



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Aislamiento y producción micelial de algunas especies de hongos silvestres comestibles con distribución en México”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
ERWIN PIÑÓN PENSAMIENTO



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. HERMILO LEAL LARA

2004



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Erwin Piñón Pensamiento

FECHA: 25-05-2004

FIRMA: Erwin Piñón Pensamiento

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Aislamiento y producción micelial de algunas especies de hongos silvestres comestibles con distribución en México"

realizado por Erwin Piñón Pensamiento

con número de cuenta 09650433-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Hermilo Leal Lara

Propietario

M. en C. Luis Manuel Pinzón Picaseña

Propietario

Dr. Siefredo Sierra Galván

Suplente

M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Suplente

Biol. Alfonso Montañez Arce

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chavez



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

# Aislamiento y producción micelial de algunas especies de hongos silvestres comestibles con distribución en México

	Pag.
<b>1 Resumen</b> .....	2
<b>2 Introducción</b> .....	3
2.1 Antecedentes .....	7
2.2 Justificación .....	9
2.3 Objetivos .....	10
2.4 Hipótesis .....	11
<b>3 Materiales y métodos</b> .....	12
<b>3.1 Material fúngico</b> .....	12
3.1.1 Material fúngico aislado .....	12
<b>3.2 Aislamiento de las cepas de hongos silvestres</b> .....	14
<b>3.3 Crecimiento micelial de 6 especies en medios de agar</b> .....	15
<b>3.4 Evaluación de la producción de esclerocios por especies del género <i>Morchella</i></b> .....	18
3.4.1 Producción de esclerocios por <i>Morchella angusticeps</i> , <i>M. conica</i> , <i>M. crassipes</i> y <i>M. elata</i> .....	18
3.4.2 Formación de esclerocios por <i>Morchella elata</i> en medio EMA con suplementos .....	19
<b>3.5 Producción de inóculo</b> .....	20
3.5.1 Invasión de granos de cereal por <i>Morchella crassipes</i> , <i>M. elata</i> y <i>Sparassis crispa</i> .....	20
3.5.2 Producción de biomasa de <i>Morchella elata</i> en medios líquidos de extracto vegetal .....	21
3.5.3 Efecto de la homogeneización del micelio en el crecimiento de <i>Lyophyllum decastes</i> en medios líquidos .....	22
<b>4 Resultados y Discusión</b> .....	24
<b>4.1 Descripción de las especies aisladas</b> .....	24
<b>4.2 Aislamiento de las cepas de hongos silvestres</b> .....	26
<b>4.3 Crecimiento micelial de 6 especies en medios de agar</b> .....	29
<b>4.4 Evaluación de la producción de esclerocios por especies del género <i>Morchella</i></b> .....	42
4.4.1 Producción de esclerocios por <i>Morchella angusticeps</i> , <i>M. conica</i> , <i>M. crassipes</i> y <i>M. elata</i> .....	42
4.4.2 Formación de esclerocios por <i>Morchella elata</i> en medio EMA con suplementos .....	44
<b>4.5 Producción de inóculo</b> .....	47
4.5.1 Invasión de granos de cereal por <i>Morchella crassipes</i> , <i>M. elata</i> y <i>Sparassis crispa</i> .....	48
4.5.2 Producción de biomasa de <i>Morchella elata</i> en medios líquidos de extracto vegetal .....	50
4.5.3 Efecto de la homogeneización del micelio en el crecimiento de <i>Lyophyllum decastes</i> en medios líquidos .....	52
<b>5 Conclusiones</b> .....	55
<b>6 Literatura citada</b> .....	58

# 1 Resumen

En el presente estudio se trabajó con siete especies de hongos silvestres comestibles con distribución en el país: *Clitocybe gibba*, *Lyophyllum decastes*, *Morchella angusticeps*, *Morchella conica*, *Morchella crassipes*, *Morchella elata* y *Sparassis crispa*. Posteriormente al proceso de aislamiento, con ellas se realizaron diferentes experimentos en los que se probaron distintos medios de cultivo líquidos, semisólidos y sólidos para determinar si serían útiles en la producción de micelio, que es una fase inicial muy importante en el cultivo de cualquier hongo. Algunos de los medios utilizados son empleados comunmente en metodologías para producción de micelio, pero otros fueron ideados y probados por primera ocasión en este trabajo. Se encontraron desde medios en los que el crecimiento micelial no fue favorable hasta medios en los que fue muy favorable. También se determinaron características del crecimiento de dichos hongos en ellos.

## 2 Introducción

El cultivo de hongos comestibles ha tenido largos años de experiencia en todo el mundo, particularmente en las dos últimas décadas ha habido una gran expansión en esta industria. En la década de 1970 la producción mundial de hongos estaba representada predominantemente por la especie *Agaricus bisporus* con un 70%, situación que cambió notablemente ya que en la década de 1990 la producción mundial de esta especie representaba únicamente el 37% y otras especies comenzaron a adquirir importancia, entre ellas *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp. representando totales de un 16.8% y un 16.3%, respectivamente (Royse, 1997). Además de las especies ya mencionadas, las especies más cultivadas actualmente a nivel mundial son: *Auricularia fuscosuccinea*, *A. polytricha*, *Flammulina velutipes*, *Grifolia* spp., *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula boryanus*, *L. lepideus*, *Pholiota nameko*, *P. mutabilis*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Tremella fuciformis*, y *Volvariella volvacea* (Royse, 1997). En total son más de 50 las especies de hongos comestibles o medicinales que se cultivan en el mundo; sin embargo, tal número puede incrementar ya que muchas otras, tanto especies saprofitas como micorrízicas, son susceptibles de ser cultivadas según se hagan investigaciones sobre ellas (Guzmán *et al.*, 1993; Danell y Camacho, 1997; Dahlstrom *et al.*, 2000 y Yamada *et al.*, 2001). En lo referente a hongos comestibles con distribución en México, hay un trabajo en el que los autores sostienen que existe un total de 204 especies, de las cuales 112 son comercializadas en los mercados del centro del país (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989). Del total de especies comestibles conocidas en 1989, el 49% de ellas pertenece al grupo trófico saprofito, el 46% al micorrízico y el resto son parásitas (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989). Una manera de contribuir al proceso de aprovechamiento de los hongos comestibles nacionales es

comenzar a generar información acerca de algunos de ellos. Debido a la vasta gama de especies mexicanas es necesario establecer criterios de selección que permitan abordar de manera viable este problema.

Para elegir las especies con las que se realizaron los experimentos de este trabajo, se consultaron diferentes referencias (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989; Villarreal, 1994 y Montañéz, 1999) en las que se registran hongos comestibles que tienen distribución en localidades pertenecientes al territorio nacional y los grupos tróficos a los que pertenecen. Con esta información se elaboró la Tabla 1. Se puso especial atención en el subgrupo de hongos saprobios ya que por sus propias cualidades tróficas es considerado por el autor de esta tesis como el grupo artificial en el que se encuentran especies con mayor potencial para ser cultivadas. Sin embargo, en los últimos años se han realizado cultivos de hongos micorrícicos en distintas condiciones experimentales (Danell y Camacho, 1997; Dahlstrom *et al.*, 2000 y Yamada *et al.*, 2001) por lo que no se le resta importancia a los estudios en los que se pretenda cultivar especies de este segundo subgrupo de hongos comestibles.

Tabla 1. Hongos silvestres saprobios con distribución en México

Especie	División	Sustrato	Fuente
<i>Aleuria aurantia</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Cookeina sulcipes</i>	Ascomycota	Sobre madera	1
<i>C. tricholoma</i>	Ascomycota	Sobre madera	1
<i>Helvella acetabulum</i>	Ascomycota	Terricola	3
<i>H. crispa</i>	Ascomycota	Terricola	3
<i>H. lacunosa</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>H. macropus</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Morchella costata</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>M. crassipes</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>M. elata</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Peziza badia</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Sarcosphaera eximia</i>	Ascomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Agaricus arvensis</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>A. augustus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 2
<i>A. bitorquis</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>A. campestris</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>A. placomyces</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>A. silvaticus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 2
<i>A. silvicola</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 2
<i>A. subperonatus</i>	Basidiomycota	Fimicola	1
<i>A. subrutilescens</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Arachnion album</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Armillaria luteovirens</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>A. mellea</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Auricularia auricula</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>A. delicata</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>A. fuscossuccinea</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>A. mesenterica</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>A. polythicha</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Boletellus ananas</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>B. betula</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>B. russellii</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Boletus barrowsii</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>B. piperatus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Chlorophyllum molybdites</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Clavaria vermicularis</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Calvatia cyathiformis</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. gigantia</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Clavulina cinerea</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. cristata</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. rugosa</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Clitocybe clavipes</i>	Basidiomycota	Sobre mantillo	2
<i>C. gibba</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 2
<i>C. nebularis</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. suaveolens</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Collybia acervata</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. butyracea</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	2 y 3
<i>C. confluens</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>C. dryophila</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1, 2 y 3
<i>C. polyphylla</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Coprinus comatus</i>	Basidiomycota	Fimicola	1
<i>Favolus alveolaris</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>F. brasiliensis</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Flammulina velutipes</i>	Basidiomycota	Sobre madera	3

1 = Villareal y Pérez-Moreno, 1989

2 = Villareal, 1994

3 = Montañez, 1999

Continúa

Especie	División	Sustrato	Fuente
<i>Gomphus clavatus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Hericium caput-ursi</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>H. coraloides</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>H. erinaceus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Hohenbuehelia petaloides</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Hydnum imbricatum</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1 y 2
<i>Laccaria bicolor</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>L. farinacea</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Lentinula boryana</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Lentinus lepideus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1 y 2
<i>Lepista irina</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Lycoperdon candidum</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>L. oblongiosporum</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>L. perlatum</i>	Basidiomycota	Humicola y Terricola	2 y 3
<i>L. rimulatum</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>L. umbrinum</i>	Basidiomycota	Sobre humus	2
<i>Lyophyllum decastes</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 3
<i>L. immundum</i>	Basidiomycota	Terricola	3
<i>Macrolepiota procera</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Marasmius albogriseus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Melanoleuca evenosa</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Mycena pura</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1 y 2
<i>Omphalotus mexicanus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	3
<i>Panus conchatus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>P. crinitus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>P. dryinus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>P. levis</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>P. ostreatoroseus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>P. ostreatus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1 y 3
<i>P. smithii</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Pluteus atricapillus</i>	Basidiomycota	Sobre madera	3
<i>Psathyrella spadicea</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Basidiomycota	Mantillo, Humus y Madera	1 y 2
<i>Ramaria aurea</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>R. concolor</i>	Basidiomycota	Humicola	3
<i>R. botryris</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>R. flavobrunescens</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>R. stricta</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Schizophyllum commune</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>S. fasciatum</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1
<i>Sparassis crispa</i>	Basidiomycota	Sobre madera	1 y 2
<i>Strobilomyces floccopus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>S. confusus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Stropharia coronilla</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Suillus americanus</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Vascellum curtisii</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>V. intermedium</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>V. gudenii</i>	Basidiomycota	Mantillo y Humus	1
<i>Volvariella bombycina</i>	Basidiomycota	Mantillo y Madera	1
<i>V. volvacea</i>	Basidiomycota	Sobre madera y Fimicola	1

1 = Villareal y Pérez-Moreno, 1989

2 = Villareal, 1994

3 = Montañez, 1999

## 2.1 Antecedentes

En las últimas décadas, además de aparecer especies de hongos comestibles tales como *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp. en los porcentajes de la producción mundial superiores al 10% (Royse, 1997), también ha habido avances en cuanto al cultivo de especies nuevas en distintas partes del mundo. En 1978 Hashioka y Arita publicaron un trabajo en el que se obtuvieron fructificaciones de 11 especies silvestres japonesas incluidas en los siguientes géneros: *Coprinus*, *Lyophyllum*, *Oudemansiella*, *Panellus*, *Pholiota* y *Pleurotus*. En su estudio se empleó la paja de arroz como componente principal del sustrato y se complementaron los nutrientes del medio con excrementos de pollo, también se registra que la producción de basidiocarpos de la especie *Pholiota adiposa* fue probada como la más prácticamente aplicable entre las especies incluidas. En 1981 Samajpati publicó un estudio en el que se propone y comprueba tanto un método de cultivo para micelio en medio líquido como el desarrollo de basidiocarpos de la especie india silvestre *Tricholoma cassum* en composta sintética. Guinberteau y Olivier en el año 1991 publicaron una investigación en la que se desarrollaron métodos para la producción de basidiomas de especies silvestres francesas del género *Lepista* utilizando compostas como sustratos. Kinuta en 1991 publicó un trabajo en el que se propone un método para la fructificación de *Lyophyllum decastes* utilizando diferentes proporciones de rocas pulverizadas, paja y harinas de maíz y arroz, en dicho trabajo no se menciona el origen de las cepas utilizadas. Finalmente Stamets en el año 2000 presenta un trabajo en el que se pueden encontrar numerosas técnicas de cultivo de hongos comestibles y medicinales que incluyen a 31 especies distintas. Los trabajos antes mencionados muestran que el número de especies saprofitas cultivadas puede

incrementar de acuerdo a los estudios que se realicen con ellas, es decir de acuerdo a la acumulación de información que se genere en nuevos estudios.

