

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

Yolanda Arana-Gabriel¹
Cristina Burrola-Aguilar^{1§}
Carmen Zepeda Gómez¹
Sergio Franco-Maass²
Gerardo Mata Montes de Oca³

¹Centro de Investigación en Recursos Bióticos-Facultad de Ciencias-Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Atlacomulco km 14.5, Toluca, Estado de México. CP. 50200. (yaranag@uaemex.mx; cba@uaemex.mx; zepedac@uaemex.mx). ²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales-Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. (sfrancom@uaemex.mx). ³Instituto de Ecología AC. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, México. CP. 91070. (gerardo.mata@inecol.edu.mx).

§Autor para correspondencia: cba@uaemex.mx.

Resumen

La producción de inóculo es un proceso que requiere de su optimización, ya que, en gran parte depende generar una mayor eficiencia biológica en el cultivo de hongos, reducir los costos económicos, así como problemas de contaminación y tiempo en los ciclos de cultivo. En la presente investigación, durante el año 2016, se evaluó la colonización de cuatro sustratos (rastrojo de maíz, aserrín de *Quercus* sp., aserrín de *Senecio cinerarioides* y rastrojo de maíz en combinación con aserrín de *S. cinerarioides*) con inóculo líquido y sólido de *F. mexicana* (cepas IE 974, IE 984, IE 985, IE 986). Como resultados se obtuvo que la velocidad de colonización de los diferentes sustratos varió entre las cuatro cepas ($p \leq 0.0001$). Los sustratos con inóculo sólido presentaron velocidades de crecimiento menores respecto al inóculo líquido, los sustratos con inóculo líquido fueron colonizados en un periodo de 17 días y con inóculo sólido tardaron 50 días y en algunos casos hubo partes que no fueron colonizadas; lo cual también estuvo relacionado con el sustrato utilizado, presentando una interacción ($p \leq 0.0001$) entre el tipo de inóculo y el sustrato que afecta la velocidad de crecimiento. La incorporación de inóculo líquido en el cultivo de hongos permite aumentar la densidad y velocidad de crecimiento micelial, así como la aparición temprana de primordios, lo que contribuye a reducir el tiempo en el ciclo de cultivo.

palabras clave: pellets, primordios, rastrojo de maíz, trigo, velocidad de crecimiento.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: febrero de 2019

Introducción

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

Flammulina velutipes es una especie cosmopolita, tolerante a temperaturas menores de 18 °C, es conocida como enokitake, enoki, hongo de invierno o seta de aguja de oro en países como China, Japón, Siberia, Estados Unidos de América, Australia y Taiwán. En Asia es un hongo altamente apreciado por sus propiedades medicinales y alto valor nutricional; además, se considera como un producto de calidad gourmet (Chang y Miles, 2004; Sharma *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2012).

En México, *F. velutipes* es comercializada únicamente en supermercados, principalmente en la región central del país (Mayett y Martínez-Carrera, 2010). Por otra parte, *Flammulina mexicana*, es una especie silvestre endémica de México que se desarrolla sobre tallos y ramas de la jara (*Senecio cinerarioides*) en las zonas de bosque de *Pinus* y *Abies* del centro de México a altitudes superiores de 2 700 m y a una temperatura media menor a 18 °C (Redhead *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2012; Arana-Gabriel *et al.*, 2014). Suele extraerse para autoconsumo y se encuentra dentro de las 20 especies de hongos de mayor importancia cultural en algunas localidades del Nevado de Toluca, México (Franco *et al.*, 2012; San Román, 2014; De la Garza, 2017).

En fechas recientes se ha venido desarrollando el cultivo a nivel experimental de *F. mexicana* sobre diversos sustratos como la jara (*S. cinerarioides*), rastrojo de maíz (*Zea mays*) y aserrín de encino (*Quercus* sp.) (Arana-Gabriel, 2018). El proceso de cultivo de los hongos involucra diferentes fases; la preparación del sustrato, preparación de inóculo, inoculación de sustratos e inducción de cuerpos fructíferos. La ejecución adecuada y secuencia de cada una de dichas fases, al final del proceso representa una producción exitosa o no de cuerpos fructíferos. Una de las etapas en la que se debe de tener especial cuidado es la preparación de inóculo, ya que este incide directamente en el tiempo de colonización, la densidad del micelio y eficiencia biológica (Kawai *et al.*, 1996; Rosado *et al.*, 2002; Abdullah *et al.*, 2013).

La producción de inóculo es un proceso que se basa, principalmente, en la fermentación sólida en granos de gramíneas como trigo, sorgo, cebada y mijo. A escala industrial, este proceso es costoso dado el uso de equipo de esterilización e incubación y materiales como tipo de grano utilizado y suplementos (Rosado *et al.*, 2002). Una alternativa para disminuir los costos de producción que implica el inóculo sólido es la sustitución de inóculo sólido por inóculo líquido. El uso de inóculo líquido permite una distribución uniforme del micelio en el sustrato, en periodos cortos de tiempo, lo que además reduce problemas de contaminación (Frieal y McLoughlin, 2000; Abdullah *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016).

Algunas especies de hongos en las que se han realizado trabajos de producción de inóculo líquido son *Pleurotus* spp. (Rosado *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2008; Abdullah *et al.*, 2013), *Agaricus bisporus* (Frieal y McLoughlin, 2000), *F. velutipes* (Hassan *et al.*, 2012), *Sparassis latifolia* (Ma

et al., 2016) y *Lentinula edodes* (Kawai *et al.*, 1996) ya que la mayor parte de investigaciones de producción de biomasa en fermentación sumergida son para la producción de metabolitos secundarios y polisacáridos (Petre *et al.*, 2010; Elisashvili, 2010).

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

Materiales y métodos

Material biológico

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

Producción de inóculo sólido

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

Producción de inóculo líquido y caracterización miceliar

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

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

Concluido el periodo de incubación, se midió el pH del medio y se caracterizó la biomasa tanto morfológicamente (forma y tamaño) como microscópicamente para tener reporte del comportamiento miceliar bajo condiciones de agitación. El color del micelio se reportó con la clave de color 'códigos de colores HTML' (html-color-codes.info/). Para la caracterización microscópica, se tomaron pequeñas muestras de micelio con las que se hicieron preparaciones temporales con rojo Congo al 10%, lo que permitió observar la presencia de fíbulas y descartar que el micelio producido estuviera contaminado. Asimismo, se midió el diámetro de las hifas a 100x (20 hifas por tratamiento) con la ayuda del programa Motic digital Microscope DMB3-223 (Motic China Group Co., Ltd., 2001-2004).

Posteriormente se filtró la biomasa, se lavó con agua destilada estéril para evitar que el medio de cultivo fuera un factor en la colonización de los sustratos y se homogenizó en un procesador de alimentos Magic Bullet Deluxe® durante 10 s con 100 ml de agua destilada estéril (modificado de Stamets, 2000). De igual manera se cuantificó la biomasa seca; después del periodo de incubación, la biomasa se filtró, se lavó con agua destilada estéril y se puso a secar en estufa a 80 °C por 24 h para su posterior pesado.

Evaluación del crecimiento miceliar en diferentes sustratos

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

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

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., 2009), los datos de velocidad de crecimiento miceliar se sometieron a un análisis de varianza (Anova) para determinar si había o no diferencias entre cepas, sustratos y tipo de inóculo (sólido y líquido) y un análisis multivariado de varianza (Manova) para determinar si había interacción entre los sustratos y el tipo de inóculo que afectara la velocidad de crecimiento. Las diferencias significativas se determinaron con una prueba de rangos múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$).

Obtención de cuerpos fructíferos

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

Resultados y discusión

Material biológico

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

Producción de inóculo sólido

Para la producción de inóculo primario, las semillas de trigo tardaron 20 días en presentar una colonización miceliar abundante (+++) de 100%. Con inóculo secundario el tiempo de colonización fue de 15 días (100% de grano invadido y micelio abundante), tiempo que se encuentra dentro del rango reportado para especies del género *Pleurotus* donde el crecimiento miceliar tarda de 20-26 días (Grisson *et al.*, 2008). El tiempo de colonización y densidad del micelio se encuentra en función de la cepa, sustrato utilizado, pH, porcentaje de humedad y temperatura de incubación. En la producción de inóculo sólido, se podrían utilizar otro tipo de semilla o aserrín suplementados; sin embargo, su uso depende de la disponibilidad y los costos de cada región. En este caso, el trigo es uno de los granos con más disponibilidad en cuanto a producción y costos en el Estado de México; además es considerado un buen vehículo para la propagación del micelio; la humedad de 70% y pH de 8.5 son valores que se encuentran dentro de los rangos reportados para el crecimiento del micelio ya que facilitan la disponibilidad de nutrientes (Ríos *et al.*, 2010).

Producción de inóculo líquido y caracterización miceliar

La producción de biomasa de las cuatro cepas IE 974, IE 984, IE 985 y IE 986 en medio líquido C-PL fue, en promedio, de 7.9 g L⁻¹ después de 20 días de agitación. El micelio formó pellets globosos y de superficie fimbrosa con un tamaño de 1.5 a 3 cm de diámetro. Microscópicamente, las hifas fueron lisas con diámetro de 1.1-3.3 µm, ramificadas, septadas y con fíbulas abundantes y frecuentes. La morfología del micelio (filamentos libres o pellets) y el tamaño de los pellets dependen de la intensidad de agitación; en cuanto a la cantidad de biomasa producida depende de la especie, cepa, fuente de carbono del medio de cultivo, pH y oxígeno disuelto (Cui *et al.*, 1997; Frial y McLoughlin, 2000; Grison *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2016). Por ejemplo, para *Sparassis latifolia*, que se ha llevado a obtención de biomasa en medio líquido, con una producción de 11.96 g L⁻¹ después de 15 días (Ma *et al.*, 2016) o para *Pleurotus pulmonarius* donde se obtuvo biomasa en tres días a partir de un biorreactor automatizado (Abdullah *et al.*, 2013).

Evaluación del crecimiento miceliar en diferentes sustratos

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

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

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento miceliar en diferentes sustratos.

Cepa	Sustrato	Tipo de inóculo	Velocidad de crecimiento miceliar (cm día ⁻¹)	Densidad del micelio
IE 974	AQ	S	0.41 defghi*	++
	ASC	S	0.42 cdefgh	+++
	RM	S	0.29 fghijkl	+++
	ASC+RM	S	0.38 defghij	+++
	AQ	L	0.44 bcdefg	++
	ASC	L	0.45 bcdef	+++
	RM	L	0.42 cdefgh	+++
	ASC+RM	L	0.71 a	+++
IE 984	AQ	S	0.41 defghi	++
	ASC	S	0.46 bcde	+++

Cepa	Sustrato	Tipo de inóculo	Velocidad de crecimiento miceliar (cm día ⁻¹)	Densidad del micelio
IE 985	RM	S	0.26 ijkl	+++
	ASC+RM	S	0.27 hijkl	+++
	AQ	L	0.26 ijkl	-
	ASC	L	0.13 l	-
	RM	L	0.22 jkl	-
	ASC+RM	L	0.21 kl	+
	AQ	S	0.41 defghi	++
	ASC	S	0.44 bcdefg	+++
	RM	S	0.28 ghijkl	+++
	ASC+RM	S	0.35 efghijk	+++
	AQ	L	0.41 defghi	++
	ASC	L	0.58 abc	+++
	RM	L	0.59 ab	+++
	ASC+RM	L	0.53 bcd	+++
IE 986	AQ	S	0.44 bcdefg	+
	ASC	S	0.48 bcde	+++
	RM	S	0.24 jkl	+++
	ASC+RM	S	0.38 defghij	+++
	AQ	L	0.44 bcdefg	++
	RM	L	0.71 a	+++
	ASC	L	0.26 ijkl	+++
	ASC+RM	L	0.69 a	+++

AQ= aserrín de *Quercus* sp.; ASC= aserrín de *S. Cinerariooides*; RM= rastrojo de maíz; ASC+RM= aserrín de *S. cinerariooides* y rastrojo de maíz; L= inóculo líquido; S= inóculo sólido; -= extremadamente escaso; += escaso; +++= moderado; ++++= abundante; * = letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

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

La rápida colonización de sustratos y maduración temprana del micelio con inóculo líquido también ha sido reportada para especies como *L. edodes* (Kawai *et al.*, 1996), *Pleurotus ostreatoroseus* (Rogéiro *et al.*, 2002) y *P. pulmonarius* (Abdullah *et al.*, 2013). Esto se debe a que el inóculo líquido se utiliza directamente en el sustrato (Frial y McLoughlin, 2000; Gregori *et al.*, 2007) aumentando el número de puntos de invasión donde se reinicia el crecimiento miceliar, comenzando a nutrirse directamente del sustrato. En el inóculo en trigo, por el contrario, disminuyen los puntos de invasión ya que se inicia por la parte superior de los tubos y en este caso, el micelio primero comenzó a nutrirse de la semilla retrasando así la colonización de los sustratos.



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

Otra desventaja de usar inóculo sólido, es que, cuando se utiliza continuamente un medio de cultivo con una fuente simple de hidratos de carbono, los hongos se vuelven menos eficientes en la colonización de sustratos y producción de cuerpos fructíferos, además de que no son viables metabólicamente (Rogéiro *et al.*, 2002).

El uso de inóculo líquido en la presente investigación tuvo resultados favorables desde el inicio de la colonización de los sustratos al tercer día; al contrario de la inoculación con trigo que comenzó al quinto día, tendencia también reportada para *L. edodes* (Kawai *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de la eficiencia en la colonización de los sustratos con inóculo líquido, Ma *et al.* (2016); Silveira *et al.* (2008) reportan que no existen diferencias en la eficiencia biológica en la producción de cuerpos fructíferos entre diferentes tipos de inóculo.

El éxito en el uso de inóculo líquido, se relaciona con la eficiencia a la hora de transferirlo al sustrato, permitiendo una colonización rápida, lo que se traduce en una reducción en la duración del ciclo de producción. La distribución más uniforme del inóculo en el sustrato, proporciona un crecimiento homogéneo del micelio, lo cual disminuye los costos tanto de mano de obra como de

materiales; así como la reducción considerable de problemas de contaminación por organismos antagonistas (Frieal y McLoughlin, 2000; Rogéiro *et al.*, 2002; Abdullah *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016). La aparición de hongos antagonistas puede inhibir el crecimiento del micelio y reducir o anular la producción de las fructificaciones; lo que representa una de las necesidades fundamentales en la industria del cultivo de los hongos comestibles (Mata *et al.*, 2011).

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

Obtención de cuerpos fructíferos

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

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



Figura 2. Primordios de *F. mexicana*.

A pesar que, en la presente investigación, la producción de biomasa en medio líquido se llevó a cabo en sistema en Bach, este procedimiento puede ser escalado a nivel de biorreactor para su optimización y automatización; lo que permitiría aumentar la biomasa producida y reducir considerablemente la producción inóculo y el ciclo de cultivo. Por otra parte, el uso de germoplasma nativo puede diversificar las especies cultivadas comestibles y con propiedades funcionales, así como trabajar con especies de importancia cultural en cada región y utilizar los sustratos disponibles y aptos para su cultivo (Morales *et al.*, 2010).

Conclusiones

Generalmente, el cultivo sumergido o líquido se lleva a cabo para la obtención de sustancias bioactivas, pero al generar altas cantidades de biomasa en periodos cortos de tiempo y espacios pequeños, esta puede utilizarse como inóculo sobre un sustrato sólido. Los resultados fueron favorables utilizando inóculo líquido a base de croquetas para perro adicionado con extracto de levadura y peptona de gelatina, obteniendo en promedio 7.9 g L⁻¹ de biomasa seca en las cuatro cepas utilizadas de *F. mexicana*. La eficiencia entre inóculo sólido y líquido se midió con base a la velocidad de colonización de los sustratos y densidad del micelio. El rastrojo de maíz y rastrojo de maíz con aserrín de jara fueron los sustratos en donde la velocidad de crecimiento fue mayor con las cepas IE 974 y IE 986 de *F. mexicana* con inóculo líquido. Tanto las cepas como el sustrato e inóculo interfieren en la pronta colonización de los sustratos y la densidad miceliar, así como en la producción de cuerpos fructíferos. Realizar este tipo de investigaciones permite identificar y modificar los factores que deben ser considerados para el cultivo de especies comerciales o determinar la viabilidad de cepas de especies silvestres, antes de ser llevados a un cultivo a escala experimental, comercial o industrial. Tanto las cepas como el tipo de sustratos e inóculo interfieren en la pronta colonización y densidad miceliar así como en la producción de cuerpos fructíferos.

Literatura citada

- Abdullah, N.; Ismail, R., Johari, N. M. K. and Annuar, M. S. M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéil by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Sci. Hortic.* 161(1):65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>.
- Arana-Gabriel, Y.; Burrola-Aguilar, C.; Garibay-Orijel, R. y Franco-Maass, S. 2014. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 20(3):213-226. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>.
- Arana-Gabriel, Y. 2018. Cultivo experimental de hongos comestibles silvestres: *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum secc. Difformia*. Toluca Estado de México. Tesis Doctoral (Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales). Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Facultad de Ciencias. 117 p.
- Carreño-Ruiz, S. D.; Capello-García, S.; Gaitán-Hernández, R.; Cifuentes-Blanco, J. y Rosique-Gil, E. 2014. Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 5(8):1447-1458. <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263137780009.pdf>.
- Chang, S. T. and Miles, P. G. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact*. CRC Press. Boca Raton. 480 p.

- Cui, Y. Q.; van der Lans, J. M. and Luyben, K. C. A. M. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55(5):715-726. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970905\)55:5<715:AID-BIT2>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715:AID-BIT2>3.0.CO;2-E).
- Cruz-Ulloa, B. S. 1995. Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos. 1^{ra}. (Ed). Universidad Nacional Autónoma de México (UAEM). Estado de México. 102 p.
- De la Garza, P. M. 2017. Integración del patrimonio biocultural sobre los hongos como estrategia de desarrollo sostenible en el parque ecoturístico de Cacalomacán, Estado de México. Toluca Estado de México. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales). Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Facultad de Ciencias. 77 p.
- Elisashvili, V. 2012. Submerged cultivation of medical mushrooms: bioprocesses and products (Review). *Int. J. Med. Mushrooms.* 14(3):211-239. <http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i3.10>.
- Franco, M. S.; Burrola-Aguilar, C. y Arana-Gabriel, Y. 2012. Hongos comestibles silvestres: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. EON, México. 342 p.
- Frietal, M. T. and McLoughlin, A. J. 2000. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. *Biotechnol. Lett.* 22(5):351-354. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005616516646>.
- Grisson, C. F.; Marchetto, R.; Bettin, F.; Camassola, M.; Salvador, M. and Pinheiro, D. A. J. 2008. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 35(10):1149-1155. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0394-x>.
- Gregori, A.; Svagelj, M. and Pohleven, J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol. Biotechnol.* 45(3):236-247. <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2007/July-September/45-238.pdf>.
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmenes, D.; Soto-Velazco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 2013. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. 1^{ra}. (Ed). Instituto Politécnico Nacional. México. 245 p.
- Hassan, F. R. H.; Ghada, M. M. M. and El-Kady, A. T. M. 2012. Mycelial biomass production of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) by submerged culture. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* 6(7):603-610. <https://pdfs.semanticscholar.org/a73d/9056a3d7c1a60b1ca02f61b82fea2244e1c7.pdf>.
- Huerta, G.; Martínez-Carrera, D.; Sánchez, J. E. y Leal-Lara, H. 2009. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Rev. Mex. Micol.* 30(1):31-42. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S0187-31802009000200004>.
- Kawai, G.; Kobayashi, H.; Fukushima, Y. and Ohsaki, K. 1996. Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mycoscience.* 37(2):201-207. <https://doi.org/10.1007/BF02461345>.
- Ma, L.; Quan, L. Y.; Yang, C.; He, Y. Z. and Ling, J. X. 2016. Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust. *Sci. Hortic.* 209(1):22-30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.001>.
- Mata, G.; Ortega, S. C. y Pérez, M. R. 2011. Inóculo suplementado: evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café. *Rev. Mex. Micol.* 4(1):53-61. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S0187-31802011000200008>.

- Mayett, Y. y Martínez-Carrera, D. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. *In: Martínez-Carrera, D.; Curvetto, N.; Sobal, M.; Morales, P. y Mora, V. M. (Eds.). Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. México. 293-329 pp.*
- Morales, P.; Sobal, M.; Bonilla, M.; Martínez, W.; Ramírez-Carrasco, P.; Tello, I.; Spezzia, T.; Lira, N.; De Lima, R.; Villa, S.; Montiel, E. y Martínez-Carrera, D. 2010. *In: Martínez-Carrera, D.; Curvetto, N.; Sobal, M.; Morales, P. y Mora, V. M. (Eds.). Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. México. 91-108 pp.*
- Petre, M.; Teodorescu, A.; Țuluca E.; Bejan, C. and Andronescu A. 2010. Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15(2):50-55. <https://www.rombio.eu/rbl1vol15Supplement/7%20Petre%20Marian.pdf>.
- Psurtseva, N. V. 2005. Modern taxonomy and medical value of the *Flammulina* mushrooms. *Int. J. Med. Mushrooms* 7(3):449-451. [http://www.dl.begellhouse.com/download/article/09c9296052c6992a/IJM%200703%20\(449-451\).pdf](http://www.dl.begellhouse.com/download/article/09c9296052c6992a/IJM%200703%20(449-451).pdf).
- Redhead, A. S.; Estrada-Torres, A. and Petersen, H. R. 2000. *Flammulina mexicana*, a New Mexican Species. *Mycologia*. 92(5):1009-1018. <https://doi.org/10.2307/3761595>.
- Ríos, M.; Hoyos, J. y Mosquera, S. 2010. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *P. ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Rev. Bio. Agro.* 8(2):86-94. <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S1692-35612010000200012>.
- Rosado, F. R.; Kemmelmeier, C. and Da Costa, S. M. 2002. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *J. Basic. Microbiol.* 42(1):37-44. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<37:AID-JOBM37>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<37:AID-JOBM37>3.0.CO;2-S).
- San Roman, A. E. 2014. Conocimiento tradicional en el aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en el Nevado de Toluca. Toluca, Estado de México. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales) Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Facultad de Ciencias. 57 p.
- Sharma, V. P; Kumar, S. and Tewari, R. P. 2008. *Flammulina velutipes*, the culinary medicinal winter mushroom. Technical Bulletin. Directorate of Mushroom Research, New Delhi. 53 p.
- Shrestha, B.; Lee, W. H.; Han, S. K. and Sung, J. M. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology*. 34(2):83-91. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.2.083>.
- Silveira, M.; Furlan S. and Ninow J. 2008. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(4):858-862. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400014>.
- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten speed press, China. 596 p.
- Stamets, P. 2005. Mycelium running: how mushrooms can help save the world (Ed.) 1th. Ten Speed Press. Estados Unidos de América. 356 p.
- Tradd, C. 2014. Organic mushroom farming and mycoremediation: simple to advanced and experimental techniques for indoor and outdoor cultivation. Chelsea Green Publishing. Estados Unidos de América. 277-280 pp.