

OBTENCIÓN DE CEPAS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE CINCO ESPECIES DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE ALTA MONTAÑA EN EL CENTRO DE MÉXICO

OBTAINING STRAINS AND SPAWN PRODUCTION FROM FIVE SPECIES OF ALPINE WILD EDIBLE MUSHROOMS IN THE CENTER OF MEXICO

Yolanda Arana-Gabriel¹; Cristina Burrola-Aguilar¹; Roberto Garibay-Orijel²; Sergio Franco-Maass³.

¹Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. km 14.5, carretera Toluca-Atlaconulco. C. P. 50200. Toluca, Estado de México. MÉXICO. Correo-e: cba@uaemex.mx Tel.:+52 (722) 2 96 55 53 (Autora para correspondencia).

²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria. A. P. 70-233. C. P. 04510. México, D. F.

³Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario núm. 100, col. Centro. C. P. 50000. Toluca, Edo. de México. MÉXICO.

RESUMEN

Se obtuvieron cepas de *Psathyrella spadicea*, *Floccularia* aff. *luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* aff. *shimeji*, cuyos esporomas son recolectados y consumidos por habitantes del Nevado de Toluca, México. Las cepas se estudiaron *in vitro* en seis medios de cultivo (ACP: Agar croquetas de perro, AM: Agar maíz, PDA-PL: Agar papa dextrosa-peptona y levadura, EMA-PL: Agar extracto de malta-peptona y levadura, PDA y EMA) a 18 °C y 25 °C. Las especies se desarrollaron satisfactoriamente a 18 °C, siendo *F. mexicana* y *L. aff. shimeji* las que tuvieron mayor velocidad de crecimiento y producción de biomasa. *Flammulina mexicana* solo se desarrolló a 18 °C, presentando mayor crecimiento y producción de biomasa en ACP. La cepa de *L. aff. shimeji* creció a 18 y 25 °C, la mayor velocidad de crecimiento se registró en medio PDA a 18 °C y la mayor producción de biomasa en EMA-PL a 18 °C. Considerando las mejores condiciones para el desarrollo de micelio *in vitro*, se produjo inóculo primario de *F. mexicana* y *L. aff. shimeji* en trigo y sorgo. La mayor densidad del micelio y porcentaje de grano cubierto se obtuvieron con el sustrato de trigo.

PALABRAS CLAVE: Cultivo *in vitro*, aislamiento vegetativo, producción de biomasa, velocidad de crecimiento, *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum* aff. *shimeji*.

ABSTRACT

Strains of *Psathyrella spadicea*, *Floccularia* aff. *luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* and *Lyophyllum* aff. *shimeji* were obtained, their sporomes use to be collected and consumed by inhabitants of the Nevado de Toluca, Mexico. The strains were studied *in vitro* on six culture media (DFA: Dog food agar, MA: Maize agar, PDA-PL: potato dextrose-peptone and yeast agar, EMA-PL: malt extract agar peptone and yeast, PDA and EMA) at 18 °C and 25 °C. Species satisfactorily developed at 18 °C, *F. mexicana* and *L. aff. shimeji* had the highest growth rate and biomass production. *Flammulina mexicana* only developed at 18 °C showing higher growth and biomass production on DFA. The strain of *L. aff. shimeji* grew at 18 and 25 °C, the highest growth rate was recorded on PDA at 18 °C and highest biomass production on EMA-PL at 18 °C. Regarding the best conditions for the *in vitro* development of mycelium, primary spawn was obtained from *F. mexicana* and *L. aff. shimeji* in wheat and sorghum. The highest density and percentage of covered mycelium were obtained using wheat substrate.

KEYWORDS: *In vitro* culture, vegetative isolation, biomass production, growth rate, *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum* aff. *shimeji*.



Recibido: 25 de abril, 2014

Aceptado: 08 de octubre, 2014

doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.04.017

<http://www.chapingo.mx/revistas>

INTRODUCCIÓN

En México se consumen 371 especies de hongos de manera tradicional (Garibay-Orijel & Ruan-Soto, 2014). La recolecta forma parte de los patrones de subsistencia de las poblaciones rurales cercanas a las zonas boscosas, por ser una de las principales fuentes de ingresos y alimentación durante la temporada de lluvias (Alvarado-Castillo & Benítez, 2009; Boa, 2005). El conocimiento micológico tradicional es la base de todo aprovechamiento de los hongos silvestres, pues 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 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 mayor y mejor aprovechamiento del germoplasma propio, reduciendo así su dependencia genética y tecnológica (Garibay-Orijel, Ruán-Soto, & Estrada-Martínez, 2010).

El cultivo de hongos en México promueve beneficios económicos, ecológicos y sociales (Martínez-Carrera, 2002). Actualmente, la mayoría de las cepas utilizadas en el cultivo comercial provienen de regiones de América del Norte, Europa y el sur de Asia. Las cepas son mantenidas bajo métodos convencionales o depositadas en colecciones para su preservación, y son utilizadas en investigaciones orientadas al cultivo de especies comestibles, incremento de la colección de cepas, mejoramiento de los sistemas de cultivo, producción de enzimas y adaptación fisiológica de los hongos (Mata, Salmones, & Gaitán-Hernández, 2010). Algunos géneros con los que se trabajan son: *Pleurotus*, *Lentinula*, *Neolentinus*, *Volvariella*, *Agaricus*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hypsizigus*, *Lepista* y *Morchella* (Martínez-Carrera, 2002; Mata et al., 2010). De aquí la importancia de realizar estudios encaminados a la obtención, caracterización y aprovechamiento del germoplasma propio de cada región, como es el caso del Nevado de Toluca, Estado de México, donde se han registrado 77 especies de hongos comestibles silvestres (Franco, Burrola, Aguila & Arana, 2012). Algunas de estas especies se consideran con alto potencial de cultivo, por ser saprobias y apreciadas localmente para autoconsumo, como *Psathyrella spadicea* (P. Kumm.) Singer (clavo de oyamel), *Floccularia* aff. *luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar (hongo de yema), *Clitocybe squamulosa* (Pers.) P. Kumm. (tejamanilero) y *Flammulina mexicana* Redhead, Estrada, & R. H. Petersen (hongo de jara). Esta última ha sido reportada recientemente como comestible (Franco et al., 2012). El género *Flammulina* es conocido por su distribución cosmopolita y por tener especies comestibles de importancia económica, nutricional y medicinal como *F. velutipes* (Curtis) Singer (Ge, Yang, Zhang, Mathey, & Hibbet, 2008; Rodrigues, Paccola-Meirelles, De Jesus, & Kazue, 2009; Suárez & Nieto, 2013). Otra especie con im-

INTRODUCTION

In Mexico, 371 species of mushrooms are consumed traditionally (Garibay-Orijel & Ruan-Soto, 2014). Mushroom collection is part of the subsistence patterns of the rural populations surrounding wooded areas, for being one of the main sources of income and food during the rainy season (Alvarado-Castillo & Benítez, 2009; Boa, 2005). The traditional mycological knowledge is the basis of all exploitation of wild fungi, because it allows identifying and learning about the species that can be potentially amenable to cultivation, for consumption and marketing, mainly those valued regionally. Thanks to the consumption patterns and detailed traditional knowledge of the people, it is also possible to select species adapted to the environmental conditions of particular regions, provide elements to define substrates and improve the technology of the cultivation of edible fungi industry, allowing more and better use of local germplasm, reducing the genetic and technological dependence (Garibay-Orijel, Ruán-Soto, & Estrada-Martínez, 2010).