## 2.2 Justificación

El conocimiento popular ancestral generado a lo largo de cientos de años y el acumulado durante varias generaciones de micólogos, referente al uso de los hongos comestibles con distribución natural en México, es explotado sólo parcialmente, reduciéndose el aprovechamiento de 204 especies solo a la recolección para autoconsumo y para la comercialización local a baja escala exclusivamente en el período en el que se presentan de manera natural, es decir la temporada de lluvias.

Estos recursos podrían ser utilizados para proveer alternativas de producción de alimentos de alto valor nutricional que contribuyan a la solución de problemáticas tanto locales, a nivel nacional, como globales. Por otro lado, el incremento del conocimiento de los hongos silvestres susceptibles de ser cultivados, además de proveer nuevas vías para el aprovechamiento de este importante recurso natural mexicano, de alguna forma reitera la importancia de los esfuerzos de conservación tanto cultural como de la biodiversidad.

Por lo tanto es importante incrementar la cantidad de estudios que se enfocan al conocimiento de la domesticación y a las diferentes fases del cultivo de nuevas especies, debido a que de esta manera aumenta el potencial de aprovechamiento de este importante recurso y se tendrían nuevas alternativas para aplicar a algunos problemas en los que los hongos son de gran utilidad, como la biotransformación de desperdicios de procesos agronómicos y domésticos, manejo de bosques y desarrollo de líneas de producción de alimentos de alto valor nutricional y ecológicamente sostenibles.

## 2.3 Objetivos

Realizar aislamientos de cepas silvestres de hongos comestibles con distribución natural en México.

Explorar la posibilidad de producir micelio de los hongos aislados en diferentes medios de cultivo.

Conocer algunas características del crecimiento micelial de los hongos seleccionados en los medios utilizados.

## 2.4 Hipótesis

Debido a las características particulares de cada especie aislada, relacionadas con su desarrollo, morfología y fisiología; al comparar aspectos relacionados con su crecimiento micelial se encontrarán diferencias entre ellas, estas diferencias deben tomarse en cuenta al desarrollar métodos específicos de cultivo para producción de micelio en gran escala.

## 3 Materiales y Métodos

### 3.1 Material fúngico

Se realizaron tres recolecciones en dos tipos de vegetación durante el mes de septiembre del año 2002, es decir uno de los últimos meses de la temporada de lluvias en el Valle de México. Los sitios visitados fueron:

1 Desierto de los Leones, D.F. (bosque de coníferas)

2 Ajusco, D.F. (bosque de coníferas)

3 Inmediaciones del Cerro Tepozteco, Morelos. (bosque mixto)

El material recolectado fue identificado con base en las características morfológicas y utilizando claves de identificación. Este material no incluía ninguna especie saprobia (Tabla 2). En total se identificaron 8 especies pertenecientes a 7 géneros, todas están reconocidas como micorrícicas (Villarreal y Perez-Moreno, 1989) por lo que se descartaron para efectuar aislamientos.

#### 3.1.1 Material fúngico aislado

Con la finalidad de obtener material fúngico para aislar cepas de hongos pertenecientes al grupo de hongos saprobios comestibles, durante el mes de octubre del año 2002 se realizaron visitas a tres mercados: Jamaica y Merced de la Ciudad de México y Santiago Tianguistenco del Estado de México. De esta manera fue posible adquirir especímenes a precios que variaron entre \$30 y \$150 /kg. Se obtuvo información referente a su procedencia, acerca de los nombres comunes que usan los vendedores, y se revisaron las

**Tabla 2. Especímenes micorrícicos recolectados  
(no saprobios)**

<b>Especie</b>	<b>División</b>	<b>Nombre común</b>
<i>Amanita rubescens</i>	Basidiomycota	mantecoso
<i>Tricholoma equestre</i>	Basidiomycota	no obtenido
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	Basidiomycota	no obtenido
<i>Lactarius rubrilacteus</i>	Basidiomycota	enchilados
<i>Russula brevipes</i>	Basidiomycota	trompa
<i>Gomphus floccosus</i>	Basidiomycota	corneta
<i>Hygrophorus russula</i>	Basidiomycota	no obtenido
<i>Hygrophorus cossus</i>	Basidiomycota	no obtenido

características morfológicas. Las determinaciones taxonómicas de este material se efectuaron con base en cuatro claves de identificación (Guzmán, 1977; Hansen y Knudsen, 1992, 1997 y 2000). El material comprende a 10 cepas pertenecientes a 7 especies ubicadas en 4 géneros (Tabla 3, pag 27). Las descripciones de dichas especies se presentan en la primera sección del capítulo 4 Resultados y discusión.

Con la intención de facilitar la relación de las secciones del presente capítulo y del capítulo 4 Resultados y Discusión, las siguientes secciones se organizaron de acuerdo a la estructura de este último, es decir, los títulos aquí presentados corresponden con los respectivos de las secciones de dicho capítulo.

### **3.2 Aislamiento de las cepas de hongos silvestres**

Se utilizaron dos medios semisólidos de agar cuya preparación se describe a continuación:

Agar agua (A-A): 20 g Agar + 1 l H<sub>2</sub>O y

Extracto de malta agar (EMA): 15 g de extracto de malta + 20 g agar + 1 l H<sub>2</sub>O

Los medios se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 libras x pulg<sup>2</sup> de presión. Los aislamientos se efectuaron colocando trozos muy pequeños del contexto de los cuerpos fructíferos en el centro de las placas de agar. Se utilizó una campana de flujo laminar para reducir los problemas de contaminación. En el caso del género *Morchella* se procedió separando cuidadosamente las dos capas que componen a los cuerpos fructíferos: himenio y adhimenio. Posteriormente, con ayuda de una navaja filosa fría previamente esterilizada a la flama directa, se realizaron pequeños

cortes de la parte recientemente expuesta del himenio y se colocaron en las placas de agar. En el caso de *Morchella conica* una de las cepas obtenidas se aisló a partir de una esporada, el procedimiento utilizado fue el siguiente: se obtuvo una esporada en papel aluminio, se cortó una sección de éste y se sumergió en un frasco pequeño con 5 ml de agua, previamente esterilizado y enfriado, se agitó el trozo de aluminio y se retiró cuando el agua se notaba turbia, se hicieron tres diluciones de este frasco transfiriendo sucesivamente 100 µl a frascos con 4.9 ml de agua, cada transferencia se hizo posteriormente a la agitación del frasco anterior. Se inocularon 50 µl de cada dilución en placas de EMA. Se desecharon las cajas contaminadas. Las que presentaron crecimientos miceliales con características consistentes con las del micelio de *Morchella* (Stamets, 2000) se transfirieron a nuevas cajas de EMA.

### 3.3 Crecimiento micelial de 6 especies en medios de agar

Para la realización de este experimento, en los casos de las especies con las que sólo se contaba con una cepa se eligieron las que presentaron mejor crecimiento en los medios de agar utilizados en la etapa del aislamiento, por lo que no se incluyó a *Morchella conica*. En el caso de las especies *Lyophyllum decastes* y *Clitocybe gibba*, especies de las que se contaba con dos cepas de cada una, se eligió la cepa con crecimiento más vigoroso en la misma etapa.

Medios de cultivo y sus componentes:

- Extracto de malta agar (EMA): 15 g de extracto de malta + 20 g agar + 1 l H<sub>2</sub>O destilada.

- Papa dextrosa levadura agar (PDLA): A 1 l H<sub>2</sub>O destilada en ebullición se agregaron 300 g de papa pelada, el calentamiento a temperatura de ebullición se mantuvo durante 30 min. Se separó la fase líquida de la sólida por filtración y se añadió H<sub>2</sub>O destilada para completar a 1 l por el agua perdida por evaporación. A este extracto se agregaron 20 g de dextrosa, 20 g de agar y 2 g de levadura.

- Agar composta inmadura (A-CompIn): A 1 l de H<sub>2</sub>O destilada se agregaron 15 g de composta inmadura deshidratada, la mezcla se mantuvo en agitación toda una noche, por filtración se separaron las partículas sólidas, se completó el volumen a 1 l con H<sub>2</sub>O destilada y se añadieron 20 g de agar.

- Agar composta avanzada (A-CompAv): A 1 l de H<sub>2</sub>O destilada se agregaron 15 g de composta avanzada deshidratada, la mezcla se mantuvo en agitación toda una noche, por filtración se separaron las partículas sólidas, se completó el volumen a 1 l con H<sub>2</sub>O destilada y se añadieron 20 g de agar.

- Agar humus (A-Humus): A 1 l de H<sub>2</sub>O destilada se añadieron 15 g de tierra negra deshidratada, la mezcla se mantuvo en agitación toda una noche, se completó el volumen a 1 l con H<sub>2</sub>O destilada y se añadieron 20 g de agar.

Los dos primeros medios mencionados en esta sección son medios utilizados comunmente en la producción de micelio, los tres restantes fueron ideados y probados por primera vez en este experimento. Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 30 min., a una temperatura de 121 °C y 15 libras x pulg<sup>2</sup> de presión.

### Procedimiento experimental:

Placas de agar en cajas Petri se inocularon en el centro con bloques de 5 x 5 mm de agar obtenidos de los bordes de colonias previamente desarrolladas, dichos bloques se realizaron con asas de siembra rígidas frías, esterilizadas a la flama directa continuamente. El inóculo fue colocado en el centro de las cajas Petri de incubación con la ayuda de una base de caja Petri vacía que estaba marcada con la posición en la que debía quedar el inóculo, esta base se invertía y se alineaba debajo de cada caja a inocular. Se realizaron 3 réplicas de cada medio de cultivo para cada cepa. Entre las mediciones, las cajas con los diferentes medios correspondientes a cada cepa fueron colocadas en bolsas de plástico alargadas para evitar contaminaciones. Las cajas fueron incubadas a 23 °C. Se realizaron las mediciones en una campana de flujo laminar. Se midió el radio máximo de cada colonia en diez ocasiones durante un periodo de 29 días, los días de medición fueron: 1°, 2°, 3°, 5°, 6°, 8°, 11°, 17°, 19° y 29° contados a partir de la inoculación. También se registraron características morfológicas del micelio; los resultados se presentan en forma de gráficas de crecimiento radial por unidades de tiempo (días), los puntos intermedios entre las mediciones se obtuvieron gráficamente dibujando el intervalo para cada día de medición a partir del promedio del radio de las réplicas  $\pm$  la desviación estándar y uniendo los intervalos de las mediciones subsecuentes con una curva, que es la que se presenta (sección 4.3). Debido a que no todos los registros de los datos se efectuaron en días consecutivos, para evitar interpretaciones incorrectas de las curvas de crecimiento, en cada caso se eliminó el último dato de las mediciones, es decir aquel en el que el micelio ya había alcanzado el radio máximo de la caja Petri.

