

In vitro mycelial growth of wild edible mushrooms from the central Mexican highlands

Crecimiento miceliar *in vitro* de hongos comestibles silvestres de alta montaña en el centro de México

César Díaz-Talamantes¹; Cristina Burrola-Aguilar^{1*}; Xóchitl Aguilar-Miguel¹; Gerardo Mata²

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Centro de Investigación de Recursos Bióticos. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 14.5, San Cayetano. C. P. 50295. Toluca, Estado de México, México.

²Instituto de Ecología, A. C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya. C. P. 91070. Xalapa, Veracruz, México. *Corresponding author: cba@uaemex.mx, tel.: +52 (722) 296 5553.

Abstract

Introduction: Wild edible mushrooms are considered functional foods of high culinary value; their demand has increased in recent years.

Objective: The mycelial growth of *Bovista aestivalis*, *Infundibulicybe squamulosa*, *I. gibba*, *Gymnopus dryophilus* and *Lycoperdon perlatum* was evaluated to identify species susceptible to culture.

Materials and methods: Mycelial growth rate (GR) and biomass were determined at 18 and 25 °C in solid and liquid culture media and in seed supplemented with *Pinus patula* needles. Metabolic activity (Ma) was quantified in the supplemented seed using the fluorescein diacetate (FDA) technique.

Results and discussion: *Gymnopus dryophilus* and *L. perlatum* showed better mycelial development. In solid medium, the optimal treatment for both species was maize agar at 18 °C. The *G. dryophilus* GR was 2.2 mm·d⁻¹ with 70 mg biomass; the *L. perlatum* GR was 2.0 mm·d⁻¹ with 30 mg biomass. In liquid culture, the *G. dryophilus* GR was 0.11 g·d⁻¹ and for *L. perlatum* it was 0.12 g·d⁻¹. In supplemented sorghum, *G. dryophilus* had Ma of 61.5 µg of FDA·g⁻¹ of substrate and a GR of 1.18 mm·d⁻¹; *L. perlatum* recorded 23.6 µg of FDA·g⁻¹ and a GR of 0.68 mm·d⁻¹.

Conclusion: The *G. dryophilus* strain is susceptible to culture.

Keywords: Sorghum, *Gymnopus dryophilus*, *Lycoperdon perlatum*, maize agar, pine needle agar.

Resumen

Introducción: Los hongos comestibles silvestres se consideran alimentos funcionales de alto valor culinario; su demanda ha aumentado en los últimos años.

Objetivo: Se evaluó el crecimiento miceliar de *Bovista aestivalis*, *Infundibulicybe squamulosa*, *I. gibba*, *Gymnopus dryophilus* y *Lycoperdon perlatum*, para identificar especies susceptibles al cultivo.

Materiales y métodos: La tasa de crecimiento miceliar (TC) y la biomasa se determinaron a 18 y 25 °C en medios de cultivo sólido, cultivo líquido y en semilla suplementada con acículas de *Pinus patula*. La actividad metabólica (Am) se cuantificó en la semilla suplementada, mediante la técnica del diacetato de fluoresceína (FDA).

Resultados y discusión: *Gymnopus dryophilus* y *L. perlatum* presentaron mejor desarrollo miceliar. En medio sólido, el tratamiento óptimo para ambas especies fue agar maíz a 18 °C. La TC de *G. dryophilus* fue 2.2 mm·d⁻¹ con biomasa de 70 mg; la TC de *L. perlatum* fue 2.0 mm·d⁻¹ con biomasa de 30 mg. En cultivo líquido, la TC de *G. dryophilus* fue 0.11 g·d⁻¹ y para *L. perlatum* fue 0.12 g·d⁻¹. En sorgo suplementado, *G. dryophilus* tuvo Am de 61.5 µg de FDA·g⁻¹ de sustrato TC de 1.18 mm·d⁻¹; *L. perlatum* registró 23.6 µg de FDA·g⁻¹ y TC de 0.68 mm·d⁻¹.

Conclusión: La cepa de *G. dryophilus* es susceptible al cultivo.

Palabras clave: Sorgo, *Gymnopus dryophilus*, *Lycoperdon perlatum*, agar-maíz, agar-acículas de pino.

Introduction

The demand for wild edible mushrooms has increased considerably as they represent a new food trend (Martínez-Carrera, Morales, Sobal, Bonilla, & Martínez, 2007). Fungi have high nutritional and energetic value and provide health benefits, which is why they are considered functional foods of high culinary value (Trigos & Suárez-Medellín, 2010).

Mexico is one of the countries with the greatest diversity of wild edible mushrooms; about 371 species are consumed (Garibay-Orijel & Ruan Soto, 2014). Due to this great fungal diversity, it is essential to study the native wild species, strengthen their conservation and seek alternative uses (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015). The study of wild edible mushrooms can generate great economic, social, technological and scientific benefits. Fungi represent an alternative means of helping achieve food security (Mayett & Martínez-Carrera, 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola [FIDA], & Programa Mundial de Alimentos [PMA], 2006); their strains may be susceptible to culture (Carreño-Ruiz, Capello-García, Gaitán-Hernández, Cifuentes-Blanco, & Rosique-Gil, 2014), they boost small farmer production and they decrease dependence on foreign strains (Morales et al., 2010). Fungal germplasm could provide better resistance to attack by pests and diseases common in industrial production (Salmones, Ballesteros, Zulueta, & Mata, 2012) and generate greater competition in the market throughout the year. This resource has not been used to its full potential (Garibay-Orijel et al., 2009) and the traditional and ecological knowledge that exists in this respect can be used to identify the most valued species with the greatest demand, which may eventually be taken advantage of (Burrola-Aguilar, Montiel, Garibay-Orijel, & Zizumbo-Villarreal, 2012).

A total of 77 species of edible mushrooms have been recorded in the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area in the State of Mexico (Franco-Maass, Burrola-Aguilar, & Arana-Gabriel, 2012), some considered with high potential for culture because they are saprobes (Arana-Gabriel, Burrola-Aguilar, Garibay-Orijel, & Franco-Maass, 2014). Among the species that stand out in the region, and which are valued for food and cultural reasons, are *Gymnopus dryophilus* (Bull.) Murrill 1916, popularly known as “clavitos de llano”, and *Lycoperdon perlatum* Pers. 1796 or “terneritas” (Franco-Maass et al., 2012). The latter has great medicinal potential due to its cicatrizant, antioxidant and antimicrobial properties (Alvarado-Castillo, Mata, & Benítez-Badillo, 2015).

In recent years, research has focused on the biotechnological development of wild mushrooms

Introducción

La demanda de los hongos comestibles silvestres ha aumentado considerablemente ya que representan una nueva tendencia alimenticia (Martínez-Carrera, Morales, Sobal, Bonilla, & Martínez, 2007). Los hongos tienen alto valor nutrimental y energético y brindan propiedades benéficas para la salud, por lo que se consideran alimentos funcionales de alto valor culinario (Trigos & Suárez-Medellín, 2010).

México es uno de los países con mayor diversidad de hongos comestibles silvestres; se consumen alrededor de 371 especies (Garibay-Orijel & Ruan Soto, 2014). Debido a esta gran diversidad fúngica es fundamental estudiar las especies silvestres nativas, fortalecer su conservación y buscar alternativas para su aprovechamiento (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015). El estudio de los hongos comestibles silvestres puede generar grandes beneficios económicos, sociales, tecnológicos y científicos. Los hongos representan una alternativa para la seguridad alimentaria (Mayett & Martínez-Carrera, 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola [FIDA], & Programa Mundial de Alimentos [PMA], 2006); sus cepas pueden ser susceptibles al cultivo (Carreño-Ruiz, Capello-García, Gaitán-Hernández, Cifuentes-Blanco, & Rosique-Gil, 2014), impulsan la producción rural de pequeños productores, y la dependencia de cepas extranjeras puede disminuir (Morales et al., 2010). El germoplasma de hongos podría presentar una mejor resistencia al ataque de plagas y enfermedades comunes en la producción industrial (Salmones, Ballesteros, Zulueta, & Mata, 2012) y generar mayor competencia en el mercado durante todo el año. Tal recurso no se ha utilizado en todo su potencial (Garibay-Orijel et al., 2009) y se puede hacer uso del conocimiento tradicional y ecológico que existe al respecto, para identificar las especies más valoradas y con mayor demanda, que eventualmente pueden ser aprovechadas (Burrola-Aguilar, Montiel, Garibay-Orijel, & Zizumbo-Villarreal, 2012).