The cultivation of edible mushrooms in Mexico promotes economic, ecological and social benefits (Martínez-Carrera, 2002). At present, most of the strains used for commercial crop come from North America, Europe and South Asia. The strains are maintained under conventional methods or deposited in collections for preservation, and are used in research aimed at cultivating edible species, increasing strain collection, improving cropping systems, producing enzymes and physiological adaptation of mushrooms (Mata, Salmones, & Gaitán-Hernández, 2010). *Pleurotus*, *Lentinula*, *Neolentinus*, *Volvariella*, *Agaricus*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hypsizigus*, *Lepista* and *Morchella* are some of the genera most commonly used (Martínez-Carrera, 2002; Mata et al., 2010). Hence the importance of studies aiming to obtain, characterize and use local germplasm from each region, as in the case of the Nevado de Toluca, Estado de México, where 77 species of wild edible mushrooms have been recorded (Franco, Burrola, & Arana, 2012). Some of these species are considered to have high potential for cultivation, because are saprophytic and appreciated locally for self-consumption, for example *Psathyrella spadicea* (P. Kumm.) Singer (clavo de oyamel), *Floccularia* aff. *luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar (hongo de yema), *Clitocybe squamulosa* (Pers.) P. Kumm. (tejamanilero) and *Flammulina mexicana* Redhead, Estrada, & R. H. Petersen (hongo de jara). The last species mentioned was recently reported as edible (Franco et al., 2012). *Flammulina* is known for its cosmopolitan distribution and for having edible species of economic, nutritional and medicinal importance as *F. velutipes* (Curtis) Singer (Ge, Yang, Zhang, Mathey, & Hibbet, 2008; Rodrigues, Paccola-Meirelles, De Jesús, & Kazue, 2009; Suárez & Nieto, 2013). Another species with culinary and economic importance in regional markets is *Lyophyllum* aff. *shimeji* (Kawam.) Hongo (known in Mexico as clavo de llano, clavo de bosque or clavito) (Mariaca, Silva, & Castellanos, 2001). This is a facultative mycorrhizal species widely

portancia culinaria y económica en los mercados regionales es *Lyophyllum* aff. *shimeji* (Kawam.) hongo (clavo de llano, clavo de bosque o clavito) (Mariaca, Silva, & Castellanos, 2001), una especie micorrízica facultativa ampliamente distribuida en el este de Asia y en las regiones del norte de Europa (Moncalvo et al., 2002; Visnovsky et al., 2013). Hoy en día, a pesar de que *L. aff. shimeji* se cultiva exitosamente en medio sintético (Kusuda et al., 2004; Ohta, 1994, 1998), se generan investigaciones dedicadas a su fructificación mediante la asociación con especies arbóreas, en función de la cepa y su origen geográfico (Visnovsky et al., 2014).

Los objetivos de esta investigación fueron aislar vegetativamente, en diferentes medios de cultivo, cepas de algunas especies de hongos usadas como alimento en el Nevado de Toluca; estudiar las características de las cepas e identificar el medio más adecuado para el cultivo *in vitro* y producción de inóculo primario en relación con la velocidad de crecimiento y producción de biomasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los esporomas de hongos comestibles de importancia alimenticia y económica se recolectaron, a partir de un muestreo dirigido hacia los bosques de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham., donde los pobladores de las comunidades del Nevado de Toluca suelen encontrarlos. Los esporomas fueron identificados y caracterizados conforme a Franco et al. (2012). Los ejemplares voucher se depositaron en la colección de hongos del Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología de la UNAM (MEXU) bajo los siguientes números: 27404 (*C. squamulosa*); 27405 (*F. aff. luteovirens*); 27406 (*L. aff. shimeji*); 27407, 27408 (*P. spadicea*) y 27409, 27410, 27411 (*F. mexicana*).

Aislamiento y caracterización de cepas

La cepas se obtuvieron por aislamiento vegetativo en los medios agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (EMA); se tuvieron 20 repeticiones por medio de cultivo e incubaron a 18 y 25 °C en oscuridad (Chang & Miles, 2004; Stamets, 2000). Posteriormente, las cepas se sembraron en seis medios de cultivo: agar croquetas de perro (ACP), agar maíz (AM), agar papa dextrosa-peptona y levadura (PDA-PL), agar extracto de malta-peptona y levadura (EMA-PL), EMA y PDA (Stamets, 2000). En el Cuadro 1 se muestran las formulaciones de cada uno de estos. Todos los medios se esterilizaron a 121 °C y 15 lb de presión, se agregaron 0.05 g de cloranfenicol (SIGMA^{MR}) como antibiótico y se midió el pH, dando los siguientes valores: EMA = 4.8, PDA = 5.5, AM = 6.1, ACP = 6.2, EMA-PL = 5, PDA-PL = 5.7. Las cepas de *F. mexicana* y *L. aff. shimeji* fueron depositadas con las claves IE 974 e IE 975, respectivamente, en el cepario del Instituto de Ecología (INECOL) en Xalapa, Veracruz, México.

Una vez que el micelio invadió por completo la caja de Petri, se hizo la caracterización macroscópica con base en lo se-

distributed in eastern Asia and northern regions of Europe (Moncalvo et al., 2002; Visnovsky et al., 2013). At present, although *L. aff. shimeji* grows successfully on synthetic medium (Kusuda et al., 2004; Ohta, 1994, 1998), research devoted to its fructification through association with tree species, depending on the strain and its geographical origin, is been generated (Visnovsky et al., 2014).

The objectives of this research were to isolate strains of various species of mushrooms used as food in the Nevado de Toluca using different culture media; to characterize the strains and to identify the most appropriate medium for the cultivation *in vitro*; and to produce primary spawn measuring its growth rate and biomass production.

MATERIALS AND METHODS

Sporomes of edible mushrooms with local economic importance were collected from a sample directed toward the forests of *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham., where the residents of the communities of the Nevado de Toluca usually find them. The sporomes were identified and characterized according to Franco et al. (2012). Voucher specimens were deposited in the fungal collection of the National Herbarium of Mexico at the Institute of Biology, UNAM (MEXU) under the following numbers: 27404 (*C. squamulosa*); 27405 (*F. aff. luteovirens*); 27406 (*L. aff. shimeji*); 27407, 27408 (*P. spadicea*) and 27409, 27410, 27411 (*F. mexicana*).

Isolation and strain characterization

The strains were obtained by vegetative isolation in potato dextrose agar (PDA) and malt extract agar (EMA); 20 repetitions were obtained by culture medium and incubated at 18 and 25 °C in darkness (Chang & Miles, 2004; Stamets, 2000). Later, strains were inoculated on six culture media: dog food agar (DFA), maize agar (MA), potato dextrose-peptone and yeast agar (PDA-PL), malt-peptone extract and yeast agar (EMA-PL), EMA and PDA (Stamets, 2000). Table 1 shows the formulations of each one. All media were sterilized at 121 °C and 15 pounds of pressure; 0.05 g of chloramphenicol antibiotics (SIGMA^{MR}) were added. The pH was measured, obtaining the following values: EMA = 4.8, PDA = 5.5, MA = 6.1, DFA = 6.2, EMA-PL = 5, PDA-PL = 5.7. *F. mexicana* and *L. aff. shimeji* strains were deposited, with the keys IE 974 and IE 975, respectively, in the strain collection of the Institute of Ecology (INECOL) in Xalapa, Veracruz, Mexico.

Once the mycelium completely invaded the Petri dish, the macroscopic characterization was conducted based on the method reported by Cruz-Ulloa (1995). For this purpose, the mycelium was taken in the exponential growth phase and temporary preparations were made using congo red at 10 %; the presence of clamp connections was observed and the diameter of hyphae at 100x was measured (20 hyphae per treatment) using the Mo-

CUADRO 1. Formulaciones de los medios de cultivo utilizados para la obtención de cepas de hongos comestibles silvestres: *Psathyrella spadicea*, *Floccularia aff. luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum aff. shimeji*.

TABLE 1. Culture media formulations used for obtaining strains of wild edible fungi: *Psathyrella spadicea*, *Floccularia aff. luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana*, and *Lyophyllum aff. shimeji*.

Medios de cultivo / Culture media	Formulación (g-litro ⁻¹ de agua destilada) / Formulation (g-liter ⁻¹ of distilled water)
ACP / DFA	15 g de agar agar HYCEL ^{MR} / 15 g agar agar HYCEL ^{MR} 15 g de croquetas de perro GANADOR [®] / 15 g of dog kibble GANADOR [®] 2 g de extracto de levadura BD Bioxon ^{MR} / 2 g of yeast extract BD Bioxon TM 1 g de peptona de gelatina BD Bioxon ^{MR} / 1 g of gelatin peptone BD Bioxon TM
AM / MA	15 g de agar agar HYCEL ^{MR} / 15 g agar agar HYCEL TM 15 g de harina de maíz MASECA [®] / 15 g corn flour MASECA [®] 2 g de extracto de levadura BD Bioxon ^{MR} / 2 g of yeast extract BD Bioxon TM 1 g de peptona de gelatina BD Bioxon ^{MR} / 1 g of gelatin peptone BD Bioxon TM
PDA-PL / PDA-PL	39 g de PDA-BD Bioxon ^{MR} / 39 g of PDA-BD Bioxon TM 2 g de extracto de levadura BD Bioxon ^{MR} / 2 g of yeast extract BD Bioxon TM 1 g de peptona de gelatina BD Bioxon ^{MR} / 1 g of gelatin peptone BD Bioxon TM
EMA-PL / EMA-PL	31.9 g de MEA-BD Difco ^{MR} / 31.9 g de MEA-BD Difco TM 2 g de extracto de levadura BD Bioxon ^{MR} / 2 g of yeast extract BD Bioxon TM 1 g de peptona de gelatina BD Bioxon ^{MR} / 1 g of gelatin peptone BD Bioxon TM
EMA / EMA	31.9 g de EMA-BD Difco ^{MR} / 31.9 g EMA-BD Difco TM
PDA	39 g de PDA-BD Bioxon ^{MR} / 39 g PDA-BD Bioxon TM

ACP: Agar croquetas de perro, AM: Agar maíz, PDA-PL: Agar papa dextrosa-peptona y levadura, EMA-PL: Agar extracto de malta-peptona y levadura. DFA: dog food agar, AM: maize agar, PDA-PL: dextrose potato and yeast agar, EMA-PL: malt extract -peptone and yeast agar.