### 3.4 Evaluación de la producción de esclerocios por especies del género *Morchella*

#### 3.4.1 Producción de esclerocios por *Morchella angusticeps*, *M. conica*, *M. crassipes* y *M. elata*

Medio de cultivo:

Mezcla suelo trigo 1:5: El trigo se coció en agua en ebullición durante 30 minutos aproximadamente. Se preparó una mezcla en proporción 1:5 de tierra negra y trigo cocido. Se colocaron 450 g de la mezcla en frascos de 860 ml de capacidad, se taparon con hule espuma y aluminio y se esterizaron en autoclave durante 1:30 hrs. a 121 °C y 15 Libras x pulg<sup>2</sup> de presión. Posteriormente al enfriamiento del medio, se inoculó cada frasco con un disco de agar con el micelio del hongo deseado, dichos discos se obtuvieron presionando, a manera de sacabocados, la placa de agar con la boca de tubos de 2.5 cm de diámetro previamente esterilizados. Se agregaron 60 ml de H<sub>2</sub>O a los frascos en la primera y segunda semana posteriores a la inoculación. Se realizaron 4 replicas por cepa.

Procedimiento experimental:

Los frascos fueron colocados en cajas de cartón e incubados a 23 °C, se hicieron observaciones entre las hidrataciones del sustrato. Se registró la abundancia de esclerocios a la 11<sup>a</sup> semana en términos semicuantitativos de acuerdo a cuatro categorías: ningún esclerocio, pocos esclerocios, abundancia media y esclerocios abundantes.

### 3.4.2 Formación de esclerocios de *Morchella elata* en medio EMA con suplementos

#### Medios de cultivo:

El medio EMA fue preparado de manera independiente con varios suplementos no convencionales, es decir, no encontrados en métodos comunes para el cultivo de hongos: 5 extractos, una mezcla de ellos y pastillas comerciales de vitaminas y minerales maceradas. Los 5 extractos fueron hechos a partir de: trigo y sorgo crudos; basura orgánica doméstica deshidratada (que incluía cáscaras de aguacate, naranja, limón, papaya y plátano, así como restos de pan, tortilla, masa de tamal, hoja de maíz, cascara de huevo, cebolla, semillas de aguacate y ramas de racimos de uvas); aserrín de encino; aserrín de encino prehidratado y extracto vegetal (ver sección 3.5.2). De cada ingrediente o grupo de ingredientes 200 g fueron licuados en 1 l de H<sub>2</sub>O destilada, se separaron las fases líquidas de las sólidas por filtración, estas últimas se desecharon en todos los casos y a las primeras se les adicionaron los componentes habituales del EMA en las proporciones normales utilizadas en todos los experimentos en los que se empleó este medio (secciones 3.1 y 3.2). El medio que fue preparado mezclando los extractos se obtuvo combinando 100 ml de cada uno de los extractos anteriormente descritos y adicionando los componentes habituales del EMA proporcionalmente al volumen. El medio EMA con vitaminas y minerales se preparó de la siguiente manera: se maceraron 5 comprimidos de un producto vitamínico, cuyo nombre comercial es Centrum, en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se mezcló el macerado con 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se agregaron los componentes habituales del EMA.

Procedimiento experimental:

Se inocularon las placas de los medios con discos de agar obtenidos a partir de placas previamente invadidas por la cepa de *Morchella elata*, los discos se obtuvieron presionando directamente, a manera de sacabocados, dichas placas con la boca de tubos de 1.5 cm de diámetro previamente esterilizados y enfriados. Para facilitar la colocación central del inóculo se utilizó una base de caja Petri invertida marcada en el centro, en cada inoculación dicha base se alineaba invertida debajo de la caja a inocular. Se compararon dos condiciones de incubación del cultivo: por un lado, iluminación diurna natural y temperatura ambiente oscilante; y por otro, oscuridad y temperatura constante a 23 °C. Se realizaron dos réplicas para cada medio en cada condición de incubación. Se evaluó la abundancia de esclerocios a la tercera semana de acuerdo a cuatro categorías semicuantitativas: ningún esclerocio (0), pocos esclerocios (1), abundancia media (2) y esclerocios abundantes (3).

### **3.5 Producción de inóculo**

#### **3.5.1 Invasión de granos de cereal por *Morchella crassipes*, *M. elata* y por *Sparassis crispa***

Medios de cultivo:

Se describirá la preparación de estos sustratos de sorgo y trigo utilizando el caso del sorgo, ya que el procedimiento fue el mismo en el caso de ambos granos exceptuando la parte de la preparación en la que se añadió el doble de la concentración de sales, que se realizó únicamente en el caso del sorgo. Se coció el grano aproximadamente durante 30 min en

agua previamente en ebullición, se enfrió con agua corriente y se permitió que escurriera el agua atrapada entre los granos, posteriormente se pesó el grano cocido, se adicionaron las sales de acuerdo al peso en la siguiente proporción:  $\text{Ca}_2\text{SO}_4$  1.3% y  $\text{CaCO}_3$  0.3%, para la preparación del sustrato con doble contenido de sales se adicionaron 2.6 % de  $\text{Ca}_2\text{SO}_4$  y 0.6 % de  $\text{CaCO}_3$ . Se prepararon tubos de 2.5 cm de diámetro por 20 cm de largo colocando 35 g de cada mezcla. Los tubos fueron tapados con hule espuma y aluminio y se esterilizaron durante 30 min a 121 °C y 15 libras x pulg<sup>2</sup> de presión. Los tubos fueron inoculados con discos de agar previamente colonizado, que se obtuvieron presionando las placas de agar, a manera de sacabocados, con la boca de tubos de 1.5 cm de diámetro previamente esterilizados y enfriados. Los tubos fueron incubados a 23 °C. Se realizaron cuatro réplicas de cada sustrato.

#### Procedimiento experimental:

Se revisaron periódicamente los tubos y se registró el día en que fueron totalmente invadidos por la cepa en cuestión, los datos se presentan como el promedio de los días de la invasión total del sustrato  $\pm$  la desviación estándar.

#### 3.5.2 Producción de biomasa de *Morchella elata* en medios líquidos de extracto vegetal

##### Medios de cultivo:

Extracto vegetal: Este medio se preparó licuando y filtrando 400 g de ramas y hojas de *Schinus molle* (pirul) y de *Cupressus* sp. (ciprés) en 1 l de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. La fase sólida se desechó y la líquida se esterilizó en autoclave durante 30 min a 121 °C y 15 libras x pulg<sup>2</sup> de presión.

Extracto vegetal + extracto de malta: Este medio se preparó utilizando el extracto vegetal anteriormente descrito, al cual se le agregaron 15 g de extracto de malta / 1 H<sub>2</sub>O antes de la esterilización.

#### Procedimiento experimental:

Se colocaron en un vaso homogeneizador 50 ml de agua estéril previamente enfriada y una placa de agar previamente invadida por *Morchella elata*. La homogeneización se realizó durante intervalos de tiempo subsecuentes y acumulados de 20, 40, 60 y 80 segundos, en cada tiempo se obtuvieron cuatro alícuotas del homogeneizado y se inocularon dos matraces de 150 ml con 50 ml de cada medio, es decir 4 en total. Posteriormente los matraces se incubaron en agitación a 23 °C durante dos semanas, se separó el micelio del medio por filtración, se pesó el micelio hidratado y finalmente se deshidrató para obtener la biomasa seca.

#### 3.5.3 Efecto de la homogeneización del micelio en el crecimiento de *Lyophyllum decastes* en medios líquidos

##### Medios de Cultivo:

Medio Peptona glucosa: Los componentes de este medio y sus proporciones fueron: 2 g de peptona + 2 g de glucosa anhidra + 50 mg agar /100 ml H<sub>2</sub>O.

Extracto de malta (EM): Los componentes y las proporciones de este medio son las anteriormente descritas para el medio extracto de malta agar (EMA) exceptuando el agar (secciones 3.1 y 3.2).

#### Procedimiento experimental:

Se realizó la homogeneización del micelio colocando en un vaso homogeneizador 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril previamente enfriada y una placa de agar colonizada por la especie *Lyophyllum decastes*. La homogeneización se hizo en intervalos subsecuentes y acumulados de 30, 45, 60, 75 y 90 segundos, después de cada intervalo se obtuvieron alícuotas de 50 µl que se distribuyeron en seis matraces de 120 ml con 50 ml de cada medio (dos réplicas por medio). Los matraces fueron incubados a 23 °C. Cuatro de ellos en agitación, dos de cada medio, y dos sin agitación correspondientes al medio EM. Se verificó el crecimiento del micelio a la segunda semana de incubación utilizando dos categorías: con crecimiento y sin crecimiento.

## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Descripción de las especies aisladas

*Clitocybe gibba* (Pers.: Fr) Kumm.

Cuerpo fructífero de mediano a grande 3-10 cm de alto, al inicio convexo, posteriormente aplanado y finalmente deprimido profundamente, mamiforme al centro, color crema, paja, beige pálido o cuero. Margen al inicio enrollado y posteriormente incurvado; contexto delgado, de color blanco, sabor dulce; especímenes maduros higrófanos. Consistencia ligeramente elástica o subcorrea. Láminas decurrentes, aserradas, blancas o pálidas. Estípíte 4-10 cm de largo x 0.5-1.2 cm de ancho, concolor al píleo; sólido, algunas veces algo excéntrico y ensanchado en la base, glabro o fibriloso, en ocasiones estriado. Esporas: blancas, 5-8 x 3-5  $\mu\text{m}$ , ovovales o lacrimiformes. Presente en bosques de coníferas.

*Lyophyllum decastes* (Fr.: Fr) Sing.

Píleo de 2-10 cm de diámetro, liso, de convexo a plano, algunas veces deprimido; color café grisáceo claro, café amarillento claro, grisáceo, amarillento o blanquecino-paja. Láminas adheridas al pie o un poco continuadas hacia este; blancas, blanquecinas o amarillentas, base carnosa prominente de la cual emergen los cuerpos fructíferos formando un conglomerado. Estípíte: 5-10 cm de largo x 0.6-1.5 cm de ancho, color blanco o amarillento, a veces es excéntrico. Esporas: blancas, 5-7  $\mu\text{m}$ , globulares o elipsoides, lisas, no amiloides. Crece en el suelo en bosques de encinos y pinos.

*Morchella angusticeps* Peck.

Cuerpo fructífero semejante a un panal, 5-10 cm de alto x 1-3 cm de ancho, hueco. Presenta costillas con bordes negros que separan a alveolos de formas cuadradas o rectangulares dispuestos en filas verticales. Estípite: 2-8 cm de alto x 2-6 cm de ancho. Color blanco, con textura granular, 5-12 cm de largo x 2.4 cm de ancho. Fuertemente surcado o lacunoso, furfuráceo o glabro. Esporas amarillentas, elipsoides, 18-25 x 11-15  $\mu\text{m}$ , lisas.

*Morchella conica* Pers.:Fr.

Cuerpo fructífero delgado y alargado, 3-8 cm de alto x 2-3 cm de ancho, hueco, oval u obtusamente cónico, costillas longitudinales relativamente paralelas, color gris pardo o negruzco pardo, usualmente formando líneas subparalelas, las costillas horizontales son cortas, color café negruzco. Estípite: 2-4 cm de largo x 1-1.5 cm de ancho, blanquecino después amarillento pardusco, forma cilíndrica. Esporas amarillentas, 20-24 x 12-14  $\mu\text{m}$  elípticas. En áreas abiertas de bosques de coníferas.

*Morchella crassipes* Peck.

Cuerpo fructífero largo y ancho, 7-15 cm de alto x 7-10 cm de ancho, hueco, ovoide o campanulado, algunas veces puntiagudo con depresiones angulares profundas e irregulares café oliváceas, costillas amplias color café oscuro. Estípite: 10-11 cm de alto x 5-6 cm de ancho. La parte inferior engrosada con pliegues profundos longitudinales color crema. Esporas de 20-22 x 12-14  $\mu\text{m}$ , elipsoides, lisas. Este hongo ha sido encontrado en suelos enriquecidos.

*Morchella elata* Bull.: Fr.

Cuerpo fructífero mayor a 8 cm de alto, hueco, obtusamente cónico, costillas profundas más o menos paralelas, delgadas y mal definidas, raramente bifurcadas o anastomosadas, costillas transversales delgadas, mas cortas que las principales, color café amarillento pálido. Estípites más o menos lacunoso, furfuráceo, blanco. Esporas de 19-25 x 14-15  $\mu\text{m}$ , elípticas, lisas. En bosques de coníferas y encinos.