En el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, en el Estado de México, se han registrado 77 especies de hongos comestibles (Franco-Maass, Burrola-Aguilar, & Arana-Gabriel, 2012), algunas consideradas con alto potencial de cultivo por ser saprobias (Arana-Gabriel, Burrola-Aguilar, Garibay-Orijel, & Franco-Maass, 2014). Entre las especies que destacan en la región, y son valoradas alimenticia y culturalmente, se encuentran *Gymnopus dryophilus* (Bull.) Murrill 1916, conocida popularmente como “clavitos de llano”, y *Lycoperdon perlatum* Pers. 1796 o “terneritas” (Franco-Maass et al., 2012). Este último tiene gran potencial medicinal debido a sus propiedades como cicatrizante, antioxidante y antimicrobiano (Alvarado-Castillo, Mata, & Benítez-Badillo, 2015).

at strain and inoculum levels (Martínez-Carrera et al., 2007), including studies on: mycelial growth on enriched solid culture media (Gaitán-Hernández, 2000; Gaitán-Hernández & Báez-Rodríguez, 2008; León-Avendaño, Martínez-García, Caballero, & Martínez-Carrera, 2013); influence of the liquid medium's inoculum nutrients on the production of biomass and other metabolites (Chegwin & Nieto 2013; Lin & Chen, 2007; Torres- López, Quinter, & Tehortua, 2011); mycelial growth on different seeds (Arana-Gabriel et al., 2014; Carreño-Ruiz et al., 2014; Villegas, 2007); supplemented seeds used as inoculum (Gaitán-Hernández, Cortés, & Mata, 2014; Gaitán-Hernández & Salmones, 2015; Mata, Savoie, Delpech, & Olivier, 1998) and quantification of biomass present in inoculum prepared with seed using indirect techniques such as the estimation of fluorescein diacetate (FDA) (Mata, Ortega, & Pérez-Merlo, 2011). These studies allow us to know the nutritional and environmental requirements of the species, thereby establishing the parameters for their culture (Arana-Gabriel et al., 2014).

Based on the above, the aim of this work was to evaluate and characterize the mycelial growth of some strains of saprobic wild edible mushrooms from the central Mexican highlands, to establish the optimum conditions of *in vitro* mycelial culture and identify which can be susceptible to culture.

Materials and methods

Sampling area

Cacalomacán Ejidal Ecological Park (PEEC for its initials in Spanish) is located in the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area in the State of Mexico. The PEEC covers a total area of 244 ha in the 2 800 to 3 247 m altitudinal gradient. The predominant climate is temperate semi-cold with summer rains. Average annual temperature ranges between 12 and 18 °C and average annual rainfall is from 1 200 to 1 800 mm. The predominant vegetation type corresponds to a secondary coniferous forest consisting of *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex Endl., *Eucalyptus globulus* Labill., *Pinus ayacahuite* C. Ehrenb. ex Schltdl., *P. patula* Schltdl. & Cham. and *P. montezumae* D. Don in Lamb. (Sánchez-Jasso, Aguilar-Miguel, Medina-Castro, & Sierra-Domínguez, 2013).

Strain collecting

By means of preferential sampling, conducted during field trips throughout the PEEC, fruit bodies were collected from saprobic fungi of cultural, alimentary and economic importance in central Mexico. The specimens were characterized macroscopically according to Delgado, Villegas, and Cifuentes (2005)

En los últimos años se han realizado investigaciones enfocadas al desarrollo biotecnológico de hongos silvestres a nivel de cepas e inóculo (Martínez-Carrera et al., 2007), como el crecimiento miceliar en medios de cultivo sólidos enriquecidos (Gaitán-Hernández, 2000; Gaitán-Hernández & Báez-Rodríguez, 2008; León-Avendaño, Martínez-García, Caballero, & Martínez-Carrera, 2013); la influencia de los nutrientes del inóculo en medio líquido sobre la producción de biomasa y otros metabolitos (Chegwin & Nieto, 2013; Lin & Chen, 2007; Torres- López, Quinter, & Tehortua, 2011); el crecimiento del micelio sobre diferentes semillas (Arana-Gabriel et al., 2014; Carreño-Ruiz et al., 2014; Villegas, 2007); semillas suplementadas utilizadas como inóculo (Gaitán-Hernández, Cortés, & Mata, 2014; Gaitán-Hernández & Salmones, 2015; Mata, Savoie, Delpech, & Olivier, 1998); y cuantificación de biomasa presente en inóculo preparado con semilla, mediante técnicas indirectas como la estimación de diacetato de fluoresceína (FDA) (Mata, Ortega, & Pérez-Merlo, 2011). Estos estudios permiten conocer los requerimientos nutricionales y ambientales de las especies, estableciendo los parámetros para su cultivo (Arana-Gabriel et al., 2014).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar y caracterizar el crecimiento miceliar de algunas cepas de hongos comestibles silvestres saprobios de alta montaña, para establecer las condiciones óptimas de cultivo de micelio *in vitro* e identificar cuáles pueden ser susceptibles de cultivo.

Materiales y métodos

Zona de muestreo

El Parque Ecológico Ejidal de Cacalomacán (PEEC) se localiza en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca en el Estado de México. El PEEC tiene una superficie total de 244 ha en el gradiente altitudinal 2 800 a 3 247 m. El clima predominante es templado semifrío con lluvias en verano. La temperatura media anual oscila entre 12 y 18 °C y la precipitación media anual es de 1 200 a 1 800 mm. El tipo de vegetación sobresaliente corresponde a un bosque secundario de coníferas *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex Endl., *Eucalyptus globulus* Labill., *Pinus ayacahuite* C. Ehrenb. ex Schltdl., *P. patula* Schltdl. & Cham. y *P. montezumae* D. Don in Lamb. (Sánchez-Jasso, Aguilar-Miguel, Medina-Castro, & Sierra-Domínguez, 2013).

Obtención de cepas

Mediante un muestreo preferencial, a partir de recorridos en todo el PEEC, se recolectaron esporomas de hongos saprobios de importancia cultural, alimenticia y económica en el centro de México. Los ejemplares se caracterizaron macroscópicamente de

and microscopically according to Franco-Maass et al. (2012) for later taxonomic identification. The specimen vouchers were deposited in the Fungal Collection (XAL) of the Institute of Ecology, a non-profit organization.

Vegetative isolation and characterization of strains

Pure cultures were obtained from fruit bodies in three commercial solid culture media (potato dextrose agar [PDA] pH 5.6, malt extract agar [MEA] pH 4.7, Sabouraud dextrose agar [SA] pH 5.6) and two unconventional media: maize agar (MA: 15 g·L⁻¹ of corn meal, 15 g·L⁻¹ of agar agar, 2 g·L⁻¹ of yeast extract and 1 g·L⁻¹ of gelatine peptone, pH 6.3) and pine needle agar (NA: 15 g·L⁻¹ of an aqueous infusion of dried and ground pine [*Pinus patula*] needles, 15 g·L⁻¹ of agar agar, 2 g·L⁻¹ of yeast extract and 1 g·L⁻¹ of gelatine peptone, pH 5.8). The media were pre-sterilized at 120 °C and 15 psi for 15 min. Strains were characterized macroscopically and microscopically according to Cruz-Ulloa (1995).

Evaluation of mycelial growth in solid medium

Mycelial growth rate

With a 0.5-cm-diameter punch, mycelium was taken from the culture media in which each strain had the best mycelial development and was placed in the center of a 9-cm-diameter Petri dish. The dishes were incubated in the dark at 18 and 25 °C. For each strain, four culture media were evaluated at two temperatures, with eight replicates. Mycelial growth was measured every other day for 28 days. The measurements of each replicate were plotted against the incubation time and the growth curve was linearized to obtain the equation of a straight line (Gaitán-Hernández & Báez-Rodríguez, 2008):

$$y = mx + b$$

where,

m = slope of the straight line representing the mycelial growth rate (GR, mm·d⁻¹)

y = distance (mm)

x = incubation time (d)

b = constant factor

Biomass quantification

The mycelium was placed in water at approximately 90 °C and rinsed until agar-free. Subsequently, the sample was placed in an oven at 80 °C for 24 h and the dry biomass was weighed (Santiago-Martínez, Estrada-Torres, Varela, & Herrera, 2003).

acuerdo con Delgado, Villegas, y Cifuentes (2005) y microscópicamente de acuerdo con Franco-Maass et al. (2012) para su posterior identificación taxonómica. Los ejemplares *vouchers* se depositaron en la Colección de Hongos (XAL) del Instituto de Ecología, A. C.

Aislamiento vegetativo y caracterización de las cepas

Los cultivos puros se obtuvieron de esporomas en tres medios de cultivo sólido comercial (agar papa dextrosa [PDA] pH 5.6, agar extracto de malta [EMA] pH 4.7, agar Sabouraud dextrosa [AS] pH 5.6) y dos medios no convencionales: agar maíz (AM: 15 g·L⁻¹ de harina de maíz, 15 g·L⁻¹ de agar agar, 2 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g·L⁻¹ de peptona de gelatina, pH 6.3) y agar acículas de pino (AA: 15 g·L⁻¹ de una infusión acuosa de acículas de pino [*Pinus patula*] secas y molidas, 15 g·L⁻¹ de agar agar, 2 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g·L⁻¹ de peptona de gelatina, pH 5.8). Los medios fueron previamente esterilizados a 120 °C y 15 psi durante 15 min. Las cepas se caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo con Cruz-Ulloa (1995).