ñalado por Cruz-Ulloa (1995). Para ello, se tomó el micelio en la fase de crecimiento exponencial y se realizaron preparaciones temporales con rojo congo al 10 %; se observó la presencia de fíbulas y se midió el diámetro de las hifas a 100x (20 hifas por tratamiento) con ayuda del programa Motic digital Microscope DMB3-223 (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004)

Evaluación de la velocidad de crecimiento y producción de biomasa

Con ayuda de un horador se tomó un disco (5 mm de diámetro) de agar con micelio que se colocó en el centro de la caja de Petri (9 cm de diámetro); se tuvieron seis réplicas por medio de cultivo. Las cajas se incubaron a 18 y 25 °C en oscuridad, y cada tercer día se midió el diámetro de la colonia con un vernier (calibrador vernier metal 5" PRETUL[®], ver-6p, China). La velocidad de crecimiento se calculó con la fórmula utilizada por Huerta, Martínez-Carrera, Sánchez, y Leal-Lara (2009):

$$\text{Velocidad de crecimiento} = (D_f - D_i) / (T_f - T_i)$$

Donde:

D_f = Diámetro final de crecimiento
D_i = Diámetro inicial de crecimiento
T_f-T_i = Días de crecimiento micelial

tic digital Microscope DMB3-223 software (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004)

Evaluation of growth rate and biomass production

Using a tunneler, we took a disk (5 mm diameter) of agar with mycelium which was placed in the center of the Petri dish (9 cm diameter); six replications by culture medium were obtained. The plates were incubated at 18 and 25 °C in darkness, and every third day the colony diameter was measured with a vernier (vernier caliper metal 5 "PRE-TUL[®], see-6p, China). The growth rate was calculated with the formula used by Huerta, Martínez-Carrera, Sánchez, y Leal-Lara (2009):

$$\text{Growth rate} = (D_f - D_i) / (T_f - T_i)$$

Where:

D_f = Final growth diameter
D_i = Initial growth diameter
T_f-T_i = Days of mycelial growth

Biomass was quantified by measuring the dry weight by the modified technique of Santiago-Martínez, Estrada-Torres, Varela, and Herrera (2003). Once the incubation period was completed, the strains were placed in boiling

La biomasa se cuantificó midiendo el peso seco mediante la técnica modificada de Santiago-Martínez, Estrada-Torres, Varela, y Herrera (2003). Una vez concluido el periodo de incubación, las cepas se colocaron en agua hirviendo para eliminar el agar, se enjuagaron con agua caliente y se secaron en un horno a 80 °C por 24 h.

El análisis estadístico se hizo con el programa Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009). Los datos de *F. mexicana* se sometieron a un ANOVA considerando el medio de cultivo como factor, y la velocidad de crecimiento y producción de biomasa como variables de respuesta. Los datos del hongo *L. aff. shimeji* también se trataron con un ANOVA, donde los factores fueron la temperatura y el medio de cultivo, y las variables de respuesta fueron la velocidad de crecimiento y producción de biomasa. Las diferencias significativas entre medios de cultivo se determinaron con una prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$). Debido a que la velocidad de crecimiento de *P. spadicea*, *F. aff. luteovirens* y *C. squamulosa* fue muy lenta, la producción de biomasa no se cuantificó, por lo que dichas cepas no se analizaron estadísticamente.

Producción de inóculo

La producción de inóculo de *L. aff. shimeji* se evaluó en los medios PDA y EMA-PL, y *F. mexicana* se evaluó en ACP y PDA-PL, utilizando granos de trigo y sorgo como sustrato (10 réplicas por tratamiento). Los granos fueron sometidos a un proceso de hidratación (Gaitán-Hernández, Salmones, Pérez-Merlo, & Mata, 2006; Stamets, 2000). El trigo, además de la hidratación, se sometió a un proceso de cocción (evitando que se deshiciera o tuviera una consistencia dura) con la finalidad de romper el endospermo y que las hifas penetraran con mayor facilidad. El exceso de agua se eliminó y se pesaron 200 g de cada grano, se adicionaron 3.5 g de cal·kg⁻¹ y se colocaron en frascos de vidrio. Los frascos se taparon con papel aluminio para su esterilización en la autoclave a 15 lb y 121 °C durante 1 h. Previa a la inoculación se midió el pH y la humedad (%). La inoculación se hizo a 18 °C con el micelio que presentó mayor biomasa y velocidad de crecimiento en los medios de cultivo, colocando tres fragmentos de 1 cm² sobre la semilla. A los 30 días de incubación se obtuvo el porcentaje de grano invadido por el hongo, también se evaluó la densidad del micelio mediante el análisis cualitativo modificado de Villegas, Pérez, y Arredondo, (2007): 1.0-2.0 = micelio poco denso (0-30 % del grano cubierto por micelio), 2.1-3.0 = micelio medianamente denso (31-80 % del grano cubierto por micelio), 3.1-5.0 = micelio denso (81-100 % del grano cubierto por micelio).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron e identificaron cepas de *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum aff. shimeji*, *Psathyrella spadicea*, *Clitocybe squamulosa* y *Floccularia aff. luteovirens*. Las especies con mejor desarrollo en el cultivo *in vitro* para la producción de inóculo fueron *F. mexicana* y *L. aff. shimeji*.

water to remove the agar, rinsed with hot water and dried in an oven at 80 °C for 24 h.

Statistical analyses were done with the Statgraphics® Centurion XVI software (StatPoint Technologies, Inc., 2009). *F. mexicana* data were subjected to ANOVA with the culture medium as factor, and the growth rate and biomass production as response variables. *L. aff. shimeji* data were also treated with an ANOVA, where the factors were the temperature and culture medium, and the response variables were the growth rate and biomass production. Significant differences between culture media were determined with a multiple range test of Tukey ($P \leq 0.05$). Because the growth rate of *P. spadicea*, *F. aff. luteovirens* and *C. squamulosa* was slow, the biomass production was not quantified, so these strains were not analyzed statistically.

Spawn production

Spawn production of *L. aff. shimeji* was evaluated on PDA media and EMA-PL, and *F. mexicana* was evaluated on DFA and PDA-PL, using wheat and sorghum grains as substrate (10 replications per treatment). The grains were subjected to a process of hydration (Gaitán-Hernández, Salmones, Pérez-Merlo, & Mata, 2006; Stamets, 2000). Wheat, besides being hydrated, was subjected to a boiling process in order to break the endosperm so the hyphae penetrate the seed (preventing the seed for getting rid or have a hard consistency) more easily. Water excess was removed and 200 g of each grain were weighted, 3.5 g of cal·kg⁻¹ were added and placed in glass flasks. The flasks were capped with aluminum foil for autoclaving at 15 pounds and 121 °C for 1 h. Prior to inoculation, pH and moisture (%) were measured. Inoculation was done at 18 °C using the mycelium with higher biomass and growth rate in the culture media, placing three pieces of 1 cm² on the seeds. At 30 days of incubation the percentage of grain invaded by the fungus was obtained, mycelial density was also evaluated using the qualitative analysis (modified) of Villegas, Pérez, and Arredondo, (2007): 1.0-2.0 = not very dense mycelium (0-30 % of the grain covered with mycelium), 2.1-3.0 = medium dense mycelium (31-80 % of grain covered with mycelium), 3.1-5.0 = dense mycelium (81-100 % of grain covered with mycelium).

RESULTS AND DISCUSSION

Strains of *Flammulina mexicana*, *Lyophyllum aff. shimeji*, *Psathyrella spadicea*, *Clitocybe squamulosa* and *Floccularia aff. luteovirens* were isolated and identified. *F. mexicana* and *L. aff. shimeji* were the species with better development *in vitro* culture for the reproduction of spawn.

Characterization of strains

Psathyrella spadicea (P. Kumm.) Singer (known in Mexico as clavo de oyamel).

Caracterización de cepas

Psathyrella spadicea (P. Kumm.) Singer (clavo de oyamel).