*Sparassis crispa* (Wulf.: Fr.) Fr.

Cuerpo fructífero de 10 a 30 cm de alto, caroso, como un conglomerado redondeado de muchos lóbulos anastomosados de forma petaloide con márgenes delgados ondulantes, color crema a amarillo pálido, frecuentemente emergiendo desde las raíces de alguna planta perenne, pseudoesclerocio subterráneo alargado. Hifas irregularmente infladas, la mayoría con fibulas. Esporas de 5-7 x 3-5  $\mu\text{m}$ , elipsoides, hialinas, negativas al reactivo de Melzer.

#### 4.2 Aislamiento de las cepas de hongos silvestres

En total se aislaron 10 cepas pertenecientes a 4 géneros (Tabla 3). *Morchella angusticeps* y *Morchella conica* no están registradas en el listado de hongos saprobios, pero fueron incluidas en el estudio para ampliar la información acerca del género. La totalidad de las cepas aisladas, excepto una, se obtuvo a partir del material adquirido en los tres mercados mencionados en la sección 3.1.1; la excepción fue la cepa de *Sparassis crispa* que se obtuvo a partir de material que llegó por donación al laboratorio de Micología del Instituto

Tabla 3. Aislamiento de cepas silvestres de hongos comestibles procedentes<sup>2</sup> del Estado de México

Especie	Obtención		Aislamiento	
	Lugar	Procedencia	Fecha	Medio*
<i>Clitocybe gibba</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	26/10/02	EMA
<i>Clitocybe gibba</i>	M. Jamaica	Rio Frio E. Méx	29/10/02	EMA
<i>Lyophyllum decastes</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	19/10/02	EMA
<i>Lyophyllum decastes</i>	M. Jamaica	Rio Frio E. Méx	28/10/02	EMA
<i>Morchella angusticeps</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	18/10/02	A-A
<i>Morchella conica</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	17/10/02	A-A
<i>Morchella conica</i> <sup>1</sup>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	23/10/02	EMA
<i>Morchella crassipes</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	17/10/02	A-A
<i>Morchella elata</i>	M. Santiago T	San. Tia. E. Méx	18/10/02	A-A
<i>Sparassis crispa</i> <sup>2</sup>	I. Biol. (UNAM)	Morelos	12/10/02	EMA

\* Medios. EMA (extracto de malta agar), A-A (agar agua)

<sup>1</sup> Aislamiento a partir de esporas

<sup>2</sup> Sólo en este caso la cepa aislada no es originaria del Edo. Méx.

de Biología, UNAM. Dicha cepa también es la única que procede de una localidad no perteneciente al estado de México.

En términos generales el estado del material biológico (grado de pureza-contaminación) determinó la posibilidad de efectuar los aislamientos. En el presente trabajo los dos medios utilizados para realizar los aislamientos fueron útiles, aunque por la presencia de contaminantes en numerosos ensayos de aislamiento se recomienda utilizarlos adicionándolos con algunos antibióticos como es practicado por algunos autores (Pinzón-Picaseño *et al.*, 1982). Para los casos de otros hongos se considera que probablemente sea importante la composición del medio y quizás las condiciones de incubación del micelio en el proceso de aislamiento.

Una manera de verificar si efectivamente se aislaron las especies determinadas taxonómicamente, fue revisar si las características cualitativas del micelio de estos hongos correspondían con las características reportadas (Stamets, 2000), esto ocurrió en los casos de las cepas del género *Morchella* y en la de la especie *Sparassis crispa*. En el primer caso se trataba de un micelio blanquecino que se expandía rápidamente en el medio EMA y que después de algunos días de invadir completamente las placas de agar formaba esclerocios que inicialmente presentaban la misma coloración que el micelio en expansión, finalmente tomaban una coloración café; el medio también tomaba una coloración café. En el segundo caso, el micelio presentaba una coloración gris-blanquecina y formaba pseudo-fructificaciones algodonosas distribuidas aleatoriamente en el medio. En los caso de las cepas de las especies *Clitocybe gibba* y *Lyophyllum decastes* no se encontraron descripciones como las mencionadas en líneas anteriores pero al ser aisladas dos cepas de

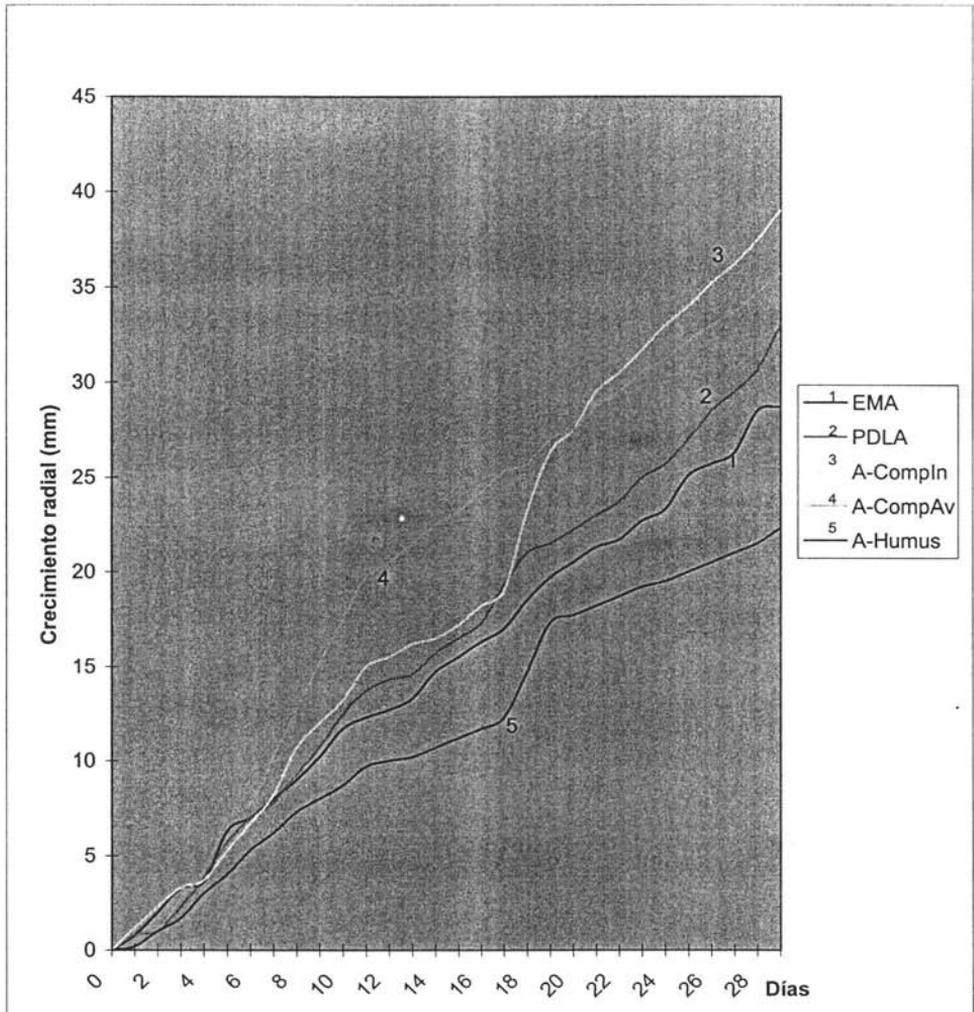
cada especie, se pudieron comparar entre sí, lo que permitió comprobar que fueran consistentes las características microscópicas de ambas cepas para cada especie.

#### 4.3 Crecimiento micelial de 6 especies en medios de agar

Una vez obtenidas las cepas, se realizó un primer experimento para determinar algunas características de su crecimiento vegetativo en diferentes medios, como crecimiento radial de la colonia, tipo de micelio y eventualmente en el caso del género *Morchella*, la formación de esclerocios. Se inocularon seis de las cepas aisladas en 5 medios diferentes de fácil obtención y se midió el radio de la colonia en diez ocasiones durante 29 días. En el caso de algunas especies el experimento no tuvo una duración mayor a 8 días por la rapidez con la que fueron colonizadas las placas de agar. También se registraron características cualitativas del micelio en crecimiento. Dos de los medios utilizados son ricos en nutrimentos: extracto de malta agar (EMA) y papa dextrosa levadura agar (PDLA), estos, son utilizados ampliamente en la propagación de micelio. Contrariamente, los tres medios restantes son pobres en nutrimentos: agar extracto de composta inmadura (A-CompIn), agar extracto de composta avanzada (A-CompAv) y agar extracto de humus (A-Humus) y fueron ideados y probados por primera vez en este experimento. Los resultados (Figuras 1-6) se presentan en forma de gráficas de crecimiento radial de las colonias en función del tiempo. Estas gráficas están acompañadas de características cualitativas del crecimiento micelial en cada medio.

En la figura 1 se observa el crecimiento radial de la cepa 26/10 de *Clitocybe gibba* en los 5 medios. En general, el crecimiento es similar al principio y diverge gradualmente con el

Figura 1.  
Crecimiento micelial de *Clitocybe gibba* en 5 medios

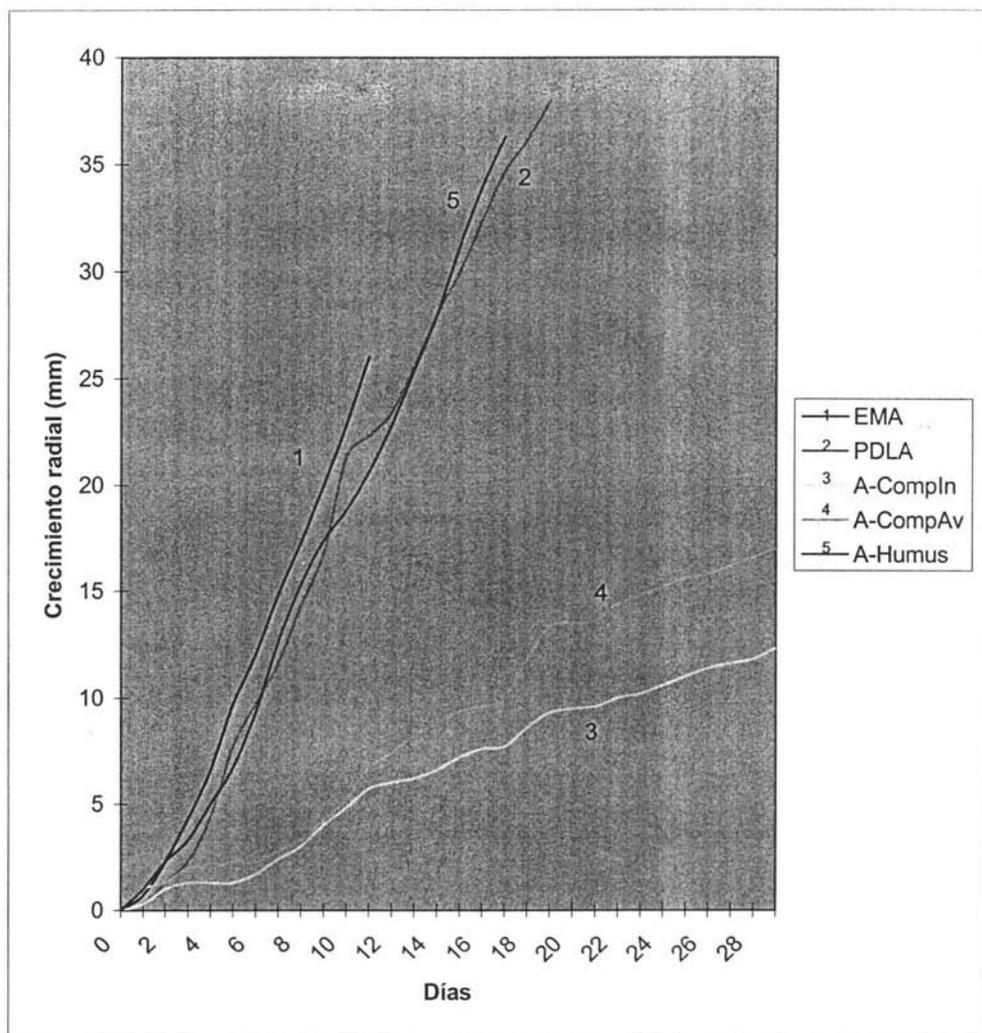


Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de cultivo				
	EMA	PDLA	A-Compln	A-CompAv	A-Humus
Color	Blanco	Amarillo	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escaso	Escaso	Escaso
Tipo	Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (Forma)	Circular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular

tiempo en todos los medios; las mediciones obtenidas para los medios más ricos en nutrientes, EMA y PDLA ocupan sitios intermedios. En dos de los medios considerados pobres en cuanto a la cantidad de nutrientes, A-CompIn y A-CompAv, la mayoría de las mediciones del crecimiento son mayores en comparación con el resto de los medios; en el medio restante, A-Humus, también considerado pobre en nutrientes, se obtuvieron las menores mediciones. Las características del micelio en los medios pobres diferían notablemente de las características observadas en los medios ricos, se trataba de un micelio escaso y de crecimiento irregular; las colonias más vigorosas se presentaron en los medios ricos, como lo indican las características cualitativas de la figura 1.