Evaluación del crecimiento micelial en medio sólido

Tasa de crecimiento micelial

Con un horador de 0.5 cm de diámetro se tomó micelio de los medios de cultivo en los que cada cepa presentó mejor desarrollo micelial y se colocó en el centro de una caja Petri de 9 cm de diámetro. Las cajas se incubaron en oscuridad a 18 y 25 °C. Para cada cepa se evaluaron cuatro medios de cultivo a dos temperaturas, con ocho repeticiones. El crecimiento del micelio se midió cada tercer día durante 28 días. Las mediciones de cada repetición se graficaron respecto al tiempo de incubación y la curva de crecimiento se linealizó para obtener la ecuación de una recta (Gaitán-Hernández & Báez-Rodríguez, 2008):

$$y = mx + b$$

donde,

m = pendiente de la recta que representa la tasa de crecimiento micelial (TC, mm·d⁻¹)

y = distancia (mm)

x = tiempo de incubación (d)

b = factor constante

Cuantificación de biomasa

El micelio se colocó en agua a 90 °C aproximadamente y se enjuagó hasta dejarlo libre de agar. Posteriormente, la muestra se colocó en un horno a 80 °C por 24 h y se pesó la biomasa seca (Santiago-Martínez, Estrada-Torres, Varela, & Herrera, 2003).

Evaluation of mycelial growth in seed treatments used as an inoculum source

Invasion and mycelial density

The strains *G. dryophilus* and *L. perlatum* were inoculated in four treatments: wheat (T1), sorghum (T2), wheat supplemented with 10 % pine needles (T3) and sorghum supplemented with 10 % pine needles (T4). The grains were cleaned and hydrated, after which the previously hydrated pine needles were added. Then 200 g of substrate were placed in 400-mL glass vials, with eight replicates per treatment. The vials were sterilized and incubated in the dark at 18 °C for 28 days. Afterwards, the percentage of grain invaded by the fungus and mycelial density were obtained through the qualitative analysis proposed by Villegas (2007) and modified by Arana-Gabriel et al. (2014).

Mycelial growth rate in seed

The treatment with the best invasion percentage and mycelial density was identified and 24 g fresh weight were taken to fill each 9-cm-diameter Petri dish, with 10 replicates. The dishes were inoculated with a 0.7-cm piece of mycelium in solid medium and incubated in the dark for 21 days at 20 °C. Subsequently, GR was calculated using the linear growth function described above (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015).

Metabolic activity of the mycelium in seed

Forty grams of seed from the optimal treatment of each strain were incubated separately in 100-mL glass vials in the dark at 20 °C. Subsequently, metabolic activity (Ma) was estimated by four weekly measurements of FDA hydrolysis according to the method of Swisher and Carrol (1980) modified by Mata and Savoie (1998).

Mycelial growth rate and biomass quantification from liquid culture

The liquid culture medium was made with 15 g of corn flour in a flask filled to 1L with distilled water. Subsequently, the medium was centrifuged in 50-mL tubes at 8 500 rpm for 10 min to obtain a precipitate-free medium. Finally, 2 g·L⁻¹ of yeast extract and 1 g·L⁻¹ of soy peptone were added. Then 100 mL of medium were added into 150-mL Erlenmeyer flasks and sterilized (Chegwin & Nieto, 2013). The flasks were inoculated with a 0.7-cm piece of mycelium in solid media, capped with aluminum foil and placed on an orbital shaker at 80 rpm for 21 days at 20 °C. The biomass was quantified by dry weight weekly with three replicates per measurement. GR was obtained from the Monod equation as a function of biomass (Sánchez & Royse 2002):

$$TC = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

Evaluación del crecimiento micelial en los tratamientos de semillas utilizadas como fuente de inóculo

Invasión y densidad micelial

Las cepas *G. dryophilus* y *L. perlatum* se inocularon en cuatro tratamientos: trigo (T1), sorgo (T2), trigo suplementado con acículas de pino al 10 % (T3) y sorgo suplementado con acículas de pino al 10 % (T4). Los granos se limpiaron e hidrataron y se agregaron las acículas de pino previamente hidratadas. Se colocaron 200 g de sustrato en frascos de cristal de 400 mL, con ocho repeticiones por tratamiento. Los frascos se esterilizaron y se incubaron en oscuridad a 18 °C durante 28 días. Posteriormente, el porcentaje de grano invadido por el hongo y la densidad del micelio se obtuvieron mediante el análisis cualitativo propuesto por Villegas (2007) y modificado por Arana-Gabriel et al. (2014).

Tasa de crecimiento micelial en semilla

Se identificó el tratamiento con mejor porcentaje de invasión y densidad de micelio y se tomaron 24 g en fresco para llenar cada caja Petri de 9 cm de diámetro, con 10 repeticiones. Las cajas se inocularon con un trozo de 0.7 cm de micelio en medio sólido y se incubaron en oscuridad durante 21 días a 20 °C. Posteriormente, la TC se calculó con la función de crecimiento lineal descrita anteriormente (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015).

Actividad metabólica del micelio en semilla

Cuarenta gramos de semilla del tratamiento óptimo de cada cepa se incubaron por separado en frascos de cristal de 100 mL en oscuridad a 20 °C. Posteriormente, la actividad metabólica (Am) se estimó mediante cuatro mediciones semanales de la hidrólisis de FDA de acuerdo con el método de Swisher y Carrol (1980) modificado por Mata y Savoie (1998).

Tasa de crecimiento micelial y cuantificación de biomasa a partir de cultivo líquido

El medio de cultivo líquido se elaboró con 15 g de harina de maíz en un matraz aforado a 1 L con agua destilada. Posteriormente, el medio se centrifugó en tubos de 50 mL a 8 500 rpm durante 10 min para obtener un medio libre de precipitado. Finalmente se agregaron 2 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g·L⁻¹ de peptona de soya. Se adicionaron 100 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 150 mL y se esterilizaron (Chegwin & Nieto, 2013). Los matraces se inocularon con un trozo de 0.7 cm de micelio en medio sólido, se taparon con papel aluminio y se colocaron en un agitador orbital a 80 rpm, durante 21 días a 20 °C. La biomasa se cuantificó mediante peso seco cada

where,

x = biomass (g) at time t (d)

(x_0) = initial biomass (g)

Statistical analysis

The interaction between temperature and solid culture media on mycelial growth rate and biomass was determined using a multifactorial statistical analysis (MANOVA) with 95 % confidence ($P \leq 0.05$). Tukey's range test was performed with the STATGRAPHICS Centurion XVI software program (Statpoint Technologies, Inc., 2009), to know the statistically significant differences in the mean values.

Results and discussion

Obtaining and microscopic and macroscopic characterization of strains

Five strains of wild edible mushrooms were isolated in pure culture *in vitro*: *Bovista aestivalis* (Bonord.) Demoulin 1979 (*pedo de burro*), *Infundibulicybe squamulosa* (Pers.) Harmaja 2003 (*tejamanilero* or *copa*), *I. gibba* (Pers.) Harmaja 2003 (*tejamanil*), *G. dryophilus* (*clavitos de llano*) and *L. perlatum* (*terneritas*). The strains were safeguarded in the fungal strain collection of the Institute of Ecology, under the numbers: IE 991 (*B. aestivalis*), IE 988 (*G. dryophilus*), IE 989 (*I. gibba*), IE 990 (*I. squamulosa*) and IE 987 (*L. perlatum*).

The fungus *B. aestivalis* was able to develop in all media with a GR of 1.2 mm·d⁻¹, although the growth in SA and MEA, at 18 and 25 °C, was slow and sparse. The mycelium has an irregular, circular shape with a fimbriated margin, a velvety texture with a flat surface and white prostrate-submerged growth (Figure 1A). The hyphae are sinuous with hyaline, rounded ends and measure 1.1 (0.7-2.4) mm wide.

Infundibulicybe gibba grew in all media and at both temperatures with a GR of 1.0 mm·d⁻¹; however, in NA it presented the lowest growth and density. The mycelium has a circular shape with a smooth, fimbriated margin, a velvety texture, a flat surface and submerged growth (Figure 1B). The hyphae measured 2.2 (1.5-2.8) mm wide, and are smooth with hyaline, rounded-globose ends, with fibulae and parietal extensions.

Gymnopus dryophilus had a GR of 2.2 mm·d⁻¹ and high mycelial density in all media under the two evaluation temperatures, with the exception of SA at 18 and 25 °C where growth was very slow. The mycelium is circular-shaped with a fimbriated margin, cottony texture and flat surface; the growth is aerial and white, which with aging changes to a creamy brown hue (Figure 1C). The hyphae are smooth with septate, hyaline, rounded

semana con tres repeticiones por medición. La TC se obtuvo de la ecuación de Monod en función de la biomasa (Sánchez & Royse, 2002):

$$TC = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

donde,

x = biomasa (g) al tiempo t (d)

(x_0) = biomasa inicial (g)

Análisis estadístico

La interacción entre la temperatura y los medios de cultivo sólidos sobre la tasa de crecimiento micelial y la biomasa se determinó con un análisis estadístico multifactorial (MANOVA) con 95 % de confianza ($P \leq 0.05$). Se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009), para conocer las diferencias estadísticamente significativas en los valores promedio.