La cepa creció únicamente en PDA-PL con pH de 5.7 a 18 °C, alcanzando 3.2 cm de diámetro en tres meses. La cepa tuvo forma circular con margen fimbriado, crecimiento del micelio sumergido con textura algodonosa, superficie plana, densidad escasa y de color café (Figura 1a). En cuanto a las características microscópicas, las hifas midieron de 2.1 a 3.3 μm de diámetro; se observaron ramificadas, septadas, sinuosas y con fíbula frecuentes.

Floccularia aff. *luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar (hongo de yema).

La cepa obtenida creció en medio EMA (pH 4.8) y AM (pH 6.1) a 18 °C. En medio EMA, la cepa alcanzó diámetro

The strain grew only on PDA-PL with pH of 5.7 at 18 °C, reaching 3.2 cm in diameter in three months. The strain was circular with fimbriate margin, mycelium growth submerged with cottony texture, flat, low density and brown color (Figure 1a). With respect to the microscopic features, the hyphae measured 2.1 to 3.3 μm in diameter; were observed branched, septated, sinuous hyphae and with frequent clamp connections.

Floccularia aff. *luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar (known in Mexico as hongo de yema).

The strain obtained grew up on EMA (pH 4.8) and MA (pH 6.1) at 18 °C. On EMA, the strain reached maximum diameter of 3.5 cm in three months; it had round shape and margin, aerial mycelium growth, cottony texture, flat surface and abundant white color density (Figure 1b). Microscopically, we observed branched, septated, sinuous hyphae

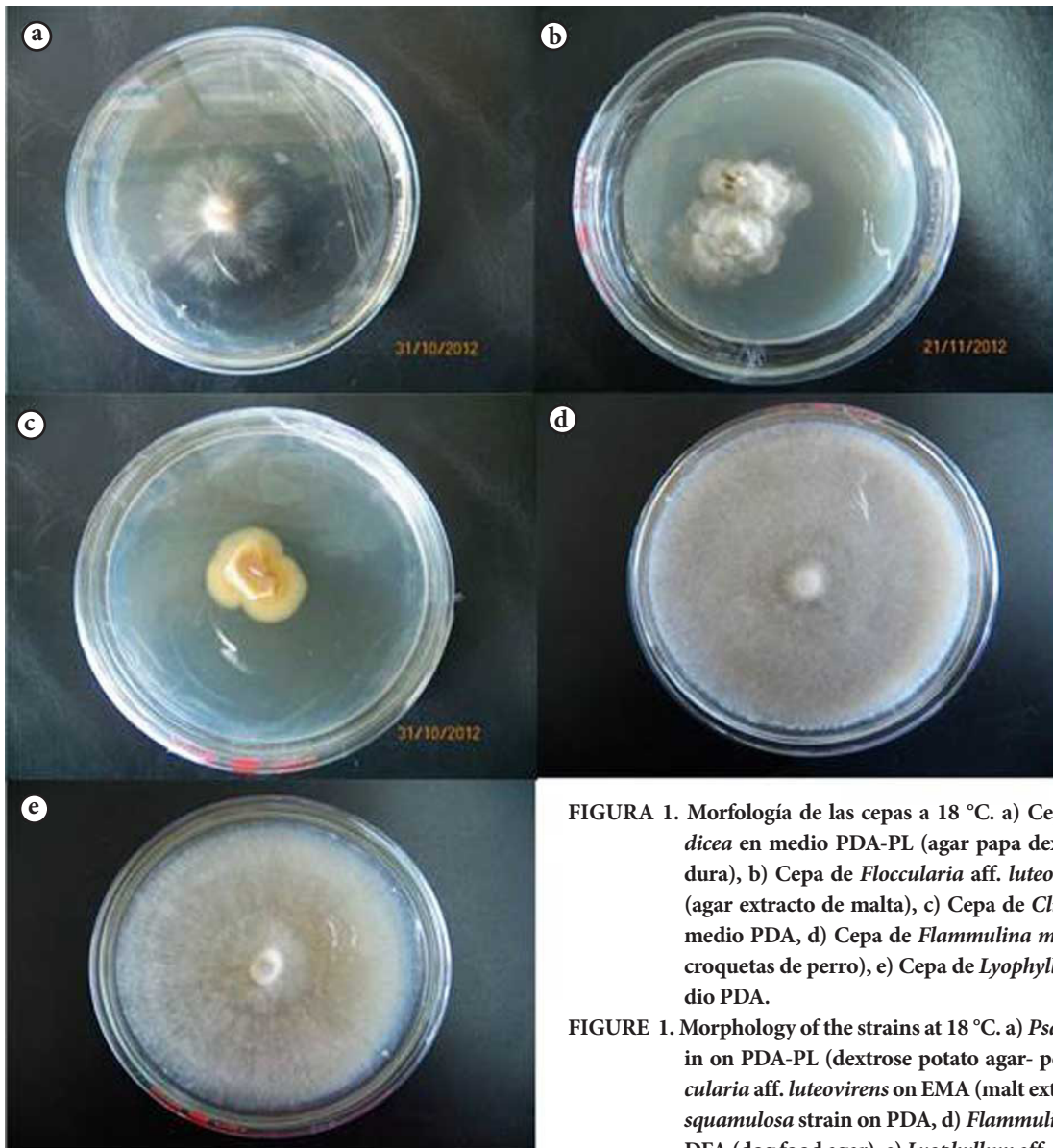


FIGURA 1. Morfología de las cepas a 18 °C. a) Cepa de *Psathyrella spadicea* en medio PDA-PL (agar papa dextrosa-peptona y levadura), b) Cepa de *Floccularia* aff. *luteovirens* en medio EMA (agar extracto de malta), c) Cepa de *Clitocybe squamulosa* en medio PDA, d) Cepa de *Flammulina mexicana* en ACP (agar croquetas de perro), e) Cepa de *Lyophyllum* aff. *shimeji* en medio PDA.

FIGURE 1. Morphology of the strains at 18 °C. a) *Psathyrella spadicea* strain on PDA-PL (dextrose potato agar- peptone-yeast), b) *Floccularia* aff. *luteovirens* on EMA (malt extract agar), c) *Clitocybe squamulosa* strain on PDA, d) *Flammulina mexicana* strain on DFA (dog food agar), e) *Lyophyllum* aff. *shimeji* strain on PDA.

máximo de 3.5 cm en tres meses; presentó forma y margen circular, crecimiento de micelio aéreo, textura algodonosa, superficie plana, densidad abundante y de color blanca (Figura 1b). Microscópicamente, las hifas se observaron ramificadas, septadas, sinuosas y con fíbulas escasas, y midieron de 2.1 a 3.3 μm de diámetro. En medio AM, la cepa midió 4 cm de diámetro en dos meses, con forma y margen irregular, crecimiento de micelio aéreo, textura aterciopelada, superficie irregular y de color blanca. Las hifas variaron de 1.7 a 2.1 μm de diámetro; se observaron ramificadas, septadas, lisas y con fíbulas frecuentes.

Clitocybe squamulosa (Pers.) P. Kumm. (tejamanilero).

La cepa se aisló en PDA con pH de 5.5 a 18 °C alcanzando 3.2 cm de diámetro en tres meses; creció con forma irregular, margen liso, micelio sumergido, textura aterciopelada, superficie plana, densidad escasa y de color amarilla (Figura 1c); desarrolló hifas de 2.8 a 4.2 μm de diámetro, ramificadas, septadas, tortuosas y con fíbulas frecuentes.

Flammulina mexicana Redhead, Estrada & R. H. Petersen (hongo de jara).

La cepa creció en los seis medios de cultivo (EMA, PDA, AM, ACP, EMA-PL y PDA-PL) a 18 °C. En los seis medios, la cepa presentó forma circular, margen fimbriado, crecimiento de micelio de tipo aéreo, textura algodonosa, superficie plana y de color blanco con algunas tonalidades amarillo-marrón, con la tonalidad más marcada en PDA (Figura 1d). Una vez que el micelio invadió por completo el medio de cultivo, las cajas de Petri se almacenaron a 4 °C; a tal temperatura, la especie formó primordios en el medio AM. En cuanto a las características microscópicas, las hifas fueron ramificadas, septadas, lisas y con fíbulas frecuentes. El diámetro de las hifas difirió en cada uno de los medios: en EMA-PL y PDA-PL fue de 1.8 μm (1.5-2.1 μm), seguidos de EMA y PDA con 2 μm (1.7-2.4 μm), ACP con 2.4 μm (2.1-2.8 μm) y en AM de 3 μm (2.7-3.4 μm).

Lyophyllum aff. *shimeji* (Kawam.) hongo (clavo de llano, clavo de bosque o clavito).