En el caso de la cepa 19/10 de *Lyophyllum decastes* (figura 2), se notan dos tendencias de crecimiento radial, una, de mayor crecimiento, en los medios EMA, PDLA y A-Humus; y otra de menor crecimiento en los medios, A-CompIn y A-CompAv. Una vez más el crecimiento radial rápido en medios pobres, en este caso en el medio A-Humus, no indica crecimiento micelial vigoroso (ver características cualitativas del crecimiento de la columna A-Humus). Resulta curioso que sean tan similares las curvas entre dos medios contrastantes, por un lado PDLA un medio rico en nutrientes y por otro A-Humus, un medio pobre. Con los elementos que aporta este experimento es difícil explicar esta respuesta, podría tratarse de una coincidencia de los valores de crecimiento por un lado en un medio en el que el crecimiento radial es alto por la presencia de nutrientes utilizados por el hongo y por otro lado un crecimiento radial rápido ocasionado por la dominancia apical típica de algunos medios pobres en la cantidad de carbono disponible, este comportamiento se discute en los párrafos finales de esta sección. Ya que la respuesta en los tres medios pobres no fue la misma es posible también que en el caso del medio A-

Figura 2.  
Crecimiento micelial de *Lyophyllum decastes* en 5 medios



Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de cultivo				
	EMA	PDLA	A-Compln	A-CompAv	A-Humus
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escaso	Escaso	Escaso
Tipo	Inmerso	Inmerso y aéreo	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (forma)	Circular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular

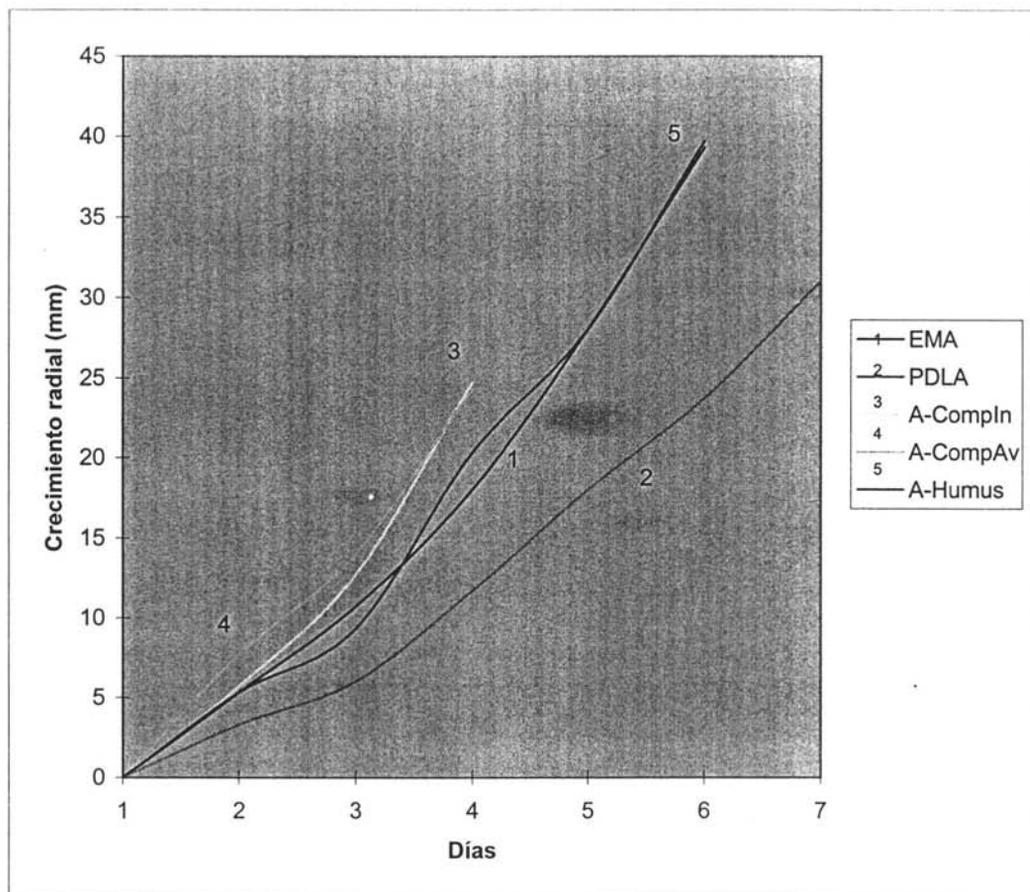
Humus actúe alguna capacidad de este hongo a responder de manera estimulada a la presencia de algún componente del humus, esto podría comprobarse al revisar el crecimiento de la misma cepa en medios tanto pobres como moderados y ricos en la cantidad de nutrimentos pero adicionados en una primera serie con la misma cantidad de extracto de humus y en series subsecuentes con distintas cantidades de extracto de humus, cada serie con sus respectivos controles en los que no se complemente el medio con extracto de humus.

La figura 3 muestra el crecimiento radial de la cepa de *Morchella angusticeps*, en este caso en todos los medios se presentó un crecimiento rápido y algo similar excepto en el medio PDLA. En este medio el crecimiento radial fue menor en todos los puntos con respecto a los otros pero el desarrollo micelial presentó mejores características, y más aun en lo referente a la producción de esclerocios (ver sección inferior de la figura 3). Sólo en este medio y en EMA se formaron esclerocios.

En la cepa de *Morchella crassipes* (figura 4) no se presentaron diferencias notables en las curvas de crecimiento en los diferentes medios, pero se destaca que en todos los medios el crecimiento radial fue muy rápido y solo en los medios ricos se presentaron características cualitativas de crecimiento vigoroso, en particular la densidad del micelio fue mayor en estos medios y nuevamente son los únicos en los que se formaron esclerocios.

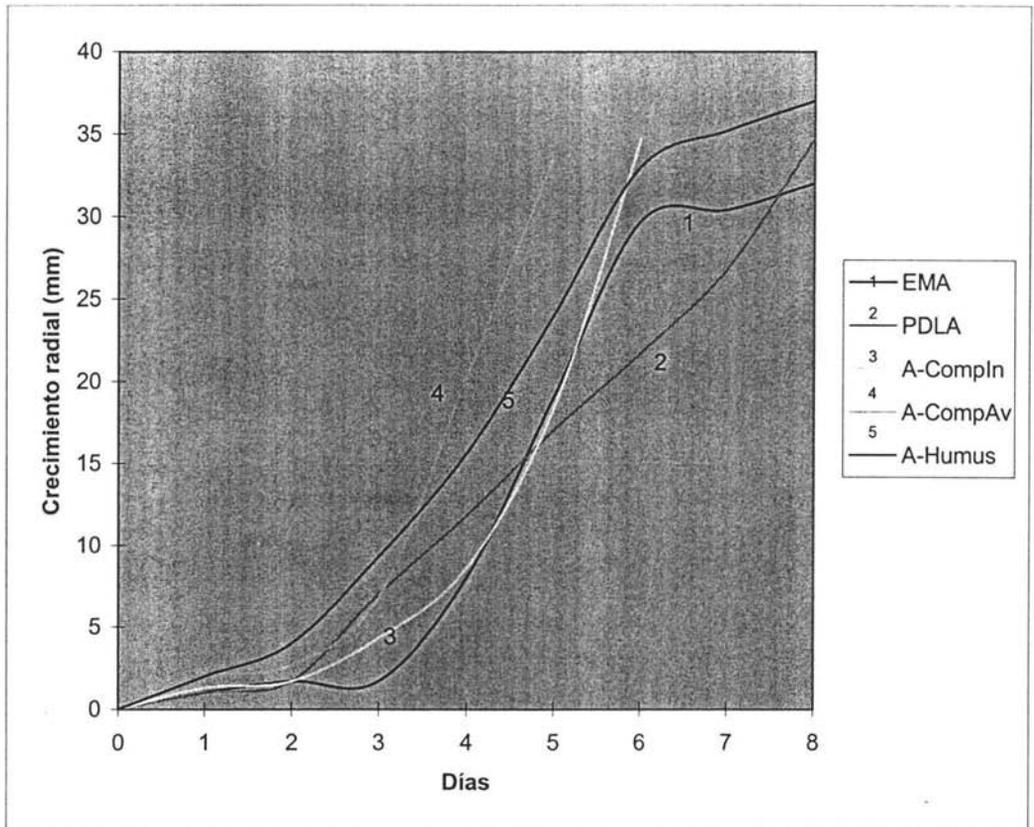
La figura 5 presenta el crecimiento de la cepa de *Morchella elata*, en este caso se observa un comportamiento estrechamente similar al de *Morchella angusticeps*, es decir, se presentan crecimientos radiales rápidos en todos los medios, el menor en el medio PDLA

Figura 3.  
Crecimiento micelial de *Morchella angusticeps* en 5 medios



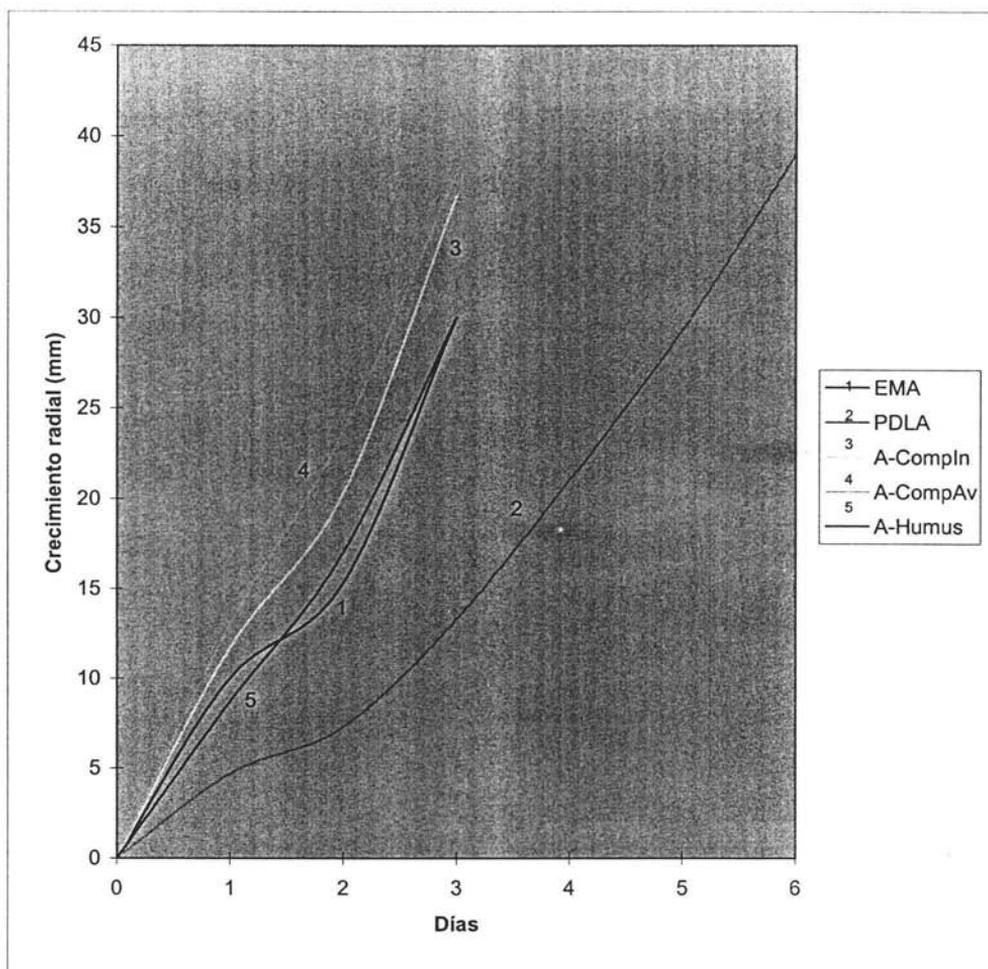
Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de cultivo				
	EMA	PDLA	A-CompIn	A-CompAv	A-Humus
Color	Amarillo claro	Amarillo claro	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escaso	Escaso	Escaso
Tipo	Inmerso	Aéreo, Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (forma)	Circular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular
Microesclerocios					
Color	Café oscuro	Café oscuro			
Distribución	Anular, dispersos	Anular, agregados			
Área cubierta %	<6	>6	-	-	-
Tamaño	<1mm - 1mm	<1mm			

