificación y, finalmente, descripción de los ciclos de cultivo.

En el Nevado de Toluca se han reportado 77 especies de Hongos Comestibles Silvestres (HCS). Algunas de ellas con alto potencial de cultivo, por ser saprobias y apreciadas localmente para autoconsumo; o bien, con importancia culinaria y económica en los mercados regionales (Franco-Maass *et al.*, 2012). Las especies con mayor importancia cultural son micorrízicas, lo que dificulta su cultivo, en comparación con las saprobias.

En un estudio previo a este, se aislaron ocho especies de hongos comestibles silvestres, de los cuales únicamente se obtuvieron cepas de cinco (*Psathyrella spadicea*, *Floccularia* aff. *luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* aff. *shimeji*). *Flammulina mexicana* (hongo de jara) y *L.* aff. *shimeji* (clavitos) fueron las que presentaron mejor desarrollo *in vitro* y potencial de ser llevadas a cultivo (Arana-Gabriel *et al.*, 2014).

A pesar de que *Flammulina mexicana* es un hongo comestible en localidades aledañas al Nevado de Toluca, este no es uno de los de mayor importancia cultural. Sin embargo, su valor radica, en que está relacionado filogenéticamente con *F. velutipes*; especie que ocupa el quinto lugar

en producción a nivel mundial, siendo China, Corea, Japón y Taiwán sus principales productores. Si bien *F. velutipes* no es producida en México, existen cepas en resguardo y escasas investigaciones sobre su cultivo.

Los hongos del genero *Lyophyllum* son ampliamente valorados tanto para autoconsumo como para venta en mercados regionales. En cuanto al cultivo de las especies de *L. secc. Difformia* en México, únicamente con *L. decastes* se han realizado trabajos dedicados a obtener fructificaciones, obteniendo resultados exitosos; en el caso de *L. shimeji* no se cuentan con estudios de su cultivo. Sin embargo, en países como Japón y China ha sido cultivado en medio sintético, sin haber colonizado las raíces del hospedero, a pesar de ser un hongo ectomicorrízico. Al desconocerse el cultivo de especies de *Lyophyllum* secc. *Difformia* y *F. mexicana* para México, es importante definir sus parámetros de cultivo, rendimientos en diferentes sustratos y la viabilidad de diferentes cepas nativas. El cultivo de estas especies puede ser incorporado a las comunidades aledañas al Nevado de Toluca para formar parte de una alternativa de aprovechamiento sustentable que proporcione una remuneración económica, así como una fuente de alimento a sus pobladores; al ser ellos quienes extraen hongos silvestres a gran escala con fines económicos y alimentación.

JUSTIFICACIÓN

Flammulina mexicana y *Lyophyllum secc. Difformia* son especies silvestres valoradas por la población en comunidades rurales, por ser una fuente de ingreso y alimento durante la temporada de lluvia. Ambas especies pueden formar parte de las prácticas de cultivo de las personas que viven en comunidades rurales, y ser utilizadas como una alternativa alimenticia (autoconsumo) y/o económica (venta), mediante la producción de cuerpos fructíferos en condiciones de invernadero.

La incorporación de ambas especies como nuevos cultivos, requiere de llevar a cabo prácticas de cultivo experimental; las cuales incluyan investigaciones acerca de su identificación, cultivo *in vitro*, tipos de sustratos y condiciones ambientales bajo las cuales se obtengan fructificaciones, ciclos de cultivo y la viabilidad de diferentes cepas. Este conjunto de conocimientos, permitirá marcar las pautas, bajo las cuales trabajar para desarrollar técnicas de cultivo adecuadas para cada especie, reducir costos en la producción y obtener una alta eficiencia biológica.

Al utilizar cepas silvestres y nativas de la región, se busca resaltar el potencial genético, empleando cepas de especies de importancia cultural que promuevan una mayor demanda e interés por el consumo de hongos, permitiendo satisfacer además el desarrollo y las necesidades comunitarias. Así como aprovechar los recursos locales, entre ellos, los desechos agrícolas, forestales o agroindustriales y condiciones ambientales específicas que requiere cada especie. Esta implementación traería consigo, reducir la dependencia de cepas extranjeras, diversificar el número de especies ya cultivadas, desarrollar métodos novedosos de cultivo a partir de la tecnología que se tenga disponible y obtener alimentos con alto valor nutritivo, con propiedades funcionales y medicinales. El cultivo de hongos silvestres además contribuye al resguardo del germoplasma y a la conservación de especies, no solo de interés comercial, sino también de importancia ecológica.

HIPÓTESIS

1.- La producción de cuerpos fructíferos en el cultivo de hongos, está relacionado directamente con las cepas utilizadas; por lo tanto, las cepas que presenten mayor velocidad crecimiento y mayor producción de biomasa en cultivo *in vitro*, desarrollarán una mayor eficiencia biológica, tasas altas de producción y ciclos de cultivo cortos.

2.- La producción de cuerpos fructíferos y la velocidad de crecimiento miceliar en la colonización de los diferentes sustratos empleados para cultivo de hongos; depende de si el inóculo utilizado es sólido o líquido.

METODOLOGÍA

Se obtuvieron cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* secc. *Difformia* a partir de un muestreo dirigido a diferentes sitios de vegetación secundaria de *Senecio cinerarioides* y bosque de *Abies religiosa* en el Parque Ecológico Ejidal de Cacalomacán y en la localidad de Agua Blanca, ambos sitios dentro del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. Las recolectas se llevaron a cabo cada 15 días durante los meses de junio a octubre de 2014 y 2015. Los cuerpos fructíferos se caracterizaron y herborizaron de acuerdo a Cifuentes *et al.* (1986) y se determinaron conforme a Franco *et al.* (2012). En la figura 1, se muestra el esquema general de trabajo propuesto en esta investigación. El esquema va desde la obtención y caracterización de cepas, medios de cultivo utilizados para cada especie, producción de inóculo, evaluación de crecimiento micelial en diferentes sustratos, hasta los bioensayos de fructificación; incluyendo las principales variables medidas durante cada etapa. La descripción detallada de la metodología se encuentra en cada uno de los artículos que forman parte de los resultados.

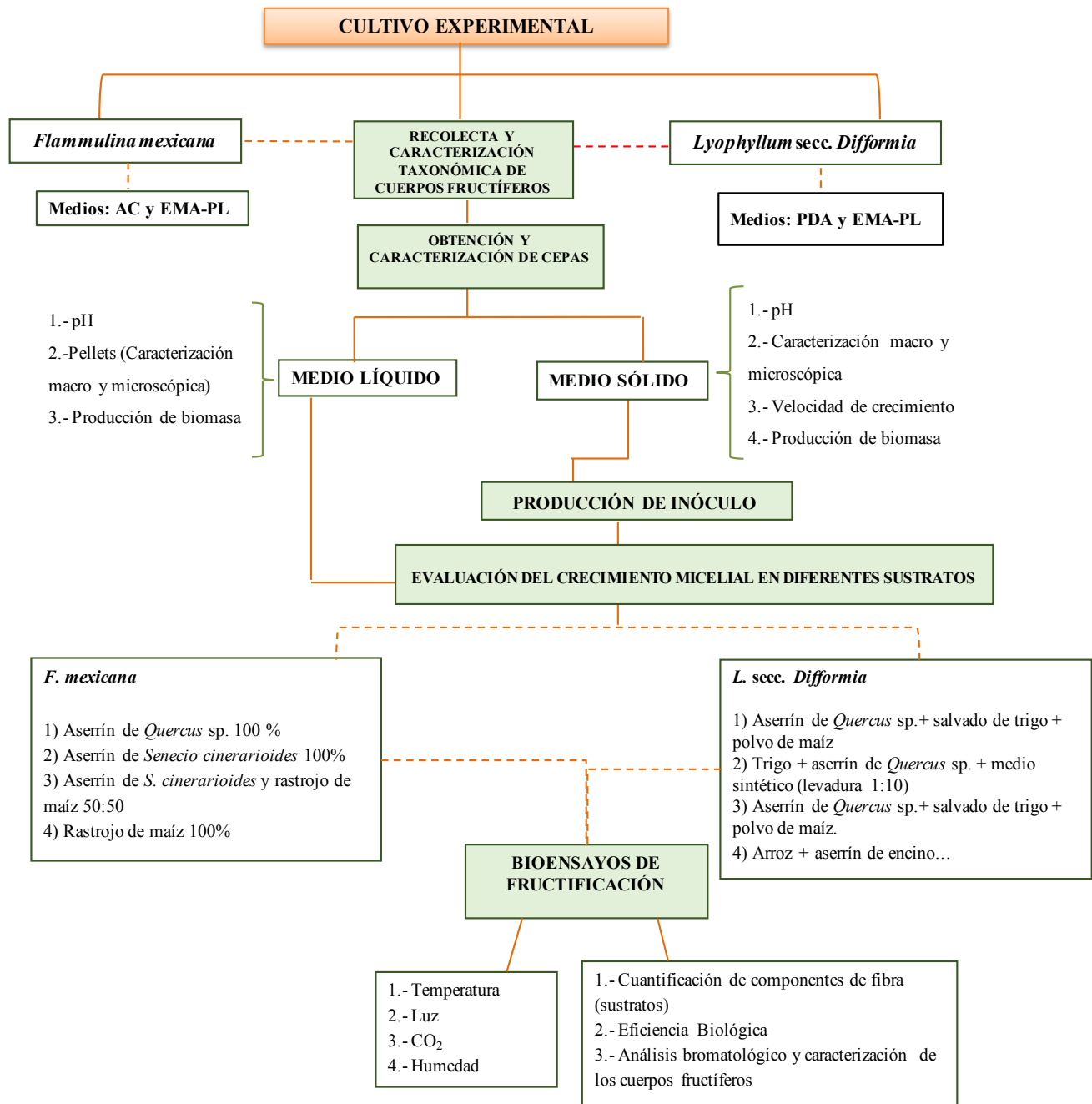


Fig. 1 Esquema general de la metodología, desde la obtención de cepas a la producción de cuerpos fructíferos. AC) Agar Croquetas, EMA-PL) Agar Extracto de Malta-Peptona y Levadura, PDA) Agar Papa Dextrosa

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación se presentan en tres capítulos, la segunda y tercera sección se presenta en formato de tres artículos, los cuales fueron enviados a Revistas Científicas para su revisión y posible publicación (en cada caso se incluye la carta de aceptación o de envío).

CAPÍTULO I. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES: *Flammulina mexicana* Y *Lyophyllum* sección *Difformia*.

CAPÍTULO II. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Flammulina mexicana*.

Artículos:

1.- Experimental cultivation of *Flammulina mexicana*: a species endemic to the high mountains of Mexico. Enviado al World Journal of Microbiology and Biotechnology. Artículo enviado al World Journal of Microbiology and Biotechnology.

2.- Colonización miceliar de *Flammulina mexicana* a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales. Artículo enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.

CAPÍTULO III. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Lyophyllum* secc. *Difformia*.

Artículo:

3.- Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains from wild edible mushrooms of *Lyophyllum* of Central Mexico. Artículo aceptado para su publicación en el Brazilian Journal of Microbiology.

El resto de los resultados se presentan en la sección: Bioensayos de fructificación de cepas nativas de *Lyophyllum* secc. *Difformia* de alta montaña de México.

En el apartado de Anexos se presentan imágenes relacionadas a los cultivos que no fueron incluidas en los artículos.

ANEXO 1. Cuerpos fructíferos y cepas de *Lyophyllum* secc. *shimeji* y *Flammulina mexicana*.

ANEXO 2. Sustratos colonizados por *Flammulina mexicana*.

ANEXO 3. Desarrollo de cuerpos fructíferos de *F. mexicana* durante días 15 días, desde la formación de primordios hasta su maduración.

NEXO 4. Cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana*, silvestres y cultivados.

NEXO 5. Ciclo de cultivo de *Flammulina mexicana*.

ANEXO 6. Ciclo de cultivo de *Lyophyllum* secc. *Difformia*.

ANEXO 7. Carta de resguardo de cepas.

ANEXO 8. Informe de análisis bromatológico de cuerpos fructíferos cosechados de *Flammulina mexicana*.

CAPÍTULO I.

DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES:

Flammulina mexicana Y *Lyophyllum* secc. *Difformia*

Flammulina mexicana Redhead, Estrada & R.H. Petersen

Características macroscópicas: El píleo mide en promedio 4.0 cm de diámetro, es de forma acampanulada cuando se encuentra en un estado juvenil y plano-convexa al madurar, amarillo; la orilla es más clara que el centro, tiene consistencia viscosa cuando se moja y margen estriado-crenulado. Las láminas se encuentran libres del estípite, poco separadas entre sí, ventricosas y de color amarillo. El estípite mide de 3.0 a 8.0 cm de longitud y de 2.0 a 6.0 mm de diámetro; es cilíndrico, hueco, cartilaginoso, de color anaranjado o amarillo pálido; en sus etapas maduras la base es más oscura, casi café (Figura 2).



Fig. 2 Cuerpos fructíferos silvestres de *F. mexicana*, recolectados en cuatro sitios diferentes. a,b,c) Cacalomacán, d) cuerpos fructíferos recolectados en Agua Blanca, Zinacantepec, del cual se obtuvo la cepa IE-974 (F.M-1).

Características microscópicas: Los basidios miden (30.0-40.0) 32.5 x 6.6 (5.2-8.5) μm , tienen forma clavada y son tetraesterigmáticos. Las basidiosporas miden (7.0-8.5) 7.5 x 5.0 (5.0-6.0) μm , son elípticas, hialinas y lisas (Figura 3).

Especie saprobia de *Senecio cinerarioides* en bosque de alta montaña, fructifica durante los meses de junio a agosto, reproducción sexual de tipo heterotálico bifactorial (Redhead, 2000).

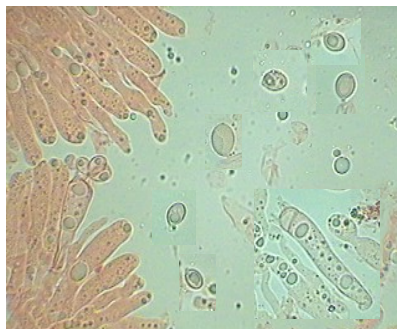


Fig. 3 Basidios y basidiosporas de *F. mexicana* en Rojo Congo a 100x

***Lyophyllum* sección *Difformia* (Fr.) Kühner**

Los ejemplares recolectados, taxonómica y molecularmente corresponden a *Lyophyllum decastes* s.l, especie dentro de la sección *Difformia*. Larsson y Sundberg (2011) mencionan que las especies que se encuentran dentro de esta sección son muy similares morfológicamente, por lo que los análisis filogenéticos sugieren que la ecología es un carácter importante para diferenciar entre especies. La sección *Difformia* esta integrada por *L. connatum*, *L. decastes*, *L. fumosum* y *L. loricatum*; la sección se caracteriza por tener un crecimiento cespitoso y los cuerpos fructíferos no se ennegrecen (Kalamees, 2004; Sesli, 2015). Fructifican en pastizal y en bosque de pino (Sesli, 2015). Dado que los ejemplares recolectados presentaron características morfológicas variadas entre ellos, pero que corresponden a la misma especie; su caracterización se describe a continuación por separado.

***Lyophyllum* sp. 1 (cepa IE 975)**

Características macroscópicas: El píleo mide de 2.5 a 6.0 cm de diámetro, es de convexo a plano-convexo con margen incurvado y lobulado, su superficie es lisa y su color va de café oscuro a café grisáceo. Las láminas se encuentran adheridas al estípite, son ligeramente decurrentes, con borde ondulado, juntas; su color varía de blanco a crema conforme maduran. El estípite mide de 3.0 a 9.0 cm de longitud y 2.0 cm de diámetro, tiene forma cilíndrica con la parte inferior más delgada, ligeramente sinuoso, seco y de color crema a café (figura 4a).

Características microscópicas: Los basidios miden (23-34) 29 x 6.4 (5-8) μm , tienen forma clavada con gúttulas y son tetraesterigmáticos. Las esporas miden de 4 (3-5.6) x 3.8 (3.1-6) μm , son redondas o casi redondas, lisas e hialinas (figura 4b).

Es considerada como una especie ectomicorrizógena de *Pinus* sp. (Yamanaka, 2008), fructifica durante los meses de junio a agosto. Se encontró en la localidad de Agua Blanca (Zinacantepec, Toluca Edo. de México). Tipo de reproducción sexual: heterotálico bifactorial.

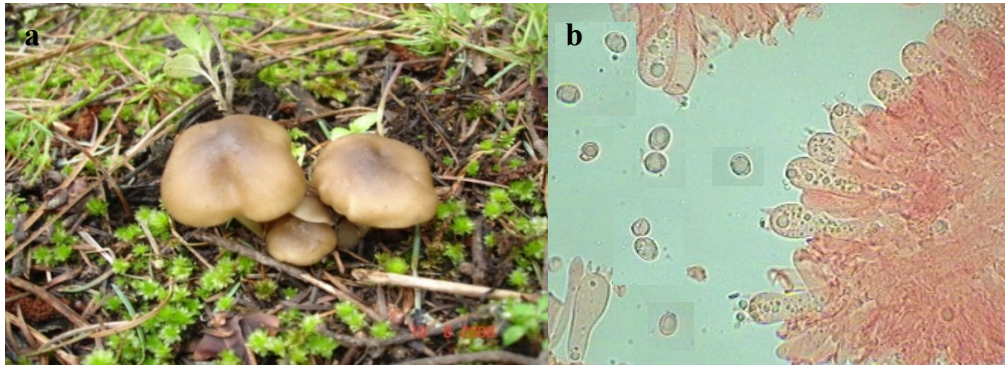


Fig. 4 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 1, b) basidios y basidiosporas en Rojo Congo a 100x.

Lyophyllum sp. 2 (cepa IE 981)

Caracterización macroscópicas: El píleo mide 2.3-9 cm, es convexo, con margen liso e incurvado de color crema-grisáceo. Las láminas se encuentran adheridas al estípite, muy juntas y de color blanco a grisáceo conforme maduran. El estípite mide de 5.6 x 1.0 cm, es de forma cilíndrica, liso y de color blanco (figura 5a).

Caracterización microscópicas: Presencia de fíbulas. Los basidios miden 34.9 (31-36) x 5.7 (5-6.5) μ tienen forma clavada, con presencia de gránulos o gotas de aceite. Las esporas miden 5.5 (5-6.5) x 3.8 (3.1-4.6) μ m, son lisas e hialinas y con gránulos o gotas de aceite (figura 5b-c).

Especie saprobia en bosque *Pinus moctezumae*, fructifica durante los meses de junio a agosto. Se encontró en la localidad de Cacalomacán (Zinacantepec, Toluca Edo. de México). Tipo de reproducción sexual: heterotálico bifactorial

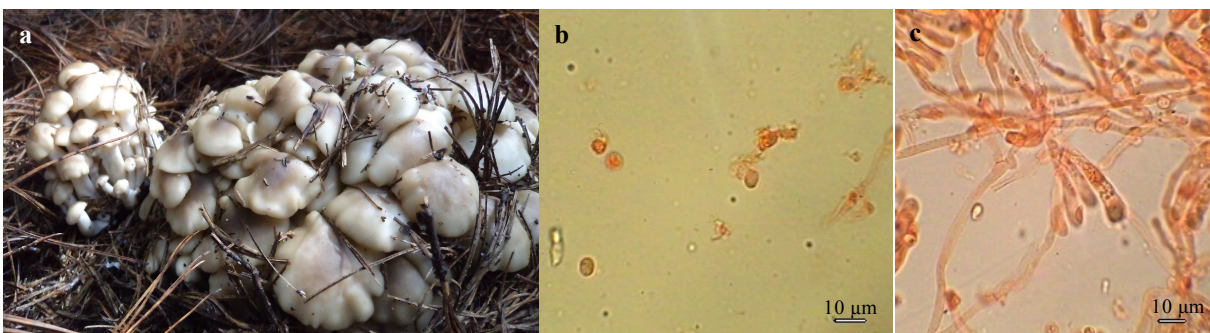


Fig. 5 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 2, b) basidiosporas c) basidios en Rojo Congo a 100x.

***Lyophyllum* sp. 3** (MEXU 28148, cepa IE 982)

Caracterización macroscópicas: El píleo mide 2-9 cm, es convexo, con margen liso, lobulado e incurvado y color café. Las láminas se encuentran muy juntas, libres a ligeramente adheridas al estípite y de color blanco. El estípite mide 3.2 x 1.3 cm, tiene forma cilíndrica, es ligeramente estriado y de color blanco (figura 6a).

Caracterización microscópicas: Presencia de fibulas. Los basidios miden 38.6 (36-42) x 6.2 (3.4-5.5) μm , son clavados con gránulos o gotas de aceite. Las esporas miden 5.9 (4.9-7) x 3.8 (5.3-7) μm , son lisas e hialinas con gránulos o gotas de aceite (figura 6b-c).

Especie saprobia de vegetación secundaria, fructifica durante los meses de junio a agosto. Se encontró en la localidad de Cacalomacán (Zinacantepec, Toluca Edo. de México). Tipo de reproducción sexual: heterotálico bifactorial.

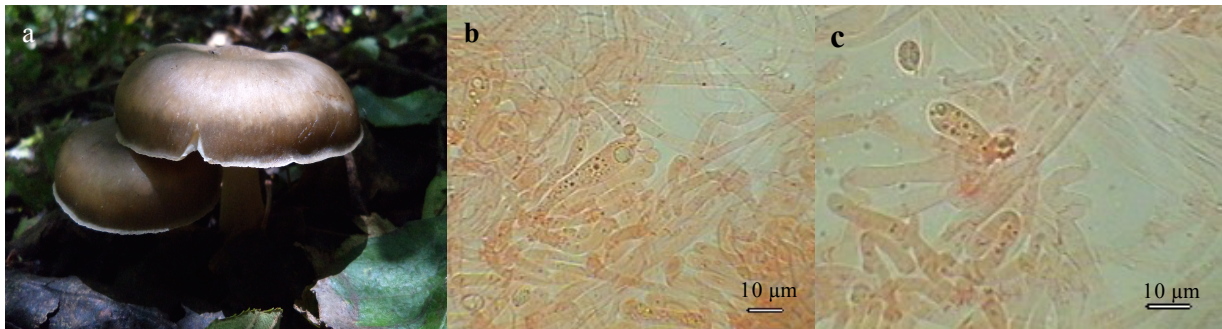


Fig. 6 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* sp. 3, b) basidios, c) basidiosporas en Rojo Congo a 100x.

Lyophyllum* aff. *shimeji (Kawam.) Hongo (1971) (MEXU 28149, cepa IE 983)

Caracterización macroscópicas: El píleo mide 1.9-7 cm es convexo, la superficie es lisa, con margen incurvado a plano de color café oscuro a café grisáceo. Las láminas se encuentran libres del estípite, juntas y son de color blanco a crema. El estípite mide 7-6 x 0.9-2 cm, es de forma cilíndrica, con superficie fimbrada, contexto fibroso-cartilaginoso y de color blanco-crema (figura 7a).

Caracterización microscópica: Presencia de fibulas. Los basidios miden 32 (30.4-34.6) x 6.5 (5.4-7.3) μm , son clavados con gránulos o gotas de aceite (figura 7b). Las esporas son subglobosas de 6.2 (4.5-7) x 3.8 (3.4-4.2) μm , son lisas e hialinas y con gránulos o gotas de aceite (figura 7c).

Especie saprobia en bosque de *Pinus* sp., fructifica durante los meses de junio a agosto. Se encontró en la localidad de Coatepec Harinas (Zinacantepec, Toluca Edo. de México). Tipo de reproducción sexual: heterotálico bifactorial.