La cepa aislada creció en los seis medios de cultivo (EMA, PDA, AM, ACP, EMA-PL y PDA-PL) a 18 y 25 °C. La cepa presentó forma circular en todos los medios a las dos temperaturas, margen liso a fimbriado, con crecimiento de micelio postrado-sumergido o postrado aéreo, textura aterciopelada o algodonosa, superficie plana o cóncava y de color blanco con café en PDA-PL y EMA, y color blanco en el resto de los medios (Figura 1e). Microscópicamente, las hifas fueron ramificadas, septadas y con fíbulas. A 18 °C, el diámetro de las hifas varió en cada uno de los medios de cultivo: PDA = 1.3 μm (1.2-1.5 μm), EMA = 1.4 μm (1.3-1.5 μm), EMA-PL: 1.6 μm (1.5-1.9 μm), AM = 1.8 μm (1.5-2.1 μm), ACP = 1.9 μm (1.7-2.1 μm) y PDA-PL = 2 μm (1.5-2.5 μm). A 25 °C, las hifas midieron: PDA = 1.9 μm (1.7-2.1 μm), EMA: 1.9

with few clamp connections, and measured 2.1 to 3.3 μm in diameter. On MA, the strain measured 4 cm in diameter in two months, with irregular shape and margin, growth of aerial mycelium, velvety surface and irregular white color. The hyphae ranged from 1.7 to 2.1 μm in diameter; were observed branched, septated, smooth hyphae and with frequent clamp connections.

Clitocybe squamulosa (Pers.) P. Kumm. (known in Mexico as tejamanilero).

The strain was isolated on PDA with pH of 5.5 at 18 °C reaching 3.2 cm in diameter in three months; the strain had irregularly shape, smooth margin, submerged mycelium, velvety texture, flat surface, low density and was yellow (Figure 1c); it developed hyphae of 2.8 to 4.2 μm in diameter, branched, septated, tortuous and with frequent clamp connections.

Flammulina mexicana Redhead, Estrada & R. H. Petersen (known in Mexico as hongo de jara).

The strain grew on the six culture media (EMA, PDA, MA, DFA, EMA-PL and PDA-PL) at 18 °C. On the six media, the strain showed a round shape, fimbriate margin, aerial mycelium growth, cottony texture, flat surface, white color with some yellow-brown tone, the hue was more marked in PDA (Figure 1d). Once the mycelium completely invaded the culture medium, the petri dishes were stored at 4 °C; at that temperature, the species formed primordia on the MA medium. With respect to the microscopic features, the hyphae were branched, septated, smooth and with frequent clamp connections. The diameter of the hyphae differed in each of the media: on EMA-PL and PDA-PL was 1.8 μm (1.5-2.1 μm), followed by EMA and PDA with 2 μm (1.7-2.4 μm), DFA with 2.4 μm (2.1-2.8 μm) and MA with 3 μm (2.7-3.4 μm).

Lyophyllum aff. *shimeji* (Kawam.) Hongo (known in Mexico as clavo de llano, clavo de bosque o clavito).

The strain isolated grew on the six culture media (EMA, PDA, MA, DFA, EMA-PL and PDA-PL) at 18 and 25 °C. The strain had round shape in all media at both temperatures, smooth to fimbriate margin, with prostrate-submerged or air prostrate mycelial growth, velvety or cottony texture, flat or concave surface and white-brown color in PDA-PL and EMA, and white color on the other growing media (Figure 1e). Microscopically, the hyphae were branched, septated and with clamp connections. At 18 °C, the diameter of the hyphae varied in each of the culture media: PDA = 1.3 μm (1.2-1.5 μm), EMA = 1.4 μm (1.3-1.5 μm), EMA-PL: 1.6 μm (1.5-1.9 μm), MA = 1.8 μm (1.5-2.1 μm), DFA = 1.9 μm (1.7-2.1 μm) and PDA-PL = 2 μm (1.5-2.5 μm). At 25 °C hyphae measured: PDA = 1.9 μm (1.7-2.1 μm), EMA: 1.9 (1.7-2.3 μm), EMA-PL: 1.6 μm (1.3-2.1 μm), MA = 1.7 μm (1.5-2 μm), DFA = 2.2 μm (1.9-2.6 μm) and PDA-PL = 1.7 μm (1.5-1.9 μm).

(1.7-2.3 μm), EMA-PL: 1.6 μm (1.3-2.1 μm), AM = 1.7 μm (1.5-2 μm), ACP = 2.2 μm (1.9-2.6 μm) y PDA-PL = 1.7 μm (1.5-1.9 μm).

Velocidad de crecimiento y producción de biomasa

El hongo *P. spadicea* alcanzó diámetro máximo de 3.2 cm en tres meses; *F. aff. luteovirens*, 3.5 cm en tres meses; y *C. squamulosa*, 3.2 cm en tres meses. Debido a que la velocidad de crecimiento fue muy lenta en estas especies, la producción de biomasa no se cuantificó.

El Cuadro 2 muestra los resultados de la comparación de medias de Tukey de la velocidad de crecimiento y producción de biomasa de *F. mexicana* en los diferentes medios de cultivo. Respecto a *F. mexicana*, existieron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento ($F_{5,35} = 2.32$, $P < 0.0001$) y producción de biomasa ($F_{5,35} = 11.30$, $P < 0.0001$) en los seis medios de cultivo. La mayor velocidad de crecimiento micelial (0.65 $\text{cm}\cdot\text{día}^{-1}$) se registró en los medios ACP y AM, alcanzando 9 cm de diámetro en 13 días. La velocidad de crecimiento micelial más lenta (0.31 $\text{cm}\cdot\text{día}^{-1}$) se registró en el medio PDA, con un tiempo de colonización entre 25 a 27 días. En EMA, EMA-PL y PDA-PL hubo invasión de 9 cm de diámetro a los 17, 19 y 21 días, respectivamente. En cuanto a la producción de biomasa, los mejores medios fueron PDA-PL, EMA-PL y ACP, siendo estadísticamente similares ($P \leq 0.05$).

La velocidad de crecimiento de *L. aff. shimeji* fue diferente significativamente con respecto a la temperatura ($F_{1,71} = 494.55$, $P < 0.0001$) y el medio de cultivo ($F_{5,71} = 207.02$, $P < 0.0001$) y hubo interacción significativa ($F_{5,71} = 152.93$, $P < 0.0001$) entre ambos factores. Con relación a la producción de biomasa, también se encontraron diferencias estadísticas significativas con respecto a la temperatura ($F_{1,71} = 16.73$, $P < 0.0001$) y el medio de cultivo ($F_{5,71} = 8.44$, $P < 0.0001$), existiendo interacción significativa ($F_{5,71} = 19.09$, $P < 0.0001$) entre ambos factores. El Cuadro 3 muestra los resultados de

Growth rate and biomass production

The mushroom *P. spadicea* reached a maximum diameter of 3.2 cm in three months; *F. aff. luteovirens*, 3.5 cm in three months; and *C. squamulosa*, 3.2 cm in three months. The production of biomass was not quantified, because the growth rate was very slow in these species.

Table 2 shows the results of the Tukey's mean comparison of growth rate and biomass production of *F. mexicana* on different culture media. There were significant differences in growth rate ($F_{5,35} = 2.32$, $P < 0.0001$) and biomass production ($F_{5,35} = 11.30$, $P < 0.0001$) on the six culture media with respect to *F. mexicana*. Highest mycelial growth rate (0.65 $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$) was recorded on the DFA and MA growing media, reaching 9 cm in diameter in 13 days. The slower mycelial growth rate (0.31 $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$) was recorded in PDA, with a time of colonization between 25 to 27 days. EMA, EMA-PL and PDA-PL had invasion of 9 cm in diameter at 17, 19 and 21 days, respectively. As for biomass production, the best growing media were PDA-PL, EMA-PL and DFA being statistically similar ($P \leq 0.05$).

The growth rate of *L. aff. shimeji* differed significantly with respect to the temperature ($F_{1,71} = 494.55$, $P < 0.0001$) and growing medium ($F_{5,71} = 207.02$, $P < 0.0001$) and there was significant interaction ($F_{5,71} = 152.93$, $P < 0.0001$) between both factors. With respect to the biomass production, statistically significant differences were also found with respect to the temperature ($F_{1,71} = 16.73$, $P < 0.0001$) and culture medium ($F_{5,71} = 8.44$, $P < 0.0001$), and there was a significant interaction ($F_{5,71} = 19.09$, $P < 0.0001$) between both factors. Table 3 shows the results of the Tukey's mean comparison of growth rate and biomass production of *L. aff. shimeji* in different culture media. The significantly higher growth rate occurred in PDA at 18 °C (0.40 $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$), invading the Petri dish in 21 days. The significantly higher growth rate occurred in DFA, and MA, both culture media at 25 °C. At this temperature, some culture media showed irregular growth

CUADRO 2. Velocidad de crecimiento y producción de biomasa de *Flammulina mexicana* en los diferentes medios de cultivo a 18 °C.