Figura 4.  
Crecimiento micelial de *Morchella crassipes* en 5 medios



Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de cultivo				
	EMA	PDLA	A-Compln	A-CompAv	A-Humus
Color	Amarillo claro	Amarillo claro	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escaso	Escaso	Escaso
Tipo	Inmerso	Aéreo, Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (forma)	Circular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular
Microesclerocios					
Color	Café obscuro	Café obscuro	-	-	-
Distribución	Anular, dispersos	Anular, agregados	-	-	-
Área cubierta %	<6	>6	-	-	-
Tamaño	<1mm - 1mm	<1mm	-	-	-

Figura 5.  
Crecimiento micelial de *Morchella elata* en 5 medios

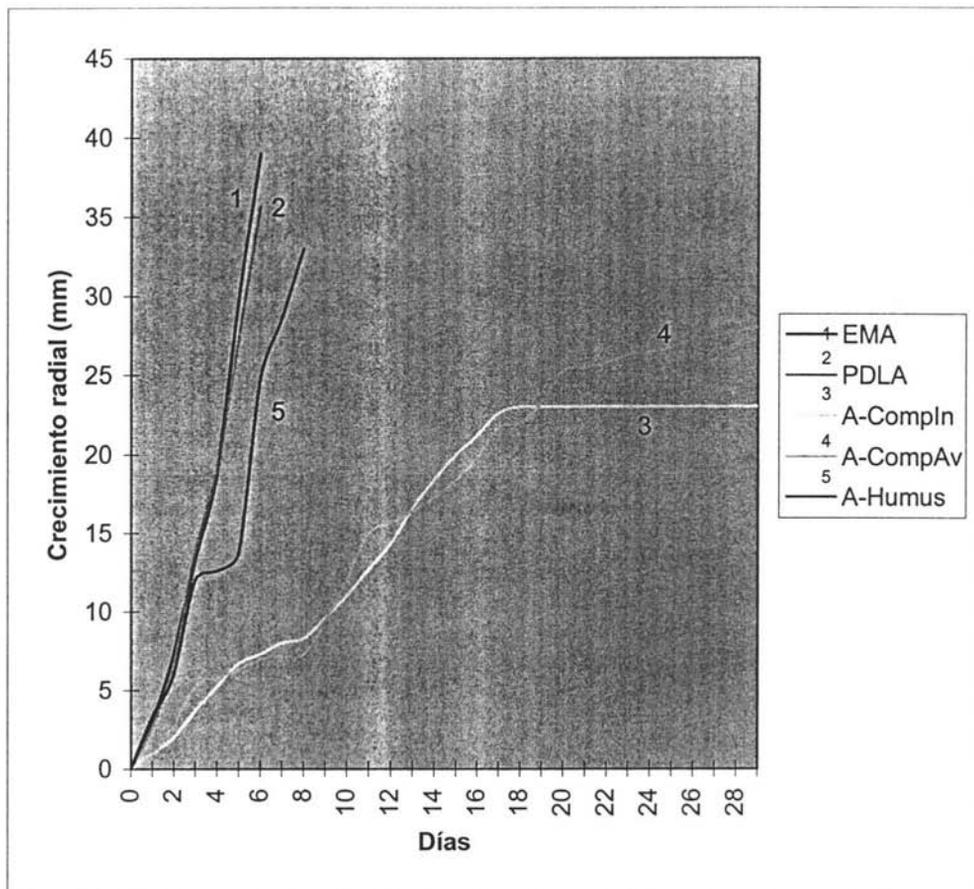


Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de cultivo				
	EMA	PDLA	A-CompIn	A-CompAv	A-Humus
Color	Amarillo	Amarillo	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escaso	Escaso	Escaso
Tipo	Aéreo e Inmerso	Aéreo e Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (forma)	Iregular	Iregular	Iregular	Iregular	Iregular
Microesclerocios					
Color	Café claro	Café			
Distribución	irregular, dispersos	irregular, agregados			
Área cubierta %	<6	>12	-	-	-
Tamaño	<1mm - 3mm	<1mm - 1mm			

pero con las mejores características miceliales, una vez más la abundancia de esclerocios fue mayor en este medio que en EMA, nuevamente únicos medios en los que se presentaron estas estructuras; se presenta crecimiento mayor en dos de los medios pobres aunado a características no vigorosas del micelio y las curvas de dos medios contrastantes son muy similares, siendo los mismos medios en ambas cepas, es decir EMA y A-Humus.

En el caso de la cepa de *Sparassis crispa* (figura 6), se notan dos tipos de crecimiento, uno lento en los medios A-CompIn y A-CompAv y otro notablemente rápido en los tres medios restantes. Nuevamente, el crecimiento en A-Humus es rápido pero el micelio no presenta la misma exuberancia que en EMA y PDLA. En el medio A-CompIn se presenta el único caso, para todas las cepas y medios probados, en el que el crecimiento se detiene y la curva toma una pendiente horizontal, esto significa que este tipo de experimentos aportarían mayor información si fueran planeados dispositivos de cultivo para tiempos de crecimiento largos (esto implicaría algunas complicaciones técnicas). En el presente caso el límite de crecimiento observable en el radio de la colonia estaba dado por las paredes de las cajas Petri, es decir, 40 mm. Por lo que la duración máxima del experimento estuvo limitada sólo a 4 semanas. Con dispositivos que permitieran crecimientos mayores, no solamente radiales, sino volumétricos, este tipo de experimentos podrían ser de gran utilidad en estudios del crecimiento vegetativo micelial y darían posibilidad de obtener datos probablemente importantes para el conocimiento de las características del crecimiento de hongos en distintos medios, tanto de hongos de los que ya se conocen aspectos fundamentales de su fructificación como de hongos cuyos aspectos estén por conocerse. Sin embargo, como es notable en los párrafos anteriores de esta sección, a partir de este experimento fue posible determinar algunas características del crecimiento de las cepas

Figura 6.  
Crecimiento micelial de *Sparassis crispa* en 5 medios



Características del micelio de las colonias desarrolladas					
Características	Medios de Cultivo				
	EMA	PDLA	A-Compln	A-CompAv	A-Humus
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Abundancia	Denso	Denso	Escasa	Escasa	Escasa
Tipo	Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso	Inmerso
Colonia (forma)	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular

elegidas en los cinco medios utilizados. Con este tipo de análisis, se pueden realizar clasificaciones objetivas de medios de acuerdo al comportamiento de los hongos en ellos, lo que aporta información referente a sustratos en los que el crecimiento micelial es mejor, en términos cuantitativos y cualitativos.

Las gráficas de crecimiento radial obtenidas con estos experimentos coinciden con las obtenidas por algunos autores (Cochrane, 1958 y Griffin, 1994) en ellas se encuentran distintas fases de curvas de crecimiento sigmoideal en las que el micelio al estar establecido en un medio presenta una tendencia natural de crecimiento radial caracterizada por un crecimiento lineal, que al considerar el crecimiento total de la biomasa resulta un tipo de crecimiento volumétrico exponencial. Durante la primera fase no se encuentra un crecimiento observable en términos cuantitativos, en el presente caso, al considerar todas las cepas utilizadas y todos los medios, esta fase tuvo distintas duraciones, desde algunas horas hasta dos días, el nombre que recibe dicha fase es el de fase retardada. Como lo sugieren algunos experimentos de fragmentación del micelio, esta fase requiere de algún tiempo para la preparación de la expansión de las hifas (Cochrane, 1958; Robinson, 1978 y Griffin, 1994). La siguiente es la fase exponencial, en esta la tasa de crecimiento se ve acelerada (las pendientes de los puntos en ella tienden a la verticalidad), dicha fase tuvo una duración breve en la mayoría de los casos pero se presentó muy marcadamente en la cepa de la especie *Morchella crassipes* en todos los medios, en esta fase se considera que la presencia de nuevas ramificaciones es crítica en la aceleración del crecimiento por el aumento de ramificaciones y por la obtención de nutrientes del medio a partir de ellas hasta que se consigue la tasa máxima de crecimiento (Griffin, 1994), después de esta fase el crecimiento radial continúa pero haciéndolo de manera lineal, esta fase es la que domina en

la mayoría de las gráficas y corresponde con la fase en la que el micelio se ha establecido en el medio (Cochrane, 1958 y Griffin, 1994), a esta le sigue una fase de decaimiento del crecimiento (las pendientes de las curvas tienden a la horizontalidad); esta fase se observa solo en algunos casos; en particular en el de la cepa de *Morchella crassipes* en los medios A-Humus y EMA y en el caso de la cepa de *Sparassis crispa* en los medios A-CompIn y A-CompAv, esta fase corresponde con el agotamiento de algún nutriente limitante o con la acumulación de productos de desecho (Griffin, 1994), finalmente el crecimiento termina cuando la curva de crecimiento es totalmente horizontal, es decir la pendiente de la curva en esta fase es igual a cero, por lo que el crecimiento se detiene, esto ocurrió, como se ha mencionado en párrafos anteriores, solo en la cepa de *Sparassis crispa* en el medio A-CompIn, ésta es considerada como la fase de muerte (Cochrane, 1958 y Griffin, 1994).

La mayor rapidez del crecimiento micelial en medios pobres, tendencia presente en cuatro de las seis cepas probadas, es interpretada como respuesta a un estrés relacionado con déficit de nutrientes. El micelio se expande sobre estos sustratos principalmente de manera longitudinal-radial, sin ramificarse como normalmente lo hace o si se ramifica de manera normal (no se realizaron análisis de los patrones de ramificación en los diferentes medios) el crecimiento de las ramificaciones se ve disminuido al compararlo con el respectivo de las hifas principales, lo que resulta en modificaciones de la morfología normal de la colonia. Aunque Robinson (1978) considera que este tipo de expansión rápida del micelio en medios con fuente de carbono limitada es una ventaja de los hongos en ambientes naturales porque incluso los medios pobres en nutrientes son colonizados rápidamente, el autor de este trabajo considera que es un tipo de estrategia de crecimiento, seleccionada naturalmente, en la que se emplea menos energía en términos de la

acumulación de materia, además de ser la manera más eficaz de encontrar otro sustrato o de salir de uno desfavorable, sin considerar efectos quimiotrópicos de sustratos próximos. Este tipo de dominancia apical del crecimiento relacionada con la disponibilidad de nutrimentos ha sido documentada con anterioridad (Robinson, 1978 y Griffin, 1994). Lo que se esperaría si el crecimiento continuara en el tiempo, es que en todos los medios pobres el micelio llegaría a una longitud máxima determinada por la cantidad de energía presente en el inóculo ya que por tratarse de un sustrato pobre, el micelio se expande sobre éste rápidamente utilizando sólo la energía disponible en el inóculo y en el mismo micelio, prácticamente sin obtener nada del sustrato.