Resultados y discusión

Obtención y caracterización macroscópica y microscópica de las cepas

Cinco cepas de hongos comestibles silvestres se aislaron en cultivo puro *in vitro*: *Bovista aestivalis* (Bonord.) Demoulin 1979 (*pedo de burro*), *Infundibulicybe squamulosa* (Pers.) Harmaja 2003 (*tejamanilero* o *copa*), *I. gibba* (Pers.) Harmaja 2003 (*tejamanil*), *G. dryophilus* (*clavitos de llano*) y *L. perlatum* (*terneritas*). Las cepas se resguardaron en el cepario de hongos del Instituto de Ecología, A. C. bajo los números: IE 991 (*B. aestivalis*), IE 988 (*G. dryophilus*), IE 989 (*I. gibba*), IE 990 (*I. squamulosa*) e IE 987 (*L. perlatum*).

El hongo *B. aestivalis* logró desarrollarse en todos los medios con una TC de 1.2 mm·d⁻¹, aunque el crecimiento en AS y EMA, a 18 y 25 °C, fue lento y poco denso. La forma del micelio es circular irregular con margen fimbriado, textura aterciopelada con superficie plana y crecimiento postrado-sumergido de color blanco (Figura 1A). Las hifas son hialinas de 1.1 (0.7-2.4) mm de ancho y sinuosas con terminación redondeada.

Infundibulicybe gibba creció en todos los medios y a ambas temperaturas con una TC de 1.0 mm·d⁻¹; sin embargo, en AA presentó el crecimiento y densidad más bajo. La forma del micelio es circular con margen liso-fimbriado, textura aterciopelada, superficie plana y crecimiento sumergido (Figura 1B). Las hifas midieron 2.2 (1.5-2.8) mm de ancho, son hialinas con fibulas y prolongaciones parietales, y lisas con terminación redondeada-globosa.



Figure 1. Mycelium of the strains obtained. A) *Bovista aestivalis* in maize agar (MA) at 18 °C, B) *Infundibulicybe gibba* in PDA at 25 °C, C) *Gymnopus dryophilus* in pine needle agar at 18 °C, D) *Infundibulicybe squamulosa* in MA at 18 °C and E) *Lycoperdon perlatum* in MA at 18 °C.

Figura 1. Micelio de las cepas obtenidas. A) *Bovista aestivalis* en agar maíz (AM) a 18 °C, B) *Infundibulicybe gibba* en PDA a 25 °C, C) *Gymnopus dryophilus* en agar acículas de pino a 18 °C, D) *Infundibulicybe squamulosa* en AM a 18 °C y E) *Lycoperdon perlatum* en AM a 18 °C.

ends; it has abundant fibulae and parental extensions. The hyphae measured 3.1 μm wide in MA, 3.9 mm in NA, 3.1 mm in MEA and 3.0 mm in PDA at 18 °C; and 3.4 mm wide in MA, 3.7 mm in NA, 2.7 mm in MEA and 2.7 mm in PDA at 25 °C.

Infundibulicybe squamulosa developed in all media at both temperatures; however, its GR was 0.9 $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ and its mycelial density was very low. The mycelium is yellow, submerged and irregularly-shaped with a smooth, fimbriated margin, a velvety texture and a flat surface (Figure 1D). The fungus developed hyphae measuring 2.6 (2.2-3.3) mm wide, branched, septate and with frequent fibulae.

Lycoperdon perlatum grew at a GR of 1.6 $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$. In MEA at 18 and 25 °C, growth was almost nil. The mycelium is circular-shaped with a fimbriated margin, cottony texture and flat surface; the growth is creamy white, submerged-aerial (Figure 1E). The hyphae are smooth-sinuuous with hyaline, rounded-globose ends, with parietal extensions and scarce fibulae. The hyphae measured 3.3 mm wide in MA, 3.7 mm in NA, 2.8 mm in SA and 2.5 mm in PDA at 18 °C; and 3.1 mm in MA, 3.4 mm in NA, 2.7 mm in SA and 2.9 mm in PDA at 25 °C.

Bovista aestivalis, *I. gibba* and *I. squamulosa* had slow growth, so only *G. dryophilus* was selected in NA, MA, PDA and MEA at 18 and 25 °C, and *L. perlatum* in NA, MA, PDA and SA at 18 and 25 °C, to evaluate mycelial growth in solid medium and in seed used as an inoculant.

Evaluation of mycelial growth in solid medium

Mycelial growth rate and biomass quantification

Table 1 reports the GR and biomass of *G. dryophilus* and *L. perlatum* in the culture media and evaluation temperatures. In this table it can be seen that there were no statistically significant differences among the treatments ($P > 0.05$) and that there was no interaction

Gymnopus dryophilus tuvo una TC de 2.2 $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ y densidad micelial alta en todos los medios bajo las dos temperaturas de evaluación, a excepción de AS a 18 y 25 °C donde el crecimiento fue muy lento. La forma del micelio es circular con margen fimbriado, textura algodonosa y superficie plana; el crecimiento es aéreo y de color blanco, al envejecer cambia a una tonalidad crema-café (Figura 1C). Las hifas son lisas con terminaciones redondeadas, hialinas y septadas; presenta abundantes fíbulas y prolongaciones parentales. Las hifas midieron 3.1 μm de ancho en AM, 3.9 mm en AA, 3.1 mm en EMA y 3.0 mm en PDA a 18 °C; y 3.4 mm de ancho en AM, 3.7 mm en AA, 2.7 mm en EMA y 2.7 mm en PDA a 25 °C.

Infundibulicybe squamulosa se desarrolló en todos los medios a las dos temperaturas; sin embargo, su TC fue de 0.9 $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ y su densidad micelial fue muy baja. El crecimiento del micelio es sumergido de color amarillo, de forma irregular con margen liso-fimbriado, textura aterciopelada y superficie plana (Figura 1D). El hongo desarrolló hifas de 2.6 (2.2-3.3) mm de ancho, ramificadas, septadas y con fíbulas frecuentes.

Lycoperdon perlatum creció a una TC de 1.6 $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$. En EMA a 18 y 25 °C, el crecimiento fue casi nulo. La forma del micelio es circular con margen fimbriado, textura algodonosa y superficie plana; el crecimiento es sumergido-aéreo de color blanco-crema (Figura 1E). Las hifas son lisas-sinuuous con terminaciones redondeadas-globosas, hialinas con prolongaciones parietales y escasas fíbulas. Las hifas midieron 3.3 mm de ancho en AM, 3.7 mm en AA, 2.8 mm en AS y 2.5 mm en PDA a 18 °C; y 3.1 mm en AM, 3.4 mm en AA, 2.7 mm en AS y 2.9 mm en PDA a 25 °C.

Bovista aestivalis, *I. gibba* e *I. squamulosa* tuvieron crecimiento lento; por tal motivo solamente se seleccionaron *G. dryophilus* en AA, AM, PDA y EMA a 18 y 25 °C, y *L. perlatum* en AA, AM, PDA y AS a 18 y 25 °C, para evaluar el crecimiento micelial en medio sólido y en semilla utilizada como inoculante.

**Table 1. Mycelial growth rate (GR) and biomass production of *Gymnopus dryophilus* and *Lycoperdon perlatum*.
Cuadro 1. Tasa de crecimiento micelial (TC) y producción de biomasa de *Gymnopus dryophilus* y *Lycoperdon perlatum*.**

Temperature (°C) / Temperatura (°C)	Culture medium / Medio de cultivo	<i>Gymnopus dryophilus</i>		<i>Lycoperdon perlatum</i>	
		GR (mm·d ⁻¹) / TC (mm·d ⁻¹)	Biomass (mg) / Biomasa (mg)	GR (mm·d ⁻¹) / TC (mm·d ⁻¹)	Biomass (mg) / Biomasa (mg)
18	SA/AS	NE	NE	1.6 cd	10 cd
	MA/AM	2.2 a	70 abc	2.0 a	30 a
	NA/AA	2.3 a	110 a	1.9 a	10 bc
	PDA	2.4 a	30 c	1.0 e	6 e
	MEA/EMA	2.2 a	40 bc	NE	NE
	SA/AS	NE	NE	1.6 c	10 c
25	MA/AM	2.2 a	60 abc	1.7 b	10 b
	NA/AA	2.2 a	90 ab	2.0 a	20 a
	PDA/	2.2 a	30 c	1.1 d	7 d
	MEA/EMA	2.3 a	0.04 bc	NE	NE

SA: Sabouraud dextrose agar, MA: maize agar, NA: pine needle agar, PDA: potato dextrose agar and MEA: malt extract agar. NE: medium not evaluated. The letters in each column represent significant differences among treatments (Tukey, $P < 0.05$).