TABLE 2. Growth rate and biomass production of *Flammulina mexicana* on different culture media at 18 °C.

Medio de cultivo / Culture media	Velocidad de crecimiento / Growth rate ($\text{cm}\cdot\text{día}^{-1}$)	Biomasa / Biomass (g)
AM / MA	0.65 a	0.05 c
ACP / DFA	0.65 a	0.07 ab
EMA	0.44 b	0.05 bc
PDA	0.31 e	0.04 bc
EMA-PL	0.36 c	0.07 a
PDA-PL	0.34 d	0.08 a

AM: Agar maíz, ACP: Agar croquetas de perro, PDA-PL: Agar papa dextrosa-peptona y levadura, EMA-PL: Agar extracto de malta-peptona y levadura. *Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

MA: maize agar, DFA: dog food agar, PDA-PL: dextrose potato and yeast agar, EMA-PL: malt extract -peptone and yeast agar.

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

CUADRO 3. Velocidad de crecimiento y producción de biomasa de *L. aff. shimeji* en los diferentes medios de cultivo y temperaturas.
TABLE 3. Growth rate and biomass production of *L. aff. shimeji* on different culture media and temperatures.

Factores / Factors		Variables de estudio / Response variable	
Medio de cultivo / Culture media	Temperatura / Temperature (°C)	Velocidad de crecimiento (cm-día ⁻¹) / Growth rate (cm-day ⁻¹)	Biomasa / Biomass (g)
AM / MA	18 °C	0.347 cde	0.111083 abc
AM / MA	25 °C	0.152 a	0.087117 ab
ACP / DFA	18 °C	0.347 cde	0.174133 def
ACP / DFA	25 °C	0.145 a	0.080350 a
EMA	18 °C	0.343 cd	0.142933 bcde
EMA	25 °C	0.310 b	0.121250 abcd
PDA	18 °C	0.400 f	0.092283 abc
PDA	25 °C	0.333 ef	0.146067 cde
EMA-PL	18 °C	0.320 bc	0.221500 f
EMA-PL	25 °C	0.340 cd	0.087050 ab
PDA-PL	18 °C	0.360 de	0.144917 bcde
PDA-PL	25 °C	0.360 de	0.192900 ef

AM: Agar maíz, ACP: Agar croquetas de perro, PDA-PL: Agar papa dextrosa-peptona y levadura, EMA-PL: Agar extracto de malta-peptona y levadura. *Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

MA: maize agar, DFA: dog food agar, PDA-PL: dextrose potato and yeast agar, EMA-PL: malt extract -peptone and yeast agar.

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

la comparación de medias de Tukey de la velocidad de crecimiento y producción de biomasa de *L. aff. shimeji* en los diferentes medios de cultivo. La velocidad de crecimiento significativamente mayor se presentó en PDA a 18 °C (0.40 cm-día⁻¹), invadiendo la caja de Petri en 21 días. La velocidad de crecimiento significativamente menor se registró en ACP y AM, ambos medios a 25 °C. A esta misma temperatura, algunos medios presentaron crecimiento irregular, ya que existieron periodos donde no hubo crecimiento o como el caso de AM y ACP donde el micelio dejó de crecer a los 23 días, alcanzando solo 5 cm de diámetro y manteniéndose así hasta el día 31 que se dejó de monitorear. Por otra parte, la producción de biomasa significativamente mayor se presentó en EMA-PL a 18 °C (0.22 g). De manera contrastante, la cepa de *L. aff. shimeji* que creció en PDA a 18 °C tuvo la mayor velocidad de crecimiento, pero también menor producción de biomasa.

El crecimiento del micelio de cada una de las especies en los diferentes medios de cultivo está relacionado con la teoría de que, bajo condiciones nutricionales favorables, los hongos incrementan la ramificación de sus hifas y, por consiguiente, la cantidad de biomasa, aumentando la eficiencia de suministro de nutrientes al incrementarse el área superficial del micelio (Harris, 2008; Jennings & Lysek, 1999). Por lo contrario, en condiciones limitantes de nutrientes, el micelio tiende a ser menos ramificado para maximizar la disponibilidad de estos (Prosser & Tough, 1991). Con respecto al pH, este valor únicamente se midió en los medios de cul-

as there were periods when there was no growth; or as the case of MA and DFA where the mycelium stopped growing at 23 days, reaching only 5 cm in diameter and staying like this until day 31 when monitoring stopped. Moreover, the production of biomass was significantly higher in EMA-PL at 18 °C (0.22 g). In contrast, the strain of *L. aff. shimeji* that grew on PDA at 18 °C had the highest growth rate, but also lower biomass production.

Mycelium growth of each species in the different culture media is related to the theory that, under favorable nutritional conditions, fungi increases the branching of the hyphae and thus, the amount of biomass, increasing the efficiency of nutrient supply by increasing the surface area of the mycelium (Harris, 2008; Jennings & Lysek, 1999). In contrast, in nutrient-limiting conditions, mycelium tends to be less branched to maximize the availability of these nutrients (Prosser & Tough 1991). With respect to pH, this value was only measured in the culture media, but it was not an experimental variable; however, the value recorded from each culture media could refer to the possible ranges to handle in subsequent studies. The pH is involved in the metabolism of nutrients, and in the permeability of the membrane, so it can be one of the factors that are affecting the development of the mycelium; Miles and Chang (1997) mention that most fungi have better vegetative growth on a medium that goes from acid to neutral. This is reflected in the species *F. mexicana* and *L. aff. shimeji*, since these species developed the larger diameter of hyphae on DFA and MA with pH

tivo, más no fue una variable que se ajustara; sin embargo, el valor registrado en cada medio podría hacer referencia sobre los posibles rangos a manejar en estudios posteriores. El pH está involucrado en el metabolismo de los nutrientes y en la permeabilidad de la membrana, por lo que puede ser uno de los factores que estén afectando el desarrollo del micelio; Miles y Chang (1997) mencionan que la mayoría de los hongos presentan mejor crecimiento vegetativo en un medio que va de lo ácido a lo neutral. Esto se ve reflejado en las especies *F. mexicana* y *L. aff. shimeji*, ya que desarrollaron el mayor diámetro de hifas en los medios ACP y AM con pH de 6.2 y 6.1, respectivamente. Vázquez-García, Santiago-Martínez, y Estrada-Torres (2002), en un estudio con cepas de hongos ectomicorrícicos, mencionan que el pH afecta el crecimiento, biomasa y el patrón de ramificación del micelio; el pH a la vez puede ser afectado por la fuente de N. Otro factor importante se muestra en las especies que desarrollaron micelio aéreo y tuvieron mayor velocidad de crecimiento; esto puede deberse a que el micelio aéreo favorece el proceso respiratorio al incrementarse la difusión del oxígeno y, por lo tanto, se genera la energía necesaria para mantener el metabolismo celular (Rahardjo, Weber, Le Comte, Tramper, & Rinzema, 2002). La relación C/N y el pH deben considerarse en la elaboración de medios más adecuados para las cepas de *P. spadicea*, *C. squamulosa* y *F. aff. Luteovirens*, las cuales tuvieron velocidad de crecimiento más lenta en comparación con *F. mexicana* y *L. aff. shimeji*. Además hay que considerar y relacionar dichos factores con el hábitat de cada especie; por ejemplo, *P. spadicea* está registrada como sapropárasita (Vašutová, 2008), sus requerimientos nutricionales y el pH son específicos, lo cual se reflejó en la pérdida de la cepa al tratar de reaislarla.

La formación de primordios de *F. mexicana*, en cultivo puro, confirma la identidad de la cepa y es un indicativo de su capacidad de fructificación, la cual depende de las características nutricionales y ambientales como luz, temperatura y concentración de CO₂ (Stamets, 2000; Yamanaka, Namba, & Tajiri, 2000). La selección de cepas fúngicas con capacidad para formar primordios en conjunto con la investigación encaminada a conocer sus características nutricionales y ambientales, pueden constituir las bases de futuras investigaciones para el cultivo de hongos (Díaz, Flores, & Honrubia, 2009; Stamets, 2000).

Producción de inóculo

El inóculo primario se produjo de *F. mexicana* y *L. aff. shimeji*, ya que fueron las especies con mejor desarrollo en el cultivo *in vitro*. En el caso de *F. mexicana* se utilizó el micelio que creció en los medios ACP y PDA-PL, pues no presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la mayor producción de biomasa de acuerdo con la prueba de Tukey (Cuadro 2); además, con el medio ACP se registró también la mayor velocidad de crecimiento. Los granos de trigo (60 % de humedad y pH 8.3) y sorgo (70 % de humedad y pH 7) se utilizaron debido a su disponibilidad, bajo costo

of 6.2 and 6.1, respectively. Vázquez-García, Santiago-Martínez, and Estrada-Torres (2002), in a study with strains of ectomycorrhizal fungi, mention that the pH affects growth, biomass and branching pattern of the mycelium; but at the same time the pH can be affected by the source of N. Another important factor is shown in the species that developed aerial mycelium and had a greater growth rate; this may be because the aerial mycelium favors the breathing process to increase the diffusion of oxygen and, therefore, generates the energy needed to maintain cellular metabolism (Rahardjo, Weber, Le Comte, Tramper, & Rinzema, 2002). C/N ratio and pH should be considered in developing appropriate culture media for strains of *P. spadicea*, *C. squamulosa* and *F. aff. luteovirens*, which had slower growth rate compared to *F. mexicana* and *L. aff. shimeji*. We also have to relate these factors to the habitat of each species; for example, *P. spadicea* is registered as saproparasitic (Vašutová, 2008), and their nutritional requirements and pH are specific, which was reflected in the loss of the strain when trying to reisolate it.

The formation of primordia of *F. mexicana*, in pure culture, confirmed the identity of the strain and is an indicative of its fruiting capacity, which depends on the nutritional and environmental conditions such as light, temperature and CO₂ concentration (Stamets, 2000; Yamanaka, Namba, & Tajiri, 2000). The selection of fungal strains with ability to form primordia together with the research to meet their nutritional and environmental conditions, can be the basis of future research for fungi cultivation (Díaz, Flores, & Honrubia, 2009; Stamets, 2000).

Spawn production

The primary spawn came from *F. mexicana* and *L. aff. shimeji*, because these species had the best development on culture *in vitro*. In the case of *F. mexicana*, we used mycelium growing on DFA and PDA-PL, because they did not showed statistically significant differences in terms of biomass production according to the Tukey test (Table 2); besides, the higher growth rate was also recorded with DFA. Wheat grains (60 % moisture and pH 8.3) and sorghum (70 % moisture and pH 7) were used due to their availability, low cost and quality. Table 4 shows the qualitative assessment of the spawn production after 20 days of incubation; the best production was reached on wheat on DFA developing dense mycelium and the highest percentage (98.3 %) of grain covered.

Spawn production of *L. aff. shimeji* was elaborated with mycelium on PDA and EMA-PL, because the strain had higher growth rate on PDA and biomass production in EMA-PL. Table 4 shows the evaluation of the spawn production after 30 days of incubation. Wheat inoculated with mycelium of both media proved to be suitable for the production of primary spawn, by presenting dense mycelium and greater percentage of grain covered. In both species, the mycelium of primary spawn showed branching, septated hyphae and with frequent clamps connections.

y calidad. El Cuadro 4 muestra la evaluación cualitativa del inóculo a los 20 días de incubación; las mejores condiciones las presentó el trigo con ACP, desarrollando micelio denso y el mayor porcentaje (98.3 %) de grano cubierto.

La producción de inóculo de *L. aff. shimeji* se hizo con el micelio de medio PDA y EMA-PL, debido a que la cepa tuvo mayor velocidad de crecimiento en PDA y producción de biomasa en EMA-PL. En el Cuadro 4 se muestra la evaluación del inóculo a los 30 días de incubación, donde el trigo inoculado con micelio de ambos medios resultó el más adecuado para la producción de inóculo primario, por presentar micelio denso y mayor porcentaje de grano cubierto. En ambas especies, el micelio del inóculo primario presentaba hifas ramificadas, septadas y con fíbulas frecuentes.

In both species, wheat was more efficient for spawn production. This type of grain allows the mycelium to be more effective, so it is considered as a nutritional supplement (Stamets, 2000). Both humidity and pH of the grain are in the optimal range for the growth of mycelium; the optimum humidity range is 50 to 75 % (Miles & Chang, 1997; Sánchez & Rosye, 2001) facilitating the availability of nutrients. The pH directly influences the membrane proteins and the activity of the enzymes linked to the cell wall (affecting their metabolism), so when a fungus is grown under an inadequate substrate pH, although temperature conditions and nutrients are optimal, growth is affected (Miles & Chang, 1997; Sánchez & Rosye, 2001). Grains were not compared in this study, because grains did not undergo the same treatment; wheat was boiled but sorghum was not, a process that led to

CUADRO 4. Evaluación del inóculo primario de *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum aff. shimeji* después de 30 días de incubación.

TABLE 4. Evaluation of primary spawn *Flammulina mexicana* and *Lyophyllum aff. shimeji* after 30 days of incubation.

Grano / Medio de cultivo / Grain / Culture media	Densidad del micelio / Mycelium density	Grano cubierto por el hongo / Grain cover with fungi (%)
<i>L. aff. shimeji</i>		
sorgo / sorghum (PDA)	3	87.5
sorgo / sorghum (EMA-PL)	1	21.4
trigo / wheat (EMA-PL)	4	70.1
trigo / wheat (PDA)	4	75.0
<i>F. mexicana</i>		
sorgo (ACP) / sorghum (DFA)	2	75.8
sorgo / sorghum (PDA-PL)	2	69.1
trigo (ACP) / wheat (DFA)	5	98.3
trigo / wheat (PDA-PL)	4	90.0

ACP: Agar croquetas de perro, PDA-PL: Agar papa dextrosa-peptona y levadura, EMA-PL: Agar extracto de malta-peptona y levadura.

Densidad del micelio: 1.0-2.0 = micelio poco denso (0-30 % del grano cubierto por micelio), 2.1-3.0 = micelio medianamente denso (31-80 % del grano cubierto por micelio), 3.1-5.0 = micelio denso (81-100 % del grano cubierto por micelio). Clasificación modificada de Villegas et al. (2007).

DFA: dog food agar, PDA-PL: dextrose potato and yeast agar, EMA-PL: malt extract -peptone and yeast agar.

Mycelium density: 1.0-2.0 = not very dense mycelium (0-30 % of the grain cover by mycelium), 2.1-3.0 = medium dense mycelium (31-80 % of the grain cover by mycelium), 3.1-5.0 = dense mycelium (81-100 % of the grain cover by mycelium). Classification modified by Villegas et al. (2007).

En ambas especies, el trigo fue más eficiente en la producción de inóculo. Este tipo de grano favorece al micelio para tener más vigor, por lo que se considera como un suplemento nutricional (Stamets, 2000). Tanto la humedad como el pH del grano se encuentran en el rango óptimo para el crecimiento del micelio; el rango óptimo de humedad es de 50 a 75 % (Miles & Chang, 1997; Sánchez & Rosye, 2001) facilitando la disponibilidad de los nutrientes. El pH influye directamente sobre las proteínas de la membrana y la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular (afecta su metabolismo), por lo que si el pH del sustrato donde crece un hongo no es adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimos, el crecimiento será afectado (Miles & Chang, 1997; Sánchez & Rosye, 2001). En este estudio no hubo comparación entre granos, debido a que

greater nutrients availability in wheat (Stamets, 2000) and favored the growth of the mycelium. This has been reported for species such as *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. and *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Holguín & Suárez, 2011; Rios, Hoyos, & Mosquera, 2010; Villegas et al., 2007).

According to results of biomass, growth rate, and production of primary spawn, *L. aff. shimeji* and *F. mexicana* can be considered as important and viable alternatives for cultivation of new species of wild edible mushrooms in Mexico. Furthermore, these species are related with species already cultivated such as *F. velutipes* and *L. shimeji*. Although *L. shimeji* is considered a mycorrhizal species, the synthetic culture medium for the production of fruit bodies is already known (Ohta, 1998).

no pasaron por el mismo tratamiento; ya que el trigo fue hervido y el sorgo no, proceso que generó la mayor disponibilidad de nutrientes en el trigo (Stamets, 2000) y favoreció el crecimiento del micelio, lo cual también es reportado para especies como *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. y *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Holguín & Suárez, 2011; Ríos, Hoyos, & Mosquera, 2010; Villegas et al., 2007).

De acuerdo con los resultados de biomasa, velocidad de crecimiento y producción de inóculo primario, *L. aff. shimeji* y *F. mexicana* pueden considerarse como alternativas importantes y viables para el cultivo de nuevas especies de hongos silvestres en México. Además, hay relación con especies ya cultivadas como *F. velutipes* y *L. shimeji*, que a pesar de que esta última es considerada una especie micorrícica, se conoce el medio de cultivo sintético para la producción de cuerpos fructíferos (Ohta, 1998).

Además de evaluar la producción de esporomas en diferentes sustratos con las cepas ya estudiadas, es necesario realizar investigaciones enfocadas al aislamiento de nuevas cepas de hongos, para comparar la eficiencia entre ellas, probar diferentes granos para producción de inóculo, modificar y controlar las variables de pH y humedad de los granos. Con *F. mexicana* sería importante utilizar aserrín de las ramas de *Senecio cinerarioides* A. Rich., como sustrato; especie de jara donde el hongo se desarrolla y que generalmente es utilizada como leña. En el caso de *L. aff. shimeji* es factible utilizar el medio sintético propuesto por Otha (1994) y, de manera conjunta, diseñar una estrategia que permita introducirla al mercado y así formar parte de una alternativa viable de aprovechamiento sustentable para las personas que viven en zonas rurales.

CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* permite conocer los requerimientos nutricionales y ambientales de las especies de hongos. Las cepas aisladas presentaron desarrollo favorable a 18 °C de incubación, esto se atribuye a la temperatura del Nevado de Toluca que varía de -3 a 18 °C. Los medios de cultivo utilizados en la presente investigación son considerados generalistas ya que se desconocen los requerimientos nutricionales específicos de las especies utilizadas; sin embargo, proporcionan información importante para identificar factores a los que las cepas son sensibles, mediante su fisiología. Los hongos *F. mexicana* y *L. aff. shimeji* fueron las especies más adecuadas para la producción de inóculo primario; siendo el trigo el mejor vehículo para la propagación de micelio. Con la información obtenida, en conjunto con el conocimiento de sus características biológicas, se generan las bases para futuras investigaciones relacionadas a mejorar sus condiciones de cultivo *in vitro* y experimentar con su fructificación.

Besides evaluating sporome production on different substrates with the strains already studied, it is necessary to conduct future research focused on the isolation of new strains of these fungi, to compare the efficiency between them, to try different grains for spawn production, and to experiment with grain moisture and pH. With *F. mexicana* would be important to use sawdust from *Senecio cinerarioides* A. Rich. branches as substrate (a shrub known in Mexico as jara) because it is the natural substrate of the fungus. In the case of *L. aff. shimeji* is feasible to use the synthetic culture medium proposed by Otha (1994) and, together, develop a strategy to enter the market and make it part of a viable alternative for sustainable use for people living in rural areas.

CONCLUSIONS

In vitro cultivation allows knowing the nutritional and environmental requirements of different mushroom species culture. The isolated strains presented its best development at 18 °C of incubation; this is attributed to the temperature of their natural environment, the Nevado de Toluca which ranges from -3 to 18 °C. The culture media used in this investigation are considered generalists because the specific nutritional requirements of the species used are unknown; however, they provide important information to identify sensitive factors for strains, by means of their physiology. *F. mexicana* and *L. aff. shimeji* mushrooms were the most suitable species for the production of primary spawn; being wheat the best vehicle for the spread of mycelium. With the information obtained, together with the knowledge of their biological characteristics, the foundation for future research related to improving their conditions of *in vitro* cultivation and experiment with their fruiting are generated.

End of English Version

REFERENCIAS

- 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. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=93912996022>
- Boa, E. (2005). *Los hongos silvestres: Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Serie Productos forestales no madereros No. 17*. Roma, Italia: FAO.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact* (2nd ed.). USA: CRC Press.
- Cruz-Ulloa, B. S. (1995). *Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos*. México: Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM.
- Díaz, G., Flores, R., & Honrubia, M. (2009). Descripción de cultivos miceliarios de Boletales neotropicales y europeos

- (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 1–7. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88316009001>
- Franco, M. S., Burrola-Aguilar C., & Arana, G. Y. (2012). *Hongos comestibles silvestres: Un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca*. México: EON.
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez-Merlo, R., & Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas, aislamiento, siembra y producción*. México: Instituto de Ecología.
- Garibay-Orijel, R. & Ruan-Soto, F. (2014). Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. In A. Moreno-Fuentes, & R. Garibay-Orijel (Eds.), *La etnomicología en México, estado del arte*. México: CONACYT-UAEH-UNAM.
- 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 D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, & V. M. Mora (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 243–270). México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP.
- 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 Diversity*, 32, 59–68. Obtenido de http://www.kib.ac.cn/yjzwz/sdys/zjytxyjz/tnh_fblw/201201/P020120116392914990126.pdf
- Harris, S. D. (2008). Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823–832. doi:10.3852/08-177
- Holguín, M., & Suárez, C. (2011). Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 130–140. Obtenido de <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/Vol5/Vol.5%20No.1/Vol.5%20No.1.%20Art.11.pdf>
- Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, J. E., & Leal-Lara, H. (2009). Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 31–42. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88316009004>
- Jennings, D. H., & Lysek, G. (1999). *Fungal Biology* (2nd ed.). USA: Springer.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Matsuzawa, K., Shirasaka, N., Nakazawa, M., ... Terashita T. (2004). Characterization of extracellular glucoamylase from the ectomycorrhizal mushroom *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience*, 45, 383–389. doi: 10.1007/s10267-004-0196-6
- Mariaca, R., Silva, L. C., & Castaños, C. A. (2001). Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum*, 8, 30–40. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10402004>
- Martínez-Carrera, D. (2002). Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional*, 14(2), 61–74. Obtenido de <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/10.pdf>
- Mata, G., Salmones, D., & Gaitán-Hernández (2010). Basic and applied research on mushroom cultivation at the Institute of Ecology, Xalapa, México. In D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, & V. M. Mora (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 243–270). México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP.
- Miles, G. P., & Chang, S. (1997). *Mushroom biology, concise basic and current developments word scientific*. USA: Riverd Edge.
- Moncalvo, J. M., Vilgalys, R., Redhead, S. A., Johnson, J. E., James, T. Y., Aime, M., ... Miller, O. K. (2002). One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 23, 357–400. doi: 10.1016/S1055-7903(02)00027-1
- Motic China Group Co., Ltd. (2001-2004). Motic Images Plus version 2.0. Multi language version. China: Autor.
- Ohta, A. (1994). Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. *Mycoscience*, 35, 147–151. doi: 10.1007/BF02318492
- Ohta, A. (1998). Culture conditions for commercial production of *Lyophyllum shimeji*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 39, 13–20.
- Prosser, J. I., & Tough, A. J., (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(4), 253–274. doi: 10.3109/07388559109038211
- Rahardjo, Y. S., Weber, F. J., Le Comte, P. E., Tramper, J., & Rinzema, A. (2002). Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(5), 539–544. doi: 10.1002/bit.10222
- Ríos, M., Hoyos J., & Mosquera, S. (2010). Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(2), 86–94. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n2/v8n2a12.pdf>
- Rodrigues, M. M., Paccola-Meirelles L. D., De Jesús, T. F., & Kazue N. I. (2009). Influence of *Flammulina velutipes* mycelia culture conditions on antimicrobial metabolite product. *Mycoscience*, 50, 78–81. doi: 10.1007/s10267-008-0447-z
- Sánchez, J., & Royse, D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* (1a ed.). México: ECOSUR.
- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L., & Herrera, T. (2003). Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia*, 37, 575–584. Obtenido de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2003/nov-dic/art-3.pdf>
- 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), 1–8. doi: 10.1016/j.riam.2012.03.011
- Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medicinal mushrooms* (3rd ed.), China: Ten Speed Press.

- Statpoint Technologies, Inc. (2009). Statgraphics® Centurion XVI. USA: Autor.
- Vašutová, M. (2008). Taxonomic studies on *Psathyrella* sect. *spadi-ceae*. *Czech Mycology*, 60(2), 137–171. Obtenido de <https://web.natur.cuni.cz/cvsm/CM60201.pdf>
- Vázquez-García, A., Santiago-Martínez G., & Estrada-Torres A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, 73, 1–15. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/400/40073101.pdf>
- Villegas, E. V., Pérez, A., & Arredondo, C. (2007). Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivos sólidos para la producción de micelio como inóculo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 56–63. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/715>
- Visnovsky, S. B., Cummings, N., Guerin-Laguette, A., Wang, Y., Yamada, A., Kobayashi, H., ... Pitman, A. R. (2014). Detection of the edible ectomycorrhizal fungus *Lyophyllum shimeji* colonising seedlings of cultivated conifer species in New Zealand. *Mycorrhiza*, 24(6), 453–463. doi: 10.1007/s00572-013-0552-5
- Yamanaka, K., Namba, K., & Tajiri, A. (2000). Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience*, 41, 189–191. doi: 10.1007/s00572-013-0552-5