El fenómeno de dominancia apical del micelio en medios pobres, indica que la velocidad de crecimiento radial por si misma no es un buen elemento para determinar el aprovechamiento de un sustrato por los hongos y que probablemente los medios mejor utilizados por estos organismos son aquellos en los que se presenta un crecimiento lento o moderado pero con características miceliales más vigorosas. En estudios posteriores sería muy interesante evaluar la respuesta del crecimiento micelial radial de distintos hongos en medios completos o en extractos de ellos en los que se haya comprobado su fructificación, esto mostraría características de sus comportamientos en dichos medios y probablemente podrían extrapolarse dichas respuestas al compararlas con las de hongos de los que se desconoce el tipo de sustrato en el que fructifican. Lo anterior, aunado al análisis de las características ecológicas de los sitios en los que fructifican, podría ser una estrategia útil para la investigación del proceso de fructificación de hongos que no se han logrado cultivar.

#### 4.4 Evaluación de la producción de esclerocios por especies del género *Morchella*

En dos de las técnicas exitosas propuestas para el cultivo de *Morchella* (Stamets, 2000), la parte fundamental es la producción de esclerocios. Por este motivo se realizaron dos experimentos que aportan información acerca de la producción de estas estructuras por especies de este género.

##### 4.4.1 Producción de esclerocios por *Morchella angusticeps*, *M. conica*, *M. crassipes* y *M. elata*

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar cual de las cepas aisladas presentaba mayor producción de esclerocios. Lo anterior se hizo evaluando semicuantitativamente la abundancia de esclerocios de todas las cepas del género *Morchella* en un mismo medio de cultivo que consistió en una mezcla suelo-trigo en proporción 1:5, se empleó este medio ya que se ha comprobado su utilidad en la producción de esclerocios del género *Morchella* (Stamets, 2000). Las cepas que presentaron mayor abundancia de esclerocios fueron la de *Morchella crassipes* y la de *Morchella elata* (tabla 4). La cepa de *Morchella conica* obtenida a partir del cuerpo fructífero, no presentó ningún esclerocio; la cepa de esta misma especie que fue aislada a partir de esporas formó esclerocios con una abundancia media y la cepa de *Morchella angusticeps* formó muy pocos. Este experimento muestra variaciones interespecíficas e intraespecíficas en la producción de esclerocios en el género *Morchella* en las condiciones utilizadas (ver sección 3.3.1 en material y métodos), lo que indica que existen diferencias fisiológicas claras entre las especies e incluso entre cepas de la misma especie. Dado que los esclerocios están

**Tabla 4. Producción de esclerocios de 4 especies del género *Morchella* después de 11 semanas de incubación en sustrato de suelo-trigo (1:5)**

<b>Especie</b>	<b>Color</b>	<b>Abundancia*</b>
<i>Morchella angusticeps</i>	ocre	1
<i>Morchella conica</i> **	ocre oscuro	2
<i>Morchella conica</i>	-	0
<i>Morchella crassipes</i>	ocre claro	3
<i>Morchella elata</i>	ocre claro	3

\* 0 = sin esclerocios, 1 = pocos, 2 = regular, 3 = abundantes

\*\* Cepa obtenida a partir de esporas

constituidos principalmente de materiales en la forma de compuestos de carbono (Smith y Berry, 1978) es probable que las diferencias observadas estén dadas por distintas cualidades de cada especie o cepa en los procesos de digestión extramicelial, en el transporte de compuestos del sustrato al micelio, en la translocación de moléculas en el micelio e incluso en la dinámica de síntesis y transformación de los componentes miceliales del esclerocio. Para aclarar los procesos fisiológicos que pueden estar ocasionando estas diferencias se requeriría de minuciosas pruebas características de estudios enzimáticos o biomoleculares; sin embargo, otra manera de incrementar el conocimiento de la producción de estas estructuras por especies del género, sería a partir del estudio de una amplia gama de cepas de la misma especie y distintas condiciones de cultivo como se practica ampliamente en estudios de micología aplicada (Hashioka y Arita, 1978; Guinberteau y Oliver, 1991 y Kinuta 1991), lo que permitiría obtener una producción más eficiente de estas estructuras, que, como se ha mencionado son fundamentales en las técnicas de fructificación de estos preciados hongos.

#### 4.4.2 Formación de esclerocios de *Morchella elata* en medio EMA con suplementos

Uno de los datos que aportó el primer experimento (sección 4.3, figuras 3-5) fue que la producción de esclerocios en especies del género *Morchella* es afectada por la composición del medio en el que se desarrolla el micelio. Esto motivó a la realización de un experimento en el que se pudiese comparar la producción de esclerocios en una gama amplia de medios. Se utilizó como medio base extracto de malta agar (EMA) por su comprobada efectividad en la producción de esclerocios, tanto en el presente trabajo (figs. 3-5) como por los datos de Singh y Verma (2000). Se probaron 7 suplementos, 6 preparados a partir de extractos de

materiales fáciles de adquirir por su disponibilidad y por sus precios, 3 de ellos son productos de desecho (basura orgánica doméstica y aserrines), y uno consistió de un producto vitamínico comercial. En este experimento también se determinó la abundancia de esclerocios en los distintos medios comparando dos tratamientos: por un lado iluminación diurna natural y temperatura ambiente oscilante y por otro lado oscuridad y temperatura constante a 23 °C. Se encontraron diferencias entre los medios y entre los tratamientos probados (Tabla 5). Los niveles fueron desde ningún esclerocio hasta esclerocios abundantes. El medio en el que se presentó la mayor abundancia de esclerocios fue el de EMA con el suplemento de vitaminas y minerales. El tratamiento en el que hubo mayor cantidad de esclerocios fue el de iluminación diurna y temperatura ambiente oscilante. En los casos de los medios con extractos de granos de trigo y sorgo y en el de extracto de aserrín prehidratado, no se presentaron diferencias entre las condiciones de incubación probadas, en el resto de los casos sí se presentaron diferencias entre ellas; consistentemente hubo una mayor abundancia de esclerocios cuando la temperatura fue variable y la iluminación diurna natural. Se atribuyen las diferencias principalmente a las variaciones de temperatura ya que, al tratarse de estructuras subterráneas no habría razones para creer que la luz esté afectando en su formación. Esto podría comprobarse de manera sencilla al realizar experimentos en los que se compare de manera independiente el efecto de la temperatura y de la iluminación. En este experimento, al comparar los dos tratamientos de incubación utilizados para cada medio, solo en los medios con extracto vegetal y con vitaminas y minerales se presentaron diferencias de dos niveles semicuantitativos utilizados, de 0 a 2 y de 1 a 3 respectivamente, en el resto de los casos cuando hubo diferencia las hubo sólo con niveles subsiguientes de producción de esclerocios. Es importante destacar la mayor abundancia de esclerocios en el medio EMA con vitaminas y

Tabla 5. Formación de esclerocios de *Morchella elata* en medio EMA suplementado con extractos

Suplementos (Extractos)	Abundancia de esclerocios	
	Temperatura variable, iluminación diurna	23 °C, Oscuridad
Trigo y sorgo	2	2
Basura orgánica doméstica	1	0
Aserrín encino	1	0
Aserrín encino prehidratado	2	2
Extracto vegetal	2	0
Mezcla *	2	1
Vitaminas y Minerales **	3	1

0= ningún esclerocio, 1=pocos, 2=regular, 3=abundantes

Extractos = filtrado del macerado de 200g del componente en 1 l de agua

\* Mezcla de todos los extractos anteriores

\*\* Este medio se preparó con dos capsulas de vitaminas y minerales Centrum

minerales. Como se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos y al inicio de esta sección, todos los medios tenían como componente principal extracto de malta y se añadieron diversos suplementos, sin embargo, el medio en el que la producción de esclerocios fue mayor fue aquél en el que el suplemento estaba dado por pequeñas cantidades de muchas sustancias importantes en bajas concentraciones, lo que sugiere que en alguna medida la producción de estas estructuras resulta mejor no cuando se incorporan más moléculas estructurales de los esclerocios, es decir carbohidratos (Smith y Berry, 1978), como en el caso del extracto de trigo y sorgo, sino cuando se incorporan al medio micronutrientes, esto podría indicar que alguno o algunos de los procesos fisiológicos relacionados con la formación de estas estructuras se ven favorecidos al estar presentes tales sustancias. Dichos procesos podrían ser los relacionados con las actividades digestivas extramiceliales, con el transporte de compuestos del sustrato al micelio, con la translocación de moléculas en el micelio e incluso con la dinámica de síntesis y transformación de los componentes miceliales del esclerocio.

#### **4.5 Producción de inóculo**

Una de las fases fundamentales en el cultivo a gran escala de hongos comestibles es la producción de inóculo, ésta es posible realizarla mediante sustratos semisólidos, líquidos y sólidos. Estos dos últimos tipos de sustratos son los más empleados en la producción industrial de inóculo y fueron los que se utilizaron en los siguientes experimentos.

#### 4.5.1 Invasión de granos de cereal por *Morchella crassipes*, *M. elata* y por *Sparassis crispa*

Para este experimento, la selección de cepas estuvo dada por el buen crecimiento que presentaron las tres cepas en el primer experimento (sección 4.3, figs. 4 - 6). En el proceso de producción de inóculo de distintas especies, utilizando granos, tanto la concentración de sales como el grano son factores que influyen en alguna medida (Stamets, 2000). Por ello, se probó el efecto de distintos sustratos, en los que se variaron estos factores, sobre el tiempo (días) requerido para obtener la invasión total. Se evaluaron trigo y sorgo con la misma concentración de sales y también el doble contenido de sales para el caso del sorgo. Las cepas utilizadas fueron: *Morchella crassipes*, *M. elata* y *Sparassis crispa*. En las cepas de *Morchella crassipes* y *Sparassis crispa* se encontraron diferencias mayores a tres días al comparar los sustratos (Tabla 6). En el caso de *Morchella elata*, comparando el trigo y el sorgo, hubo una invasión más rápida en el trigo; y, de entre las dos concentraciones de sales en sorgo, se requirieron menos días para la invasión en la concentración mayor. En el caso de *Morchella crassipes*, al comparar los dos tipos de grano se presentó mayor velocidad en el trigo, como en el caso anterior. Al comparar la rapidez de la invasión del grano de sorgo con dos diferentes concentraciones de sales, se encontró que ésta fue más rápida en la concentración menor. El último caso es el de la cepa de *Sparassis crispa*, con ella la mayor velocidad se obtuvo en sorgo al comparar los dos granos, al comparar las concentraciones, se requirió menos tiempo en la menor concentración. Se realizaron análisis de varianza independientes, uno por especie, para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En los casos de las cepas de *Morchella elata* y *Sparassis crispa* no se encontraron diferencias significativas:  $F_{2/8} < 4.46$   $P < .05\%$  y  $F_{2/9} < 4.26$   $P < .05\%$  respectivamente. En el caso de *Morchella crassipes* sí se encontraron

Tabla 6. Invasión de granos de cereal por *Morchella elata*, *M. crassipes* y por *Sparassis crispa*

Sustrato			Tiempo requerido para la invasión total del sustrato (días)		
			Especies		
grano	Ca <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	<i>Morchella elata</i>	<i>Morchella crassipes</i>	<i>Sparassis crispa</i>
Sorgo	1.3	0.3	12.0 ± 1.7	10.0 ± 0.0	16.0 ± 1.6
	2.6	0.6	10.8 ± 1.0	12.8 ± 1.9	17.0 ± 4.2
Trigo	1.3	0.3	10.3 ± 1.7	9.3 ± 0.5	19.0 ± 1.4

diferencias significativas entre los tratamientos pero se atribuyen a la carencia de homocedasticidad de los datos, es decir, las varianzas de los tratamientos resultaron ser diferentes estadísticamente; el resultado del análisis respectivo es el siguiente:  $F_{2/8} > 4.46$   $P = .05\%$ . Todo lo anterior sugiere que, al utilizar dichas cepas, en términos estadísticos, los sustratos utilizados no presentan las diferencias suficientes para hacer notar distintas respuestas a las variaciones de los factores analizados, en particular la cantidad de sales y el grano. Los análisis estadísticos se realizaron siguiendo los procedimientos reportados en la literatura especializada (Daniel, 1987; Riffenburg, 1993 y Bland, 2000).