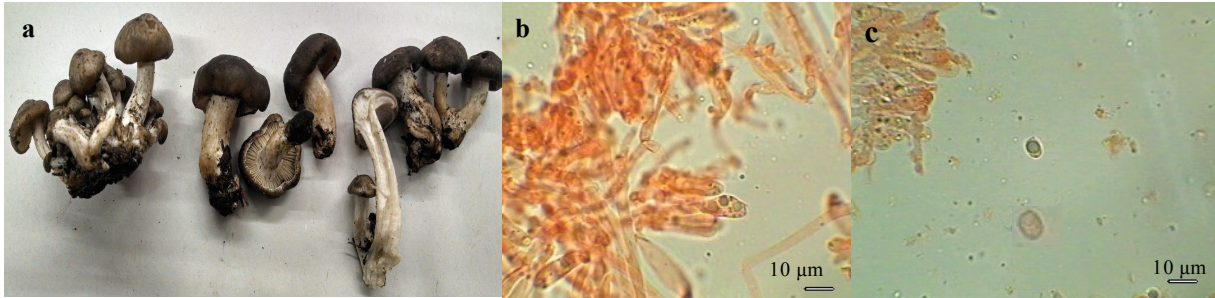


Fig. 7 a) Cuerpos fructíferos de *Lyophyllum*. aff. *shimeji*, b) Basidios, c) Basidiosporas en Rojo Congo a 100x.

CAPÍTULO II.

CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Flammulina mexicana*

CAPÍTULO II. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Flammulina mexicana*

Artículo 1. Experimental cultivation of *Flammulina mexicana*: a species endemic to the high mountains of Mexico. Enviado al World Journal of Microbiology and Biotechnology.

WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY
 Editorial Manager
 Role: Author Username: C.Burrola-Aguilar
 HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions Being Processed for Author Cristina Burrola-Aguilar, Ph. D.
 Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	WIBI-D-18-00046	Experimental cultivation of <i>Flammulina mexicana</i> : a species endemic to the high mountains of Mexico	16 Jan 2018	16 Jan 2018	New Submission

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

World Journal of Microbiology and Biotechnology
Experimental cultivation of *Flammulina mexicana*: a species endemic to the high mountains of Mexico
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Experimental cultivation of <i>Flammulina mexicana</i> : a species endemic to the high mountains of Mexico
Article Type:	Original Article
Keywords:	native strains; liquid spawn; maize stubble; fruit bodies; hemicellulosa
Corresponding Author:	Cristina Burrola-Aguilar, Ph. D. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Toluca, Estado de México MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Yolanda Arana-Gabriel, Master in Science
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Yolanda Arana-Gabriel, Master in Science Cristina Burrola-Aguilar, Ph. D. Sergio Franco-Maass, Ph. D. Gerardo Mata, Ph. D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (SIEA 3687/2014/CIA) Dr. Cristina Burrola-Aguilar
Abstract:	<p><i>Flammulina mexicana</i> is a fungus species endemic to high mountains and has potential for commercial cultivation. Four strains were isolated from wild fruit bodies. There were no morphological differences among these strains; however, the choice of culture media did produce differences. Growth rate was greatest in strains IE 974 and IE 986 at 0.65 cm/day and these strains also presented the highest biomass production at 6.9 and 7.7 g/l, respectively; with a period of 35 days in production with solid spawn and 20 days with liquid spawn. All the four strains have the capacity fructify in agricultural and forestry wastes. Strains IE 986 and IE 974 presented greater biological efficiency, at 34.5% and 31.9% respectively, with maize stubble as a substrate. Nutritional analysis of the fructifications obtained showed a high percentage of fiber (52.51%) and low carbohydrate content (9.03%). For this reason, culture of these species represents an alternative for its ex situ conservation and use.</p>

EXPERIMENTAL CULTIVATION OF *Flammulina mexicana*: A SPECIES ENDEMIC TO THE HIGH MOUNTAINS OF MEXICO

Yolanda Arana-Gabriel^{1ab}, Cristina Burrola-Aguilar^{1cd*}, Sergio Franco-Maass^{2ef}, Gerardo Mata^{3gh}

¹Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. km 14.5, carretera Toluca-Atlacomulco. C. P. 50200. Toluca, Estado de México. MÉXICO.

^aagy-arana@hotmail.com, ^borcid.org/0000-0002-7539-365X, ^ccba@uaemex.mx, ^dorcid.org/0000-0003-3499-8668

*Correspondent author. cba@uaemex.mx. Tel.: +52 (722) 2 96 55 53

²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas. Toluca, Estado de México. MÉXICO. ^esfrancom@uaemex.mx, ^forcid.org/0000-0002-3512-130X

³Instituto Nacional de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, C. P. 91070. Veracruz, MÉXICO. ^ggeramata@gmail.com, ^hforcid.org/0000-0003-1646-7003

Abstract

Flammulina mexicana is a fungus species endemic to high mountains and has potential for commercial cultivation. Four strains were isolated from wild fruit bodies. There were no morphological differences among these strains; however, the choice of culture media did produce differences. Growth rate was greatest in strains IE 974 and IE 986 at 0.65 cm/day and these strains also presented the highest biomass production at 6.9 and 7.7 g/l, respectively; with a period of 35 days in production with solid spawn and 20 days with liquid spawn. All the four strains have the capacity fructify in agricultural and forestry wastes. Strains IE 986 and IE 974 presented greater biological efficiency, at 34.5% and 31.9% respectively, with maize stubble as a substrate. Nutritional analysis of the fructifications obtained showed a high percentage of fiber (52.51%) and low carbohydrate content (9.03%). For this reason, culture of these species represents an alternative for its *ex situ* conservation and use.

Key words: native strains, liquid spawn, maize stubble, fruit bodies, hemicellulosa

Introduction

In Mexico, 371 species of wild mushrooms are consumed (Garibay-Orijel and Ruan-Soto 2014); however, not more than five of these species are cultivated at commercial scale and experimentation with new cultures is both relatively recent and rare (Garibay-Orijel et al. 2010). Wild mushrooms represent a very important biological and genetic resource that offers great potential for the cultivated mushroom productive sector. They are organisms that develop in given substrates and environmental conditions; which provides the genetic variation necessary to produce the characteristics desired by the commercial sector. Given their importance to the ecosystem and high economic potential, exploitation of wild mushrooms requires sustainable management in order to guarantee conservation of the wild germplasm (Salmones and Mata 2012).

Cultivation of new species of wild mushrooms represents a strong potential for the preservation of traditional knowledge and acquisition of new genes and functional properties (Morales et al. 2010). Cultivation of species valued by regional populations helps to promote their consumption and commercialization, ensuring the commercial viability of new businesses. These mushroom cultures can be an alternative for the reduction of contamination caused by organic agricultural, forestry or agro-industrial wastes, converting them into nutritious foods (Omarini et al. 2009) and contributing to solving problems such as food insufficiency. In the long-term, these regional species can broaden their geographic influence through increasing the number of people interested in trying new mushrooms (Garibay-Orijel et al. 2010). One example of this is the species *Flammulina mexicana* Redhead, Estrada & R.H. Petersen, commonly known as “hongo de jara”; the consumption of which has been documented in five locations of the Nevado de Toluca, Mexico (Franco et al. 2012) and mentioned within the 20 species of mushrooms of greater cultural importance according to the traditional knowledge generated from research carried out in the area. In addition, it has already been tested in an *in vitro* culture from a wild strain (Arana-Gabriel et al. 2014). This species is endemic to the high mountains (Hughes et al. 1999; Redhead et al. 2000), grows at elevations above 2700 m, at temperatures below 18 °C (Redhead et al. 2000; Franco et al. 2012; Arana-Gabriel et al. 2014). It presents sexual reproduction of the bifactorial heterothallic type (Redhead et al. 2000) and is saprobic in habit, fructifying on the “jara” (*Senecio cinerarioides* A. Rich.), a shrub that grows in high

mountain forests.

The genus *Flammulina* is considered cosmopolitan in deciduous forests and tolerant to low temperatures, for which reason it is recognized as a winter mushroom. *Flammulina velutipes* is the best-known species of the genus. This is one of the most cultivated mushrooms of the world, due to its nutritional value and its therapeutic use (antitumoral activity and immunomodulatory and antibiotic properties) (Chang and Miles 2004; Sharma et al. 2008).

Given that *F. mexicana* is a species with potential for cultivation, and the advantages that the incorporation of new regional mushrooms cultivation has; the objective of the present investigation was to determine and evaluate the strains, type of spawn, substrates and environmental conditions to produce fructifications of *F. mexicana* at the level of experimental cultivation.

Materials and Methods

Collection and characterization of fruit bodies

Fruit bodies were collected from a sample directed to different secondary vegetation sites of *Senecio cinerarioides* en from the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area in Mexico. Voucher specimens were deposited in the fungal collection of the Herbario Nacional de México, at the Instituto de Biología of the UNAM (MEXU), under the following registry numbers: 27411, 28146, 28150, 28151.

Acquisition and characterization of strains

Strains of *F. mexicana* were obtained from mushrooms from different shrubs de *S. cinerarioides* by vegetative isolation in dog food agar (DFA) medium, for subsequent incubation at 18 °C in darkness. Tissue fragments were submerged in oxygenated water for 30 minutes and washed with sterile distilled water in order to avoid contamination of the samples. The strains obtained were deposited in the ceparium of the Instituto de Ecología (INECOL) in Xalapa, Veracruz, Mexico, with the keys: IE 984, IE 985, IE 986 and evaluated together with the strain IE 974 of *F. mexicana* that had been obtained in a previous study (Arana-Gabriel et al. 2014). The sequences of each strain were also deposited in GenBank under the accession numbers: KY794659, KY794660, KY794661

and KY794662.

Once the mycelium had completely invaded the Petri dish, macroscopic characterization was conducted, based on Cruz-Ulloa (1995) and using the color key “HTML Color Codes” (html-color-codes.info/). For the microscopic characterization, temporary preparations were made with 10% Congo Red in order to verify the presence of clamps and the diameter of the hyphae was measured at 100x (20 hyphae per treatment) using the program Motic digital Microscope DMB3-223 (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004).

Evaluation of the strains

Growth rate in solid médium

With a borer, 5 mm diameter samples were removed from the agar containing mycelium and placed in the center of Petri dishes (9 cm in diameter) in the two culture media. One non-conventional medium: DFA (15 g of agar, 15 g of dog croquettes of the brand GANADOR[®], 2 g of yeast extract, 1 g of gelatin peptone in one liter of distilled water) (Stamets 2000; Arana-Gabriel et al. 2014) and one conventional medium: malt extract agar with added peptone and yeast (MEA-PY) (31.9 g of malt extract agar, 2 g of yeast extract, 1 g of gelatin peptone in one liter of distilled water). The strains were incubated in darkness at 18 °C. Strain diameter was measured every third day with a Vernier (metal vernier caliper 5” Pretul[®], ver-6p, China). The growth rate (GR) was obtained using the equation of Huerta et al. (2009) $GR = (Fd - Id) / (Ft - It)$ (where “Fd” is the final diameter of growth, “Id” is the initial diameter of growth and “Ft-It” is the duration of the period of mycelial growth in days). Five replicates were conducted per treatment and strain.

Biomass production in solid médium

Once the incubation period of the strains was over, the agar of the samples was eliminated by immersion in boiling water. The mycelium was recovered, filtered and rinsed with hot water. It was then oven-dried at 80 °C for 24 hours and weighed to obtain the dry biomass (Arana-Gabriel et al. 2014).

Biomass production in liquid medium

One hundred ml of the dog food medium with peptone and yeast (DF-PY) and malt extract with peptone and yeast (ME-PY) were placed in 250 ml Erlenmeyer flasks (five replicates per treatment). The media inoculated with 0.5 cm in diameter of mycelium were incubated in darkness for 20 days at 18 °C and at 120 rpm in a water bath with agitation (PolyScience®).

At the end of this incubation period, the pH of the medium was measured and the mycelium filtered and left to dry at 80 °C for 24 hours prior to weighing.

All the culture media of the different treatments were sterilized in an autoclave at 121 °C, 15 lb psi for 15 minutes and 0.05 g of Chloramphenicol (SIGMA®) added as an antibiotic.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the program Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009), for the evaluation of the strains, the data are applied to a multivariate analysis of variance (MANOVA) in order to determine whether the interaction between the strains and the culture media affect of the growth and/or biomass production. In addition, a correlation analysis was performed between the biomass production and the growth rate in solid medium.

For the biological efficiency and fruit bodies size in the fruiting bioassay, an analysis of variance (ANOVA) was performed; and the significant differences for both analyzes were determined with a Tukey multiple rank test ($P \leq 0.05$).

Solid spawn

Wheat seeds were subjected to a process of cleaning, washing and hydration for 24 hours, then boiled for ten minutes. Once drained, 200 g were weighed and slaked lime [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] (3.5 g of slaked lime per kg of seeds) added. The seeds were then placed in flasks (five replicates per treatment) for sterilization in an autoclave at 121 °C, 15 lb psi for 1 hr (Guzmán et al. 2013). Once the flasks had cooled, the seeds were inoculated with three 1 cm²

fragments of mycelium from the four strains developed in the two media (DFA and MEA-PY); with a factorial design of 4 x 2 x 5 (4 strains, 2 culture media, 5 replicates). For the secondary spawn, wheat seeds were subjected to the procedure described above and inoculated with five percent of the primary spawn.

Liquid spawn production

The same procedure described for biomass production in a liquid medium was followed; following 20 days in agitation, the pellets were washed and homogenized in a liquidizer for 10 s with 100 ml of sterile distilled water (Stamets, 2000).

Fructification bioassays production

Four different formulations were used as substrates: 1) *Quercus* sp. sawdust 100 % (QS), 2) *S. cinerarioides* sawdust 100% (SSC), 3) *S. cinerarioides* sawdust with maize stubble 50:50 (SSC+MS) and 4) Maize stubble 100% (MS). The different combinations of substrates were hydrated to 70% and slaked lime [Ca(OH)₂] (0.1%) and gypsum (CaSO₄) (0.1%) added. Two kg of each of the four combinations of substrates were placed in Polypaper bags REYMA^{M.R.} with a factorial design 4 x 4 x 2 x 5 (4 strains x 4 substrates x 2 spawn types x 5 replicates). The substrates were sterilized for two hours at 121 °C and 15 lb psi for 15 in an autoclave. Once the bags had cooled, they were inoculated with 5% (based on the substrate moist weight) of solid or liquid spawn. For inoculation with the seeds, an orifice was made in the center of the substrate in which the spawn was placed and for inoculation with liquid, sterile 60 ml syringes were used. The bags were incubated at 18 °C in darkness, until the mycelium had invaded the substrate. They were then placed in a fructification chamber, under the following conditions: incubation temperature of 18 °C (Thermo-hygrometer Vaisala[®]), relative humidity of 90-100% (humidifier Vitallys Plus[®]), 70-100 lux of light (luxometer BK Precision[®]) and an exchange of fresh air for one hour twice a day.

Characterization of harvested fruit bodies

Once the mature fruit bodies were obtained, the Biological Efficiency (BE) was determined using the equation $BE = \text{fresh weight of harvested fungi} / \text{dry weight of the substrate used} \times 100$ (Guzmán et al. 2013). The fruit bodies were characterized macro- and micro-morphologically and compared with those collected in the field. A bromatological analysis of the cultivated mushrooms was conducted; moisture content was calculated based on NOM-116-SSA1-1994 (Norma Oficial Mexicana, 1995), ash content based on NMX-F-607-NORMEX-2013 (Norma Oficial Mexicana, 2013), fat content based on NMX-F-615-NORMEX-2004 (Norma Oficial Mexicana, 2004), protein content (factor 6.25) based on NMX-F-608-NORMEX-2011 (Norma Oficial Mexicana, 2014), raw fiber content based on NMX-F-613-NORMEX-2003 (Norma Oficial Mexicana, 2003) and carbohydrate content by calculation.

Quantification of substrate fiber components

Quantification of fiber components (cellulose-hemicellulose and lignin) for the different treatments was conducted at three stages: prior to inoculation, at the end of incubation and at the end of final mushrooms production, along with a control without spawn for each substrate. Using the detergent method (Goering and Van, 1970), the fiber was extracted both in neutral detergent (FND) and in acid detergent (FAD). Lignin was determined with sulfuric acid (72%), cellulose content was estimated directly from the FDA-lignin and hemicellulose content was calculated as $FND - FAD$ (Goering and Van 1970). All analyses were conducted in triplicate and the results presented were based on dry material (%).

Results

Acquisition and characterization of strains

The fruit bodies collected belong to the species *F. mexicana*, and were found fruiting on both dead material and live branches of *Senecio cinerarioides*.

In total four wild strains were evaluated, morphologically, no differences were found among these strains but there were differences among the growth patterns observed in the culture media. The mycelium of the four strains in the DFA medium was white in color (#FFFFFF) with uniform growth, fimbriate margin, aerial mycelium, cotton-like texture and a flat surface. In contrast, the mycelium of the strains developed in the medium MEA-PY was light greyish yellow (#F7F8E0) to dark yellow (#B18904) and brown (#61380B) in color, with an irregular shape and prostrate or aerial type growth. Microscopically, the four strains developed hyphae that were branched, septate, smooth and with the presence of clamps. The diameter of the hyphae was similar among strains but differed between culture media; in the DFA medium, the hyphae were slightly thicker [1.9 (1.7-2.7 μm)] than in the MEA-PY medium [1.7 (1.2-2.5 μm)].

Evaluation of the strains

Growth rate in solid médium

According to the statistical analysis, culture medium ($F_{1,39} = 3342.19$, $P < 0.0001$) affected the growth rate, with the mycelium reaching 9 cm in diameter in a maximum of 15 days in the DFA medium, for an average growth rate of 0.65 $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$. This contrasts with the medium MEA-PY, where this value was 0.38 $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$. In addition to the culture medium, strain ($F_{3,39} = 96.04$, $P \leq 0.0001$) was also a factor that affected growth rate, as observed in Table 1. The Tukey multiple ranges test shows that the strains IE 974 and IE 986 presented the highest growth rate, followed by IE 984 and IE 985. However, there was no statistically significant interaction ($F_{3,39} = 2.78$, $P \geq 0.0568$) between the strains and culture media.

Biomass production in solid médium

Biomass production in the solid medium presented significant differences in relation to the strain ($F_{3,39} = 19.85$, $P \leq 0.0001$) and culture medium ($F_{1,39} = 54.64$, $P \leq 0.0001$). There was an interaction ($F_{1,39} = 540$, $P \leq 0.0040$) between these two factors that also affected biomass production. With respect to the Tukey multiple ranges test, biomass production was significantly greater in the medium MEA-PY with the strains IE 984, IE 985 and IE 986 but lower

in the DFA medium (Table 1). In general, the strains that developed the greatest biomass presented a lower growth rate ($r = -0.6134$).

Biomass production in liquid medium

Statistical analysis did not reveal significant differences with respect to the strains ($F_{3,39} = 1.60, P \geq 0.2077$); however, there were differences between culture media ($F_{54,82} = 8.44, P \leq 0.0001$) and no interaction ($F_{3,39} = 0.86, P \geq 0.4718$) between the two factors. The Tukey multiple ranges test revealed that there was greater biomass production in strains IE 984, IE 985 and IE 986 with the medium DF-PY, and lower production in strains IE 974 and IE 984 with the medium ME-PY (Table 1).

The pellets formed in the liquid medium presented a globose form and fimbrose surface. The final pH of the liquid medium in the four strains changed from 6.1 to 6.4 and 6.3 in medium DF-PY and from 5.3 to 5.8 in medium ME-PY.

Table 1. Growth rate and biomass production in four strains of *F. mexicana* (means \pm SD)

Strain	Solid medium		Liquid medium		
	Culture medium	Growth day (cm/day)	Biomass (g/ Petri dish)	Culture medium	Biomass (g/l)
IE974	MEA-PY	0.36 \pm 0c*	0.08 \pm 0.01c	ME-PY	2.3 \pm 0.04c
	DFA	0.65 \pm 0a	0.07 \pm 0.00c	DF-PY	6.9 \pm 0.21ab
IE 984	MEA-PY	0.26 \pm 0.02d	0.18 \pm 0.03a	ME-PY	2 \pm 0.22c
	DFA	0.57 \pm 0b	0.10 \pm 0.00c	DF-PY	8.7 \pm 0.25a
IE 985	MEA-PY	0.29 \pm 0d	0.16 \pm 0.02ab	ME-PY	4.7 \pm 0.28abc
	DFA	0.58 \pm 0.03b	0.10 \pm 0.00c	DF-PY	8.5 \pm 0.27a
IE 986	MEA-PY	0.38 \pm 0.01c	0.18 \pm 0.01a	ME-PY	3.1 \pm 0.18bc
	DFA	0.65 \pm 0a	0.11 \pm 0.04bc	DF-PY	7.7 \pm 0.05a

DFA: Dog Food Agar, MEA-PY: Malt Extract Agar-Peptone and Yeast, DF-PY: Dog Food-Peptone and Yeast, ME-PY: Malt Extract-Peptone and Yeast. *Different letters in the same column indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$).

Inoculation with solid spawn

At the time of preparation of the wheat seeds for primary spawn primary inoculation of the four strains, the moisture

content of the seeds was 77% and the pH was 8.5. In all the treatments, the mycelium was dense, white (#FFFFFF) and presented 100% invasion of the seeds within 20 days. For the production of secondary spawn, the time of colonization was 15 days with dense mycelium and 100% invasion of the seeds.

Fructification bioassay

By day 30 of incubation, strain IE 986 with liquid spawn had invaded 100% of the MS substrate, followed by strain IE 974 within 40 days and the rest of the treatments in 42 days. In the case of strains IE 986 and IE 974 in MS with liquid spawn, the primordia developed in darkness four days after the mycelium invaded the substrate. For the rest of the treatments, fruit bodies formation was induced by removing the bags and leaving the substrate blocks exposed to a relative humidity of 90 to 100%, with continuous light (70-100 lux) for 24 hr per day and exchanges of air for one hour twice per day. When the stipes reached 2 cm in length, a PVC tube of 4.5 cm in length by 11 cm in diameter was placed to facilitate normal development of the fruit bodies, which reached their state of maturation in 15 days. The first harvest was made before the pileus margin began to curve upwards, with an average production of a 100 g per bag. The culture cycles stopped at the end of the third harvest, with a period of 6 days between one and the other harvest for induction of the fruit bodies and 15 days for their maturation.

The strains IE 974, IE 984 and IE 985 with liquid spawn in SSC+MS, and IE 986 in SSC+MS with solid spawn began to form small mushrooms at 13 days after the process of induction; however, these did not mature and therefore their BE was not reported. The rest of the treatments, mainly those with *S. cinerarioides* and *Quercus* sp. sawdust with solid and liquid spawn, presented slow mycelial growth and did not invade completely, which allowed the substrates to become contaminated with *Trichoderma* sp., and those that were invaded did not form mushrooms (IE 984 and IE 986).

The strains presented differences in BE ($F_{6,34}=158.76$, $P \leq 0.0001$); strains IE 974 and IE 986 with MS inoculated with liquid medium presented the highest BE compared to the rest of the strains and treatments, with up to 31.9 and 34.5 %, respectively. Strains IE 986 and IE 985 fructified in MS with solid and liquid spawn; as shown in Table 2, in both cases the liquid spawn is more efficient than the solid spawn, both in terms of fruit bodies production and times of colonization of the substrate. IE 986 was the only strain to fructify in two different substrates (MS and SSC+MS), of which the latter substrate presented the lowest BE (5.8%). In total, the culture

cycle for the strain IE 986 in MS with liquid spawn was 91 days, while for strain IE 974 this was 101 days, beginning from incubation of the substrate until acquisition of a third harvest with mature mushrooms. With solid spawn, the culture cycle was 117 days. The rest of the treatments had a duration of 103 days.

Characterization of cultivated fruit bodies

Morphologically, the cultivated mushrooms were very similar to their wild counterparts (Figure 1). The pileus reached an average size of 2 (1-3-3.7) cm, were flat-convex in form and soft yellow (#F2F5A9, #F7D358) in color, which as they matured took on a dark yellow (#8A4B08) to brown (#61380B) coloration in the center of the pileus, with a translucent margin, moist-viscous surface with a small umbo in the center. The gills were free of the stipe, joined and soft yellow (#F2F5A9, #F5DA81) in color. The stipes were cylindrical and slightly flattened in form, 7.2 (3-10) x 0.2 (0.1-0.5) cm in size, cartilaginous and with a fibrous surface, the basal part was brown (#61380B) and as it reached the pileus the color vanished until reaching a soft yellow (#F2F5A9). With respect to size, the cultured mushrooms had larger pileus and stipes than their wild counterparts and presented statistical differences among treatments and strains (twenty fruit bodies were measured per treatment bag) (Table 2).

Table 2. Size of wild and cultured mushrooms and biological efficiency of *F. mexicana* (means ± SD)

Treatment	Type of spawn	Pileus		Stipe	Biological Efficiency
		Diameter (cm)	Length (cm)	Diameter (cm)	
Wild sporomes		2.3 (1.6-2.6)	2.9 (2.4-3.7)	0.2 (0.1-0.3)	-
IE 974/MS	L	2.15 (1.5-3)± 0.60ab*	7.52 (5.5-9) ± 1.38ab	0.24 (0.2-0.4) ± 0.08ab	31.9 ± 2.91a
IE 986/MS	L	1.86 (1.5-2.7) ± 0.40b	7.82 (6-10) ± 1.23a	0.24 (0.2-0.4) ± 0.08ab	34.5 ± 4.09a
IE 986/MS	S	1.98 (1.3-2.5) ± 0.41ab	6.86 (3-9) ± 2.31abc	0.23 (0.15-0.25) ± 0.05ab	14.8 ± 1.96b
IE 986/SSC+MS	L	2.15 (1.5-3) ± 0.45ab	6.02 (4.3-7) ± 0.79abc	0.17 (0.1-0.25) ± 0.05b	5.84 ± 1.00d
IE 985/MS	L	1.91 (1.5-2.2) ± 0.20b	5.99 (4.2-7.2) ± 0.84bc	0.22 (0.2-0.3) ± 0.03b	8.7 ± 0.50cd
IE 984/MS	L	2.55 (1.7-3.7) ± 0.65a	5.68 (4-7) ± 0.96c	0.34 (0.15-0.5) ± 0.16a	10.8 ± 0.76bc
IE 985/MS	S	1.76 (1.5-2.1) ± 0.22b	5.65 (4.2-7) ± 1.07c	0.18 (0.1-0.25) ± 0.04b	7.18 ± 0.72cd

MS: Maize stubble, SSC+MS: *Senecio cinerarioides* sawdust and maize stubble, L: liquid spawn, S: solid spawn.

*Different letters in the same column indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$)

In terms of the bromatological analysis of the cultured mushrooms, which was conducted only with the mushrooms of the strain IE 986 harvested in MS, the following results were obtained based on 6.42% of dry material: moisture

content 93.58 %, ashes 12.72 %, fats 1.64 %, protein (factor: 6.25) 17.68 %, raw fiber 52.51 % and carbohydrates 9.03 %.

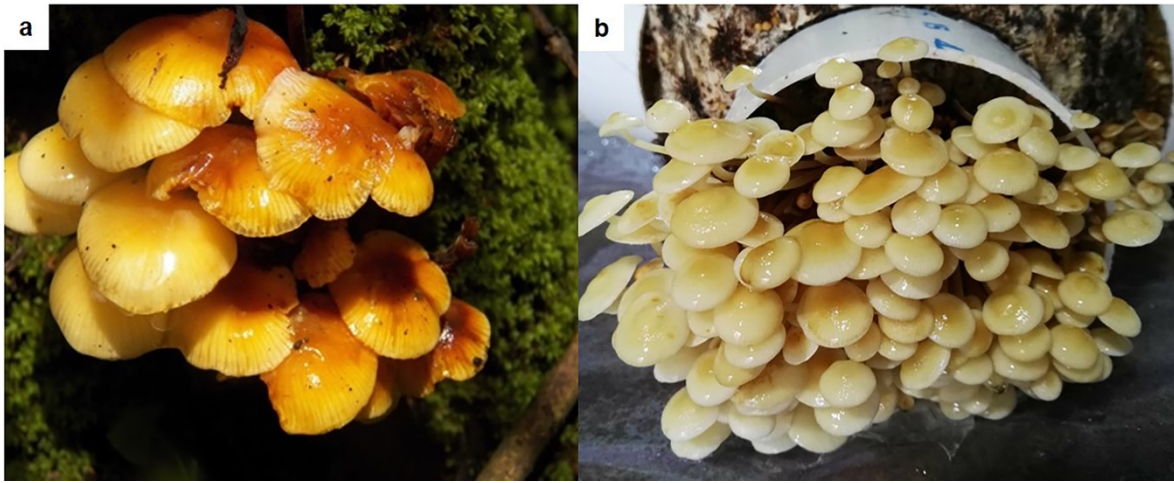


Fig 1. *Flammulina mexicana*. a) Wild mushrooms growing on *Senecio cinerarioides*, b) Cultured mushrooms on maize stubble (MS).

Quantification of the substrate fiber components

To identify the component(s) of the fiber that are capable of degradation by *F. mexicana*, a fiber analysis of the substrates that were completely colonized by mycelium, and those from which fruit bodies were obtained, was conducted. In the different treatments, in both periods of quantification (substrates colonized by mycelium and spent-ground) the percentages of hemicellulose decreased with respect to the control; however, in the final stage after the third harvest, this component decreased by more than half, while the quantity of cellulose increased slightly and that of lignin doubled (Table 3). This trend was clearly observed in the MS substrate, which presented the highest quantity of hemicellulose and lowest quantity of cellulose and lignin among the four different substrates. In strain IE 986 with MS, which presented the highest BE, hemicellulose decreased from 28.23 to 12.02%, cellulose increased slightly from 30.83 to 35.86% and lignin increased from 5.08 to 12.86%. For this reason, it is inferred that *F. mexicana* could be a species of brown putrefaction.

Table 3. Fiber analysis in colonized substrates with fruit bodies production (means \pm SD)

Strain	Substrate	Type of spawn	Invaded substrate			Harvested substrate		
			Hemicellulose (%)	Cellulose (%)	Lignin (%)	Hemicellulose (%)	Cellulose (%)	Lignin (%)
Control	MS	-	28.23 \pm 0.01a*	30.83 \pm 0.31fgh	5.08 \pm 0.89j	28.23 \pm 0.01a	30.83 \pm 0.31ef	5.08 \pm 0.89 f
	MS+SSS	-	27.21 \pm 0.13ab	32.39 \pm 0.10ef	13.68 \pm 0.19de	27.21 \pm 0.13b	32.39 \pm 0.10de	13.68 \pm 0.19d
	SSC	-	23.79 \pm 0.29cd	32.48 \pm 0.87ef	18.1 \pm 0.30c	23.79 \pm 0.29c	32.48 \pm 0.87de	18.1 \pm 0.31b
	QS	-	21.42 \pm 0.37efg	42.24 \pm 0.37a	23.13 \pm 0.67a	21.42 \pm 0.37d	42.24 \pm 0.37a	23.13 \pm 0.67a
IE 974	MS	L	13.66 \pm 0.54j	35.52 \pm 0.92 cd	9.13 \pm 0.39h	10.95 \pm 0.26g	37.32 \pm 0.26bc	12.79 \pm 0.26d
	SSC+MS	L	22.64 \pm 0.85def	30.96 \pm 0.53fgh	13.51 \pm 0.29def	-	-	-
IE 984	SSC	S	20.89 \pm 0.46fg	30.35 \pm 0.31fgh	20.83 \pm 0.68b	-	-	-
	QS	L	17.94 \pm 1.15i	38.37 \pm 1.24 b	22.80 \pm 0.80a	-	-	-
	SSC	L	20.17 \pm 0.58gh	30.89 \pm 0.42fgh	18.97 \pm 0.45c	-	-	-
	MS	L	24.33 \pm 0.63cd	25.50 \pm 0.81i	7.42 \pm 0.17i	13.12 \pm 0.00e	33.6 \pm 1.35d	10.06 \pm 0.56e
	SSC+MS	L	22.34 \pm 0.80def	32.13 \pm 0.62fg	12.31 \pm 0.25	-	-	-
IE 985	MS	S	21.65 \pm 0.45efg	19.97 \pm 0.50j	9.40 \pm 0.23gh	10.26 \pm 0.04gh	24.83 \pm 0.68g	10.84 \pm 0.36e
	MS	L	25.16 \pm 0.84bc	30.01 \pm 0.76gh	6.57 \pm 0.13i	12.42 \pm 0.12ef	30.42 \pm 0.35f	10.57 \pm 0.18e
	SSC+MS	L	24.43 \pm 0.29cd	30.27 \pm 0.88fgh	7.34 \pm 0.16i	-	-	-
IE 986	MS	S	13.92 \pm 0.41i	34.67 \pm 0.41de	10.45 \pm 0.24g	12.10 \pm 0.47f	30.07 \pm 0.15f	10.58 \pm 0.69e
	SSC+MS	S	10.66 \pm 0.54 k	37.38 \pm 0.97bc	14.42 \pm 0.13d	-	-	-
	SSC	L	18.12 \pm 1.36hi	31.84 \pm 1.45fg	19.37 \pm 0.27 c	-	-	-
	MS	L	25.17 \pm 0.90bc	25.65 \pm 0.83i	7.63 \pm 0.17i	12.02 \pm 0.27f	35.86 \pm 0.75 c	12.86 \pm 0.42d
	SSC+MS	L	23.51 \pm 0.72cde	28.73 \pm 0.79h	13.06 \pm 0.28ef	10.19 \pm 0.03h	37.94 \pm 0.25b	15.45 \pm 0.11c

Quercus sp. sawdust, SSC: *Senecio cinerarioides* sawdust; MS: maize stubble, SSC+MS: *Senecio cinerarioides* sawdust and maize stubble, L: liquid spawn, S: solid spawn, - : treatments without fruit body formation. *Different letters in the same column indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$).

For the rest of the treatments, data pertaining to the consumption of hemicellulose were obtained after the incubation period, when the substrates were completely invaded by the mycelium (Table 2). For example, for SSC+MS (IE 984), hemicellulose decreased from 27.21 to 22.34%, cellulose remained the same as with strain IE 984 or decreased from 32.39 to 28.73% in IE 986 and lignin stayed the same or decreased from 13.68 to 7.44 in IE 985. In SSC, hemicellulose increased from 23.79 to 18.12% in strain IE 986, as did the cellulose from 32.48 to 30.89% in IE 984. With respect to lignin, statistically there were no changes. In the substrate QS, with the strain IE 984, hemicellulose and cellulose decreased from 21.42 to 17.49% and from 42.24 to 38.37%, respectively, and there were no differences in the lignin with respect to the control.

Discussion

Cultivation of new species of fungi requires research to identify the optimal growth conditions for the strains, such as the nutrient content of the culture medium, pH, spawn type, substrates and temperature and time of incubation, as well as determining environmental conditions suitable for fructification.

For the experimental culture of *F. mexicana* from native strains, the DFA culture medium, considered a non-conventional source of carbon, is the most suitable medium for *in vitro* culture. Certain studies, such as that of Zapata et al. (2007) and Chegwin (2013) report that some non-conventional carbon sources generate good biomass production, with greater growth rate and higher production of metabolites, and can also be used in the culture of other species of fungi, thus decreasing process cost.

Using a solid medium, *F. mexicana* presented maximum biomass production in the medium MEA-PY at 0.18 g/Petri dish. Using a liquid medium, this was presented at 8.7 g/l in the DF-PY medium. These results are similar to those of *F. velutipes*, where biomass production of 4.16-4.82 g/l has been reported after 15 days at 25 °C (Kim et al. 2002), 10.9 g/l after 16 days at 26 °C (Diamantopoulou et al. 2012) and 5.5 g/l by day 10 (Kozhemyakina et al. 2010). Biomass production in liquid medium depends on species, intensity of agitation and the nutrients in the culture medium. It has been reported that biomass production increases 1.5 to 2 times in liquid media relative to production in solid media (Kozhemyakina et al. 2010), as was demonstrated in this study with *F. mexicana*. Because a greater quantity of biomass of higher quality is produced in a shorter time in liquid medium (Rodríguez-Porcel et al. 2005) can be used as spawn.

Spawn type (solid or liquid) affected the time of substrate colonization; the liquid spawn developed dense mycelium and was the first to invade, compared to the substrates inoculated with seed. Mushrooms production was more rapid in substrates with liquid spawn. These trends agree with that reported for another species, such as *Lentinula edodes* (Kawai et al. 1995), *Agaricus blazei* (Lin and Yang 2006) and *Pleurotus ostreatus* (Silveira et al. 2008). Due to the fact that the liquid medium can be inoculated directly into the substrate, incubation time is reduced and there is greater density of mycelium, a uniform distribution in the substrates and fewer problems of contamination (Frieal and McLoughlin 2000).

The moisture content of the substrates and the ambient temperature are important factors for mycelium growth. All substrates were adjusted to a moisture content of 70%; however, this percentage could have affected the sawdust-

based substrates, slowing the growth rate and preventing the mycelium from completely invading the substrate, leading to problems of contamination (Abdullah et al. 2013). Rapid invasion of substrates would avoid contamination by other microorganisms. For *F. velutipes*, the optimum moisture content is 60-65% (Sharma et al. 2008), for which reason it is suggested that the moisture content for sawdust-based substrates should be less than 70%.

For fruit bodies production, the best strain was IE 986 in MS with liquid spawn. This strain invaded in a maximum of 30 days, a period similar to that of *F. velutipes*, which invades in approximately 25 days (Royse 1996; Leifa et al. 2001). Fruit bodies formation began at day 34 of incubation in darkness at a temperature of 16 to 18 °C. To stimulate formation, it is important to consider factors such as the light and moisture content of both the substrate and the environment. The temperature conditions under which *F. mexicana* fructified were very different to those for *F. velutipes*, which has to be subjected to different temperature changes for a period of 10 to 14 days (Royse 1996). However, for both species, the primordia are induced in conditions of darkness, which explains why there were blocks that did not fructify in the presence of light or in some cases even failed to mature.

Once the fruit bodies had developed, exchanges of fresh air were carried out twice a day with alternating 12 hr periods of light and darkness. The light, exchange of fresh air and moisture content are all essential elements for fruit bodies maturation (Sakamoto et al. 2002).

The aerial growth of the mycelium that *F. mexicana* presented in culture at strain level suggests that it is a species that must be subjected to conditions of sufficient oxygen as with *F. velutipes*. This condition is reflected in the size of the fruit bodies, which presented pileus with smaller diameters and longer stipes than those found in wild specimens of this species. The pileus of the wild mushrooms measure 2.2 x 2.3 cm y the stipes 2.9 x 0.2 cm, while those obtained in culture present pileus of 1.9 (1-5-2.7) x 1.7 (1-2.9) cm and stipes of 7.2 (3-10) x 0.2 (0.1-0.4) cm.

These changes are affected by both the exchange of fresh air and quantity of light. In a commercial cultivation of *F. velutipes*, the concentrations of CO₂ and intensity of light are altered in order to modify the size of the pileus and stipe. When CO₂ concentrations increase, pileus diameters decrease and the stipes elongate to 14-18 cm (Sharma et al. 2008). In conditions of darkness, the stipes are elongated and thin and present small pileus (pinhead fruit body) that are whiter in color than those that formed in the presence of light (Sakamoto et al. 2004).

In terms of the BE, the strains IE 986 and IE 974 had a percentage in three harvests that exceeded that of the other two strains (Table 2); however, when compared with the BE of *F. velutipes*, it was very low. For *F. velutipes*, report

BE values of 56 and 78% with two harvests in 40 days in coffee residue (Kwon et al. 2009), 73% in maize straw (Ji et al. 2001), between 48-138 % in supplemented substrates and up to 150 % in fiber of palm and rice (Harith et al. 2014), 45% in sawdust (Sharma et al. 2005) and 112% in cotton seeds (Dang et al. 2001).

Despite the low BE found compared to that of *F. velutipes*, it is important to note that this study represents the first experimental cultivation conducted with *F. mexicana* and that the substrates utilized by this study were not supplemented. The supplementation substrates will have a greater biological efficiency (Harith et al. 2014; Rocha and Nogueira 2016).

The mycelial growth and the fruit bodies production in the experimental cultivation, depends of the genetic characteristics of each species, strains, substrates and spawn types used, (Philippoussis et al. 2001; Xu et al. 2016). The liquid spawn being more efficient in the substrate colonization; the strain IE 986 and IE 974 showed higher production of biomass and growth rate *in vitro* culture, so that to produce fruit bodies are those with a shorter culture cycle.

Regarding the nature of the substrates, the decrease in hemicellulose and cellulose in the four different substrates prior to formation of fruit bodies and after the third harvest indicated that *F. mexicana* has the capacity to selectively degrade cellulosic and hemicellulosic components. In this way, the substrates MS and MS+SSC that presented a higher percentage of hemicellulose and lignin also had the highest rate of mycelial growth and mushrooms production. The capacity for degradation is therefore influenced by the nature of the substrate, environmental and genetic factors among species or even among strains of the same species, enzymes and the quantity and resistance of the cellulose, hemicellulose and lignin (Montoya and Orrego 2012; Xu et al. 2016; Economou et al. 2017).

The substrates used for the cultivation of mushrooms are generally derived from agricultural, agro-industrial or forestry wastes, which are found with varying availability in different regions (Omarini et al. 2009; Salmones and Mata 2012). The success of the *F. mexicana* culture in maize stubble is of great importance, considering that this substrate is one of the most commonly available agricultural wastes in the central region of Mexico. This also contributes to the reduction of costs and avoids the use of its natural substrate (*S. cinerarioides*) in the context of a commercial cultivation process.

In terms of the nutrient content of the cultured *F. mexicana* mushrooms (ashes 12.72%, fats 1.64 %, protein 17.68 %, raw fiber 52.51% and carbohydrates 9.03%), these values are within the ranges reported for another species (Chang and Miles 2004; Sharma et al. 2008) with the exception of fiber content. The cultivated mushrooms of the

F. mexicana strain IE 986 in MS presented a high percentage of fiber and a low percentage of carbohydrates; this trend supports that reported for *Ganoderma tsugae*, which presents a high percentage of fiber (73.4) and, as the mushrooms mature, the quantity of fiber increases and the contents of other components are reduced (Tseng et al. 2005). These results allow *F. mexicana* to be considered a good source of fiber. This fiber is mostly composed of chitin (25%), hemicelluloses, mannans and β -glucans (4-13%), which are all components of the cell wall (Manzi and Pizzoferrato 2000; Pizarro et al. 2014). These components confer anti-allergen activities and participate in modulation of the immune system, prevention of the promotion and progression of certain types of cancer and reduction of levels of cholesterol in the blood, among other functional properties (Manzi and Pizzoferrato 2000; Pizarro et al. 2014).

These types of study, focused on the experimental cultivation of wild edible mushrooms form the basis for continued research that helps to identify the strains, culture media, environmental conditions and substrates that can be used and/or to modified to optimize the culture process and obtain greater yields. Safeguarding the germplasm and the culture of new native species represents a viable alternative for their *ex situ* conservation, diversification of species that are already cultured and a method by which to make use of the natural resources of each region, including agricultural, forestry or agro-industrial wastes and the specific environmental conditions required by each species.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Faculty of Science, Autonomous University of the State of Mexico for the logistic support. This study was carried out as part of the project “Wild mushrooms as a strategy for sustainable development in Cacalomacán Ejido Ecological Park, State of Mexico”, financed by the Autonomous University of the State of Mexico, SIEA 3687/2014/CIA. The authors also thank Ph.D. Julieta Gertrudis Estrada Flores of the Institute of Agricultural and Rural Sciences for her support in the technique of quantification of substrate fiber components. DNA sequencing was funded by the MEXBOL network CONACYT grant 280896.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abdullah N, Ismail R, Johari NMK, Annuar MSM (2013) Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Sci Hortic* 161: 65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>
- Arana-Gabriel Y, Burrola-Aguilar C, Garibay-Orijel R, Franco-Maass S (2014) Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient* 20:213-226. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>
- Chang ST, Miles PG (2004) *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact.* CRC Press, Boca Raton.
- Chegwin AC, Nieto RIJ (2013) Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Rev Mex Mic* 37: 1-9. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802013000100002
- Cruz-Ulloa BS (1995) *Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos.* UNAM, México
- Dang JZ, Ge G, Wu QJ (2001) Studies on raw material culture and physiology of white *Flammulina velutipes*. *Edible Fungi of China* 20:6-7. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-ZSYJ200104002.htm
- Diamantopoulou P, Papanikolaou S, Katsarou E, Komaitis M, Aggelis G, Philippoussis A (2012) Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1890-1906. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9714-8>
- Economou NC, Diamantopoulou AP, Philippoussis NA (2017) Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 5213-5222. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8251-3>
- Franco MS, Burrola-Aguilar C, Arana-Gabriel Y (2012) *Hongos comestibles silvestres: Un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca.* EON, México

- Friearl MT, McLoughlin AJ (2000) Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. *Biotechnol Lett* 22:351-354. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005616516646>
- Garibay-Orijel R, Ruan-Soto F, Estrada-Martínez E (2010) El conocimiento micológico tradicional, motor para el aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. In: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (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*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla, pp 243-270
- Garibay-Orijel R, Ruan-Soto F (2014) Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. In: Moreno-Fuentes A, Garibay-Orijel R (eds) *La etnomicología en México, estado del arte*. CONACYT, UAEH, UNAM, México, pp 91-109.
- Goering HK, Van SPJ (1970) *Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications)*. Agric Hand-book No. 379, ARS-USDA, Washington DC.
- Guzmán G, Mata G, Salmenes D, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L (2013) *El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales*. IPN, México.
- Harith N, Abdullah N, Sabaratnam V (2014) Cultivation of *Flammulina velutipes* mushroom using various agro-residues as a fruiting substrate. *Pesq Agropec Bras* 49:181-188. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000300004>
- Huerta G, Martínez-Carrera D, Sánchez JE, Leal-Lara H (2009) Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Rev Mex Micol* 30:31-42. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88316009004>
- Hughes KW, McGhee LL, Methven AS, Johnson JE, Petersen RH (1999) Patterns of geographic speciation in the genus *Flammulina* based on sequences of the ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 area. *Mycologia* 91:978-986. <http://dx.doi.org/doi:10.2307/3761628>
- Ji H, Wang Q, Wang H, Chen WJ, Zhu CH, Hou H, Zhang ZA (2001) A fundamental research of mushroom cultivation using maize straw. *Edible Fungi of China* 20:10-12. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSYJ200106004.htm

- Kawai G, Kobayashi H, Fukushima Y, Ohsaki K (1995) Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mycoscience* 37:201-207. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02461345>
- Kim, J.M., Ra, K.S., Noh, D.O., Suh, H.J., 2002. Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutipes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 292–295. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000306>
- Kozhemyakina NV, Ananyeva EP, Gurina SV, Galynkin VA (2010) Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst. *Appl Biochem Microbiol* 46:536-539. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683810050121>
- Kwon JS, Lee JS, Shin WC, Lee KE, Hong EK (2009) Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture. *Biotechnol Bioprocess Eng* 14:756-762. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-009-0024-0>
- Leifa F, Pandey A, Soccol CR (2001) Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 44:205-212. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132001000200015>
- Lin JH, Yang SS (2006) Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murill by submerged fermentation. *J Microbiol Immunol Infect* 39:98-108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16604241>
- Manzi P, Pizzoferrato L (2000) Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem* 68:315-318. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00197-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00197-1)
- Montoya S, Orrego CE (2012) Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World J Microbiol Biotechnol* <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0957-2>
- Morales P, Sobal M, Bonilla M et al (2010) Los hongos comestibles silvestres en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo, In: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (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*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla, pp 91-108

- Norma Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994 (1995) Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico, mediante método por arena o grasa. Diario Oficial de la Federación, México.
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728942&fecha=15/08/1994
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-607-NORMEX-2013 (2013) Alimentos-determinación de cenizas en alimentos-método de prueba (cancela a la NMX-F-607-NORMEX-2002). Diario Oficial de la Federación, México.
<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-615-NORMEX-2004 (2004) Alimentos-determinación de extracto etéreo (método SOXHLET) en alimentos-método de prueba (cancela a la NMX-F-089-S-1978). Diario Oficial de la Federación, México.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 (2014) Alimentos-determinación de proteínas en alimentos-método de ensayo (prueba) (cancela a la NMX-F-608-NORMEX-2002). Diario Oficial de la Federación, México.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-613-NORMEX-2003 (2003) Alimentos-determinación de fibra cruda en alimentos-métodos de prueba (cancela a la NMX-F-090-S-1978). Diario Oficial de la Federación, México.
- Omarini A, Lechner BE, Albertó E (2009) *Polyporus tenuiculus*: a new naturally occurring mushroom that can be industrially cultivated on agricultural waste. J Ind Microbiol Biotechnol 36:635-642.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0530-2>
- Philippoussis A, Zervakis G, Diamantopoulou P (2001) Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World J Microbiol Biotechnol 17:191-200. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016685530312>
- Pizarro CS, Ronco AMM, Gotteland RM (2014) β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud. Rev Chil Nutr 41:439-446. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>
- Rocha VF, Nogueira ARV (2016) Optimization of substrate preparation for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions (composting: phases I and II). World J Microbiol Biotechnol 32:190. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2152-y>
- Redhead AS, Estrada-Torres A, Petersen HR (2000) *Flammulina mexicana*, a new mexican species. Mycologia 92:1009-1018. <http://dx.doi.org/10.2307/3761595>

- Rodríguez-Porcel EM, Casas-López JL, Sánchez-Pérez JA, Fernández-Sevilla JM, Chisti Y (2005) Effects of pellets morphology on broth rheology in fermentation of *Aspergillus terreus*. *Biochem. Eng J* 26:139-144. <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.bej.2005.04.011>
- Royse DJ (1996) Specialty mushrooms. In: Janick J (ed) *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, pp 464-475
- Salmones, D., Mata, G (2012) Cepario de hongos en México, In Sánchez VJ, Mata G (eds) *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica, investigación y desarrollo en un entorno multicultural*, 1st ed. INECOL-ECOSUR, México, pp 69-77
- Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, Miura K, Yajima T (2002) Protein expressions during fruit body induction of *Flammulina velutipes* under reduced temperature. *Mycol Res* 106:222-227. <http://dx.doi.org/10.1017/S095375620100541X>
- Sakamoto Y, Tamai Y, Yajima T, 2004. Influence of light on the morphological changes that take place during the development of the *Flammulina velutipes* fruit body. *Mycoscience* 45:333-339. <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-004-0195-7>
- Sharma VP, Sharma SR, Kumar S (2005) Nutritional requirements for mycelial growth and cultivation of *Flammulina velutipes*. *Mush Res* 14:13-18. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-WSWT199703001.htm
- Sharma VP, Kumar S, Tewari RP (2008) *Flammulina velutipes*, the culinary medicinal winter mushroom. Technical Bulletin. Directorate of Mushroom Research, New Delhi
- Silveira LML, Furlan AS, Ninow JL (2008) Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Ciênc Tecnol Aliment* 28: 858-862. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400014>
- Stamets P (2000) *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, New York
- Tseng YH, Lee YL, Li RC, Mau JL (2005) Non-volatile flavor components of *Ganoderma tsugae*. *Food Chem* 90: 409-415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.054>
- Xu F, Li Z, Liu Y, Rong C, Wang S (2016) Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. *Saudi J Biol Sci* 23:607-613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.001>

Zapata P, Rojas D, Fernández C, Ramírez D, Restrepo G, Orjuela V, Arroyave M, Gómez T, Atehortúa L (2007)

Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. Rev EIA Esc Ing Antioq 7:137-144.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372007000100013

CAPÍTULO II. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Flammulina mexicana*

Artículo 2. Colonización miceliar de *Flammulina mexicana* a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales. Enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.

Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México CP 56250, Tel. 01 800 088 2222 Ext. 85353



Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

Inicio Acerca de Recepción de escritos Número actual Publicaciones Registrarse **Ingresar** Noticias Búsqueda

[Inicio](#) [Ingresar](#)

Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Español (España) Ver el sitio cburrolaagullar

OJS
OPEN JOURNAL SYSTEMS

Tareas 0

Propuestas

Propuestas

Mi lista **Archivos** [Ayuda](#)

Mis envíos asignados [Buscar](#) [Nuevo envío](#)

Id.	Autor; título	Fase
No hay artículos		

Mis envíos de autoría [Buscar](#)

Id.	Autor; título	Fase
376	BURROLA AGUILAR et al.; Colonización miceliar de <i>Flammulina mexicana</i> a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales	Propuesta

1 de 1 elementos

Colonización micelial de *Flammulina mexicana* a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales

Mycelial colonization of *Flammulina mexicana* from solid and liquid spawn in agroforestry waste

Yolanda Arana-Gabriel^{1a}, Cristina Burrola-Aguilar^{1b*}, Carmen Zepeda Gómez^{1c}, Sergio Franco-Maass^{2d}, Gerardo Mata^{3e}

¹Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. km 14.5, carretera Toluca-Atacomulco. C. P. 50200. Toluca, Estado de México. MÉXICO.

^ayananag507@alumno.uaemex.mx, ^bcba@uaemex.mx, ^czepedac@uaemex.mx

*Autor de correspondencia. ^bcba@uaemex.mx. Tel.: +52 (722) 2 96 55 53

²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas. Toluca, Estado de México. MÉXICO. ^dsfrancom@uaemex.mx

³Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, C. P. 91070. Veracruz, MÉXICO. ^egerardo.mata@inecol.edu.mx

RESUMEN: La producción de inóculo es un proceso que requiere de su optimización, ya que, en gran parte depende generar una mayor eficiencia biológica en el cultivo de hongos, reducir los costos económicos, así como problemas de contaminación y tiempo en los ciclos de cultivo. En la presente investigación, durante el año 2016, se evaluó la colonización de cuatro sustratos (rastrojo de maíz, aserrín de *Quercus* sp., aserrín de *Senecio cinerarioides* y rastrojo de maíz en combinación con aserrín de *S. cinerarioides*) con inóculo líquido y sólido de *F. mexicana* (cepas IE 974, IE 984, IE 985, IE 986). Como resultados se obtuvo que la velocidad de colonización de los diferentes sustratos varió entre las cuatro cepas ($P \leq 0.0001$). Los sustratos con inóculo sólido presentaron velocidades de crecimiento

menores respecto al inóculo líquido; los sustratos con inóculo líquido fueron colonizados en un periodo de 17 días y con inóculo sólido tardaron 50 días y en algunos casos hubo partes que no fueron colonizadas; lo cual también estuvo relacionado con el sustrato utilizado, presentando una interacción ($P \leq 0.0001$) entre el tipo de inóculo y el sustrato que afecta la velocidad de crecimiento. La incorporación de inóculo líquido en el cultivo de hongos permite aumentar la densidad y velocidad de crecimiento micelial, así como la aparición temprana de primordios, lo que contribuye a reducir el tiempo en el ciclo de cultivo.

PALABRAS CLAVE: Pellets, Rastrojo de Maíz, Velocidad de crecimiento, Primordios, Trigo

ABSTRACT: Spawn production is a process that requires optimization, and that, in large part, generate a greater biological efficiency in the cultivation of mushrooms, reduce the economic costs, as well as problems of contamination and time in the culture cycles. In the present investigation, the colonization of four substrates (maize stubble, *Quercus* sp. sawdust, *Senecio cinerarioides* sawdust and *S. cinerarioides* sawdust with maize stubble) with liquid and solid spawn of *F. mexicana* (strains IE 974, IE 984, IE 985, IE 986). As results it was obtained that the speed of the colonization of the diverse substrates varied between the four strains ($P \leq 0.0001$). Substrates with solid spawn presented slower growth rates with respect to the liquid spawn; the substrates with liquid were colonized in a period of 17 days and with a solid long 50 days and in some cases there were parts that were not colonized; which was also related to the substrate used, presenting an interaction ($P \leq 0.0001$) between the type of tissue and the substrate that affects the growth rate. The incorporation of liquid spawn in the culture of fungi allows to increase the density and speed of the mycelial growth, as well as the appearance of the primordia, which contribute to reduce the time in the culture cycle.

KEY WORDS: Pellets, Corn stubble, Growth rate, Primordium, Wheat

INTRODUCCIÓN

El género *Flammulina* ocupa el quinto lugar entre los hongos comestibles cultivados a nivel mundial. Las especies cultivadas de este género de las que hasta el momento se tiene reporte son *F. velutipes* con una producción de 300,000 toneladas por año (Psurtseva, 2005), *F. populicola* cultivada en Estados Unidos y Canadá (Stamets, 2000, 2005; Tradd, 2014) y *F. mexicana* (Arana-Gabriel, 2018); esta última se encuentra en fase experimental, sin embargo, podría significar una importante alternativa en la diversificación de especies cultivadas en México.

Flammulina velutipes es una especie cosmopolita, tolerante a temperaturas menores de 18 °C, es conocida comúnmente como enokitake, enoki, hongo de invierno o seta de aguja de oro en países como China, Japón, Estados Unidos de América, Australia y Taiwán. En Asia es un hongo altamente apreciado por sus propiedades medicinales y alto valor nutricional; además, se considera como un producto de calidad gourmet (Chang y Miles, 2004; Sharma et al., 2008; Hasan et al., 2012). En México, *F. velutipes* es comercializada únicamente en supermercados, principalmente en la región central del país (Mayett y Martínez-Carrera, 2010). Por otra parte, *Flammulina mexicana*, es una especie silvestre endémica de México que se desarrolla sobre tallos y ramas de la jara (*Senecio cinerarioides*) en las zonas de bosque de *Pinus* y *Abies* del centro de México a altitudes superiores de 2700 m y a una temperatura media menor a 18 °C (Redhead et al., 2000; Franco et al., 2012; Arana-Gabriel et al., 2014). Suele extraerse para autoconsumo y se encuentra dentro de las 20 especies de hongos de mayor importancia cultural en algunas localidades del Nevado de Toluca, México (Franco et al., 2012; San Román, 2014, De la Garza, 2017).

En fechas recientes se ha venido desarrollando el cultivo a nivel experimental de *F. mexicana* sobre diversos sustratos como la jara (*S. cinerarioides*), rastrojo de maíz (*Zea mays*) y aserrín de encino (*Quercus* sp.) (Arana-Gabriel, 2018). El proceso de cultivo de los hongos involucra diferentes fases; la preparación del sustrato, preparación de inóculo, inoculación de sustratos e inducción de cuerpos fructíferos. La ejecución adecuada y secuencia de cada una de dichas fases, al final del proceso representa

una producción exitosa o no de cuerpos fructíferos. Una de las etapas en la que se debe de tener especial cuidado es la preparación de inóculo, ya que este incide directamente en el tiempo de colonización, la densidad del micelio y eficiencia biológica (Kawai et al., 1996; Abdullah et al., 2013; Rosado et al., 2002).

La producción de inóculo es un proceso que se basa, principalmente, en la fermentación sólida en granos de gramíneas como trigo, sorgo, cebada y mijo. A escala industrial, este proceso es costoso dado el uso de equipo de esterilización e incubación y materiales como tipo de grano utilizado y suplementos (Rosado et al., 2002). Una alternativa para disminuir los costos de producción que implica el inóculo sólido es la sustitución de inóculo sólido por inóculo líquido. El uso de inóculo líquido permite una distribución uniforme del micelio en el sustrato, en periodos cortos de tiempo, lo que además reduce problemas de contaminación (Frieal y McLoughlin, 2000; Abdullah et al., 2013; Ma et al., 2016). Algunas especies de hongos en las que se han realizado trabajos de producción de inóculo líquido son *Pleurotus* spp. (Silveira et al., 2008; Abdullah et al., 2013; Rosado et al., 2002), *Agaricus bisporus* (Frieal and McLoughlin, 2000), *F. velutipes* (Hassan et al., 2012), *Sparassis latifolia* (Ma et al., 2016) y *Lentinula edodes* (Kawai et al., 1996) ya que la mayor parte de investigaciones de producción de biomasa en fermentación sumergida son para la producción de metabolitos secundarios y polisacáridos (Petre et al., 2010; Elisashvili, 2010)

Ante las ventajas de utilizar inóculo líquido y de que la especie, cepa y tipo de sustrato afecta la velocidad de colonización miceliar de los sustratos; el objetivo de la presente investigación fue comparar la eficiencia en la colonización de sustratos entre inóculo líquido y sólido de cuatro cepas de *F. mexicana*, especie que ha mostrado tener potencial de cultivo comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cuatro cepas de *F. mexicana*: IE 974, IE 984, IE 985, IE 986 del Cepario del Instituto de Ecología (INECOL) de Xalapa, Veracruz, México; las cuales fueron obtenidas previamente a partir de cuerpos fructíferos de la región de alta montaña del Nevado de Toluca en el centro de México (Arana-Gabriel et al., 2014; Arana-Gabriel., 2017). Las cepas fueron reaisladas en medio de agar croquetas (AC) (15 g de agar agar, 15 g de croquetas para perro GANADOR®, 2 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de gelatina en un litro de agua destilada) (Stamets, 2000; Arana-Gabriel et al., 2014) a 18°C y caracterizadas con forme a Cruz-Ulloa (1995) y la clave de color “Códigos de colores HTML” (html-color-codes.info/).

Producción de inóculo sólido

Se preparó inóculo primario y secundario con granos de trigo. Para preparar el inóculo primario, los granos de trigo se limpiaron, lavaron e hidrataron por 24 horas, posteriormente se hirvieron durante 10 minutos. Una vez escurridos y con una humedad de 70 %, se prepararon 5 frascos con 200 g de granos por cada una de las cuatro cepas utilizadas, a las cuales se les adicionó cal [Ca(OH)₂] (0.7 g de cal por frasco) dejando el pH del trigo en 8.5, posteriormente se sometieron a esterilización en autoclave a 121°C/15 lb de presión durante una hora (Guzmán et al., 2013). Una vez enfriados los frascos con trigo, se inocularon con tres fragmentos de 1 cm² de micelio de las cuatro cepas. Para el inóculo secundario, el trigo fue sometido al procedimiento anteriormente descrito, pero ahora se inoculó el grano con 5 % del inóculo primario. Todos los tratamientos fueron incubados en obscuridad a 18 °C hasta que el micelio invadiera al 100 % los granos de trigo para poder inocular los diferentes sustratos.

Producción de inóculo líquido y caracterización miceliar

El inóculo líquido se preparó utilizando croquetas adicionadas con peptona y levadura (C-PL) (15 g de agar agar, 15 g de croquetas para perro GANADOR®, 2 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de gelatina en un litro de agua destilada) (Stamets, 2000; Arana-Gabriel et al., 2014). El medio se esterilizó en autoclave a 121°C/15 lb de presión durante quince minutos y se le agregó 0.05g de Cloranfenicol (SIGMA®) como antibiótico.

Se prepararon muestras de 100 ml de medio de cultivo (C-PL) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con cinco réplicas. Los medios se inocularon con 0.5 cm de diámetro de cada cepa y se incubaron en obscuridad durante 20 días a 18°C y 120 rpm en baño de agua con agitación PolyScience®.

Concluido el periodo de incubación, se midió el pH del medio y se caracterizó la biomasa tanto morfológicamente (forma y tamaño) como microscópicamente para tener reporte del comportamiento miceliar bajo condiciones de agitación. El color del micelio se reportó con la clave de color “Códigos de colores HTML” (html-color-codes.info/). Para la caracterización microscópica, se tomaron pequeñas muestras de micelio con las que se hicieron preparaciones temporales con rojo Congo al 10 %, lo que permitió observar la presencia de fibulas y descartar que el micelio producido estuviera contaminado. Asimismo, se midió el diámetro de las hifas a 100x (20 hifas por tratamiento) con la ayuda del programa Motic digital Microscope DMB3-223 (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004). Posteriormente se filtró la biomasa, se lavó con agua destilada estéril para evitar que el medio de cultivo fuera un factor en la colonización de los sustratos y se homogenizó en un procesador de alimentos Magic Bullet Deluxe® durante 10 segundos con 100 ml de agua destilada estéril (modificado de Stamets, 2000). De igual manera se cuantificó la biomasa seca; después del periodo de incubación, la biomasa se filtró, se lavó con agua destilada estéril y se puso a secar en estufa a 80 °C por 24 horas para su posterior pesado.

Evaluación del crecimiento miceliar en diferentes sustratos

Para determinar la eficiencia del inóculo líquido y sólido con las diferentes cepas y sustratos respecto al tiempo de colonización, densidad de micelio y porcentaje de contaminación, se utilizaron cuatro

diferentes formulaciones para los sustratos: 1.- Aserrín de encino (*Quercus* sp.) 100 % (AQ), 2.-Aserrín de jara (*S. cinerarioides*) 100 % (ASC), 3.- Rastrojo de maíz (*Zea mays*) con aserrín de *S. cinerarioides* 50:50 (ASC+RM) y 4.- Rastrojo de maíz 100 % (RM) (Arana-Gabriel, 2018). Las diferentes combinaciones de sustrato se hidrataron al 70 % (por cada kilogramo de sustrato se agregó 1.4 l de agua) y se les adicionó 0.1 % de cal [Ca (OH)₂] y 0.1 % de yeso (CaSO₄). La mezcla debidamente homogenizada se colocó en tubos de ensayo (2.5 x 15 cm) a 12 cm del volumen del tubo (Carreño-Ruiz et al., 2014) a partir de su base (equivalente a 20 g de peso húmedo). Se prepararon cinco tubos por tratamiento con un análisis factorial de: 4 x 4 x 2 x 5 (4 cepas x 4 sustratos x 2 tipos de inóculo x 5 réplicas).

Los tubos de ensayo con el sustrato se esterilizaron durante una hora a 121°C y 15 lb de presión; posteriormente se inocularon con 5 % (peso húmedo del sustrato) de inóculo secundario o 1 ml de inóculo líquido; se taparon con algodón estéril para permitir el intercambio gaseoso y se llevaron a incubación a 18 °C en condiciones de oscuridad hasta que el micelio invadió por completo los diferentes sustratos; realizando observaciones cada tercer día para monitorear el crecimiento miceliar. La velocidad de crecimiento (VC) en los diferentes sustratos se calculó dividiendo la longitud de sustrato (12 cm que tenían los sustratos en los tubos) entre el número de días que tardó el micelio en invadirlo (modificado de Huerta *et al.*, 2009). Una vez que el sustrato fue cubierto por el micelio, la densidad de este se clasificó visualmente de acuerdo con Shrestha et al., (2006) (-) = extremadamente escaso, (+) = escaso, (++) = moderado, (+++) = abundante.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009); los datos de velocidad de crecimiento miceliar se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había o no diferencias entre cepas, sustratos y tipo de inóculo (sólido y líquido) y un análisis multivariado de varianza (MANOVA) para determinar si había interacción entre

los sustratos y el tipo de inóculo que afectara la velocidad de crecimiento. Las diferencias significativas se determinaron con una prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

Obtención de cuerpos fructíferos

Una vez que todos los tratamientos presentaron el 100 % de colonización, se estimuló la producción de los cuerpos fructíferos, trasladando los tubos de ensayo a un cuarto con luz (100 lux); se les colocó algodón húmedo con agua destilada estéril en la parte superior del sustrato, el algodón se mantuvo húmedo y fue retirado al observar la aparición de primordios, a partir de ese momento, se aplicaron dos riegos de agua por día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material biológico

Las cepas reaisladas IE 974 y IE 986 en medio AC tardaron 14 días en invadir la caja Petri de 9 cm y las cepas IE 984 y IE 985 lo hicieron en 16 días. Las cuatro cepas desarrollaron un crecimiento uniforme, aéreo de color blanco (#FFFFFF), con textura algodonosa, margen fimbriado y sin presencia de exudados. Microscópicamente, las hifas fueron lisas, ramificadas, septadas y con abundantes fíbulas.

Producción de inóculo sólido

Para la producción de inóculo primario, las semillas de trigo tardaron 20 días en presentar una colonización miceliar abundante (+++) del 100 %. Con inóculo secundario el tiempo de colonización fue de 15 días (100 % de grano invadido y micelio abundante), tiempo que se encuentra dentro del rango reportado para especies del género *Pleurotus* donde el crecimiento miceliar tarda de 20-26 días (Grison et al., 2008). El tiempo de colonización y densidad del micelio se encuentra en función de la cepa, sustrato utilizado, pH, porcentaje de humedad y temperatura de incubación. En la producción de inóculo sólido, se podrían utilizar otro tipo de semilla o aserrín suplementados; sin embargo, su uso depende de

la disponibilidad y los costos de cada región. En este caso, el trigo es uno de los granos con más disponibilidad en cuanto a producción y costos en el Estado de México; además es considerado un buen vehículo para la propagación del micelio; la humedad de 70 % y pH de 8.5 son valores que se encuentran dentro de los rangos reportados para el crecimiento del micelio ya que facilitan la disponibilidad de nutrientes (Ríos et al., 2010).

Producción de inóculo líquido y caracterización miceliar

La producción de biomasa de las cuatro cepas IE 974, IE 984, IE 985 y IE 986 en medio líquido C-PL fue, en promedio, de 7.9 g/l después de 20 días de agitación. El micelio formó pellets globosos y de superficie fimbrosa con un tamaño de 1.5 a 3 cm de diámetro. Microscópicamente, las hifas fueron lisas con diámetro de 1.1-3.3 μm , ramificadas, septadas y con fíbulas abundantes y frecuentes. La morfología del micelio (filamentos libres o pellets) y el tamaño de los pellets dependen de la intensidad de agitación; en cuanto a la cantidad de biomasa producida depende de la especie, cepa, fuente de carbono del medio de cultivo, pH y oxígeno disuelto (Cui et al., 1997; Frieal y McLoughlin, 2000; Grison et al., 2008; Ma et al., 2016). Por ejemplo, para *Sparassis latifolia*, que se ha llevado a obtención de biomasa en medio líquido, con una producción de 11.96 g/l después de 15 días (Ma et al., 2016) o para *Pleurotus pulmonarius* donde se obtuvo biomasa en tres días a partir de un biorreactor automatizado (Abdullah et al., 2013).

Evaluación del crecimiento miceliar en diferentes sustratos

La velocidad de colonización de los diferentes sustratos varió entre las cuatro cepas ($F_{3,159}=15.54$, $P\leq 0.0001$), siendo la IE 974 y IE 986 las que colonizaron más rápidamente los sustratos de RM y ASC+RM ($F_{4,159}=5.09$, $P\leq 0.0007$) con inóculo líquido ($F_{1,159}=8.72$, $P\leq 0.0036$) (Cuadro 1). La cepa IE 974 presentó una velocidad de crecimiento miceliar de 0.71cm/día, tardando un promedio de 17 días en invadir el sustrato de ASC+RM con una densidad abundante (Figura 1d) de micelio al igual que la IE 986 en RM y ASC+RM (Figura 1ª). Por el contrario, el sustrato RM inoculado con inóculo sólido en las

cuatro cepas presentó la menor velocidad de crecimiento, tardando en promedio hasta 50 días (0.24 cm/día) en colonizar el 100 % del sustrato; sin embargo, pese a la baja velocidad de crecimiento, la densidad miceliar fue abundante (Figura 1e-h). El sustrato AQ en tres de las cuatro cepas con inóculo sólido presentó densidad moderada, con la cepa IE 986, la densidad fue escasa y con inóculo líquido la densidad fue de moderada a abundante, a excepción de la cepa IE 984 donde fue extremadamente escasa, con un tiempo de colonización de 27-29 días (0.13-0.26 cm/día). El crecimiento miceliar fue más uniforme en los sustratos inoculados con inóculo líquido, al contrario de los sustratos con inóculo sólido que presentaron sitios que no fueron colonizados por completo (Cuadro 1, Figura 1).

En el Cuadro 1, se muestran las diferencias de velocidad de crecimiento entre los dos tipos de inóculo y diferentes sustratos de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Tukey. La cepa IE 984 fue la única que presentó la menor velocidad de crecimiento en los cuatro sustratos con inóculo líquido, y la densidad del micelio fue de extremadamente escaso a escaso (Figura 1c). De manera general, el inóculo sólido presentó velocidades de crecimiento menores que el inóculo líquido, lo cual también estuvo relacionado con el sustrato utilizado, presentando una interacción entre el tipo de inóculo y el sustrato que afecta la velocidad de crecimiento ($F_{4,159}=18.94$, $P\leq 0.0001$).

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento miceliar en diferentes sustratos

Cepa	Sustrato	Tipo de inóculo	Velocidad de crecimiento miceliar (cm/día)	Densidad del micelio
IE 974	AQ	S	0.41 defghi*	++
	ASC	S	0.42 cdefgh	+++
	RM	S	0.29 fghijkl	+++
	ASC+RM	S	0.38 defghij	+++
	AQ	L	0.44 bcdefg	++
	ASC	L	0.45 bcdef	+++
	RM	L	0.42 cdefgh	+++
	ASC+RM	L	0.71 a	+++
IE 984	AQ	S	0.41 defghi	++
	ASC	S	0.46 bcde	+++
	RM	S	0.26 ijkl	+++
	ASC+RM	S	0.27 hijkl	+++
	AQ	L	0.26 ijkl	-
	ASC	L	0.13 l	-
	RM	L	0.22 jkl	-
	ASC+RM	L	0.21 kl	+
IE 985	AQ	S	0.41 defghi	++
	ASC	S	0.44 bcdefg	+++
	RM	S	0.28 ghijkl	+++
	ASC+RM	S	0.35 efghijk	+++
	AQ	L	0.41 defghi	++
	ASC	L	0.58 abc	+++
	RM	L	0.59 ab	+++
	ASC+RM	L	0.53 bcd	+++
IE 986	AQ	S	0.44 bcdefg	+
	ASC	S	0.48 bcde	+++
	RM	S	0.24 jkl	+++
	ASC+RM	S	0.38 defghij	+++
	AQ	L	0.44 bcdefg	++
	RM	L	0.71 a	+++
	ASC	L	0.26 ijkl	+++
	ASC+RM	L	0.69 a	+++

AQ Aserrín de *Quercus* sp., ASC Aserrín de *S. cinerarioides*, RM Rastrojo de maíz, ASC+RM Aserrín de *S. cinerarioides* y Rastrojo de maíz, L Inóculo líquido, S Inóculo sólido, - extremadamente escaso, + escaso, ++ moderado, +++ abundante. *Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).



Figura 1. Crecimiento micelial de cuatro cepas de *F. mexicana*: a,e) IE 986; b,f) IE 985; c,g) IE 984; d,h) IE 974 en diferentes sustratos inóculados. Inóculo líquido (a-d), inóculo sólido (e-h). De izquierda a derecha los tubos de ensayo con los sustratos corresponden a: RM (Rastrojo de maíz), AQ (Aserrín de *Quercus* sp.), ASC (Aserrín de *S. cinerarioides*) y ASC+RM (Aserrín de *S. cinerarioides* y Rastrojo de maíz).

La rápida colonización de sustratos y maduración temprana del micelio con inóculo líquido también ha sido reportada para especies como *L. edodes* (Kawai et al., 1996), *Pleurotus ostreatoroseus* (Rogéiro et al., 2002) y *P. pulmonarius* (Abdullah et al., 2013). Esto se debe a que el inóculo líquido se utiliza directamente en el sustrato (Frieal y McLoughlin, 2000; Gregori et al., 2007) aumentando el número de puntos de invasión donde se reinicia el crecimiento micelial, comenzando a nutrirse directamente del

sustrato. En el inóculo en trigo, por el contrario, disminuyen los puntos de invasión ya que se inicia por la parte superior de los tubos y en este caso, el micelio primero comenzó a nutrirse de la semilla retrasando así la colonización de los sustratos. Otra desventaja de usar inóculo sólido, es que, cuando se utiliza continuamente un medio de cultivo con una fuente simple de hidratos de carbono, los hongos se vuelven menos eficientes en la colonización de sustratos y producción de cuerpos fructíferos, además de que no son viables metabólicamente (Rogéiro et al., 2002). El uso de inóculo líquido en la presente investigación tuvo resultados favorables desde el inicio de la colonización de los sustratos al tercer día; al contrario de la inoculación con trigo que comenzó al quinto día, tendencia también reportada para *L. edodes* (Kawai et al., 1996). Sin embargo, a pesar de la eficiencia en la colonización de los sustratos con inóculo líquido, Ma et al. (2016) y Silveira et al. (2008) reportan que no existen diferencias en la eficiencia biológica en la producción de cuerpos fructíferos entre diferentes tipos de inóculo. El éxito en el uso de inóculo líquido, se relaciona con la eficiencia a la hora de transferirlo al sustrato, permitiendo una colonización rápida, lo que se traduce en una reducción en la duración del ciclo de producción. La distribución más uniforme del inóculo en el sustrato, proporciona un crecimiento homogéneo del micelio, lo cual disminuye los costos tanto de mano de obra como de materiales; así como la reducción considerable de problemas de contaminación por organismos antagonistas (Frieal y McLoughlin, 2000; Rogéiro et al., 2002; Abdullah et al., 2013; Ma et al., 2016). La aparición de hongos antagonistas puede inhibir el crecimiento del micelio y reducir o anular la producción de las fructificaciones; lo que representa una de las necesidades fundamentales en la industria del cultivo de los hongos comestibles (Mata et al., 2011).

La capacidad de los hongos para crecer en un sustrato no sólo está relacionada con el inóculo utilizado, sino también con el vigor de su micelio, la habilidad de las cepas para explotar adecuadamente los nutrientes del sustrato y tener mayor posibilidad de competir frente a los antagonistas, la producción de enzimas lignocelulolíticas, temperatura de incubación, así como el tamaño de partícula, composición química y pH de los sustratos (Staments 2000; Rogéiro et al., 2002; Mata et al., 2011).

Obtención de cuerpos fructíferos

Los primeros sustratos que formaron primordios fueron RM y RM+ASC con inóculo líquido de la cepa IE 986 después de 5 días de haber inducido la formación de fructificaciones (Figura 2), el resto de los tratamientos tardó de 7 a 10 días, a excepción de los cuatro sustratos inoculados con inóculo líquido de IE 984 y el sustrato AQ tanto con inóculo líquido como sólido en las cuatro cepas donde no hubo formación de primordios.

Los primordios formados presentaron crecimiento cespitoso, los píleos fueron pequeños de color amarillo (#F2F5A9) con estípites largos, lisos de color amarillo (#F2F5A9, #F7D358) con tonalidad más clara cerca del píleo (figura 2). La aparición de los cuerpos fructíferos es un indicativo de que las cepas y los sustratos utilizados son viables. La aparición de las fructificaciones en un periodo de tiempo más corto con inóculo líquido también han sido reportadas para *L. edodes* (Kawai et al., 1996) quienes mencionan que la aparición temprana de primordios es un fenómeno hereditario, que podría ser inducido con el inóculo líquido y retrasado en el sólido. El uso de inóculo líquido junto con el método utilizado en este estudio para la inducción de fructificaciones pueden ser utilizados para probar a pequeña escala la viabilidad de las cepas, sustratos y condiciones ambientales que permitan el cultivo de hongos, antes de ser llevados a nivel de invernadero.



Figura 2. Primordios de *F. mexicana*

A pesar de que, en la presente investigación, la producción de biomasa en medio líquido se llevó a cabo en sistema en Bach, este procedimiento puede ser escalado a nivel de biorreactor para su optimización y

automatización; lo que permitiría aumentar la biomasa producida y reducir considerablemente la producción inóculo y el ciclo de cultivo. Por otra parte, el uso de germoplasma nativo puede diversificar las especies cultivadas comestibles y con propiedades funcionales, así como trabajar con especies de importancia cultural en cada región y utilizar los sustratos disponibles y aptos para su cultivo (Morales et al., 2010).

CONCLUSIONES

Generalmente, el cultivo sumergido o líquido se lleva a cabo para la obtención de sustancias bioactivas, pero al generar altas cantidades de biomasa en periodos cortos de tiempo y espacios pequeños, esta puede utilizarse como inóculo sobre un sustrato sólido. Los resultados fueron favorables utilizando inóculo líquido a base de croquetas para perro adicionado con extracto de levadura y peptona de gelatina, obteniendo en promedio 7.9 g/l de biomasa seca en las cuatro cepas utilizadas de *F. mexicana*. La eficiencia entre inóculo sólido y líquido se midió con base a la velocidad de colonización de los sustratos y densidad del micelio. El rastrojo de maíz y rastrojo de maíz con aserrín de jara fueron los sustratos en donde la velocidad de crecimiento fue mayor con las cepas IE 974 y IE 986 de *F. mexicana* con inóculo líquido. Tanto las cepas como el tipo de sustrato e inóculo interfieren en la pronta colonización de los sustratos y la densidad miceliar, así como en la producción de cuerpos fructíferos. Realizar este tipo de investigaciones permite identificar y modificar los factores que deben ser considerados para el cultivo de especies comerciales o determinar la viabilidad de cepas de especies silvestres, antes de ser llevados a un cultivo a escala experimental, comercial o industrial. Tanto las cepas como el tipo de sustratos e inóculo interfieren en la pronta colonización y densidad miceliar así como en la producción de cuerpos fructíferos.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, N.; Ismail, R., Johari, N. M. K. y Annuar, M. S. M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Sci. Hortic.* 161:65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>
- Arana-Gabriel, Y.; Burrola-Aguilar, C.; Garibay-Orijel, R. y Franco-Maass, S. 2014. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 20:213-226. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>
- Arana-Gabriel, Y. 2018. Cultivo experimental de hongos comestibles silvestres: *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*. Toluca Estado de México. Tesis Doctoral (Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales). Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias.
- Carreño-Ruiz, S. D.; Capello-García, S.; Gaitán-Hernández, R.; Cifuentes-Blanco, J. y Rosique-Gil, E. 2014. Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 5(8):1447-1458. <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263137780009.pdf>
- Chang, S. T. y Miles, P.G. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact.* CRC Press. Boca Raton. 480 p.
- Cui, Y. Q.; van der Lans, J. M. y Luyben, K. C. A. M. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55(5):715-726. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970905\)55:5<715::AID-BIT2>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715::AID-BIT2>3.0.CO;2-E)
- Cruz-Ulloa, B. S. 1995. *Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos.* UNAM, México.
- De la Garza P. M. 2017. Integración del Patrimonio Biocultural sobre los hongos como estrategia de desarrollo sostenible en el parque ecoturístico de Cacalomacan, Estado de México. Toluca

- Estado de México. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales). Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias.
- Elisashvili, V. 2012. Submerged cultivation of medical mushrooms: bioprocesses and products (Review). Int. J. Med. Mushrooms 14(3):211-239.
<http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i3.10>
- Franco, M. S.; Burrola-Aguilar, C. y Arana-Gabriel, Y. 2012. Hongos comestibles silvestres: Un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. EON, México. 342 p.
- Frieal, M. T. y McLoughlin, A. J. 2000. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. Biotechnol. Lett. 22:351-354. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005616516646>
- Grison, C. F. Marchetto, R.; Bettin, F.; Camassola, M.; Salvador, M. y Pinheiro, D. A. J. 2008. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 35:1149-1155. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0394-x>
- Gregori, A.; Svagelj, M. y Pohleven, J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. Food Technol. Biotechnol. 45(3):236-247.
<http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2007/July-September/45-238.pdf>
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velazco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 2013. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. IPN. México. 245 p.
- Hassan, F. R. H.; Ghada, M. M. M. y El-Kady, A.T.M. 2012. Mycelial biomass production of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) by submerged culture. Aust. J. Basic. Appl. Sci. 6(7):603-610.
<https://pdfs.semanticscholar.org/a73d/9056a3d7c1a60b1ca02f61b82fea2244e1c7.pdf>
- Huerta, G.; Martínez-Carrera, D.; Sánchez, J. E. y Leal-Lara, H., 2009. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. Rev. Mex. Micol. 30:31-42.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200004

- Kawai, G.; Kobayashi, H.; Fukushima, Y. y Ohsaki, K. 1996. Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mycoscience* 37(2):201-207. <https://doi.org/10.1007/BF02461345>
- Ma, L.; Quan, L. Y.; Yang, C.; He, Y. Z. y Ling, J. X. 2016. Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust. *Sci. Hortic.* 209:22-30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.001>
- Mata, G.; Ortega, S. C. y Pérez, M. R. 2011. Inóculo suplementado: evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café. *Rev. Mex. Micol.* 4:53-61. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802011000200008
- Mayett, Y. y Martínez-Carrera, D. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. In Martínez-Carrera, D.; Curvetto, N.; Sobal, M.; Morales, P. y Mora, V. M. (eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. México. 293-329 pp.
- Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., Ramírez-Carrasco, P., Tello, I., Spezzia, T., Lira, N., De Lima, R., Villa, S., Montiel, E., Martínez-Carrera, D. 2010. In Martínez-Carrera, D.; Curvetto, N.; Sobal, M.; Morales, P. y Mora, V. M. (eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. México. 91-108 pp.
- Petre, M.; Teodorescu, A.; Țuluca E.; Bejan, C. y Andronescu A. 2010. Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15(2): 50-55. <https://www.rombio.eu/rbl1vol15Supplement/7%20Petre%20Marian.pdf>
- Psurtseva, N. V. 2005. Modern taxonomy and medical value of the *Flammulina* mushrooms. *Int. J. Med. Mushrooms* 7:449-451. [http://www.dl.begellhouse.com/download/article/09c9296052c6992a/IJM%200703%20\(44](http://www.dl.begellhouse.com/download/article/09c9296052c6992a/IJM%200703%20(44)

9-451).pdf

- Redhead, A. S.; Estrada-Torres, A. y Petersen, H. R. 2000. *Flammulina mexicana*, a New Mexican Species. *Mycologia*. 92(5):1009-1018. <https://doi.org/10.2307/3761595>
- Ríos, M.; Hoyos, J. y Mosquera, S. 2010. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Rev. Bio. Agro.* 8:86-94. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200012
- Rosado, F. R.; Kimmelmeier, C. y Da Costa, S. M. 2002. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *J. Basic. Microbiol.* 42:37-44. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<37::AID-JOBM37>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<37::AID-JOBM37>3.0.CO;2-S)
- San Roman, A. E. 2014. Conocimiento tradicional en el aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en el Nevado de Toluca. Toluca Estado de México. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales) Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias.
- Sharma, V. P; Kumar, S. y Tewari, R. P. 2008. *Flammulina velutipes*, the culinary medicinal winter mushroom. *Technical Bulletin. Directorate of Mushroom Research, New Delhi.* 53 p.
- Shrestha, B.; Lee, W. H.; Han, S. K. y Sung, J. M. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology* 34(2): 83-91. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.2.083>
- Silveira, M.; Furlan S. y Ninow J. 2008. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(4):858-862. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400014>
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms.* Ten Speed Press, China. 596 p.
- Stamets, P. 2005. *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World* (Primera ed.). Ten Speed Press. Estados Unidos de América. 356 p.


Tradd, C. 2014. Organic Mushroom Farming and Mycoremediation: Simple to Advanced and Experimental Techniques for Indoor and Outdoor Cultivation. Chelsea Green Publishing. Estados Unidos de América. 277-280 pp.

CAPÍTULO III.


CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Lyophyllum secc. Difformia*


CAPÍTULO III. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Lyophyllum* secc. *Difformia*

Artículo 3. Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains from wild edible mushrooms of *Lyophyllum* of Central Mexico. Aceptado para su publicación en el Brazilian Journal of Microbiology.



BRAZILIAN
JOURNAL OF
MICROBIOLOGY



CRISTINA BURROLA | My Journals | Log Out | Help 

Home

Reports


Activity History

Activity History

Decision Summary [Across all Original Submissions/Revision]

Accept: 1 Minor Revision: 1

Authored Submissions

View 

Manuscript Number	Manuscript Title	Initial Date Submitted	Status	Status Date	Letter:
BJM_2017_676_R1	Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains from wild edible mushrooms of <i>Lyophyllum</i> of Central Mexico	01/Sep/2017	Accepted	13/Dec/2017	Accept
BJM_2017_676	Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains from wild edible mushrooms of <i>Lyophyllum</i> of Central Mexico	01/Sep/2017	Under Revision	09/Nov/2017	Minor Revision

**Genetic characterization, evaluation of growth and production of biomass of strains
from wild edible mushrooms of *Lyophyllum* of Central Mexico**

Strains of *Lyophyllum* from Central Mexico

Yolanda Arana-Gabriel^{1a}, Cristina Burrola-Aguilar^{1b*}, Roberto Garibay-Orijel^{2c}, Noemí Matías-Ferrer^{2d}, Sergio Franco-Maass^{3e}, Gerardo Mata^{4f}

¹Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. km 14.5, carretera Toluca-Atzacomulco. C. P. 50200. Toluca, Estado de México. MÉXICO. ^aagy-arana@hotmail.com, ^bcba@uaemex.mx

*Correspondent author. ^bcba@uaemex.mx. Tel.: +52 (722) 2 96 55 53

²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria. A. P. 70-233. C. P. 04510. Ciudad de México. MÉXICO. ^crgaribay@ib.unam.mx, ^dnoemi.matias@st.ib.unam.mx

³Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas. Toluca, Estado de México. MÉXICO. ^esfrancom@uaemex.mx

⁴Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, C. P. 91070. Veracruz, MÉXICO. ^fgerardo.mata@inecol.edu.mx

Abstract

The present study conducted a genetic characterization and determined growth rate and biomass production in solid and liquid media, using strains obtained from wild edible sporomes of *Lyophyllum* that grow in high mountains. Vegetative isolation was used to obtain a total of four strains, which were divided into two clades within the section *Difformia*: *Lyophyllum* sp. and *Lyophyllum* aff. *shimeji*. Growth rate and biomass production were influenced by both the culture media and the strains. In a potato dextrose agar medium, the strains presented a higher growth rate, while in a malt extract-peptone and yeast agar medium, the growth rate was lower, but with a higher biomass production that was equal to that in the malt extract-peptone and yeast liquid medium.

Key words: *Lyophyllum* section *Difformia*, Native germplasm, Culture, Mycelium, Pellets

Introduction

Wild edible mushrooms play an important role in natural ecosystems and have great economic potential. Management of their natural populations should therefore be based on sustainable development, through local knowledge and the study of species domestication techniques, that allows long-term conservation of the wild germplasm [1-3]. Technological development surrounding strains of wild edible mushrooms should preferentially be focused on species that are adapted to local climatic conditions and to the existing substrates of each region in order to be successfully cultivated [4].

There are 92 species of wild edible and medicinal mushrooms that can be cultivated [5]. The genus *Lyophyllum* is of great economic, culinary and medicinal importance, as well as being

used for auto-consumption, and some of its edible species are characterized by their excellent flavor and texture [6-11]. These species are phylogenetically classified within the section *Difformia*, although their taxonomic position can be confusing as a result of their morphological plasticity [12, 13]. In general, they are saprobic species; however, some can be facultative ectomycorrhizal [10].

Commercially cultivated species of *Lyophyllum* include *L. shimeji* (Kawam.) Hongo, *L. decastes* (Fr.) Singer and *L. fumosum* (Pers.) P.D. Orton [5, 9, 11, 14-17]. Despite the fact that *L. shimeji* forms ectomycorrhizae, it has been cultivated successfully in synthetic medium thanks to the capacity of the mycelium for rapid growth in generalist media, such as potato dextrose agar [13]. There is controversy in the case of *L. decastes* and *L. fumosum*, since both have been reported as saprobic or ectomycorrhizal [10, 13, 14, 18, 19]. This could be related to the geographic origin of the strains and to the habitat in which they develop. This inconsistency could also be a consequence of incorrect species identification [10, 12]. In Mexico, both species are considered edible and are of cultural and dietary importance. They are commonly known as “clavitos”, “enterrados” or “macoyitas” and are rare and difficult to find. They grow in forests of *Pinus*, *Pinus-Alnus*, *Pinus-Abies* and *Abies religiosa* [6, 7, 20-23].

Commercial cultivation of *Lyophyllum* spp. is a long and complex process. Most studies are focused on the acquisition of biomass in submerged cultures, which is considered a viable alternative for obtaining high quality mushrooms, rich in immunostimulant polysaccharides [8]. The necessity of generating knowledge regarding the genetic resources of native fungi of central Mexico is therefore proposed. The objectives of the present study were to characterize native high mountain strains of the genus *Lyophyllum*, as well as to determine their growth rate and biomass production in both solid and liquid media. It is intended to use this information to lay a base groundwork that help to know optimum conditions for the growth and conservation of

germplasm (strains), for further work on fruiting bioassays.

Materials and Methods

Biological material

Strains were obtained by vegetative isolation from sporophores of the genus *Lyophyllum*. Mushrooms were collected through directed sampling in forests of *Pinus* spp. and *Abies religiosa* within the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area (APFFNT, by its Spanish acronym) in State of Mexico, Mexico. Collections were conducted with the help of key informants, who provided information during the fieldwork about the use of these mushrooms as food. The specimens were herborized [24], characterized with basic mycology techniques, identified [11, 25, 26] and deposited in the Fungi Collection of the Nacional Herbarium of Mexico at the Institute of Biology, UNAM (MEXU), with herbarium numbers 28148, 28147 and 28149. The strains were deposited in the Strain Collection of the Institute of Ecology (INECOL) in Xalapa, Veracruz, Mexico, with the keys IE 981, IE 982, IE 983. Along with the strains obtained, analysis was conducted on strain IE 975, which had already been deposited in the strain collection after being obtained in a previous study [27]. The DNA of the strains was extracted and sequenced and their growth rate and biomass production in solid media and biomass production in liquid media evaluated.

Genetic characterization

An XNAP kit (Sigma-Aldrich) was used to extract the DNA from the strains. A dissection needle was used to take 1 to 2 mm² of aerial mycelium from each strain in the PDA medium. The mycelium was incubated for 10 min at 65 °C and 10 min at 95 °C in 20 µl of extraction

solution in a thermocycler (Bio-Rad, model T100). Following incubation, 20 µl of dilution solution was added and the mixture incubated at ambient temperature for 30 min [28]. The ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the primers ITS1F and ITS4 [29], following the protocol of Izzo et al. [30]. The quality of the PCR products was reviewed by electrophoresis in 1% agarose gels. Good quality products were selected and cleaned using a mixture of 1 µl of ultrapure water and 1 µl of ExoSAP-IT (USB-Affimetrix) for each 3.5 µl of PCR product. The sequencing reaction was conducted with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. The DNA was sequenced in both directions, using the same primers used in the PCR, in a sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems) in the Laboratory of Genomic Sequencing of Biodiversity and Health of the Institute of Biology, UNAM. The sequences were edited and assembled in Geneious Pro R7 (Biomatters). The sequences of each strain were deposited in GenBank with the accession numbers KY195930, KY195931, KY195932 and KY195933.

The phylogenetic analyses used the DNA sequences of clade V (section *Difformia*) for phylogenetic analysis of the family Lyophyllaceae [31]. Sequences of specimens of *Lyophyllum* collected previously in State of Mexico were also used (Table 1). The outgroup was *Lyophyllum leucophaeatum* (AF357032). The ITS sequences were aligned in Muscle [32] and analyzed using methods of maximum likelihood and by Bayesian inference in Geneious Pro R7 (Biomatters). The final alignment had 573 bp and an overall nucleotide pairwise identity of 94%. The best substitution models were chosen with MrModelTest version 2 [33]. The analyses of maximum likelihood used the PhyML algorithms [34], searching for the tree topology with BEST and GTR as a substitution model. Bootstrap (MLb), with 1000 replications, was used to test the support of the branches. In the Bayesian analysis, the algorithms of MrBayes were applied [35], using the radial of the Gamma variation and the GTR model of substitution with

four Monte Carlo chains over 1,000,000 generations. Each 400 generations was sampled with a temperature value of 0.2. In order to test the support of the branches, the branch length values were stored and posterior probabilities (BPp) calculated. ITS sequences were used in the Bayesian and the maximum likelihood analysis

Table 1. Strains and specimens of *Lyophyllum* studied

ID	Strain	Species	MEXU	GenBank	Vegetation	Site
LyIE 975	IE 975	<i>Lyophyllum</i> sp.	27406	KY195930	<i>Abies religiosa</i>	APFFNT
Ly3	IE 982	<i>Lyophyllum</i> sp.	28148	KY195932	<i>Pinus</i> sp.	APFFNT
Ly1	IE 981	<i>Lyophyllum</i> sp.	28147	KY195931	<i>Pinus</i> sp.	APFFNT
AR09641	-	<i>Lyophyllum</i> sp.	25876	KT875066	<i>Pinus</i> sp.	Amanalco
CB08330	-	<i>Lyophyllum</i> sp.	25761	KT875064	<i>Abies religiosa</i>	Amanalco
Ly5.3	IE 983	<i>Lyophyllum</i> aff. <i>shimeji</i>	28149	KY195933	<i>Abies religiosa</i>	APFFNT
GO-2009-278	-	<i>Lyophyllum</i> aff. <i>shimeji</i>	26748	KT875068	-	Amecameca
HC-PNNT-078	-	<i>Lyophyllum</i> aff. <i>shimeji</i>	26594	KT875069	<i>Abies religiosa</i>	APFFNT
HC-PNNT-246	-	<i>Lyophyllum</i> aff. <i>shimeji</i>	26689	KT875070	<i>Abies religiosa</i>	APFFNT

Culture media

Vegetative isolation was conducted in the potato dextrose agar (PDA) medium. For evaluation of the strains (growth rate and biomass production) in solid media, malt extract- peptone and yeast agar (ME-PYA) and PDA were used. The PDA medium was prepared with 39% w/v potato dextrose agar BD Bioxon^{MR}; the medium ME-PYA was prepared with 33.6% w/v malt extract agar BD DifcoTM, 2% w/v yeast extract BD Bioxon^{MR} and 1% w/v gelatin peptone BD Bioxon^R. For the liquid media, malt extract with peptone and yeast (ME-PY) and potato dextrose (PD) were used. The medium ME-PY was prepared with 33.6% w/v malt extract BD BactoTM, 2% w/v yeast extract BD Bioxon^{MR} and 1% w/v gelatin peptone BD Bioxon^R. The medium PD was prepared with 39% w/v potato dextrose broth BD DifcoTM. All culture media were sterilized in an autoclave at 121 °C, 15 lbs psi for 15 minutes and 0.05 g of Chloramphenicol (Sigma[®]) were added.

Evaluation of strains in solid media

Strain characterization

Morphological characterization of the strains was carried out according to Cruz-Ulloa [36], using the color key “HTML color codes” (html-color-codes.info/). For microscopic characterization, a sample of mycelium was taken from the periphery of the strain and temporary preparations were made with Congo red dye at 10%. In these, the presence or absence of clamps was determined and the diameter of the hyphae measured at 100x (20 hyphae per treatment) using a Motic® optical microscope and the software for the Motic Digital Microscope DMB3-223 (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004).

Growth rate and biomass production

A cork borer was used to take a sample of agar with mycelium 5 mm in diameter. Five replicates were taken of this agar sample per culture medium and strain and each was placed in the center of a Petri dish (9 cm in diameter). The Petri dishes were incubated in darkness at 18 °C taken from that reported by a previous study [27] and every third day the colony diameter was measured with a vernier (5” metal vernier caliper, Pretul®, China). The growth rate (GR) was obtained from the equation $GR=(F_d-I_d)/(F_t-I_t)$ (where “ F_d ” is the final diameter of growth, “ I_d ” the initial diameter of growth and “ F_t-I_t ” = the days of mycelial growth) [37]. At the end of the incubation period of the strains, the agar was eliminated by immersion in boiling water and the mycelium was then rinsed with hot water. Once washed, it was oven dried at 80 °C for 24 hours and its dry biomass recorded [27].

Evaluation of strains in liquid medium

Production of biomass

In 250 ml Erlenmeyer flasks, 100 ml of the ME-PY and PD media were placed with five replicates per strain and culture medium. The media were inoculated with mycelium of each strain of 0.5 cm in diameter and incubated in darkness for 20 days at 18 °C and at 120 rpm in a PolyScience® agitating water bath. At the end of the incubation period, the mycelium was filtered and washed with distilled water then oven dried at 80 °C for 24 hours and then weighed. The pH of the medium was measured at the beginning and end of the incubation period.

Mycelial characterization

Characterization of the morphology of the mycelium was conducted prior to drying using a Motic® stereoscopic microscope. The number of pellets formed was quantified and their diameter measured with a vernier. For microscopic characterization, samples of the pellets were taken at the end of the period of agitation and temporary preparations made with Congo red dye at 10 % for observation under a Motic® optical microscope and corroboration of the presence of clamps.

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted with the program Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009). The effect of the interaction between the strains and the culture media on the growth rate and biomass production was evaluated using a multivariate analysis of variance (MANOVA). Significant differences among culture media were determined with a Tukey multiple range test ($p \leq 0.05$) and correlation analysis was performed between biomass production and growth rate in the solid medium. The data presented a normal distribution.

Results

Biological material

The sporophores that were collected and different morphotypes. The sporophores of strain IE 983 (MEXU 28149) have a size of the pileus of 1.9-7 cm, convex, smooth surface and incurved margin or plane, dark brown (#2A1B0A) a brown-greyish (#2A1B0A-#1C1C1C). Lamellae slightly decurrent or free, white (#FFFFFF) to cream (#FBF8EF). Stipite of 2.7-6 x 0.9-2 cm, cylindrical, fibrous-cartilaginous and white-cream (#FAFAFA-#F8ECE0). Subglobose spores of 6.2 (4.5-7) x 3.8 (3.4-4.2) μm and basidia of 32 (30.4-34.6) x 6.5 (5.4-7.3) μm .

The sporophores morphology of the strain IE 975 (MEXU 27406), IE 981 (MEXU 28147) and IE 982 (MEXU 28148) is varied, the size of the pileus ranges from 2 to 9 cm across, of form flat-convex, slightly umbonate, with smooth and incurved edge, crema-greyish (#FBF8EF-#D8D8D8), light brown (#61380B) to brown (#3B240B). Lamellae from free adhered to slightly decurrent, white (#FFFFFF), cream (#FBF8EF) and greyish (#D8D8D8). Stipe cylindrical of 3-9 cm in length, smooth or slightly striate, cream-greyish (#FBF8EF-#D8D8D8), or brown (#613F0B). In terms of size of the spores and the basidia, the specimens of the strains IE 981 and IE 975 are different to IE 982. The specimens of strains IE 981 and IE 975 have globose to subglobose spores of 3.5-6.5 x 3.8-6 μm with basidia of 23-36 x 5-8 μm , the specimen of strain IE 982 has spores of 4.9-7 x 5.3-7 μm and basidia of 36-42 x 3.4-4.5 μm .

Genetic characterization

The strains and sporophores were divided into two lineages of *Lyophyllum* within clade V (section *Difformia*). The first was formed by the strain IE 983, by sporophores bought in the

market of Amecameca, State of Mexico and by sporophores collected in the APFFNT (in the zone from which all the strains were obtained). This clade was recognized both by the Bayesian and maximum likelihood analyses with a high level of support (BPp = 0.99, MLb = 91.6). In both cases, this is the brother clade of *L. shimeji*. The second clade was formed by the strains IE 981, IE 982 and IE 975, together with specimens collected in Amanalco, State of Mexico. This clade had good support in the Bayesian analysis (BPp = 0.87) (Figure 1), but no support in the analysis of maximum likelihood (MLb = 31.5). In both analyses, the position of this clade is uncertain within the clade of *L. decastes* s.l. (*L. decastes*, *L. fumosum*, *L. conglobatum*). The table 1 shows the data of the strains generated in the present research, as well as their ID was used in the Bayesian inference analysis (Figure 1)

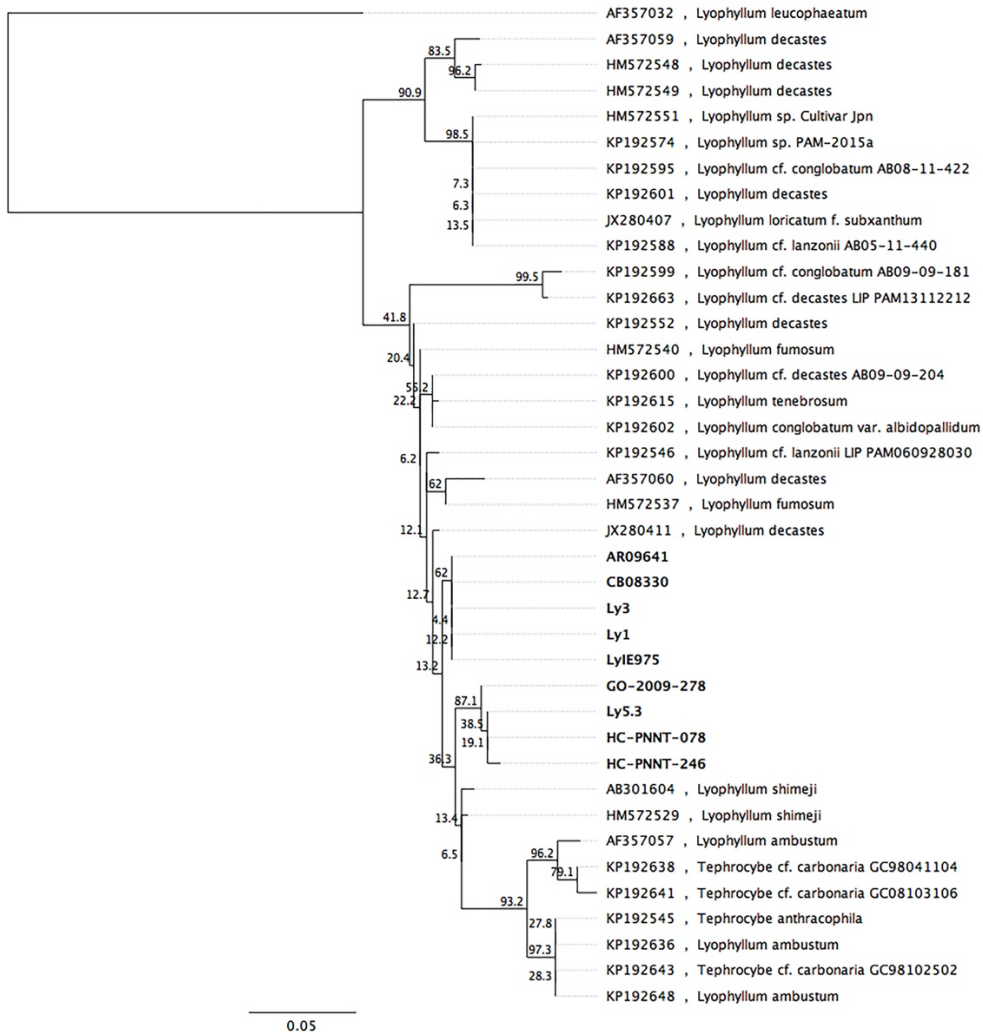


Fig. 1. Analysis of Bayesian inference based on ITS sequence of *Lyophyllum* section *Difformia* that includes the strains and specimens of *Lyophyllum* collected in the State of Mexico. LyIE975 (IE 975), Ly3 (IE 982), Ly1 (IE 981), Ly5.3 (IE 983).

Characterization of the strains

Four native strains of *Lyophyllum* were evaluated, of which three were obtained in the present study (IE 981, IE 982 and IE 983) and one was previously deposited in INECOL (IE 975). These strains presented morphological differences on culturing in different media (Figure 2).

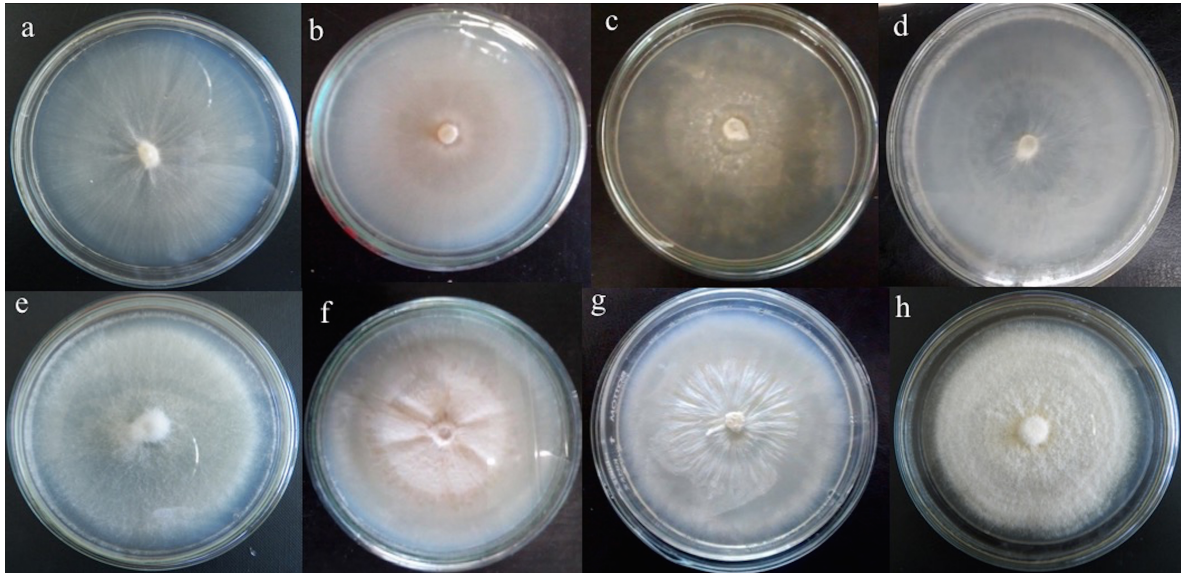


Fig. 2. Strains of *Lyophyllum* secc. *Difformia* at 18°C. a-d: strains on PDA, e-h: strains on ME-PYA; a, e: strains IE 975; b, f: strains IE 981; c, g: strains IE 982; d,h: strains IE 983

The strain IE 975 presented prostrate mycelium in ME-PYA and submerged-prostrate mycelium in PDA, while in IE 981, the mycelium was submerged in PDA and submerged-prostrate in ME-PYA. The strain IE 982 presented differences between both media, from color to surface type. This was also true of IE 983, where only the circular form was similar in both media. Exudates were absent in all the cases (Table 2, Figure 2).

Table 2. Macromorphological characterization of four *Lyophyllum* strains

Strain	Culture medium	Color	Form	Edge	Mycelial growth	Texture	Surface
IE 975	PDA	light yellow (#FBFB EF)	circular	fimbriate	submerged - prostrate	velvet	concave
	ME-PYA	light yellow (#BFB BEF)	circular	fimbriate	prostrate	velvet	concave
IE 981	PDA	light yellow (#BFB BEF)	circular	fimbriate	submerged	smooth	flat
	ME-PYA	light yellow (#BFB BEF)	circular	fimbriate	submerged - prostrate	smooth	flat
IE 982	PDA	light yellow (#BFB BEF)	circular	smooth	submerged - prostrate	smooth	flat
	ME-PYA	white (#FFFFFF)	circular	fimbriate	prostrate - aerial	cotton	concave
IE 983	PDA	white (#FFFFFF)	circular	smooth	submerged - prostrate	smooth	flat
	ME-PYA	white (#FFFFFF)	circular	fimbriate	prostrate - aerial	cotton	concave

PDA: Potato dextrose agar, ME-PYA: Malt extract-peptone and yeast agar.

Microscopically, the four strains developed branched, septate, smooth hyphae with rotundate hyphal termination and abundant and frequent presence of clamps. The average diameter of the hyphae for the strain IE 975 was 1.9 μm in PDA, and 1.6 μm in ME-PYA, the strain IE 983 presented an average diameter of 2.9 μm in PDA and 3.1 μm in ME-PYA, the strain IE 981 was 2.4 μm in PDA and 2.2 μm in ME-PYA and the strain IE 982 was 2.3 μm in PDA and 2.7 μm in ME-PYA.

Evaluation of the strains in solid medium

The mycelium presented significant differences in growth rate ($F_{1,39} = 128.23, p \leq 0.0001$) in the two culture media used, with that of the PDA medium reaching up to 0.4 $\text{cm} \cdot \text{día}^{-1}$; with a maximum diameter of 9 cm reached in approximately 21 days, and that of the ME-PYA medium presenting a minimum rate of 0.31 cm/day . Differences in growth rate not only depended on the culture medium but also on the strain ($F_{3,39} = 59.69, p \leq 0.0001$). Table 3 shows that, according to the Tukey multiple range test, four groups were formed; the higher growth in the medium PDA was present in three (IE 975, IE 982 and IE 983) of the four strains, followed by IE 982 and 983 in ME-PYA with 0.37 and 0.34 cm/day low respectively. The strain IE 981 in both culture media and IE 975 in ME-PYA presented, on average, the lowest growth rate. The formation of the groups is generated from the interaction ($F_{3,39} = 22.00, p \leq 0.0001$) between the factors: culture media and strains, which affects the growth rate of the mycelium. For this reason, each strain requires a different medium to favor its development.

Table 3. Growth rate and biomass production in solid and liquid media

Strains	Solid medium			Liquid medium	
	Culture medium	Growth rate (cm/day)	Biomass (g/ Petri dish)	Culture medium	Biomass (g/l)
IE 975	PDA	0.40 a*	0.09 c	PD	5.79 cd
	ME-PYA	0.32 cd	0.22 b	ME-PY	8.52 abcd
IE 981	PDA	0.32 cd	0.38 a	PD	11.12 ab
	ME-PYA	0.31 d	0.36 a	ME-PY	11.98 a
IE 982	PDA	0.38 ab	0.20 b	PD	5.54 d
	ME-PYA	0.37 b	0.30 a	ME-PY	9.62 abcd
IE 983	PDA	0.40 a	0.16 bc	PD	7.48 bcd
	ME-PYA	0.34 c	0.18 b	ME-PY	9.92 abc

PDA: Potato dextrose agar, ME-PYA: Malt extract-peptone and yeast agar, PD: potato dextrose, ME-PY: Malt extract with peptone and yeast. *Different letters in the same column indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

In terms of the biomass production in the solid medium, significant differences were also presented among the strains ($F_{3,39} = 54.11, p \leq 0.0001$) and the culture media ($F_{1,39} = 19.73, p \leq 0.0001$) and there was an interaction between both factors ($F_{3,39} = 7.28, p \leq 0.05$) that influenced biomass production. The highest biomass production was presented in the strain IE 981 in both culture media (Table 3), and in IE 982 in the medium ME-PYA, with an average maximum of up to 0.383 g / Petri dish, followed by IE 975 and IE 983 in the medium ME-PYA, IE 982 and IE 983 in PDA and a lower production with IE 975 in PDA. There was a negative and statistically significant correlation ($p \leq 0.0001, r = -0.6334$) between growth rate and biomass production. That is, the strains that developed the highest biomass were generally those that presented the lowest average growth rate.

Evaluation of strains in liquid medium

For biomass production in liquid medium, significant differences were presented among strains ($F_{3,39} = 9.55$, $p \leq 0.0001$), with IE 982 the strain that generated the highest quantity of biomass in both culture media, followed by IE 975, IE 982 and IE 983 in ME-PY and these latter strains, with a lower production, in PD. These results show that there are significant differences between the culture media ($F_{1,39} = 15.61$, $p \leq 0.05$), with the ME-PY the most efficient in terms of biomass production (11.98 g/l), which is up to double that of the PD (5.54 g/l) (Table 3). In contrast to the biomass production in the solid medium, there was no relationship between the culture medium and the strains in the liquid medium ($F_{3,39} = 1.07$, $p \geq 0.05$) that would affect biomass production.

In general, in terms of both biomass production and growth rate, the strains behaved differently among themselves and among culture media. In PD, the strains had a higher growth rate, while in ME-PY the rate was slow but with a greater biomass production, as was the case in ME-PY. In the liquid media, the four strains formed pellets; however, in ME-PY, where there was greater biomass production (Table 3) after 20 days in agitation, the pellets were saturated and formed a conglomerate of gelatinous consistency.

In PD, the pellets were spongy with short filaments on the periphery, a characteristic known as the “hairy length” [38]. The number and diameter of pellets differed in each strain; in IE 975, a minimum of 2 and a maximum of 9 were formed, with diameters from 1 to 3.2 cm; in IE 982, there were from 6 to 24, with diameters of 0.6 cm to 4.2 cm; in IE 983, from 8 to 12 with diameters of 1.6 to 4 cm, and in IE 981, from five to 11, with diameters of 0.9 to 4.5 cm.

The initial pH of the culture media was 5 for ME-PY and 5.7 for PD. At the end of the 20 days of incubation and agitation, this was different in the four strains and in the two culture media. The strain IE 975 presented a final pH of 4.3 in ME-PY and 4.8 in PD, the strain IE 983 was 4.8

in both media, IE 981 was 4.2 in ME-PY and 5.5 in PD and the strain IE 982 was 5.9 in ME-PY and 6.1 in PD. As was the case in the solid medium, the four strains in the liquid medium presented abundant clamps.

Discussion

The two clades into which the strains and sporophores of *Lyophyllum* collected in the State of Mexico were differentiated, are found in the section *Difformia*, which is located in the clade Vb that resolves 5 phylopecies, 9 morphospecies and 5 morphogenetic species [4]. Clade 1, formed by the strain IE 983 (Ly5.3) and specimens obtained in markets and by collection in the APFFNT (GO-2009-278, HC-PNNT-078, HC-PNNT-246), is brother to the clade /Vb-6 shimeji, which comprises one strain [31, 39] and a wild specimen associated with coniferous forest [12, 31], with a high level of support both in the Bayesian analysis and in the maximum likelihood. The morphological characteristics of the specimen from which the strain was obtained, as well as its spore size, match the characteristics reported for *L. shimeji* [11]. The position as a brother clade to that of *L. shimeji* (Figure 1) could be attributed to different conditions such as probable recent evolution or to the geographic origin or habitat in which they develop, since *L. shimeji* has been reported in association with *Pinus* in Asia [10, 12], while the specimens and strains in the present study are associated with *Abies religiosa*. This agrees with that reported for the clade of *L. fumosum* and *L. decastes*, who separated these into two subclades because they develop in different vegetation types (deciduous and coniferous forests, respectively) [12].

The position of clade 2 formed by the three other strains: IE 975, IE 982 and IE 981 and two specimens collected (AR09641 and CB08330) is uncertain (MLb=31.5) within clade Vb, and

the morphological characterization of the sporophores does not provide the data that would allow a more accurate classification. The specimens of those that were obtained are genetically similar among themselves; however, their morphology and microscopia is varied, but the size of the spores is similar to that of *L. decastes* [26]. However, the basidia do not match those of any of the other species within the section *Difformia*. Likewise, there are differences in terms of habitat (Table 1), since they are found both in the forest of *Abies religiosa* and *Pinus* sp. Confusion in the identification of the species is generated by the intraspecific plasticity of the species classified in the complex *L. decastes* within the section *Difformia* [11, 12, 26].

The specific clades within the clade /Vb are not clearly differentiated, due to the paraphyletic characteristic of the clade Vb-7 supported by a cryptic species (AF357060), while the clade Vb-8 is monophyletic and phylogenetically more distant from Vb-7 [31]. Other studies have found the same problem in delimitation of species within this clade [12]. The identification must be accompanied by a phylogenetic analysis and examination of ecological aspects, as well as a characterization at strain level [10, 40, 41]. For this reason, delimitation of these species requires a comprehensive taxonomic study, in which the possibility of describing them as new species is given consideration.

Regarding the characteristics of the strains of the two species, these are differentiated mainly by the color of the mycelium (Table 2) while sharing some other characteristics, such as the absence of anamorphic structures, the form of mycelium growth and the presence of abundant clamps and a fimbriate edge. This agrees with that reported for strains of different *Lyophyllum* species within the sections *Lyophyllum*, *Difformia* and *Tephrophana* [41]. A detailed study of the strains could generate more accurate information for identification of the species. However, the description of the strains in this study does not provide data regarding distinctive characteristics that would permit differentiation among the species [40, 41]. The characteristics of the strains

(physiology, diameter, growth rate) also provide information about the influence of temperature or pH or even the chemical composition of the culture media on the mycelial growth and production; these are parameters used in bioassays and in physiological studies that could provide data regarding suitable conditions for cultivation [42, 43]. In this case, the incubation temperature of the strains was 18 °C, taken from that reported by a previous study [27]. In this respect, the temperature used is lower than that reported for *L. decastes* which grows at 20 °C [44], *L. fumosum* at 25 °C [17] and *Lyophyllum* spp. from 20 to 25 °C [41]. Optimum incubation temperature depends on the climatic conditions of the regions of origin of the strains [4]; for this reason, it is logical that our strains would have lower optimal temperatures since they develop in high mountain environments and are adapted to lower temperatures.

Regarding the growth rate, the strain IE 983, which corresponds to *L. aff. shimeji* and IE 975 of *Lyophyllum* sp. presented a higher growth rate than that reported for *L. shimeji* and *L. decastes*, with growths of 47 to 60 mm and 22 to 85 mm, respectively, after four weeks of incubation [41]. Growth rate and biomass production are related to nutrient sources and a suitable C: N ratio [45].

In the culture media where the mycelium invaded more rapidly, biomass production was much lower and the strains that developed more biomass were those that had, on average, a lower growth rate. This suggests that the best nutritional conditions are provided by the medium based on malt extract, allowing increased hyphal branching and thus a higher quantity of biomass. In contrast, in the potato dextrose medium, the rapid growth rate shows that, under nutrient limiting conditions, the hyphae tend to be less branched and grow at a higher rate in order to maximize exploration of the medium in search of nutrients [45-47].

In liquid medium, biomass production, production of polysaccharides and the form of growth (pellets) are influenced by the strain and the culture medium as well as by the method of culture

initiation, the size of spawn of the strain and the intensity of agitation [48-51]. The culture medium (source of carbon and nitrogen) also intervenes in the density and diameter of the pellets [49, 52]. The strain that had the greatest biomass developed a higher number of pellets, a result that was very similar to that of *Sparassis latifolia* Y.C. Dai & Zheng Wang [53]. The medium based on malt extract supplemented by peptone and yeast was the most suitable for all four strains of *Lyophyllum*. This medium is considered one of the best sources of nitrogen for high mycelial growth. The peptone and/or yeast extract are also recognized efficient sources of nitrogen for the production of biomass in *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. and *L. decastes* with maltose and glucose serving as sources of carbon [8, 54]. In the case of *L. decastes*, there was a greater yield and production of polysaccharides in glucose, as a source of carbon, and yeast [8], in contrast to the four strains of *Lyophyllum*, that present greater biomass production in a medium that is rich in nitrogen.

The biomass generated in a liquid medium can be used as a liquid spawn, as a food and dietetic supplement, and for pharmaceutical applications and enzyme production [54,55] due to the production of polysaccharides [8]. The pH of the media was not adjusted, but at the end of the period of agitation it had changed in each of the strains in both culture media. This could be due to the high biomass production and, while this was not measured, the production of metabolites; factors that modify the pH at the end of the incubation period [52, 53].

Mushrooms cultivation using native strains, particularly of *Lyophyllum*, requires studies that comprise the characterization and identification (morphological and genetic) of the sporophores and strains utilized; knowledge of ecological aspects, life cycles, production and composition of metabolites and identification of substrate types and environmental conditions suitable for fructification [1, 3, 4].

Lyophyllum is a genus with potential for commercial culture and has functional and medicinal properties [9]. The strains IE 982 of *Lyophyllum* sp. and IE 983 of *L.* aff. *shimeji*, that presented the best conditions in the *in vitro* culture, represent an excellent option for studies focused on the acquisition of secondary metabolites and their experimental culture at substrate level. Working with native strains constitutes a good alternative for the regional management of germplasm adapted to the climatic and substrate conditions where they develop naturally, eliminating dependence on strains from other countries.

References

1. Alvarado-Castillo G, Mata G, Benítez-Badillo G. Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque*. 2015;36 doi: 10.4067/S0717-92002015000200001
2. Iriundo-Alegria JM. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Invest. Agrar Prod Prot Veg*. 2001;16(1):5-24.
3. Salmones D, Mata G. Cepario de hongos en México. In: Sánchez VJ, Mata G, eds. *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica, investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. México: Inecol- Ecosur; 2012:69-77.
4. Mata G, Savoie JM. *Agaricus subrufescens* un hongo comestible y medicinal de gran potencial en México. In: Sánchez VJ, Mata G, eds. *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica, investigación y desarrollo en un entorno multicultural* México: Inecol- Ecosur; 2012:137-142.
5. Boa E. Los hongos silvestres comestibles. *Perspectiva global de su uso e importancia para la población*. Roma: FAO; 2005; No. 17.

6. Estrada-Martínez E, Guzmán G, Cibrián-Tovar D, Ortega-Paczka R. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la sierra nevada (México). *Interciencia*. 2009;34(2):25-33.
7. Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J, Caballero J. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Divers*. 2004;17:115-143.
8. Pokhrel C, Ohga S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chem*. 2007;105. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.033
9. Pokhrel C, Sumikawa S, Iida S, Ohga S. Growth and productivity of *Lyophyllum decastes* on compost enriched with various supplements. *Micol Apl Int*. 2006;18(2): 21-28.
10. Visnovsky SB, Cummings N, Guerin-Laguette A, et al. Detection of the edible ectomycorrhizal fungus *Lyophyllum shimeji* colonizing seedlings of cultivated conifer species in New Zealand. *Mycorrhiza*. 2014;24. doi:10.1007/s00572-013-0552-5
11. Yamanaka K. Commercial cultivation of *Lyophyllum shimeji*. Mushroom news. Presented at the 6th international conference on mushroom biology and mushroom products, Bonn, Germany, 2009
12. Larsson E, Sundberg H. *Lyophyllum shimeji*, a species associated with lichen pine forest in northern Fennoscandia. *Mycoscience*. 2011;52. doi:10.1007/s10267-010-0104-1
13. Otha A. Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience*. 1994;35. doi:10.1007/BF02268533
14. Akamatsu Y. Reutilization of culture wastes of *Pleurotus ostreatus* and *Pholiota nameko* for cultivation of *Lyophyllum decastes*. *J Wood Sci*. 1998;44. doi:10.1007/BF01130458

15. Yamada A, Ogura T, Ohmasa M. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis; II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza*. 2001b;11. doi:10.1007/s005720000093
16. Yoshihama YM, Kusakabe KO, Matsui SO, Morita HO. Biologically pure mushroom culture and method for mushroom cultivation. Patent number US005349121A. 1994.
17. Xiao L, Shiyong Z, Yu L. Biological Characteristics of *Lyophyllum fumosum*. *Edible Fungi of China*. 2010;29:20-22 (in Japanese).
18. Hofstetter V, Redhead SA, Kauff F, Moncalvo JM., Matheny PB, Vilgalys R. Taxonomic revision and examination of ecological transitions of the Lyophyllaceae (Basidiomycota, Agaricales) based on a multigene phylogeny. *Cryptogam Mycol*. 2014;35. doi:10.7872/crym.v35.iss4.2014.399.
19. Yamada A, Ogura T, Ohmasa M. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis; I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza*. 2001a;11. doi:10.1007/s005720000092
20. Burrola-Aguilar C, Montiel O, Garibay-Orijel R, Zizumbo-Villarreal L. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Rev Mex Micol*. 2012;35:1-16.
21. Burrola-Aguilar C, Garibay-Orijel R, Argüelles-Moyao A. *Abies religiosa* forests harbor the highest species density and sporocarp productivity of wild edible mushrooms among five different vegetation types in a neotropical temperate forest region. *Agrofor Syst*. 2013;87. doi:10.1007/s10457-013-9623-z

22. Domínguez-Romero D, Arzaluz-Reyes JI, Valdés-Valdés C, Romero-Popoca NP. Uso y manejo de hongos silvestres en cinco comunidades del municipio de Ocoyoacac, Estado de México. Trop Subtrop Agroecosyst. 2005;18:133-143.
23. Franco MS, Burrola-Aguilar C, Arana-Gabriel Y. Hongos comestibles silvestres: Un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. México: EON; 2012.
24. Cifuentes J, Villegas M, Pérez-Ramírez L. Hongos. In: Lot A, Chiang A, eds. Manual para herbario. México: Consejo Nacional de la Flora de México A.C., 1986:55-64.
25. Gibson I. *Lyophyllum* and allies in the Pacific Northwest. Pacific Northwest Key Council. Pacific Northwest Key Council. <http://www.svims.ca/council/Lyophy.htm>., 2010 (accessed September 14.08.016).
26. Kalamees K. Palearctic Lyophyllaceae (Tricholomatales) in Northern and Eastern Europe and Asia. Scripta Mycologica Tartu. 2004;18:1-135.
27. Arana-Gabriel Y, Burrola-Aguilar C, Garibay-Orijel R, Franco-Maass S. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient. 2014;20. doi:10.5154/r.rchscfa.2014.04.017
28. Garibay-Orijel R, Morales-Marañón E, Domínguez-Gutiérrez M, Flores-García A. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas en un bioensayo entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de propágulos resistentes en la Faja Volcánica Transmexicana. Rev Mex Biodiv. 2013;84(1):153-169.
29. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. 1993;2. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

30. Izzo A, Agbowo J, Bruns TD. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in and old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol.* 2005;166. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01354.x
31. Bellanger JM, Moreau PA, Corriol G, et al. Plunging hands into the mushroom jar: a phylogenetic framework for Lyophyllaceae (Agaricales, Basidiomycota). *Genetica.* 2015;143. doi:10.1007/s10709-015-9823-8.
32. Edgar RC. Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 2004;19. doi:10.1186/1471-2105-5-113
33. Nylander JA. MrModeltest. Evolutionary biology centre. Sweden: Uppsala University; 2004
34. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59. doi: 10.1093/sysbio/syq010
35. Huelsenbeck JP, Ronquist F. Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754
36. Cruz-Ulloa BS. Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos. México: CCH-Sur, UNAM; 1995
37. Huerta G, Martínez-Carrera D, Sánchez JE, Leal-Lara H. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Rev Mex Micol.* 2009;30:31-42.
38. Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KCAM. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 1997;55. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715:AID-BIT2>3.0.CO;2-E

39. Maeta K, Ochi T, Tokimoto K, et al. Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74. doi: 3306-3309. 10.1128/AEM.02082-07
40. Buchalo SA, Didukh MY, Mykchaylova OB, Lynovitska VM. Microstructures in medicinal mushroom cultures international. *Int J Med Mushrooms.* 2005;7. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v7.i3.380
41. Moncalvo JM, Rehner SA, Vilgalys R. Systematics of *Lyophyllum* Section *Difformia* based on evidence from culture studies and Ribosomal DNA sequences. *Mycologia.* 1993;85. doi:10.2307/3760610
42. Sánchez J, Royse D. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. México: Ecosur; 2002.
43. Vázquez-García A, Santiago-Martínez G, Estrada-Torres A. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *An Inst Biol Ser Bot.* 2002;73:1-15.
44. Wei S, Wang J, Yu H, Chen Y. Biological characteristic of *Lyophyllum descastes* (Fr.:Fr) Singer. *Mycosystema.* 2006;1:101-108.
45. Prosser JI, Tough AJ. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev Biotechnol.* 1991;10. doi:10.3109/07388559109038211
46. Harris SD. Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia.* 2008;100. doi:10.3852/08-177
47. Jennings DH, Lysek G. *Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle*, 2nd ed. Nueva York: BIOS Scientific Publishers Ltd.; 1999.
48. Cui FJ, Chen XX, Liu WM, Sun WJ, Huo S, Yang Y. Control of *Grifola frondosa* morphology by agitation and aeration for improving mycelia and exo-polymer production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016;179. doi:10.1007/s12010-016-2006-y

49. Fu YQ, Yin LF, Zhu HY, Ru J, Shuang L, Xu Q. Effects of pellet characteristics on L-lactic acid fermentation by *R. oryzae*: pellet morphology, diameter, density, and interior structure. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174. doi:10.1007/s12010-014-1146-1
50. Kim HM, Park MK, Yun JW. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006;134(3):249-62.
51. Porcel EMR, Lopez JLC, Perez JAS, Sevilla JMF, Chisti Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillum terreus*. *Biochem Eng J.* 2005;26. doi:10.1016/j.bej.2005.04.011
52. Ma L, Lin YQ, Yang C, Ying ZH, Jiang XL. Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust. *Sci Hortic.* 2016;209. doi:10.1016/j.scienta.2016.06.001
53. Fang QH, Zhong JJ. Effect of initial pH on production of ganodermic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 2002;37. doi:10.1016/S0032-9592(01)00278-3
54. Petre M, Teodorescu A, Țuluca E, Bejan C, Andronescu A. Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation. *Rom. Biotechnol. Lett.* 2010;15:50-55.
55. Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. China: Ten Speed Press; 2000.

CAPÍTULO III. CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Lyophyllum* secc. *Difformia*

En esta segunda parte de la investigación con las cuatro cepas de *Lyophyllum* secc. *Difformia*, el objetivo fue identificar si las cepas son capaces de desarrollar fructificaciones, así como identificar los sustratos y condiciones ambientales que se requieren.

Bioensayos de fructificación de cepas nativas de *Lyophyllum* secc. *Difformia* de alta montaña

1.- Introducción

Las especies de hongos comestibles del género *Lyophyllum* son ampliamente valoradas por su sabor, textura y producción de sustancia bioactivas con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras. *Lyophyllum shimeji* y *L. decastes* son las principales especies con las que se han realizado investigaciones para la producción de cuerpos fructíferos en países como Japón y China. Una de las principales problemáticas que se tienen en la producción de cuerpos fructíferos es que algunas especies son micorrízicas facultativas. Al ser *L. shimeji* una especie micorrízica, la obtención de los cuerpos fructíferos se realiza en asociación con *Pinus densiflora* o en medio sintético. La obtención de cuerpos fructíferos en *Lyophyllum decastes* ha sido diferentes cultivos sintéticos enriquecidos con diversos suplementos. El cultivo comercial de *Lyophyllum* spp. es considerado un proceso largo y complejo, por lo que, la mayor parte de las investigaciones se enfocan en la obtención de biomasa en cultivo sumergido.

2.- Materiales y Métodos

Material biológico

Se utilizaron cuatro cepas de *Lyophyllum* secc. *Difformia*: IE 975, IE 982, IE 981 (*Lyophyllum* sp.), IE 983 (*Lyophyllum* aff. *shimeji*) del Cepario del Instituto de Ecología (INECOL) en Xalapa, Veracruz, México; las cuales fueron obtenidas previamente a partir de cuerpos fructíferos de la región de alta montaña del Nevado de Toluca en el centro de México. Las cepas fueron obtenidas en medio de agar extracto de malta con peptona y levadura (EMA-PL) (33.6 g

de Extracto de Malta Agar BD DifcoTM, 2 g de Extracto de Levadura BD Bioxon^{MR} y 1 g de Peptona de Gelatina BD Bioxon^R en un litro de agua destilada) a una temperatura de incubación de 18°C.

Producción de inóculo líquido

El inóculo líquido se preparó utilizando extracto de malta adicionado con levadura y peptona (EM-PL) (33.6 g de Extracto de Malta Agar BD BactoTM, 2 g de Extracto de Levadura BD Bioxon^{MR} y 1 g de Peptona de Gelatina BD Bioxon^R en un litro de agua destilada). El medio se esterilizó en autoclave a 121°C/15 lb de presión durante quince minutos y se le agregó 0.05 g de Cloranfenicol (SIGMAMR) como antibiótico.

Se prepararon muestras de 100 ml de medio de cultivo (EMA-PL) en matraces Erlenmeyer de 250 ml, cinco réplicas. Los medios se inocularon con 0.5 cm de diámetro de cepa y se incubaron en obscuridad durante 20 días a 18°C y 120 rpm en baño de agua con agitación PolyScience®. Concluido el periodo de incubación se filtró la biomasa, se lavó con agua destilada estéril para evitar que el medio de cultivo fuera un factor en la colonización de los sustratos y se homogenizó en un procesador de alimentos Magic Bullet Deluxe® durante 10 segundos con 100 ml de agua destilada estéril (modificado de Stamets, 2000).

Bioensayos de Fructificación

Para una primera etapa se elaboraron cuatro diferentes formulaciones de sustratos dependiendo de la especie. Los sustratos para *L. aff. shimeji* (IE 983) fueron: 1) Aserrín de *Quercus* sp.+ salvado de trigo + polvo de maíz (Ls2); 2) Trigo (Ls3); 3) Arroz (Ls4) y 4) Trigo + aserrín de *Quercus* sp. + medio sintético (levadura 1:10) (Ls5) y para *Lyophyllum* sp. (IE 975, IE 982, IE 981): 1) Aserrín de *Quercus* sp.+ salvado de trigo + polvo de maíz (Lp2) (Takaki *et al.*, 2014), 2) Arroz + aserrín de encino (Lp3) (Ohta, 1994, 1998), 3) Trigo + aserrín de *Quercus* sp. (Lp4), 4) Tierra de monte + aserrín de *Quercus* sp. + harina de arroz (Lp5) (Yoshihama, 1994). Para una segunda etapa se prepararon otras cuatro formulaciones diferentes de sustratos para las cuatro cepas de las dos especies de *L. secc. Difformia*: 1) A2Ld, 2) A3Ld, 3) A4Ld y 4) 5Ld. Todos los tratamientos se ajustaron a una humedad del 70 %. Se colocaron 150 g de cada sustrato en frascos de boca ancha con capacidad de 200 g. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento.

Los sustratos se esterilizaron durante una hora a 121°C y 15 lb de presión en autoclave. Una vez enfriados los frascos con sustratos, se inocularon con 5 % (peso húmedo del sustrato) de inóculo líquido utilizando jeringas estériles de 10 ml. Los frascos se llevaron a incubación a 18 °C en oscuridad, hasta que el micelio invadió el sustrato. Posteriormente se trasladaron a un cuarto de fructificación, con las siguientes condiciones: temperatura de incubación a 18°C (termohigrómetro Vaisala®), humedad del 90-100 % (humidificador Vitallys Plus®), requerimientos de luz de 70-100 lux (luxómetro BK Precision®) e intercambio de aire fresco de tres veces al día por una hora.

3.- Resultados

Material biológico

Las cepas reaisladas en medio EMA-PL tardaron de 24-28 días en invadir las cajas de Pertri (9 cm de diámetro), presentaron un micelio de sumergido a postrado de color blanco.

Producción de inóculo líquido

Después de 20 días de agitación, las cuatro cepas desarrollaron micelio abundante formando un conglomerado de consistencia gelatinosa, la producción de biomasa varió en cada cepa: IE 975 (8.52 g/l), IE 981 (11.98 g/l), IE 982 (9.62 g/l) e IE 983 (9.92 g/l).

Bioensayos de fructificación

Los sustratos propuestos para la primera etapa no presentaron crecimiento miceliar, Sin embargo, los sustratos propuestos para la segunda etapa si fueron colonizados en su totalidad (figura 1) y hubo formación de cuerpos fructíferos. Los resultados no fueron incorporados en presente escrito ya que se pretende tramitar la patente de su cultivo ante el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial).



Figura 1. Crecimiento miceliar de *Lyophyllum* secc. *Difformia* sobre sustrato

CONCLUSIONES GENERALES

Flammulina mexicana

Se trabajó con cuatro cepas de *Flammulina mexicana*, tres de las cuales se obtuvieron por aislamiento vegetativo a partir de diferentes cuerpos fructíferos (IE 986, IE 984 e IE 985) y una depositada previamente en el cepario del INECOL (IE 974). Molecularmente (análisis de Máxima verosimilitud) las cuatro cepas tienen una similitud de 99.8 % entre ellas y un 99.8 % con *F. mexicana*. Las secuencias de cada cepa fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso: KY794659, KY794660, KY794661 y KY794662.

El crecimiento micelial y la producción de cuerpos fructíferos en los diferentes sustratos empleados en el cultivo experimental dependen de la cepa y tipo de inóculo utilizado, siendo más eficiente por el tiempo de colonización el inóculo líquido. Las cepas IE 986 e IE 974 presentaron mayor producción de biomasa y velocidad de crecimiento en cultivo *in vitro*, por lo que, para la producción de cuerpos fructíferos son las que presentan un ciclo de cultivo más corto. El ciclo de cultivo para la cepa IE 986 en RM con inóculo líquido fue de 91 días, para la cepa IE 974 fue de 101 días; iniciando desde la incubación del sustrato hasta la obtención de un tercer corte con cuerpos fructíferos maduros, mientras que con inóculo sólido el ciclo de cultivo es de 117 días.

F. mexicana tiene la capacidad de degradar selectivamente los componentes celulósicos y hemicelulósicos y fructificar en desechos agrícolas y forestales. Las cepas IE 986 e IE 974 presentaron mayor eficiencia biológica con 34.5 % y 31.9 % respectivamente, en rastrojo de maíz como sustrato.

La producción de cuerpos fructíferos de *F. mexicana* se da a una temperatura de 16-18 °C, intensidad de luz de 70-100 lux, intercambio de aire de dos veces por día y una humedad relativa de 90-100 %.

El análisis nutricional de las fructificaciones obtenidas muestra un alto porcentaje de fibra (52.51 %) y bajo contenido de carbohidratos (9.03 %).

Lyophyllum* sección *Difformia

Para *Lyophyllum* sección *Difformia*, por aislamiento vegetativo se obtuvieron cuatro cepas, las cuales se dividen en dos clados dentro de la sección *Difformia*. Las cepas IE 981, IE 982 e IE 975 pertenecen a *Lyophyllum* sp. (Análisis Bayesiano= 0.87, Análisis de Máxima verosimilitud= 31.5) e IE 975 (depositada previamente en el cepario del INECOL) a *Lyophyllum* aff. *shimeji* (Análisis Bayesiano= 0.99, Análisis de Máxima verosimilitud= 91.6).

Morfológicamente, las cepas presentaron diferencias al ser cultivadas en los diferentes medios de cultivo. La velocidad de crecimiento y la producción de biomasa fueron influenciadas por los medios de cultivo y las cepas. La mayor velocidad en medio PDA estuvo presente en tres (IE 975, IE 982 e IE 983) de las cuatro cepas con 0.4 cm/ día; para la producción de biomasa en medio sólido y líquido la cepa IE 981 generó la mayor cantidad de biomasa seca en ambos medios de cultivo con hasta 0.383 g/caja de Petri y 11 g/l respectivamente.

Lyophyllum es un género con potencial de cultivo comercial, que tienen propiedades funcionales y medicinales, por lo que, las cepas IE 982 de *Lyophyllum* sp. e IE 983 de *L.* aff. *shimeji* que presentaron mejores condiciones en cultivo *in vitro*, son una opción para estudios enfocados a los metabolitos secundarios y su cultivo a nivel de sustrato. La obtención de cuerpos fructíferos de *Lyophyllum* requiere de más investigaciones que involucren conocer la condición micorrízica o saprobia de las especies, y de los parámetros ambientales adecuados que permitan inducir las fructificaciones.

Cultivo experimental

El cultivo experimental de hongos silvestres involucra la caracterización de cepas, medios de cultivo, condiciones ambientales y los sustratos que se pueden utilizar y/o modificar para optimizar el proceso de cultivo y tener mayor rendimiento.

El resguardo del germoplasma y cultivo de nuevas especies nativas es una alternativa viable para la conservación y diversificación de las especies ya cultivadas y para el uso de los recursos naturales con los que cuenta cada región.

Con este trabajo se pretenden sentar las bases para demostrar que México cuenta con un gran potencial de especies de hongos silvestres que pueden ser utilizadas para generar nuevas alternativas de cultivos. Es fundamental que la investigación en este tema se enfoque a la búsqueda de condiciones óptimas que permitan desarrollar cultivos de importancia local, en condiciones accesibles para beneficio de las personas que llevan a cabo esta práctica; ya que la mayoría de trabajos se enfocan en el mejoramiento de cepas de especies ya comerciales como *Agaricus* y *Pleurotus* o en eficientizar su proceso de cultivo.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

El cultivo de *Flammulina mexicana* requiere de investigación enfocada en identificar qué tipo de suplementos pueden agregarse al sustrato de rastrojo de maíz, los cuales permitan aumentar la eficiencia biológica; ya que en la presente investigación se obtuvo únicamente un 34.5 %. En cuanto a los sustratos a base de aserrín se requiere modificar el porcentaje de humedad, para evitar que estos se compacten y permitan el crecimiento de micelio y la producción de fructificaciones.

Al ser la primera vez que se lleva a cabo el cultivo de *F. mexicana* se requiere comparar el contenido nutricional de los cuerpos fructíferos silvestres con los cultivados, así como un análisis de costos.

Tanto para *F. mexicana* como para *Lyophyllum* sección *Difformia* hace falta investigación relacionada en conocer la producción de metabolitos secundarios, lo que podría contribuir al conocimiento de los beneficios antimicrobianos y/o medicinales en medio líquido y en los cuerpos fructíferos.

LITERATURA CITADA

1. Alvarado-Castillo, G., Benítez, G. 2009. El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10:531–539.
2. Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., Franco-Maass, S. 2014. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20:213–226.
3. Berkes, F., Colding, J., Folke, C. 2000. Rediscovery of traditional ecological knowledge as adaptive management. *Ecological Applications* 10:1251–1262.
4. Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población, No. 17. FAO, Roma. 161 p.
5. Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R. y Zizumbo-Villarreal, L. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 35:1–16.
6. Chang, S.T., Miles, P.G. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, Environmental Impact*. CRC Press, Boca Raton.
7. Cifuentes J, Villegas M, Pérez-Ramírez L. 1986. Hongos. In: Lot A, Chiang A, eds. *Manual para herbario*. México: Consejo Nacional de la Flora de México A.C. pp. 55–64.
8. Estrada, E., Guzmán, G., Cibrián, D., Ortega, R. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34, 25–33.
9. Franco MS, Burrola-Aguilar, C, Arana-Gabriel, Y. 2012. Hongos comestibles silvestres: Un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. México: EON.
10. Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez, M.R., Mata, G. 2009. Evaluación de la eficiencia biológica de cepas de *Pleurotus pulmonarius* en paja de cebada fermentada. *Revista Mexicana de Micología* 30:63–71
11. Garibay-Orijel, R., Ruan-Soto, F., Estrada-Martínez, E. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el aprovechamiento de los hongos comestibles y

- medicinales. In Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P., Mora, V.M. (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. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla, pp 243–270
12. Garibay-Orijel, R., Ruan-Soto, F. 2014. Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. In Moreno-Fuentes A, Garibay-Orijel R (eds.), La etnomicología en México, estado del arte. CONACYT, UAEH, UNAM, México, pp. 91–109
 13. Ge, Z.W., Yang, Z.L., Zhang, P., Matheny, P.B., Hibbett, D.S. 2008. *Flammulina* species from China inferred by morphological and molecular data. Fungal Divers. 32:59–68.
 14. González, F., 2003. Las comunidades vegetales de México. INE-SEMARNAT. México. 78 pp.
 15. Guzmán, G., 1998. Inventorying the fungi of Mexico. Biodiversity Conservation 7: 369-384.
 16. Huntington, H.P., Callaghan, T., Fox, S., Krupnik, I. 2004. Matching traditional and scientific observations to detect environmental change: A discussion on Arctic terrestrial ecosystems. Ambio Special Report 13:18–23.
 17. Kalamees, K. 2004. Palearctic Lyophyllaceae (Tricholomatales) in Northern and Eastern Europe and Asia. Scripta Mycologica Tartu 18:1–135.
 18. Larsson, E., Sundberg, H. 2011. *Lyophyllum shimeji*, a species associated with lichen pine forest in northern Fennoscandia. Mycoscience 52:289–295.
 19. Luna-Morales, C. 2002. Ciencia, conocimiento tradicional y Etnobotánica. Etnobiología 2:120-135.
 20. Mariaca, M.R., Silva, C.P., Castaños, C.A.M. 2001. Proceso de Recolección y Comercialización de Hongos Comestibles Silvestres del Valle de Toluca, México. Ciencia Ergo Sum 8(1):30–40.
 21. Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom Biotechnology in Latin America. Micología Aplicada International 14(2):61–74.
 22. Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P., Mora, V.M. 2010. Hacia un

- Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos. Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS- UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
23. Martínez-Carrera, D., Nava-López, D. 2003. Programa estratégico para el desarrollo de la producción, transformación y comercialización de hongos comestibles en el estado de Tlaxcala. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y Fundación Produce Tlaxcala, A.C.
 24. Mata, G., Savoie, J.M. 2012. *Agaricus subrufescens* un hongo comestible y medicinal de gran potencial en México. In Sánchez, V. J. y Mata, G. (eds.) Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica, investigación y desarrollo en un entorno multicultural, 1st ed. INECOL-ECOSUR, México, pp. 69–77.
 25. Montoya-Esquivel, A., Estrada-Torres, A., Kong, A., Juárez-Sánchez, L. 2001. Commercialization of Wild during Market days of Tlaxcala, Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 13(1):31–40.
 26. Montoya-Esquivel, A., Hernández-Totomoch, O., Estrada-Torres A., Kong, A. y Caballero, J. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahua community in the state of Tlaxcala, México. *Mycologia* 95(5):793–806.
 27. Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., Ramírez-Carrasco, P., Tello, I., Spezzia, T., Lira, N., De Lima, R., Villa, S., Montiel, E., Martínez-Carrera, D. 2010. Los hongos comestibles silvestres en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. In Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P., Mora, V.M. (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. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. pp.91-108
 28. Otha, A. 1994. Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience* 35, 83–87. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02268533>
 29. Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A., Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild Mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425–436.

30. Pokhrel, C., Ohga, S., 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. Food Chemistry 105:641–646.
31. Rodríguez, G. 2007. Cultivo de Hongos Comestibles. Floricultura y Diversificación 52:10–15.
32. Rodrigues, M.M., Paccola-Meirelles, L.D., De Jesus, T.F., Kazue, N.I. 2009. Influence of *Flammulina velutipes* mycelia culture conditions on antimicrobial metabolite product. Mycoscience 50:78–81.
33. Ruán-Soto, F., Garibay-Orijel, R., Cifuentes, J. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. Journal of Ethnomedicine 2(3):1746–4269.
34. Salmones, D., Mata, G. 2012. Cepario de hongos en México. In Sánchez, V.J., Mata, G. (eds.), Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica, investigación y desarrollo en un entorno multicultural. INECOL-ECOSUR, México, pp. 69–77
35. Sesli, E., Vizzini, A., Contu, M. 2015. *Lyophyllum turcicum* (Agaricomycetes: Lyophyllaceae), a new species from Turkey. Turkish Journal of Botany 39:512–519.
36. Suárez, A.C., Nieto, I.V. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. Revista Iberoamericana de Micología, 30:1-8.
37. Toledo, V.M. 1992. What is Ethnoecology? Origins, scope and implications of a rising discipline. Etnoecológica 1(1):5–21.
38. Villarreal, L., Pérez, J.M. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. Micologia Neotropical Aplicada 2:77–114.
39. Visnovsky, S.B., Cummings, N., Guerin-Laguette, A., Wang, Y., Yamada, A., Kobayashi, H., Kawai, M., Pitman, A.R. 2014. Detection of the edible ectomycorrhizal fungus *Lyophyllum shimeji* colonizing seedlings of cultivated conifer species in New Zealand. Mycorrhiza 24:453–463.

ANEXOS

ANEXO 1. Cuerpos fructíferos y cepas de *Lyophyllum secc. shimeji* y *Flammulina mexicana*

Cepa de *Lyophyllum secc. Difformia* en medio agar extracto de malta adicionado con peptona y levadura (EMA-PL).

L. secc. Difformia

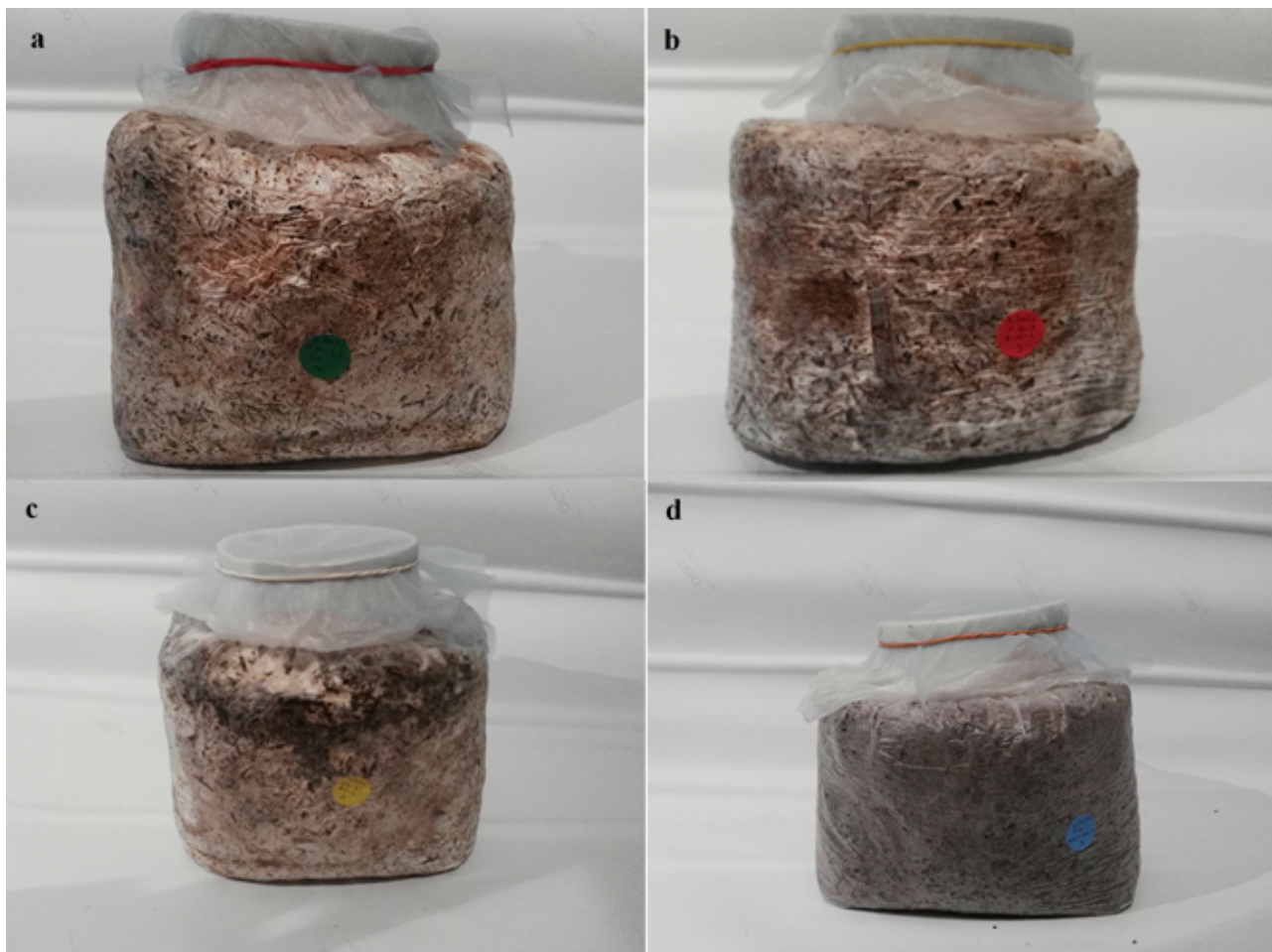
Lyphyllum sp.



Cepas de *F. mexicana* en medio agar croquetas (AC) y agar extracto de malta adicionado con peptona y levadura (EMA-PL).



ANEXO 2. Sustratos colonizados por *Flammulina mexicana*



a) Cepa IE 86, b) Cepa IE 984, c) Cepa IE 985, d) IE 974

ANEXO 3. Desarrollo de cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana* durante 15 días, desde la formación de primordios hasta su maduración.



ANEXO 4. Cuerpos fructíferos de *Flammulina mexicana*, silvestres y cultivados

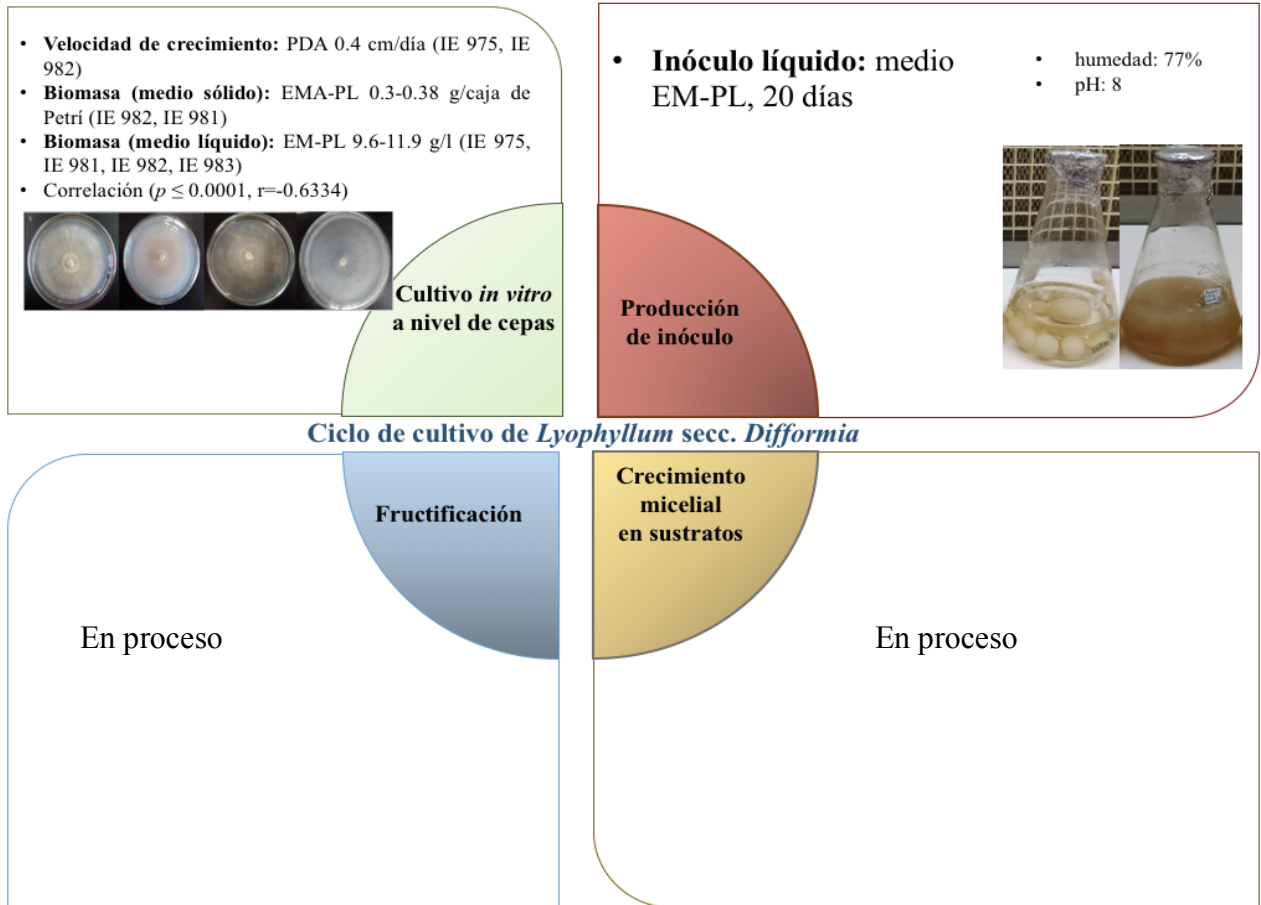


a) Cuerpos fructíferos silvestres y b-e) cultivados de *F. mexicana*. b) IE 974/RM, c) IE 986/RM, d) IE 985/RM, e) IE 984/RM

ANEXO 5. Ciclo de cultivo de *Flammulina mexicana*



ANEXO 6. Ciclo de cultivo de *Lyophyllum* secc. *Difformia*



ANEXO 7. Carta de resguardo de cepas



2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Xalapa, Veracruz, México, 13 de octubre de 2017.

Dra. Cristina Burrola Aguilar
Universidad Autónoma del Estado de México
Toluca, Estado de México
México

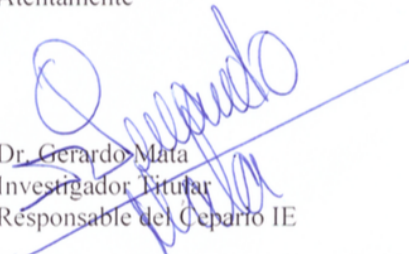
Estimada Dra. Burrola Aguilar:

Por este medio informo a Usted que las cepas que amablemente han depositado en nuestro Cepario IE del Instituto de Ecología, A.C., como parte de los trabajos de investigación de los estudiantes César Díaz Talamantes y Yolanda Arana Gabriel, han quedado registradas con los números:

Registro en Cepario IE	Especie	Registro en UAEM
IE 981	<i>Lyophyllum</i> sp	Lyo-1
IE 982	<i>Lyophyllum</i> sp	Lyo-3
IE 983	<i>Lyophyllum</i> aff. <i>shimeji</i>	Lyo 5.3
IE 984	<i>Flammulina mexicana</i>	FM 3
IE 985	<i>Flammulina mexicana</i>	FM 3-1
IE 986	<i>Flammulina mexicana</i>	FM 3-3
IE 987	<i>Lycoperdon perlatum</i>	Cepa 3
IE 988	<i>Gymnopus dryophilus</i>	Cepa 4
IE 989	<i>Infundibulicybe gibba</i>	Cepa 1
IE 990	<i>Infundibulicybe squamulosa</i>	Cepa 2
IE 991	<i>Bovista aestivales</i>	

Sin otro particular, agradezco su confianza al depositar el germoplasma de sus investigaciones en nuestra colección y le envío un saludo cordial.

Atentamente


Dr. Gerardo Mata
Investigador Titular
Responsable del Cepario IE

ANEXO 8. Informe de análisis bromatológico de cuerpos fructíferos cosechados de *Flammulina mexicana*

LOZANO SEGURIDAD
Universidad Autónoma del Estado de México
 UAEM
 Facultad de Química

LOZANO 013366
 Coordinación de Servicios

INFORME DE ENSAYOS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AMBIENTAL

Página: 1/1
 Folio: 17-0068
 Fecha de reporte: 27Ene2017

DATOS DEL CLIENTE
 NOMBRE: YOLANDA ARANA GABRIEL
 DIRECCIÓN: MANZANA 6° LOMA ENDOTZI SAN JUAN, TOLUCA, MEXICO
 ATENCIÓN A: YOLANDA ARANA GABRIEL

DATOS DE LA MUESTRA
 DESCRIPCIÓN: ALIMENTO
 IDENTIFICACIÓN: HONGO COMESTIBLE FLAMMULINA MEXICANA

DATOS DEL MUESTREO
 MONITOR: CLIENTE
 LUGAR: NO ESPECIFICADO
 FECHA: NO ESPECIFICADA
 FECHA DE RECEPCIÓN: 23 DE ENERO DE 2017
 PROCEDIMIENTO UTILIZADO: NO ESPECIFICADO
 CONDICIONES AMBIENTALES DEL MUESTREO: NO ESPECIFICADAS
 NORMA DE MUESTREO APLICADA: NO ESPECIFICADA

PARÁMETROS	RESULTADOS	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES	UNIDADES	REFERENCIA	FECHA DE ANÁLISIS
HUMEDAD	6,42	N.D.	%	NOM-116-SSA1-1994	20170124
CENIZAS	12,72	N.D.	%	NMX-F-607-NORMEX-2013	20170125
GRASA	1,64	N.D.	%	NMX-F-615-NORMEX-2004	20170125
PROTEÍNA factor: 6,25	17,68	N.D.	%	NMX-F-608-NORMEX-2011	20170124
FIBRA CRUDA	52,51	N.D.	%	NMX-F-613-NORMEX-2003	20170124
CARBOHIDRATOS	9,03	N.D.	%	POR CALCULO	20170127

OBSERVACIONES: N.D. = No disponible

REVISÓ Y APROBÓ

 Q. SERGIO A. SALAZAR MAYA
 CED. PROF. 630690
 JEFE DE DEPARTAMENTO

ESTE INFORME CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LOS RESULTADOS DE LA MUESTRA SOMETIDA A PRUEBA Y QUEDA PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL DEL PRESENTE INFORME SIN AUTORIZACIÓN PREVIA DE LA COORDINACIÓN

FMT-0022-4 ecg

LOZANO SEGURIDAD
 Paseo Colón Esq. Paseo Toluca Tel.: (01-722) 2-17-41-20 Toluca, Edo. de Méx.
 E-mail: fqservicios@yahoo.com.mx servicios_fquimica@uaemex.mx