AS: agar Sabouraud dextrosa, AM: agar maíz, AA: agar acículas de pino, PDA: papa dextrosa agar y EMA: agar extracto de malta. NE: medio no evaluado. Las letras en cada columna representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $P < 0.05$).

between the culture media and the temperature on *G. dryophilus* GR. Regarding biomass, there are statistical differences among the treatments and there is interaction between the culture media and the temperature ($P < 0.05$) on this variable. The optimal treatments were NA and MA, both at 18 and 25 °C. In the case of *L. perlatum*, there are statistically significant differences among the treatments and interaction between the culture media and the temperature ($P < 0.05$) on GR. The highest GR values were obtained in the treatments NA at 18 and 25 °C and MA at 18 °C. Concerning biomass, there are statistical differences among treatments and interaction between the culture media and the temperature ($P > 0.05$). MA medium at 18 °C and NA at 25 °C were the treatments with the highest biomass production.

Gymnopus dryophilus and *L. perlatum* showed no differences in macroscopic characteristics among the evaluated treatments, probably due to the phenotypic characters of each strain as indicated by León-Avedaño et al. (2013). In the case of *G. dryophilus*, it could be because all the culture media have the necessary nutrients, so there are no interactions between temperature and culture media on GR. However, biomass is affected by the interaction between temperature and culture media ($P < 0.05$, Table 1). In PDA and MEA at 18 and 25 °C, mycelial density was lower, reflected in lower biomass production, in contrast to the MA medium in which very abundant aerial mycelium developed. For *L. perlatum*, the density and speed of mycelial growth

Evaluación del crecimiento micelial en medio sólido

Tasa de crecimiento micelial y cuantificación de la biomasa

El Cuadro 1 reporta la TC y biomasa de *G. dryophilus* y *L. perlatum* en los medios de cultivo y temperaturas de evaluación. En dicho cuadro se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) ni hubo interacción entre los medios de cultivo y la temperatura sobre la TC de *Gymnopus dryophilus*. Respecto a la biomasa, existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y hay interacción entre los medios de cultivo y la temperatura ($P < 0.05$) sobre dicha variable. Los tratamientos óptimos fueron AA y AM, ambos a 18 y 25 °C. En el caso de *L. perlatum*, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos e interacción entre los medios de cultivo y la temperatura ($P < 0.05$) sobre la TC. Los valores más altos de TC se obtuvieron en los tratamientos AA a 18 y 25 °C y AM a 18 °C. Respecto a la biomasa, hay diferencias estadísticas entre los tratamientos e interacción entre los medios de cultivo y la temperatura ($P > 0.05$). Los medios AM a 18 °C y AA a 25 °C fueron los tratamientos con mayor producción de biomasa.

Gymnopus dryophilus y *L. perlatum* no presentaron diferencias en las características macroscópicas entre los tratamientos evaluados, debido probablemente a los caracteres fenotípicos de cada cepa como lo señalan

are affected by the treatments ($P < 0.05$, Table 1). In this case, NA medium at 18 and 25 °C produced higher mycelial growth and density followed by MA at 18 °C (aerial mycelium in both media), while in PDA at 18 and 25 °C the lowest growth values were obtained.

The highest GR and biomass values in both species were obtained with NA and MA media, which is attributed to the NA medium being based on pine needles, giving the mycelium the conditions of their natural medium. This is consistent with the findings of Gaitán-Hernández (2000), who demonstrated that the greatest mycelial growth of *Neolentinus suffrutescens* (Brot.) T. W. May & A. E. Wood was obtained in medium supplemented with pine wood extract (natural medium of the fungus).

The use of the MA medium is recommended because of the ease of acquiring corn flour. Lin and Chen (2007) and Chegwin and Nieto (2013) reported that flour-based media have an ideal C/N ratio for the production of biomass and other metabolites, essential parameters for a strain to be susceptible to culture.

On the other hand, in both strains there are differences in hyphal width based on the culture medium used. The widest hyphae of *G. dryophilus* correspond to NA medium at 18 °C (3.9 mm), NA at 25 °C (3.7 mm), MA at 18 °C (3.1 mm) and MA at 25 °C (3.4 mm), where the GR and biomass were higher compared to PDA at 18 °C (2.9 mm) and 25 °C (2.7 mm) and MEA at 18 °C (3.0 mm) and 25 °C (2.7 mm), where mycelial growth was lower and there were even more parietal extensions. According to Harris (2008), the formation of extensions is because the mycelium seeks nutrients in the medium, being forced to generate more hyphae but of lesser thickness; this was not reflected in the mycelial growth rate, but in the production of biomass. Likewise, *L. perlatum* hyphae were thicker in NA at 18 °C (3.7 mm), NA at 25 °C (3.4 mm), MA at 18 °C (3.3 mm) and MA at 25 °C (3.1 mm), corresponding to the treatments where GR and biomass were higher. In SA at 18 °C (2.8 mm) and 25 °C (2.7 mm), and PDA at 18 °C (2.5 mm) and 25 °C (2.9 mm), *L. perlatum* hyphae were thinner and with more parietal extensions, extending apically to obtain the necessary nutrients (Sánchez & Royse, 2002).

Another factor of utmost importance is the pH of the media. The fungus *G. dryophilus* showed a lower GR and biomass in treatments with lower pH (MEA = 4.7 and PDA = 5.6) compared to MA = 6.3 and NA = 5.8, suggesting that the optimum pH is within this range. In the same way, *L. perlatum* had better mycelial development in MA = 6.3 and NA = 5.8, and the lowest values were obtained in PDA = 5.6, SA = 5.6 and even MEA = 4.7, where growth was almost nil. This indicates that the optimum pH for this species is also closer to neutral pH.

León-Avendaño et al. (2013). En el caso de *G. dryophilus* podría deberse a que todos los medios de cultivo cuentan con los nutrientes necesarios, por lo que no existen interacciones entre temperatura y los medios de cultivo sobre la TC. No obstante, la biomasa sí se ve afectada por la interacción entre la temperatura y los medios de cultivo ($P < 0.05$, Cuadro 1). En PDA y EMA a 18 y 25 °C, la densidad del micelio fue más baja, reflejándose en una menor producción de biomasa, en contraste con el medio AM en el que desarrolló micelio aéreo muy abundante. Para *L. perlatum*, la densidad y velocidad de crecimiento miceliar se ven afectados por los tratamientos ($P < 0.05$, Cuadro 1). En este caso, el medio AA a 18 y 25 °C produjo mayor crecimiento miceliar y densidad seguido por AM a 18 °C (micelio aéreo en ambos medios), mientras que en PDA a 18 y 25 °C se obtuvieron los valores más bajos de crecimiento.

Los valores más altos de TC y biomasa en ambas especies se obtuvieron con los medios AA y AM, lo cual se atribuye a que el medio AA está elaborado a base de acículas de pino, brindando al micelio las condiciones de su medio natural. Esto concuerda con lo reportado por Gaitán-Hernández (2000), quien demuestra que el mayor crecimiento miceliar de *Neolentinus suffrutescens* (Brot.) T. W. May & A. E. Wood fue obtenido en medios adicionados con extracto de madera de pino (medio natural del hongo).

El uso del medio AM se recomienda debido a la facilidad para adquirir harina de maíz. Lin y Chen (2007) y Chegwin y Nieto (2013) reportaron que los medios elaborados con harinas disponen de una relación C/N ideal para la producción de biomasa y otros metabolitos, parámetros indispensables para que una cepa sea susceptible a cultivo.

Por otra parte, en ambas cepas existen diferencias en el ancho de las hifas de acuerdo con el medio de cultivo. Las hifas más anchas de *G. dryophilus* corresponden a los medios AA a 18 °C (3.9 mm), AA a 25 °C (3.7 mm), AM a 18 °C (3.1 mm) y AM a 25 °C (3.4 mm), donde la TC y biomasa fueron superior en comparación con PDA a 18 °C (2.9 mm) y 25 °C (2.7 mm) y EMA a 18 °C (3.0 mm) y 25 °C (2.7 mm), donde el crecimiento miceliar fue más bajo e incluso hubo mayor cantidad de prolongaciones parietales. De acuerdo con Harris (2008), la formación de prolongaciones se debe a que el micelio busca nutrientes en el medio viéndose obligado a generar más hifas, pero de menor grosor; esto no se reflejó en la tasa de crecimiento miceliar, pero sí en la producción de biomasa. Asimismo, las hifas de *L. perlatum* fueron más gruesas en AA a 18 °C (3.7 mm), AA a 25 °C (3.4 mm), AM a 18 °C (3.3 mm) y AM a 25 °C (3.1 mm), correspondientes a los tratamientos donde la TC y biomasa fueron mayores. En AS a 18 °C (2.8 mm) y 25 °C (2.7 mm), y PDA a 18 °C (2.5 mm) y 25 °C (2.9 mm), las hifas de *L. perlatum* fueron más delgadas y con más

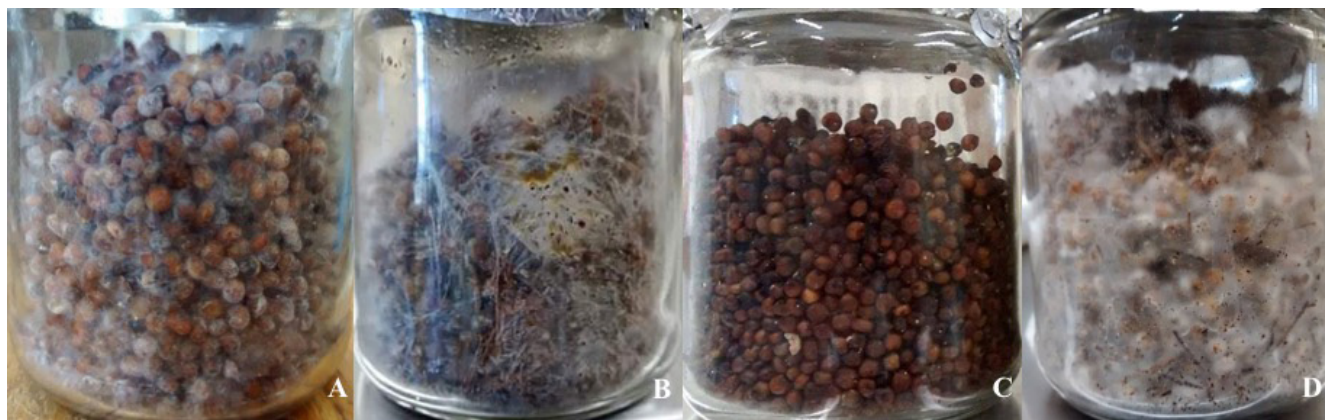


Figure 2. Mycelium of *Gymnopus dryophilus*: A) sorghum seed, B) sorghum seed supplemented with pine needles. Mycelium of *Lycoperdon perlatum* C) sorghum seed, D) sorghum seed supplemented with pine needles.

Figura 2. Micelio de *Gymnopus dryophilus*: A) semilla de sorgo, B) semilla de sorgo suplementada con acículas de pino. Micelio de *Lycoperdon perlatum* C) semilla de sorgo, D) semilla de sorgo suplementada con acículas de pino.

Evaluation of mycelial growth in seed used as an inoculum source

Invasion and mycelial density in seed

The density of *G. dryophilus* mycelium incubated at 18 °C in wheat (T1, 30 % moisture and pH 7.0) was 3.4 with 90 % invasion, and in sorghum (T2, 20% humidity and pH 7.3) the mycelial density was 3.2 with 90 % invasion (Figure 2A); in both cases, the mycelium was moderately dense. In wheat supplemented with pine needles (T3, 40 % moisture and pH 6.6) and in sorghum supplemented with pine needles (T4, 37% humidity and pH 6.9), the values increased considerably, obtaining a density of 4.2 and 100 % invasion in T3 and a density of 4.5 % and 100 % invasion of the grain in T4 (Figure 2B), in both cases with moderately dense mycelium.

In *L. perlatum*, the density of mycelium incubated at 18 °C in wheat (T1) and sorghum (T2, Figure 2C) was very low with an almost zero invasion percentage, corresponding to low density mycelium. By contrast, in supplemented wheat (T3) and supplemented sorghum (T4), mycelial density was 4.5 with 100 % mycelial invasion for T3, and a density of 4.8 and 100 % invasion of the grain for T4 (Figure 2D), both cases with moderately dense mycelium.

Regarding the invasion percentage and mycelial density in seed as an inoculum source, for both *G. dryophilus* and *L. perlatum*, the T4 treatment at 18 °C was the optimum one. This may be because pine needles provide a higher moisture percentage to the T3 and T4 treatments. Thus, there is a greater availability of water for the mycelium; additionally, the supplemented grain has pH (6.9) close to the optimum for mycelial development in solid medium.

prolongaciones parietales, extendiéndose apicalmente para conseguir los nutrientes necesarios (Sánchez & Royse, 2002).

Otro factor de suma importancia es el pH de los medios. El hongo *G. dryophilus* mostró TC y biomasa menor en los tratamientos con pH más bajo (EMA = 4.7 y PDA = 5.6) en comparación con AM = 6.3 y AA = 5.8, lo que sugiere que el pH óptimo se encuentra en este intervalo. De la misma forma, *L. perlatum* tuvo mejor desarrollo micelial en AM = 6.3 y AA = 5.8, y los valores más bajos se obtuvieron en PDA = 5.6, AS = 5.6 e incluso EMA = 4.7, donde el crecimiento fue casi nulo. Lo anterior indica que el pH óptimo para esta especie también se encuentra más cercano al pH neutro.

Evaluación del crecimiento micelial en semilla utilizada como fuente de inóculo

Invasión y densidad micelial en semilla

La densidad del micelio de *G. dryophilus* incubado a 18 °C en trigo (T1, 30 % de humedad y pH 7.0) fue de 3.4 con 90 % de invasión, y en sorgo (T2, 20 % de humedad y pH 7.3), la densidad del micelio fue de 3.2 con 90 % de invasión (Figura 2A); en ambos casos, el micelio fue medianamente denso. En el trigo suplementado con acículas de pino (T3, 40 % de humedad y pH 6.6) y en sorgo suplementado con acículas de pino (T4, 37 % de humedad y pH 6.9), los valores aumentaron considerablemente, obteniendo densidad de 4.2 y 100 % de invasión en T3 y densidad de 4.5 y 100 % de invasión del grano en T4 (Figura 2B), en ambos casos con micelio medianamente denso.

En *L. perlatum*, la densidad del micelio incubado a 18 °C en el trigo (T1) y sorgo (T2, Figura 2C) fue muy baja con un porcentaje de invasión casi nulo, correspondiente a un micelio poco denso. En contraste, en trigo

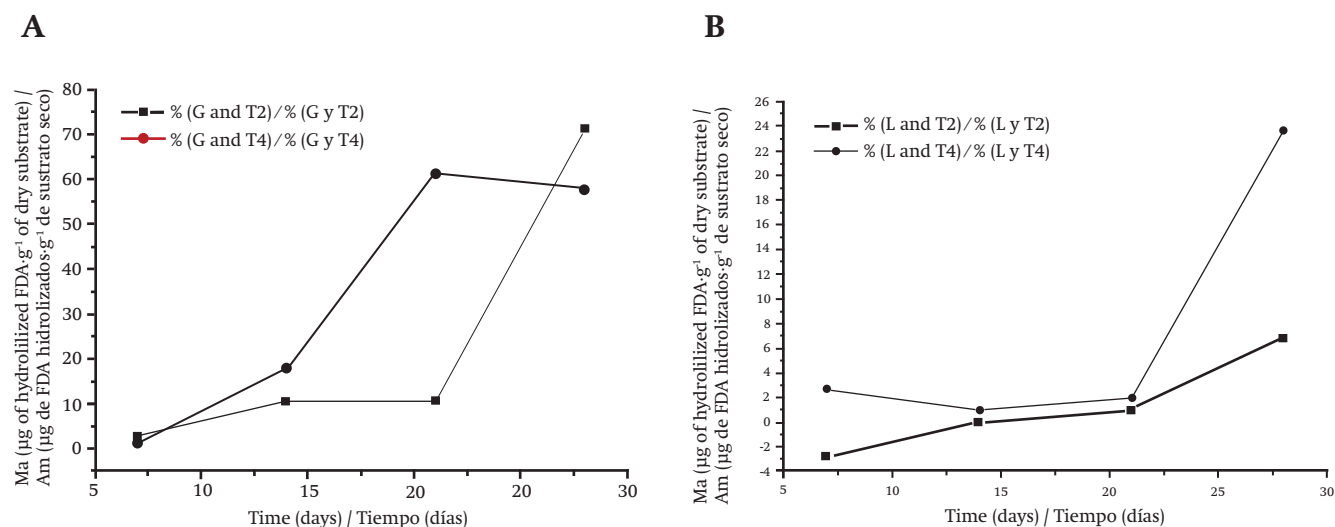


Figure 3. Metabolic activity (Ma) determined by fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis: A) *Gymnopus dryophilus* in sorghum (T2) and sorghum supplemented with pine needles (T4); B) *Lycoperdon perlatum* in sorghum (T2) and sorghum supplemented with pine needles (T4).

Figura 3. Actividad metabólica (Am) determinada por la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA): A) *Gymnopus dryophilus* en sorgo (T2) y sorgo suplementado con acículas de pino (T4); B) *Lycoperdon perlatum* en sorgo (T2) y sorgo suplementado con acículas de pino (T4).

Metabolic activity and mycelial growth rate in seed

Because *G. dryophilus* and *L. perlatum* showed better mycelial development in supplemented sorghum, the treatments comprising sorghum (T2) and sorghum supplemented with needles (T4) at 18 °C were used to estimate the metabolic activity (Ma) of the strains and contrast the mycelial development in a supplemented and non-supplemented substrate

The *G. dryophilus* mycelium presented an approximately 21-day latency phase in T2 (Figure 3A). After this period, the exponential phase reached values of 71.07 mg of hydrolyzed FDA·g⁻¹ of dry substrate. By contrast, *G. dryophilus* exhibited metabolic activity from the first week in T4, maintaining its growth until the third week with Ma of 61 mg of hydrolyzed FDA·g⁻¹ of dry substrate and a GR of 1.18 mm·d⁻¹.

Lycoperdon perlatum showed low Ma of 6.9 mg of hydrolyzed FDA·g⁻¹ of dry substrate in T2 (Figure 3B) and, therefore, very low biomass production. In T4, *L. perlatum* had higher metabolic activity of 23.6 mg of hydrolyzed FDA·g⁻¹ of dry substrate, because the supplemented substrate provided better conditions for mycelial development (37 % moisture and pH 6.9), although the exponential phase of the mycelium began after 21 days of incubation. The GR in T4 was 0.68 mm·d⁻¹.

In Figure 3A it can be seen that there is a decline in the Ma of *G. dryophilus* from 21 days in T4. This does not represent a cell death phase but rather denotes that its

suplementado (T3) y sorgo suplementado (T4), la densidad del micelio fue de 4.5 y 100 % de invasión del micelio para T3, y una densidad de 4.8 y 100 % de invasión del grano para T4 (Figura 2D), ambos casos con micelio medianamente denso.

Respecto al porcentaje de invasión y densidad miceliar en semilla como fuente de inóculo, tanto para *G. dryophilus* como para *L. perlatum*, el tratamiento T4 a 18 °C fue el óptimo. Esto puede deberse a que las acículas de pino le proporcionan mayor porcentaje de humedad a los tratamientos T3 y T4, de esta forma hay mayor disponibilidad de agua para el micelio, además de que el grano suplementado presenta pH (6.9) próximo al óptimo para el desarrollo de micelio en medio sólido.

Actividad metabólica y tasa de crecimiento miceliar en semilla

Debido a que *G. dryophilus* y *L. perlatum* presentaron mejor desarrollo miceliar en sorgo suplementado, los tratamientos de sorgo (T2) y sorgo suplementado con acículas (T4) a 18 °C se utilizaron para estimar la actividad metabólica (Am) de las cepas y contrastar el desarrollo miceliar en un sustrato suplementado y sin suplementar.

El micelio de *G. dryophilus* presentó una fase de latencia de aproximadamente 21 días en el T2 (Figura 3A). Después de este periodo, la fase exponencial alcanzó valores de 71.07 mg de FDA hidrolizados·g⁻¹ de sustrato seco. En contraste, *G. dryophilus* presentó actividad metabólica desde la primera semana en T4, manteniendo su

energy expenditure is focused on metabolic functions different from biomass production, such as, possibly, the preparation of the mycelium for fruiting, as mentioned by Mata et al. (2011). The fungus *G. dryophilus* secretes exudates due to the addition of needles; Gaitán-Hernández et al. (2014) attribute this to the fact that the mycelium is in a mature state and ready for fruiting, in contrast to T2 where after 21 days of incubation the exponential production of biomass begins. Due to the above, it is considered that the supplemented sorghum (T4) at 18 °C is the optimal treatment for the production of *G. dryophilus* inoculum.

Lycoperdon perlatum showed very low Ma in both treatments. In T2 this is possibly due to the fact that the moisture conditions (20 %) are very low, and that the pH (7.3) is above the optimum (6.3) for the development of the strain, thereby inhibiting the development of the mycelium. The fungus *L. perlatum* was able to reach higher Ma values in T4 during a longer incubation period; however, biomass and GR values are too low to consider this treatment as an option for inoculum production.

According to Villegas (2007), seeds provide a high content of carbohydrates and proteins that allow for good mycelial development; however, the mycelial growth and biomass production of *G. dryophilus* and *L. perlatum* were greater in seeds supplemented with pine needles. This is attributed to the fact that needles are the natural medium of fungi, so they are adapted to grow in it. Mata et al. (2011) indicate that the mycelium could produce lignocellulolytic enzymes that give it the capacity to properly exploit the nutrients in the substrate, thus facilitating its growth; Gaitán-Hernández and Salmones (2015) also report the presence of chemical elements that favor greater enzymatic activity of the fungus. The rapid invasion of the mycelium on the grain is of utmost importance for the optimization of culture processes (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015), so it is recommended to use the seed inoculum supplemented with pine needles. In addition, by supplementing the seed with compounds of complex organic structures, contamination by other fungi decreases significantly (Mata et al., 1998).

Mycelial growth rate in liquid culture

The medium used had pH 7.27. The fungus *G. dryophilus* had a GR of 0.11 g of dry biomass·d⁻¹, reaching 7.3 g of centrifuged fresh biomass. *Lycoperdon perlatum* presented a GR of 0.12 g of dry biomass d⁻¹ and 2.4 g of centrifuged fresh biomass.

The amount of *G. dryophilus* biomass in liquid culture is significant because the greatest effect is exerted by the available carbon source in corn flour (Torres-López et al., 2011). In spite of this, it is recommended to use seed

crecimiento hasta la tercera semana con Am de 61 mg de FDA hidrolizados·g⁻¹ de sustrato seco y TC de 1.18 mm·d⁻¹.

Lycoperdon perlatum presentó Am baja de 6.9 mg de FDA hidrolizados·g⁻¹ de sustrato seco en T2 (Figura 3B) y, por consiguiente, una producción de biomasa muy baja. En T4, *L. perlatum* presentó mayor actividad metabólica de 23.6 mg de FDA hidrolizados·g⁻¹ de sustrato seco, debido a que el sustrato suplementado le proporcionó mejores condiciones para el desarrollo del micelio (37 % de humedad y pH 6.9), aunque la fase exponencial del micelio comenzó después de los 21 días de incubación. La TC en T4 fue 0.68 mm·d⁻¹.

En la Figura 3A se puede notar que hay un declive de la Am de *G. dryophilus* a partir de los 21 días en el T4. Esto no representa una fase de muerte celular sino más bien denota que su gasto energético se enfocó en funciones metabólicas diferentes a la producción de biomasa, como podría ser la preparación del micelio para su fructificación, tal como lo mencionan Mata et al. (2011). El hongo *G. dryophilus* segrega exudados debido a la adición de acículas; Gaitán-Hernández et al. (2014) lo atribuyen a que el micelio se encuentra en un estado maduro y listo para la fructificación en comparación con el T2, donde después de los 21 días de incubación comienza la producción exponencial de biomasa. Por lo anterior, se considera que el sorgo suplementado (T4) a 18 °C es el tratamiento óptimo, para la producción de inóculo de *G. dryophilus*.

Lycoperdon perlatum presentó Am muy baja en ambos tratamientos. En el T2 se debe posiblemente a que las condiciones de humedad (20 %) son muy bajas, además de que el pH (7.3) está por encima del óptimo (6.3) para el desarrollo de la cepa, inhibiendo el desarrollo del micelio. El hongo *L. perlatum* podría alcanzar valores más altos de Am en T4 en un periodo de incubación mayor; sin embargo, los valores de biomasa y TC son bajos para considerar dicho tratamiento como una opción para la producción de inóculo.

De acuerdo con Villegas (2007), las semillas proporcionan alto contenido de carbohidratos y proteínas que permiten un buen desarrollo del micelio; sin embargo, el crecimiento micelial y producción de biomasa de *G. dryophilus* y *L. perlatum* fueron mayores en las semillas suplementadas con acículas de pino. Esto se atribuye a que las acículas son el medio natural de los hongos, por lo que están adaptados a crecer en él. Mata et al. (2011) indican que el micelio podría producir enzimas lignocelulolíticas que le brindan la capacidad de explotar adecuadamente los nutrientes del sustrato, facilitando así su crecimiento; Gaitán-Hernández y Salmones (2015) también reportan la presencia de elementos químicos que favorecen una mayor actividad enzimática del hongo. La rápida invasión del micelio sobre el grano

as an inoculation source, since it is more accessible, specialized equipment is not needed for preparing it and it is more economical (Sánchez & Royse, 2002); in addition, it has the capacity to inoculate a greater amount of substrate. By contrast, for *L. perlatum* it is recommended to use liquid culture for its production, since the biomass and GR obtained with the seed are very low and it is not feasible to develop inoculum at a larger scale.

Conclusions

Mycelial growth of *Bovista aestivalis*, *Infundibulicybe squamulosa*, *I. gibba*, *Gymnopus dryophilus* and *Lycoperdon perlatum*, in solid medium, was higher in unconventional media such as corn agar and pine needle agar at 18 °C. *Gymnopus dryophilus* and *L. perlatum* showed higher invasion, density, growth rate and mycelial biomass production values in sorghum seeds supplemented with 10 % pine needles, used as an inoculation source, than in grains without supplementation; in addition, the incubation time was lower. In the case of *L. perlatum* it is possible to use liquid culture for its production, since the biomass and growth rate in sorghum were very low and it is not feasible to develop inoculum at a greater scale. The *G. dryophilus* strain is susceptible to culture; the optimal conditions are found in flour-based solid media and in sorghum supplemented with pine needles at approximately 18 °C and near-neutral pH. According to the evaluation of mycelial growth and in the absence of similar studies, the results should serve as a basis for further studies on *in vitro* culture of the five species from the central Mexican highlands.

Acknowledgments

The authors thank CONACYT for the grant awarded to the first author and the Autonomous University of the State of Mexico's SyEA for the project funding (3687/2014/CIA).

End of English version

References / Referencias

- Alvarado-Castillo, G., Mata, G., & Benítez-Badillo, G. (2015). Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque*, 36(2), 151–161. doi: 10.4067/S0717-92002015000200001
- Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., & Franco-Maass, S. (2014). Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias*
- es de suma importancia para la optimización de los procesos de cultivo (Gaitán-Hernández & Salmones, 2015), por lo que se recomienda utilizar el inóculo en semilla suplementada con acículas de pino. Además, al suplementar la semilla con compuestos de estructuras orgánicas complejas, la contaminación por otros hongos disminuye significativamente (Mata et al., 1998).
- ### Tasa de crecimiento miceliar en cultivo líquido
- El medio utilizado presentó pH 7.27. El hongo *G. dryophilus* tuvo una TC de 0.11 g de biomasa seca·d⁻¹, alcanzando 7.3 g de biomasa fresca centrifugada. *Lycoperdon perlatum* presentó una TC de 0.12 g de biomasa seca·d⁻¹ y 2.4 g de biomasa fresca centrifugada.
- La cantidad de biomasa de *G. dryophilus* en cultivo líquido es considerable debido a que el mayor efecto lo ejerce la fuente de carbono disponible en la harina de maíz (Torres-López et al., 2011). A pesar de ello, se recomienda utilizar semilla como fuente de inoculación, ya que es más accesible, no se necesitan equipos especializados para la elaboración y es más económico (Sánchez & Royse, 2002), además de que tiene la capacidad de inocular mayor cantidad de sustrato. En contraste, para el caso de *L. perlatum* se recomienda utilizar cultivo líquido para su producción, ya que la biomasa y TC obtenidas con la semilla son muy bajas y no es viable elaborar inóculo a una escala mayor.
- ### Conclusiones
- El crecimiento miceliar de *Bovista aestivalis*, *Infundibulicybe squamulosa*, *I. gibba*, *Gymnopus dryophilus* y *Lycoperdon perlatum*, en medio sólido, fue mayor en los medios no convencionales como agar maíz y agar acículas de pino a 18 °C. *Gymnopus dryophilus* y *L. perlatum* mostraron valores más altos de invasión, densidad, tasa de crecimiento y producción de biomasa miceliar en semillas de sorgo suplementadas con acículas de pino al 10 %, utilizadas como fuente de inoculación, que en los granos sin suplemento; además, el tiempo de incubación fue menor. En el caso de *L. perlatum* es posible utilizar cultivo líquido para su producción, ya que la biomasa y tasa de crecimiento en sorgo fueron muy bajas y no es viable elaborar inóculo a una escala mayor. La cepa de *G. dryophilus* es susceptible al cultivo; las condiciones óptimas se encuentran en medios sólidos a base de harina y en sorgo suplementado con acículas de pino, aproximadamente a 18 °C y pH cercano al neutro. De acuerdo con la evaluación del crecimiento miceliar y a que no se cuenta con trabajos similares, los resultados fungen como base para estudios posteriores sobre el cultivo *in vitro* de las cinco especies de alta montaña del centro de México.

- Forestales y del Ambiente*, 20(3), 213–226. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.04.017
- Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R., & Zizumbo-Villarreal, L. (2012). Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la region de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 1–16. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/883/88325120004.pdf>
- Carreño-Ruiz, S. D., Capello-García, S., Gaitán-Hernández, R., Cifuentes-Blanco, J., & Rosique-Gil, E. (2014). Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1447–1458. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v5n8/v5n8a9.pdf>
- Cruz-Ulloa, B. S. (1995). *Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos*. México: Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM.
- Chegwin, C., & Nieto, I. J. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivados por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereal como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 1–9. Retrieved from <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2013/06/RMM-Tr-256-version-paginada-1-9.pdf>
- Delgado, A., Villegas, M., & Cifuentes, J. (2005). *Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar*. México: UNAM.
- Franco-Maass, S., Burrola-Aguilar, C., & Arana-Gabriel, Y. (2012). *Hongos silvestres comestibles: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca*. México: EON.
- Gaitán-Hernández, R. (2000). Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 20–24. Retrieved from <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/020024.pdf>
- Gaitán-Hernández, R., & Báez-Rodríguez, I. (2008). Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Revista Mexicana de Micología*, 26, 41–49. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v26/v26a7.pdf>
- Gaitán-Hernández, R., Cortés, N., & Mata, G. (2014). Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 467–474. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166270/>
- Gaitán-Hernández, R., & Salmones, D. (2015). Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1639–1652. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a17.pdf>
- Garibay-Orijel, R., Cordova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estrada-Torres, A., & Kong, A. (2009). Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*, 258(2), 122–131. doi: 10.1016/j.foreco.2009.03.051
- 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.
- Harris, S. (2008). Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823–832. doi: 10.3852/08-177
- León-Avedaño, H., Martínez-García, R., Caballero, P., & Martínez-Carrera, D. (2013). Caracterización de dos cepas de *Pleurotus djamor* nativas de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 1285–1291. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263128353019.pdf>
- Lin, E. S., & Chen, Y. H. (2007). Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology*, 98, 2511–2517. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.008
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., & Martínez, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. En J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata, & H. Leal (Eds.), *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. México: ECOSUR-CONACYT.
- Mata, G., Ortega, C., & Pérez-Merlo, R. (2011). Inóculo suplementado: evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 53–61. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v34/v34a8.pdf>
- Mata, G., & Savoie, J. M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 513–519. doi: 10.1023/A:1008886521091
- Mata, G., Savoie, J. M., Delpech, P., & Olivier, J. M. (1998). Reductions of the incidence of *Trichoderma* spp. using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *Lentinula edodes* on pasteurised wheat straw. *Agronomie: Agriculture and Environment*, 18(8-9), 515–520. Retrieved from <https://hal.inria.fr/file/index/docid/885900/filename/hal-00885900.pdf>

Fin de la versión en español

- Mayett, Y., & Martínez-Carrera, D. (2010). El consumo de hongos comestibles y su relevancia en la seguridad alimentaria de México. In D. Martínez-Carrera, N. Curvett, 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*. Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC, UAEM, UPAEP, IMINAP.
- Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., Ramírez-Carrasco, P., Tello, I., ...Martínez-Carrera, D. (2010). Hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología y desarrollo del sistema de producción-consumo. En D. Martínez-Carrera, N. Curvett, 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*. Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC, UAEM, UPAEP, IMINAP.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola (FIDA), & Programa Mundial de Alimentos (PMA). (2006). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales progresos*. Roma, Italia: Autor. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i4646s.pdf>
- Salmones, D., Ballesteros, H., Zulueta, R., & Mata, G. (2012). Determinación de las características productivas de cepas mexicanas silvestres de *Agaricus bisporus*, para su potencial uso comercial. *Revista Mexicana de Micología*, 36, 9–15. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v36/v36a3.pdf>
- Sánchez-Jasso, J. M., Aguilar-Miguel, X., Medina-Castro, J. P., & Sierra-Domínguez, G. (2013). Riqueza específica de vertebrados en un bosque reforestado del Parque Nacional Nevado de Toluca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 360–373. doi: 10.7550/rmb.29473
- Sánchez, J. E., & Royse, D. (2002). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* México: LIMUSA.
- 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(6), 575–584. Retrieved from <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2003/nov-dic/art-3.pdf>
- Statpoint Technologies, Inc. (2009). *Statgraphics Centurion XVI*. Warrenton, Virginia, USA: Author.
- Swisher, R., & Carrol, G. C. (1980). Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbiology and Ecology*, 6, 217–226. doi: 10.1007/BF02010387
- Torres-López, A., Quinter, J. C., & Tehortua, A. L. (2011). Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 103–109. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/25538/2/22949-79510-1-PB.pdf>
- Trigos, A., & Suárez-Medellín, J. (2010). Los hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. En D. Martínez-Carrera, N. Curvett, 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*. Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC, UAEM, UPAEP, IMINAP.
- Villegas, E. V. (2007). Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivo sólido para la producción de micelio como inóculo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 56–63. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/776/77690206.pdf>