#### 4.5.2 Producción de biomasa de *Morchella elata* en medios líquidos de extracto vegetal

La intención de este experimento fue establecer si un medio líquido de fácil elaboración, como el extracto vegetal de *Schinus molle* y *Cupressus* spp., es útil para la producción de inóculo de *Morchella elata* en dos semanas de incubación a 23°C, en agitación y oscuridad. Fue elegida la cepa de *Morchella elata* porque además de ser un buen candidato a cultivo por su aceptación, presentó buen crecimiento en distintos medios probados previamente en diferentes experimentos. Se evaluó la producción de biomasa en extracto vegetal simple y adicionado con extracto de malta. Ya que los medios líquidos suelen ser inoculados con micelio homogeneizado, se intentó probar también el efecto de varios tiempos de homogeneización. Se encontró crecimiento micelial en el extracto vegetal simple pero fue mucho menor al crecimiento en el medio adicionado con extracto de malta (Tabla 7). Los resultados de este experimento coinciden con lo descrito en distintos trabajos (Brock, 1951; Gilbert, 1960; Faris *et al.*, 1996 y Singh y Verma, 2000) en los que se establece que es posible producir el micelio de especies del género *Morchella* en una gama

Tabla 7. Producción de biomasa (mg) de *Morchella elata* en medios líquidos de extracto vegetal

Tiempo de homogeneización (s)	Biomasa (mg)	
	Medios	
	Extracto vegetal	Extracto vegetal + EM
20	1094.0 +- 34.4	3826.0 +- 136.2
40	1055.3 +- 64.3	3835.3 +- 190.2
60	1187.7 +- 68.3	3972.3 +- 40.3
80	910.0 +- 27.2	Sin crecimiento

El Extracto vegetal se preparó moliendo y filtrando 400g de *Schinus molle* y de *Cupressus* spp. (ramas y hojas)

EM = Extracto de malta (15 g/l)

amplia de medios de cultivo, pero se obtiene crecimiento más rápido y más abundante cuando la fuente de carbohidratos está basada en extracto de malta. Las medias entre los tratamientos se compararon por pruebas de *t* independientes para cada tiempo, en todos los casos hubo diferencias significativas. Ya que los datos presentan los mismos grados de libertad para cada tiempo, los resultados del análisis se presentan de manera conjunta:  $t_2 < -4.303$ ,  $P < 0.05$  %. Los valores respectivos del coeficiente *t* para los tiempos son: 20 seg  $t_2 = -27.50$ , 40 seg  $t_2 = -19.58$  y 60 seg  $t_2 = -49.64$ . Aunque no se realizaron análisis para comparar los distintos tiempos de homogeneización de cada tratamiento, se observa que el tiempo de 60 seg de homogeneización del micelio fue el que presentó valores mayores en ambos tratamientos, sin embargo, también se observa que eliminando el cuarto tiempo (80 seg) no se presentaron grandes diferencias entre los tiempos restantes por lo que se considera que, al trabajar con esta cepa, todos ellos son útiles en este tipo de experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron siguiendo los procedimientos reportados en la literatura especializada (Daniel, 1987; Riffenburg, 1993 y Bland, 2000).

#### 4.5.3 Efecto de la homogeneización del micelio en el crecimiento de *Lyophyllum decastes* en medios líquidos

Este experimento se realizó con el objetivo de verificar si la técnica de homogeneización del micelio es útil para producir inóculo de *Lyophyllum decastes* en medios sumergidos: Se eligió la cepa de esta especie porque ya ha sido reportada como una especie susceptible de ser cultivada (Kinuta, 1991). Se probaron diferentes tiempos de homogeneización micelial en tres condiciones diferentes: los medios fueron peptona glucosa (PG) y extracto de malta (EM) en agitación, y EM sin agitación. Sólo fueron viables los homogeneizados realizados

con los tiempos menores, es decir, 30, 45 y 60 segundos; y solo se presentó crecimiento micelial en los medios con agitación (Tabla 8). No hubo ningún crecimiento observable a simple vista en la segunda semana en el resto de los tratamientos. La técnica de homogeneización micelial para la producción de inóculo en medios sumergidos resulta útil en muchos hongos; sin embargo, cada especie, y quizá cada cepa, resiste de manera diferente la homogeneización micelial de acuerdo a la constitución de sus hifas; por lo tanto, es indispensable determinar para cada hongo los tiempos de homogeneización adecuados. Como se ve en la tabla 8, en el caso de la cepa utilizada de la especie *Lyophyllum decastes*, el límite de resistencia en los tiempos probados fue de 60 segundos en los dos medios con agitación. Debido a que la agitación incrementa la aereación del medio, es posible que la ausencia de crecimiento en EM sin agitación haya estado dada por la baja disponibilidad de oxígeno disuelto.

Tabla 8. Efecto de la homogeneización sobre el crecimiento micelial de *Lyophyllum decastes* (cepa 29/10) en medios líquidos

Tiempo de homogeneización (s)	Medios		
	PG (A)	EM(A)	EM (s A)
30	+	+	SC
45	+	+	SC
60	+	+	SC
75	SC	SC	SC
90	SC	SC	SC

+ = Crecimiento micelial en esférulas de micelio a la 2ª Semana

SC = Sin crecimiento micelial

A= Agitación

s A= Sin agitación

## 5 Conclusiones

- Los medios extracto de malta agar y agar agua son útiles en el aislamiento de distintas especies de hongos tanto saprobias como micorrícicas.
- La disponibilidad de nutrimentos del medio de cultivo afectó el crecimiento radial de las colonias de las cepas probadas.
- Los medios papa-dextrosa-levadura-agar y extracto de malta-agar son útiles para la producción de esclerocios del género *Morchella*.
- El crecimiento del micelio de hongos en distintos medios de cultivo puede ser descrito y modelado en términos cuantitativos por curvas sigmoidales de crecimiento.
- Existen variaciones intraespecíficas e interespecíficas en la producción de esclerocios por especies del género *Morchella*.
- La producción de esclerocios por la cepa probada de la especie *Morchella elata* en cultivo, es afectada favorablemente por la presencia de vitaminas y minerales.
- La producción de esclerocios por la cepa probada de la especie *Morchella elata* es afectada en cultivo por factores ambientales tales como temperatura e iluminación.

- No se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las velocidades de invasión de la cepa de *Morchella elata* en los medios sólidos preparados con granos y sales minerales.
  
- No se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las velocidades de invasión de la cepa de *Sparassis crispa* en los medios sólidos preparados con granos y sales minerales.
  
- Las diferencias estadísticamente significativas encontradas al comparar las velocidades de invasión de la cepa de *Morchella crassipes* en los medios sólidos preparados con granos y sales minerales se atribuyen a heterocedasticidad.
  
- El extracto vegetal simple a partir de hojas y ramas de *Schinus molle* y *Cupressus sp.* fue útil para la producción micelial de la cepa probada de la especie *Morchella elata*, sin embargo se obtuvieron mejores resultados cuando la fuente principal de carbono fue extracto de malta.
  
- La técnica de homogeneización micelial fue útil para obtener inóculo en medios sumergidos de la cepa probada de la especie *Morchella elata*, utilizando tiempos de homogeneización de 20, 40 y 60 segundos e incubando en agitación a 23 °C.
  
- La técnica de homogeneización micelial tiene utilidad en la producción de inóculo en medios sumergidos de la cepa probada de la especie *Lyophyllum decastes*, cuando se

utilizan tiempos de homogeneización de 30, 45 y 60 segundos, los medios peptona/glucosa y extracto de malta e incubando en agitación a 23 °C.

## 6 Literatura Citada

- Bland, M., 2000. **An Introduction to medical Statistics**. 3° Ed. Oxford University Press. London.
- Brock, T.D., 1951. Nutrition of *Morchella esculenta* Fries. **Mycologia** 43:402-422.
- Cochrane, W.V., 1958. **Physiology of fungi**. John Wiley & Sons. New York.
- Dahlstrom, S.L., Smith, J.E. & Weber, N.S., 2000. Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis. **Mycorrhiza** 9:279-285.
- Danell, E. & Camacho, F.J., 1997. Successful cultivation of the golden chanterelle. **Nature** 385:303.
- Daniel, W.W., 1987. **Biostatistics a foundation for Analysis in the Health Sciences**. 5° Ed. John Wiley & Sons. New York.
- Faris, H.J., Broderick, A. & Nair, N.G., 1996. Occurrence and initial observations of *Morchella* in Australia. *in*: Royce(ed.). **Mushroom biology and mushroom products**. Penn State Univ. Penn State.
- Gilbert, F.A., 1960. The submerged culture of *Morchella*. **Mycologia** 52:201-209.
- Griffin, D.H., 1994. **Fungal physiology**. Wiley-Liss. New York.
- Guinberteau, J. & Olivier J. M., 1991. Improvement of *Lepista* species cultivation, technical factors and selection of strains. *in*: Maher (ed.) **Science and cultivation of Edible Fungi**. Balkema. Rotterdam.
- Guzmán, G., 1977. **Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes**. Limusa. México D.F.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmenes, D., Soto-Velazco, C. y Guzmán-Dávalos, L., 1993. **El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales**. I.P.N. México.
- Hansen, L y Knudsen H., 1992. **Nordic Macromycetes. Vol 2. Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales**. Nordsvamp. Helsinki.
- Hansen, L y Knudsen H., 1997. **Nordic Macromycetes. Vol 3. Heterobasidioid, Aphylophoroid & Gastromycetoid Basidiomycetes**. Nordsvamp. Helsinki.
- Hansen, L y Knudsen H., 2000. **Nordic Macromycetes. Vol 1. Ascomycetes**. Nordsvamp. Helsinki.

- Hashioka, Y. y Arita, M., 1978. Naturalization of several saprophytic mushrooms under rice-straw culture. Delmas J.(ed) **Mushroom Science X (Part II)**. France.
- Kinuta, M., 1991. Cultivation of *Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing. in: Maher (ed.) **Science and cultivation of Edible Fungi**. Balkema. Rotterdam.
- Montañes, A., 1999, **Análisis de la Diversidad de macromicetos que crecen en bosques de encino del municipio de Chapa de Mota, Edo. de México**. Tesis de Licenciatura: UNAM. Fac. Ciencias. México D.F.
- Pinzón-Picaseño, L.M., López Guerrero, M.T., Vetiz, A.F.A. y Martínez-Marcial, J.D., 1978. Métodos para el estudio de algunas características de los hongos xilófagos como organismos degradadores de la madera. En Memorias del 7º congreso Nacional de Micología. Jalapa, Ver. 26-30. **Bol. Soc. Mex. Mic.** No17.
- Riffenburg, R. H., 1993. **Statistics in Medicine**. Academic Press. California.
- Robinson, P.M., 1978. **Practical Fungal Physiology**. John Wiley & Sons. Chichester.
- Royse, D. J., 1997. Specialty Mushrooms: Consumption, Production and Cultivation. **Rev. Mex. Mic.** 13:1-11.
- Samajpati, N., 1981. *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc., an excellent edible mushroom from india. Sing (ed) In: **Mushroom Science XI**. Sydney.
- Singh, S.K. & Verma, R.N., 2000. Effect of nutrients on mycelial growth and sclerotial formation in *Morchella esculenta*. in: Van Griensven(ed.). **Science and Cultivation of edible Fungi**. Balkema, Rotterdam.
- Smith, J.S. & Berry, D.R., 1978. **The filamentous fungi Vol. 3. Developmental mycology**. Edward Arnold. London.
- Stamets, P., 2000. **Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms**. 3º Ed., Ten Speed Press. California.
- Villarreal, R., 1994. **Análisis ecológico-silvícola de la productividad Natural de Hongos comestibles silvestres en bosques del Cofre de Perote, Veracruz**. Tesis de Maestría: Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Villarreal, L. y Pérez-Moreno, J., 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. **Micología Neotropical Aplicada** 2:77-114.
- Yamada, A., Ogura, T. & Ohmasa, M., 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. **Mycorrhiza** 11:59-66.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA