



Posgrado en Ciencias Biológicas

Aislamiento, identificación, crecimiento *in vitro* y conservación  
de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de *Juniperus*  
del estado de Tlaxcala

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Rut Ortega Ávila

Co-Directores:

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018





Posgrado en Ciencias Biológicas

Aislamiento, identificación, crecimiento *in vitro* y conservación  
de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de *Juniperus*  
del estado de Tlaxcala

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Rut Ortega Ávila

Comité Tutoral

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Dr. Arturo Estrada Torres

Dra. Margarita Villegas Ríos

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
Posgrado en Ciencias Biológicas



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**PRESENTE**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Rut Ortega Ávila** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **"Aislamiento, identificación, crecimiento *in vitro* y conservación de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de *Juniperus* del estado de Tlaxcala"**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 29 DE 2017

  
DR. ARTURO ESTRADA TORRES

  
DRA. MARGARITA VILLEGAS RÍOS

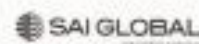
  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

  
M.C. LAURA VERÓNICA HERNÁNDEZ CUEVAS

  
DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado del CTBC de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por el apoyo en la realización de este proyecto.

A CONACYT por el apoyo brindado durante el proceso de la maestría.

A los integrantes de mi comité tutorial. La doctora Alba Mónica Montiel González, el Dr. José Luis Martínez y Pérez, el Dr. Arturo Estrada Torres, la Dra. Margarita Villegas Ríos, quienes de manera puntual y acertada estimularon y apoyaron el proyecto durante el tiempo en el que se llevó a cabo. De igual manera a la M.en C. Laura Verónica Hernández Cuevas y el Dr. René Zempoalteca Ramírez por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la tesis.

## **Agradecimientos personales**

Al universo entero por permitir que sucedan cosas extraordinarias, satisfactorias y reconfortantes en la vida de los humanos.

A mi familia por ser siempre el estímulo principal para salir adelante y querer ser parte del progreso de este país. En especial a mi madre que ha creído desde siempre en mi capacidad y en mis virtudes, a mi padre por estimularme a querer ser distinta a los demás. A mis hermanos que, aunque de lejos siempre he tenido su apoyo incondicional. A mis sobrinas, especialmente a Hany quien ha sido mi primer vínculo con esa parte de la sociedad a quien quiero aportar y dejarles algo productivo en sus vidas, te amo mi niña.

Agradezco como siempre y de manera infinita a mi directora de tesis, la doctora Alba Mónica Montiel González, quien siempre estuvo dispuesta a brindarme su apoyo como siempre no solo académico sino personal, gracias doctora por los consejos, las enseñanzas de vida y las lecciones.

Agradecimiento especial a mis compañeras y amigas de laboratorio, la M. en C. y casi doctora Anahí Armas Tizapantzi y a la M. en C. Diana Torres González, créanme chicas que, sin su ayuda, su paciencia, sus consejos y su apoyo siempre, siempre, siempre yo no hubiera podido lograr este triunfo. Ustedes han estado en todo momento, apoyándome en todos los aspectos y creo que sin lugar a dudas han sido un pilar importante en mi vida, espero de corazón que la vida las recompense siempre y que esta amistad perdure a pesar del tiempo.

Con mucho cariño, afecto y agradecimiento, no puedo dejar atrás a aquellas personas que no han necesitado ser parte de mi vida durante mucho tiempo, pero que han estado desde hace poco para estimularme, apoyarme y echarme porras. Agradezco su apoyo, admiración y esos empujoncitos que de repente una necesita para tomar aliento y energía, a ti Lupita Salas Lozano, sin duda ya eres parte fundamental en mi vida, no lo dudes nunca. A ti Arturo Rita Romero, tu apoyo y porras siempre han estado en el momento junto y preciso, gracias infinitas.

Y a todas y cada una de las personas que han creído desde hace tiempo, a las que creen ahora y a las que seguirán creyendo en mis capacidades y potencial. GRACIAS.

## **Dedicatoria**

A todos aquellos que luchamos por ser personas diferentes. Los que creemos aún en los ideales y estamos en contra de las restricciones y las represiones del sistema. A todas esas personas que quieren un mundo mejor, más justo, más empático, con más paz y más armonía con el ambiente. Dedico esta tesis a las personas que creen en el amor en todas sus formas, a las personas que, aunque parezcan muchas, en realidad son pocas, las que queremos dejar algo productivo y mejor para las nuevas generaciones, a las que no nos conformamos con ser diferentes, queremos dejar huella y dejar algo bueno a este mundo que cada día se encuentra en un desequilibrio brutal.

“El deseo de ser libre nace del contraste entre dos móviles irreductibles; la tendencia a perseverar en el ser, implicada en la herencia y la tendencia a aumentar el ser, implicada en la variación. La una es principio de estabilidad, la otra de progreso”.

*-José Ingenieros-*

## RESUMEN

El aislamiento y caracterización de organismos fúngicos de ambientes naturales ha sido de gran ayuda para el hombre, permitiéndole obtener beneficios y productos de estos. Los hongos saprótrofos, descomponedores de la materia orgánica, constituyen un importante grupo de estudio debido a que sus complejos enzimáticos suelen tener usos en la biotecnología. Trabajos sobre identificación de hongos saprótrofos de sitios perturbados son escasos, pero de gran interés, ya que las condiciones hostiles del ambiente pueden inducirles a desplegar mecanismos y/o metabolitos para sobrevivir, mismos que podrían aprovecharse biotecnológicamente, si son manejables a nivel laboratorio. En este estudio se aislaron hongos saprótrofos de un bosque de *Juniperus* del estado de Tlaxcala, México, se caracterizó su crecimiento *in vitro*, se utilizaron medios de cultivo bajo condiciones controladas. La identificación molecular de basidiomas y de micelio cultivado se realizó con secuencias de la región ITS, utilizando la herramienta BLAST, comparando con secuencias de las bases de datos mundiales. Se realizó una caracterización macro y micromorfológica de los basidiomas y se utilizaron claves taxonómicas disponibles para su identificación. Se evaluaron condiciones de conservación de las cepas aisladas, probando 10 y 15% de glicerol a temperatura ambiente, 4°C y -20°C, considerando la velocidad media de crecimiento y la biomasa para la evaluación de la viabilidad después de uno, tres y seis meses. Se aislaron ocho cepas de cuatro especies. Dos fueron identificadas como *Agrocybe pediades* (Pers.:Fr) Fayod, tres del género *Gymnopus*, dos del género *Byssomerulius* y una del género *Coniophora*. Cuatro cepas se desarrollaron mejor en EMA, tres en PDA y sólo una en medio mineral. Respecto al procedimiento de conservación, para la mayoría de las cepas la recuperación fue más factible en los tratamientos a temperatura ambiente y a 4° C independientemente de la concentración de glicerol.



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Bosque o matorral de <i>Juniperus</i></b> .....	2
<b>1.2 El reino Fungi</b> .....	3
<b>1.2.1 Basidiomycota</b> .....	4
<b>1.2.2 Hongos saprótrofos</b> .....	6
<b>1.2.3 Metabolismo fúngico</b> .....	8
<b>1.3 Aislamiento, identificación y conservación</b> .....	8
<b>1.3.1 Aislamiento</b> .....	8
<b>1.3.2 Identificación</b> .....	9
<b>1.3.3 Conservación</b> .....	9
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	16
<b>6.1 Área de estudio</b> .....	16
<b>6.2. Recolección de material fúngico</b> .....	16
<b>6.3 Aislamiento</b> .....	17
<b>6.4 Identificación</b> .....	18
<b>6.5 Ensayo de velocidad media de crecimiento</b> .....	20
<b>6.6 Ensayo de conservación</b> .....	21
<b>7. RESULTADOS</b> .....	23
<b>7.1 Muestreo</b> .....	23
<b>7.2 Aislamiento</b> .....	24
<b>7.3 Identificación</b> .....	25

7.3.1 Amplificación de las regiones ITS .....	25
7.3.2 Identificación de <i>Coniophora aff. arida</i> .....	27
7.3.3 Identificación de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	29
7.3.4 Identificación de <i>Byssomerulius aff. corium</i> .....	33
7.3.5 Identificación de <i>Gymnopus sp.</i> .....	37
7.4 Evaluación de la velocidad media de crecimiento .....	42
7.4.1 Velocidad media de crecimiento de <i>Coniophora aff. arida</i> . cepa CIGyA001-OAR018. ....	42
7.4.2 Velocidad media de crecimiento de <i>Agrocybe cf. pediades</i> cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030. ....	43
7.4.3 Velocidad de crecimiento de <i>Byssomerulius aff. corium</i> , cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR022. ....	45
7.4.4 Velocidad de crecimiento de <i>Gymnopus sp.</i> cepas CIGyA006-OAR006, CIGyA007-OAR029 y GIGyA008-OAR031. ....	46
7.5 Resultados del ensayo de preservación .....	49
7.5.1 <i>Coniophora aff. arida</i> . cepa CIGyA0036-OAR018. ....	49
7.5.1.1 Velocidad media de crecimiento .....	52
7.5.1.2 Biomasa .....	53
7.5.2 <i>Agrocybe cf. pediades</i> , cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030. ....	55
7.5.2.1 Velocidad media de crecimiento .....	58
7.5.2.2 Biomasa .....	60
7.5.3 <i>Byssomerulius aff. corium</i> cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR022 .....	63
7.5.3.1 Velocidad media de crecimiento .....	66
7.5.3.2 Biomasa .....	68
7.5.4 <i>Gymnopus sp.</i> cepas CIGyA007-OAR029 y CIGyA008-OAR031. ....	71
7.5.4.1 Velocidad media de crecimiento .....	74

7.5.4.2 Biomasa.....	76
8. DISCUSIÓN.....	78
<b>8.1 Aislamiento</b> .....	78
<b>8.2 Identificación</b> .....	78
<b>8.2.1 <i>Coniophora aff. arida</i></b> .....	78
<b>8.2.2 <i>Agrocybe cf. pediades</i></b> .....	80
<b>8.2.3 <i>Byssomerulius aff. corium</i></b> .....	81
<b>8.2.3 <i>Gymnopus sp.</i></b> .....	81
<b>8.3 Determinación de la velocidad de crecimiento</b> .....	82
<b>8.4 Ensayo de preservación</b> .....	85
9. CONCLUSIONES.....	88
10. PERSPECTIVAS .....	88
11. BIBLIOGRAFÍA.....	89

## **1. INTRODUCCIÓN**

A lo largo de los años, el ser humano ha utilizado diversas herramientas tanto para satisfacer sus necesidades primarias como para obtener conocimiento sobre su interacción con el ambiente que lo rodea. De estos esfuerzos, se han desarrollado diversas áreas dentro de las ciencias biológicas, que actualmente proveen de un acervo inmenso de información sobre la riqueza y la disponibilidad de los recursos naturales. Gracias al conocimiento de la biología, distribución y composición de ciertas especies, el ser humano ha logrado su aprovechamiento, aunque no siempre de la mejor manera, a través de la obtención de diversos recursos, como en la medicina, por ejemplo, en donde ha cubierto ciertas necesidades, tales como la prevención de enfermedades o su control o en la domesticación de especies para su alimentación. Por ello, el estudio de la diversidad y/o de la existencia de organismos en los que es factible explorar sus usos potenciales toma gran relevancia.

En este contexto, nace el campo de la Biotecnología, disciplina que se define como una actividad multidisciplinaria que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos, cuyo objetivo es hacer un uso inteligente, respetuoso y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva, para facilitar la solución de problemas en sectores como el de la salud, agropecuario, industrial y del medio ambiente (Bolívar 2007). Las prácticas de la biotecnología se basan en buscar y estudiar organismos potenciales por sus capacidades metabólicas, aunque de inicio se enfocan en la importancia ecológica y/o sus características tróficas, su modo de vida, el nicho que ocupan, los compuestos que excretan y/o metabolizan, es decir, las funciones que éstos desempeñan en los ecosistemas, para valorar su aprovechamiento. Por tal motivo, existe un esfuerzo continuo realizado durante décadas en todo el mundo por encontrar microorganismos en entornos inexplorados y con nuevas potencialidades, logrando diversos aislamientos que facilitan su manejo. Además, las técnicas moleculares han mejorado la obtención de información sobre organismos con características deseables para su uso en microbiología industrial, siguiendo una secuencia lógica al identificar en primera instancia a dichos organismos, posteriormente mantenerlos en entornos controlados y de esta manera someterlos a ensayos para alcanzar objetivos específicos (Prescott 2002). Sin embargo, antes de someter a prueba a dichos organismos, es preciso conocer un poco sobre su

biología, su distribución, características y la importancia de sus funciones ecosistémicas. Al respecto, los hongos son un grupo particular, susceptible de estudio, debido a que su función es determinante en los ecosistemas terrestres, ya que además de ser un componente importante de la biodiversidad mundial, controlan las tasas de los procesos clave en dichos ecosistemas y participan activamente en procesos de descomposición que mineralizan y reciclan nutrientes (Peay y cols. 2008).

Así mismo, los ambientes de los que se aíslan los microorganismos son parte fundamental en dichos procesos, ya que se parte de la premisa de que en dichos ambientes existen condiciones diversas que promueven nuevas características biológicas que pueden ser aprovechadas. Dentro de este contexto, los bosques tienen un papel fundamental para la implementación de un aprovechamiento racional de sus recursos, tomando en cuenta su importancia ecológica, ya que son partícipes esenciales en el mantenimiento de la estabilidad de los ciclos biogeoquímicos y por los servicios ambientales que prestan, que incluyen la protección de las cuencas hidrográficas, la conservación de la biodiversidad y el secuestro de carbono. Los bosques, y en general los ecosistemas templados, son un ejemplo primordial de la importancia biológica en México (Sánchez 2003).

Dentro de los bosques templados se encuentran los bosques de encino y de coníferas, ambos bien representados en el estado de Tlaxcala. De estos últimos, uno de sus representantes con áreas muy reducidas por el desarrollo de la agricultura es el bosque de sabino o *Juniperus*, el cual ha sido poco explorado en cuanto a la diversidad fúngica por lo que los trabajos enfocados en la importancia de esta diversidad hacia nuevos modelos con potencial biotecnológico son escasos.

### **1.1 Bosque o matorral de *Juniperus***

Es una comunidad vegetal a la que también denominan bosque de escumifolios (hojas en forma de escama), la cual se encuentra distribuida desde Baja California y Tamaulipas hasta Chiapas, cubriendo una superficie en México de menos de 0.04% del territorio total, desarrollándose en condiciones ecológicas variadas y formando una estrecha faja transicional entre el bosque de *Quercus* y de *Pinus*, por un lado, y el pastizal, matorral xerófilo, por el otro. Igualmente se

considera que estos bosques no forman propiamente una comunidad clímax, sino que son más bien de origen secundario favorecidos por el disturbio ocasionado a los bosques de encino o de pino (Rzedowski 2006). Los suelos donde se desarrollan son diversos incluyendo los alcalinos, con alto contenido de sales solubles y de yeso con drenaje deficiente, algunas veces en suelos poco profundos y pedregosos de laderas de cerros (Challenger y Soberón 2008). Los climas donde se desarrollan son desde el templado subhúmedo del tipo Cw, semiáridos del tipo BS y el frío del tipo ETH de las altas montañas. Altitudinalmente se encuentra entre los 1500 y los 4600 msnm.

Las comunidades de *Juniperus* forman bosques con individuos de 8 a 15 m de altura, separados entre ellos representando una comunidad abierta, por ello, pueden encontrarse entremezclados árboles de otros géneros, sobre todo *Pinus* y *Quercus*. Las especies que conforman estas comunidades en el país son *Juniperus flaccida*, *J. deppeana* y *J. monosperma* (INEGI 2009).

A pesar de que los estudios en este tipo de bosques son escasos, se sabe que existe una interacción entre los organismos que los conforman, de este modo el desarrollo de ciertos organismos como los hongos en ambientes boscosos, está condicionado por ciertos factores ambientales como la cobertura y la composición de especies arbóreas y del sotobosque, lo que determina la cantidad de luz que ingresa, la temperatura, el contenido de materia orgánica y la humedad (Toledo 2014).

## **1.2 El reino Fungi**

Los hongos, al igual que los insectos, son un grupo de organismos de una enorme diversidad. Se caracterizan por tener una nutrición heterótrofa, cuya alimentación es por absorción, muestran un estado vegetativo sobre o en el sustrato, una pared celular típicamente presente, por lo general compuesta de glucanos y quitina, con uno o más núcleos eucarióticos, el talo homo o heterocariótico, haploide, diploide o dicariótico; con reproducción sexual (fusión nuclear y meiosis), parasexual (fusión nuclear seguida de una gradual de-diploidización) y/o asexual (puramente mitótica); los propágulos, que por lo general son de tamaño microscópico, son esporas producidas en grandes cantidades; con esporocarpos microscópicos y macroscópicos y mostrando formas características y diversas, pero con una diferenciación de tejidos limitada,

con funciones ecológicas importantes, desempeñándose como mutualistas, saprótrofos, y parásitos, y de amplia distribución (Webster 2007).

Este reino representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida (Aguirre-Acosta 2014). Diversos estudios plantean cifras estimadas desde 500,000 hasta 1.5 millones de especies (Hawksworth 2001), sin embargo, dicho intervalo de número de especies sigue en discusión. Según estudios filogenéticos, este reino se encuentra conformado por siete grupos, Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, Zoopagomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota y Cryptomycota (Hibbett 2007, Spatafora y cols. 2016). Al respecto, se ha reportado que para México existen alrededor de 2,135 especies fúngicas (Aguirre-Acosta 2014).

Por otro lado, refiriéndonos específicamente a macromicetos, éstos se distinguen por poseer cuerpos fructíferos detectables a simple vista; la mayoría de ellos se agrupan en los Phylum Basidiomycota y Ascomycota (Mueller 2007). La importancia del estudio de los macromicetos radica en el valor del papel que juegan para el buen funcionamiento del ecosistema; dicho papel está ligado en gran medida a sus características tróficas, así, de manera general los hongos se dividen en tres grupos según sus preferencias de nicho-sustrato: mutualistas, saprobios y parásitos (Cabo 2012). En este estudio nos enfocaremos de manera particular en los macromicetos saprótrofos, de los cuales se ha descrito su importancia ecológica que los posiciona como uno de los principales y más activos descomponedores de la hojarasca, y por lo tanto como organismos que juegan un papel importante en los ciclos del carbono, nitrógeno y otros nutrientes del suelo (Reverchon 2010).

### **1.2.1 Basidiomycota**

Existen alrededor de 30,000 especies de Basidiomicetos descritas, dentro de los que se incluyen hongos formadores de setas, hongos gelatinosos, levaduras, royas y carcomas. Este grupo juega una multitud de roles ecológicos, desde la formación de simbiosis micorrízicas con plantas, la descomposición de la madera y la hojarasca, la asociación con insectos, hasta ser causantes de enfermedades de animales, humanos y plantas (Watkinson y cols. 2016).

A nivel microscópico existen tres características importantes del grupo, la producción de basidiosporas haploides formadas en un basidio en el cual un núcleo diploide se somete a la meiosis, la fusión nuclear y la meiosis ocurren dentro de los basidios y la tétrada resultante de los núcleos haploides se transmite a yemas que se diferencian en las basidiosporas. La segunda característica común del grupo es el tabique del doliporo que divide los compartimentos sucesivos a lo largo de la longitud de las hifas, este tabique está perforado por un canal central (poro) que se define por una protuberancia o hinchazón en forma de barril de la pared celular del tabique. Los núcleos no pueden migrar a través de septos de doliporo sin modificación y su distribución dentro de las hifas que se desarrollan después de la fusión de colonias sexualmente compatibles implica la formación de fibulas, la cual es la tercera característica común al grupo, las cuales aparentemente vinculan células adyacentes en las hifas. (Carlile y cols. 2001, Watkinson y cols. 2016). Aunque estas características no son generales de todo el grupo, los organismos fúngicos que las poseen pertenecen a este subphylum.

En el ciclo de vida común, una sola basidiospora germina para formar una colonia ramificada de hifas filamentosas, este micelio joven está compuesto de múltiples compartimentos, separados por septos con doliporo, cada uno con un solo núcleo haploide en la mayoría de las especies. Estos núcleos están formados por mitosis, comenzando con la primera división del núcleo único de la primera espora. El micelio resultante se denomina homocarión porque todos sus núcleos son clones genéticamente idénticos o monocarión porque los compartimentos contienen un solo núcleo. Los micelios homocarióticos se expanden a través del sustrato (suelo, madera u otros materiales) para dar paso posteriormente a la formación de cuerpos fructíferos (Figura 1), (Watkinson y cols. 2016).



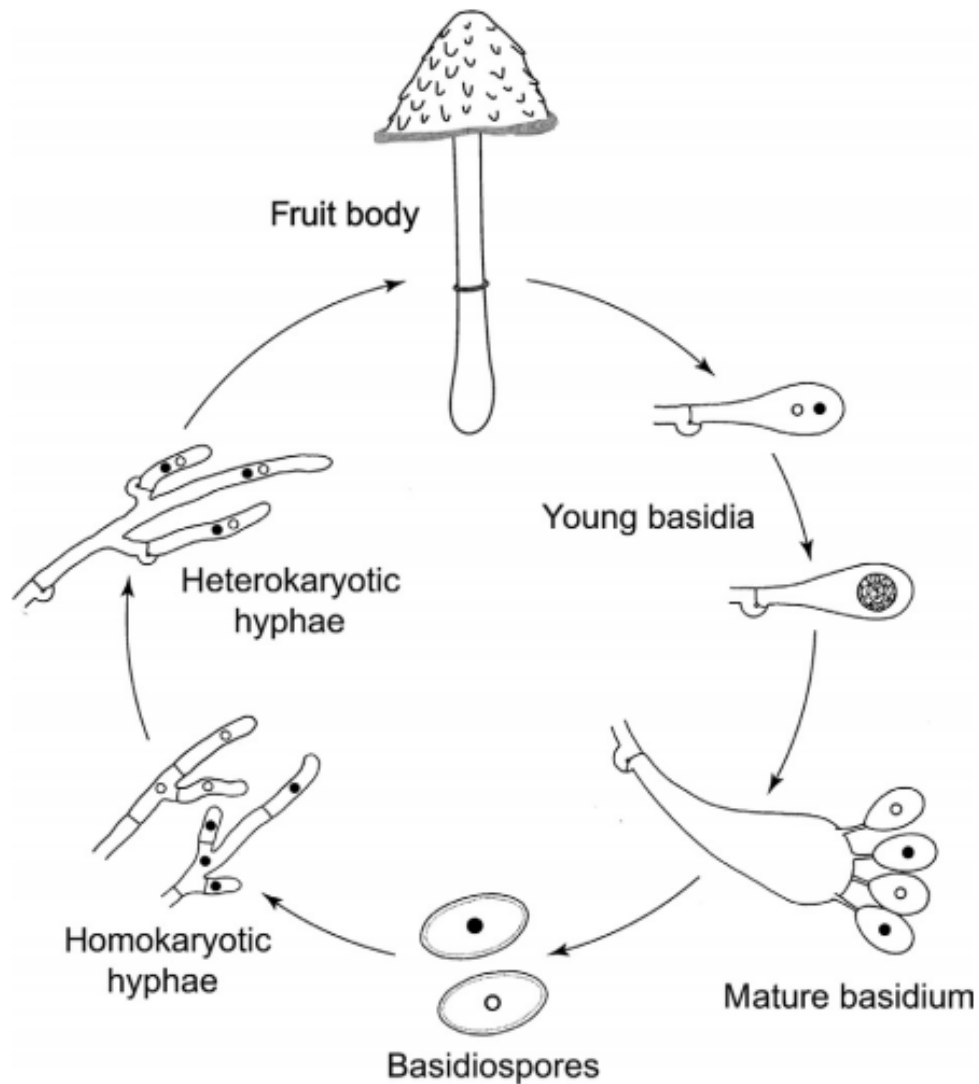


Figura 1: Ciclo de vida de un basidiomiceto típico (Watkinson y cols. 2016).

### 1.2.2 Hongos saprótrofos

Los hongos saprótrofos se caracterizan por ser parte de los principales organismos descomponedores de los ecosistemas; reciclan grandes cantidades de carbono y otros nutrientes, contribuyen a la sucesión vegetal y a la estabilidad del suelo, siendo fundamental su función en el ambiente. Los hongos que actúan en el proceso de descomposición incluyen principalmente Ascomicetos y Basidiomicetos, que son comunes en la capa superior de los suelos forestales y de pastizales; se dice que aproximadamente 8,500 especies descritas de Basidiomicetos son

saprótrofos-degradadores de ligninocelulosa y aproximadamente la mitad de ellos se desarrollan en el suelo (Grinhut 2007).

Un potente coctel de enzimas ligninocelulíticas capaces de la degradación inicial de compuestos complejos, hacen de los hongos saprótrofos los agentes dominantes en la descomposición de la hojarasca de las plantas en muchos sistemas terrestres, se cree que son responsables de la descomposición de los tejidos de las plantas leñosas, en las que se incorpora el 80% de la reserva mundial de carbono orgánico, haciendo que este ciclo lento de nutrientes mantenga cierta estabilidad en el ecosistema, lo que garantiza la retención de nutrientes en los suelos. Estos hongos también contribuyen hasta en un 90% con el total de la respiración heterotrófica en los ecosistemas forestales (Crowther 2012).

Se plantea que dichos organismos presentan diversas estrategias para asegurar su éxito reproductivo, siendo estrategias R, debido a que el sustrato que tienen que explotar es a menudo escaso, de distribución irregular e incluso efímero, tomando nutrientes de recursos variables e impredecibles, razón por la que necesitan romper el recurso carbono con enzimas extracelulares cuya producción es costosa, es por ello que invierten más energía en producir mayor cantidad de cuerpos fructíferos de menor tamaño que en producir cuerpos fructíferos de tallas grandes (Bässler 2016). Durante su desarrollo y crecimiento, estos hongos como estrategias R surgen como colonizadores iniciales de sustratos ricos en carbohidratos como tejidos de plantas y animales, donde el aporte de nutrientes es discontinuo o durante la expansión de la rizósfera donde el aporte de nutrientes puede ser continuo. Sin embargo, también han desarrollado otras estrategias como ser tolerantes al estrés (S), desarrollada en situaciones ecológicas específicas teniendo como característica principal el desarrollo continuo en un contexto de bajo suministro de energía, además de que los materiales en los que crecen pueden contener compuestos aromáticos o tóxicos a los que han adquirido presumiblemente cierta tolerancia. Por otro lado, se ha definido una tercera estrategia, la combativa (C), cuya esencia es que son el resultado del desarrollo de dispositivos antagónicos por los organismos, adecuando una habilidad para la defensa de recursos obtenidos durante la captura primaria, secundaria o la captación de los mismos, de este modo los hongos con una estrategia combativa parecen tener una competencia

enzimática para seguir explotando los recursos disponibles durante un periodo indefinido, pero no necesariamente con rapidez (Cooke 1984).

### **1.2.3 Metabolismo fúngico**

Aunque carecen de la diversidad metabólica de las bacterias, los hongos contribuyen en gran medida al ciclo global del carbono. La organización hifal combina la capacidad de asimilar nutrientes a lo largo de una red distribuida, con la capacidad de concentrar la liberación de enzimas extracelulares en los puntos de crecimiento. Como resultado los hongos son más eficientes que las bacterias al colonizar y descomponer grandes partículas de materia orgánica (Dighton y cols. 2005). Esta característica es aprovechable en condiciones de cultivo *in vitro* debido a que medios de cultivo sintéticos pueden ser utilizados por los hongos para su desarrollo en el laboratorio, lo que permite el estudio de sus potencialidades.

## **1.3 Aislamiento, identificación y conservación**

Para que los organismos puedan ser utilizados para estudios posteriores de diversa índole, se necesita mantenerlos separados de cualquier factor que pueda interferir de algún modo sobre los resultados que se desean evaluar por lo que es necesario realizar un correcto aislamiento, que permita la posterior identificación y la consecuente preservación.

### **1.3.1 Aislamiento**

En un ciclo típico de vida de los hongos, éstos forman hifas vegetativas que forman un micelio, una estructura tridimensional capaz de asimilar efectivamente los nutrientes y lograr el crecimiento, sin embargo, debido a su tipo de nutrición, requieren de materia orgánica para lograrlo y además generar energía. Estos organismos son comúnmente aislados a partir de muestras ambientales como suelo, materia orgánica y líquidos, utilizando cajas de Petri que contienen algunos medios de cultivo ricos en nutrientes como agar extracto de malta (EMA) y agar papa dextrosa (PDA) los cuales soportan el crecimiento de una gran variedad de especies fúngicas. Por otro lado, además de los nutrientes disponibles, los principales factores externos que afectan el crecimiento incluyen al pH, a la temperatura, a la humedad y a la luz; los de tipo interno en el medio son la concentración de fuente de carbono y nitrógeno y la temperatura (Nevalainen 2014).

### **1.3.2 Identificación**

La identificación y caracterización de los hongos de un ecosistema es el primer paso para poder asignar a un organismo o a un grupo de ellos, un nombre establecido o por establecer a nivel mundial, conocer sus características y el papel que puedan estar jugando en el mantenimiento del equilibrio ecológico, así como de su aprovechamiento biotecnológico potencial.

En el contexto de identificación morfológica, los especímenes se pueden comparar con ilustraciones de guías específicas, reconociéndolos a nivel de género; también se pueden examinar microscópicamente midiendo las esporas, con pruebas químicas y consultando con especialistas y con trabajos publicados para tener un acercamiento a nivel de especie. Microscópicamente, también se estudia el micelio observando estructuras específicas que determinen la identidad a nivel de especie (Carranza 2006).

Sin embargo, la práctica de identificación morfológica muchas veces no cuenta con una cantidad considerable de caracteres que permita la delimitación clara de las especies. En este sentido, existen herramientas moleculares que pueden implementarse con el fin de complementar los estudios taxonómicos y de esta manera proporcionar mayor información a nivel específico. Estos métodos se basan en el análisis de las secuencias de regiones génicas que muestran una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de microorganismos y pueden ser utilizadas para la clasificación de cepas en diversos niveles taxonómicos; los genes que codifican para los ARN ribosomales (18S y 28S), junto con el espaciador interno transcrito (ITS), son regiones que han sido ampliamente utilizadas en estudios para la identificación de hongos (Todaro y cols. 2013).

### **1.3.3 Conservación**

Para poder mantener en condiciones óptimas y disponibles a los organismos de estudio también se necesitan ciertos métodos para conservarlos viables en el laboratorio, de este modo, aseguramos su disponibilidad para estudios posteriores y/o más específicos. Entre los métodos que diversos estudios plantean como más factibles se encuentran los siguientes:

Crioconservación y/o criopreservación

Método conocido y utilizado actualmente, cuyo principio radica en que toda célula, tejido u organismo, sometido a bajas temperaturas disminuye sus funciones vitales permaneciendo en estado de dormancia por periodos prolongados, es decir, sus actividades metabólicas están suprimidas, de este modo se avala la estabilidad genética al limitar la aparición de generaciones sucesivas y la actividad celular durante un tiempo prolongado (Gutierrez 2009). En este caso para la recuperación de la cepa se recomienda poner el recipiente que la contiene en un baño de agua a 37°C para que la descongelación sea lo más rápida posible (Hernández 2003).

### Liofilización

Se basa en paralizar el metabolismo por deshidratación celular sometiendo a la muestra a congelación y sublimación. La disminución en el contenido de humedad residual da lugar a un material compacto que se disuelve posteriormente con facilidad. Para que las células no sufran algún tipo de daño se requiere agregar un agente lioprotector, una vez liofilizadas se almacenan a temperatura ambiente (García y Uruburu, 2000). El glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanodiol, etilenglicol, etanol, metanol, polietilenglicol y varios butano dioles sirven para evitar la cristalización extracelular e intracelular, pero la mayoría de ellos son tóxicos, por ello se recomienda el uso de sacarosa 1,2 M y/o leche desnatada como solución lio-protectora (Homolka, 2014). Para la recuperación de la cepa en este caso es conveniente adicionar agua destilada estéril para rehidratar las células (Hernández 2003).

### Conservación con aceite mineral

La conservación en aceite mineral estéril es un método de supresión de la evaporación. Consiste en cubrir con aceite mineral estéril o vaselina estéril el cultivo del hongo a conservar, impidiendo la evaporación del agua contenida en el medio de cultivo evitando el incremento de presión osmótica por concentración de los solutos, que produciría alteraciones importantes en el cultivo. Es un método económico, sencillo y rápido. Los conservados pueden mantenerse a temperatura ambiente o refrigerados, sin embargo, puede mostrar inconvenientes al recuperar la cepa ya que el aceite es una sustancia un poco difícil de remover lo que podría afectar el crecimiento posterior (Gato-Cárdenas 2010).

## 2. ANTECEDENTES

Los trabajos exploratorios que tienen como finalidad encontrar organismos modelo, aislados de muestras ecológicas, para su caracterización y posterior evaluación del potencial de aprovechamiento que puedan ofrecer para el área de la biotecnología son escasos, sobre todo aquellos que se enfocan en organismos como los hongos saprótrofos de especies no comestibles, por ejemplo, algunos trabajos en donde realizan el análisis de especies como *Trametes versicolor* con la finalidad de aprovechar sus capacidades en la degradación y detoxificación de algunos compuestos fenólicos, gracias a los sistemas enzimáticos que posee (Carabajal 2014). Sin embargo, existen muchos más estudios que se basan en el aprovechamiento y producción de algunos de estos hongos con fines alimentarios, tal es el caso de los hongos del género *Pleurotus* (Romero y cols. 2010).

En este sentido, algunos de los trabajos realizados hasta el momento, han tratado de evaluar de manera poco integrada, las potencialidades de degradación enzimática de algunos hongos saprótrofos, su presencia en algunos ecosistemas particulares, se han realizado esfuerzos para su identificación usando tanto caracteres morfológicos como moleculares, incluso, se han probado métodos de conservación para poder mantenerlos viables en condiciones de laboratorio. Dichas investigaciones abren muchas oportunidades para poder conocer más de cada una de las especies estudiadas o marcan la pauta para diseñar nuevos estudios dirigidos hacia la búsqueda de modelos de saprótrofos fúngicos. Algunos de estos trabajos, mencionados en orden cronológico son los siguientes:

Thorn y cols. (1996) aislaron basidiomicetos saprótrofos de muestras de suelo de 11 tipos de hábitats incluyendo zonas agrícolas de la estación Biológica de Kellogg en el condado de Michigan, con el objetivo de evaluar un método de aislamiento selectivo para basidiomicetos con EMA como medio de cultivo, adicionado con lignina, guayacol y benomilo. Logrando 67 aislamientos, identificando 51 taxones reconocidos como basidiomicetos dentro de 7 grupos, basándose en claves para basidiomicetos que degradan la lignina, pruebas de fructificación, pruebas de tinción con azul de diazonio B y presencia de fíbulas, sin embargo, no lograron la identificación hasta especie, por lo cual ellos ya comienzan con el uso de marcadores

moleculares como algunos genes del ADNr para la identificación específica, los cuales servirían para construir inferencias filogenéticas y de esa manera esclarecer dicha identidad.

En cuanto a estudios realizados en el bosque de *Juniperus* en el estado de Tlaxcala, refiriéndonos a organismos fúngicos, existe uno realizado por Ramírez (2000), con la intención de evaluar el potencial antagónico de saprótrofos de este ambiente contra cepas de hongos fitopatógenos. En dicho estudio se recolectaron e identificaron morfológicamente al menos 12 géneros de hongos saprótrofos del bosque de *Juniperus* del municipio de Ixtacuixtla, utilizando tres medios de cultivo para su aislamiento: Agar extracto de malta-extracto de levadura (MEYA), Agar papa dextrosa-extracto de levadura (PDYA) y Agar avena-extracto de levadura. En las pruebas de antibiosis con cinco cepas, para evaluar el efecto de inhibición sobre el crecimiento de cuatro cepas de hongos fitopatógenos, encontró que las cepas más prometedoras pertenecen a los géneros *Agrocybe*, *Lepiota* y *Clitocybe*. Este trabajo ofrece una primera estimación de los géneros que se encuentran en este ecosistema y fomenta el interés de estudios a nivel específico, incluso utilizando las herramientas moleculares propuestas por otros autores, además de estrategias de conservación de cepas que ofrecen características importantes dentro de las prácticas biotecnológicas.

Dentro de los trabajos que abordan las técnicas moleculares para la identificación, se encuentra el reportado por Galindo-Flores y cols. (2005) en donde aislaron un ascomiceto en el norte del estado de Sinaloa, México, a partir de preparaciones de esporas de hongos micorrízicos arbusculares. Dicho aislamiento pudo ser cultivado *in vitro* sólo en su etapa asexual en diversos medios de cultivo. Se utilizó ADN extraído de micelio para amplificar y secuenciar una región hipervariable de la subunidad 28S del ADN ribosomal, lo que permitió relacionarlo con los miembros de la familia Chaetomiaceae. La cepa aislada mostró un comportamiento saprofítico en presencia de raíces vegetales desarrolladas *in vitro*. En bioensayos se mostró que actúa como antagonista contra hongos fitopatógenos. A pesar del uso de herramientas moleculares no se logró asignar identidad a nivel específico de dicha cepa, lo que hizo centrar la atención en regiones génicas de mayor utilidad para este fin.

Carranza (2006), logró obtener una muestra representativa de la biodiversidad de hongos ectomicorrizógenos existente en tres diferentes regiones de la Sierra de Pachuca en el estado de

Hidalgo, Méx. en las que se recolectaron 10 clases de hongos, pertenecientes a siete familias. Las cepas seleccionadas fueron sometidas a diferentes estudios para lograr su identificación y selección, realizando observaciones anatómicas y morfológicas del micelio, algunas pruebas fisiológicas y bioquímicas como crecimiento en diferentes medios nutritivos, crecimiento a temperaturas extremas, degradación de algunos compuestos y estudios moleculares básicos como la extracción y amplificación de ADN con el propósito de su identificación a nivel molecular a través de la amplificación de las regiones ITS. Encontrando que Biotina, anuerina, ácido fólico (BAF) y Agar papa dextrosa (PDA) fueron los mejores medios de cultivo para crecimiento y producción de biomasa. Por otro lado, la amplificación de los fragmentos ITS del ADNr de tamaños entre 500 y 700 pb fue satisfactoria utilizando los primers universales ITS1/ITS4.

En lo que respecta al tema de conservación, Karaduman y cols. (2011) evaluaron 12 diferentes métodos de conservación para un aislado del basidiomiceto *Schizophyllum commune*, utilizando diferentes medios (tanto agua estéril como glicerol y/o trehalosa), en diferentes sustratos: semillas de trigo colonizadas y pellets de agar colonizado y a tres temperaturas (+4, +20 y -20°C). Evaluando la recuperación de la cepa después de 2, 4, 6, 9 y 12 meses. Utilizaron el crecimiento radial, la generación de biomasa y la actividad enzimática como parámetros de evaluación de la viabilidad de los métodos. De acuerdo a sus análisis estadísticos los resultados de dichos parámetros sustentan que los mejores métodos de preservación para esta cepa son las semillas de trigo colonizadas por micelio conservadas en agua estéril a +4°C, los pellets de agar en agua estéril también a 4°C, pellets de agar en agua estéril a 20°C y pellets de agar en 15% de glicerol a 20°C. Aparentemente, la temperatura de -20° C no es factible, al menos para este hongo, sin embargo, son pocas las especies en las que se han probado métodos de conservación lo que no permite que pueda ser generalizado dicho resultado.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los estudios sobre identificación de hongos saprótrofos en bosques de *Juniperus* en México son escasos y su evaluación como potenciales recursos biotecnológicos es también baja, pues al no ser estudiados se desconocen sus capacidades, inicialmente, para ser cultivados a nivel laboratorio y poder aprovecharlos.

El estudio contribuirá al conocimiento de las especies de hongos saprótrofos asociados con un bosque de *Juniperus*, de las especies que son cultivables en el laboratorio y de las que puedan proponerse como nuevos modelos para posteriores estudios en el campo biotecnológico. Esto proporcionará además un valor agregado a la biodiversidad de este tipo de ambientes.

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿A qué especies de hongos saprótrofos pertenecen las cepas que son factibles de ser aisladas a partir de un bosque de *Juniperus*?
- ¿Cuál es el comportamiento en el crecimiento micelial de los aislados en condiciones *in vitro*?
- ¿Cuál es el mejor método de conservación para mantener viables a las cepas aisladas?

#### 5. OBJETIVOS

##### General

- Aislar e identificar especies de macromicetos saprótrofos provenientes de un bosque de *Juniperus*, evaluar su crecimiento *in vitro* y determinar un método de conservación a corto y mediano plazo.

##### Particulares

- Determinar las condiciones para el aislamiento de cepas de al menos cuatro especies de hongos saprótrofos provenientes de un bosque de *Juniperus* y evaluar su crecimiento en condiciones de laboratorio.
- Identificar a las especies de hongos aislados a través de procedimientos morfológicos y moleculares.
- Determinar el mejor método de conservación de las cepas de hongos aisladas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Área de estudio

El municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala se localiza al poniente del estado, colindando al norte con los municipios de Españita y Hueyotlipan y al sur con los municipios de Tepetitla de Lardizabal y Santa Ana Nopalucan. El sitio de estudio se encuentra a una elevación de 2300 msnm, con una extensión territorial de 60 ha y a 14 km al oeste de la ciudad de Tlaxcala. El clima es templado subhúmedo con una precipitación media anual de 800 a 1000 mm. La máxima incidencia de lluvias se presenta en junio y julio, mientras que la precipitación invernal es menor al 5 %. La temperatura media anual es de 14 a 16° C, hay entre 40 y 60 días con heladas y la frecuencia de granizadas es de dos días en promedio al año (SPP 1987b).

La vegetación está constituida por bosque de *Juniperus deppeana* con pastizal dominado por especies como *Mulhenbergia implicata*, *Stipa ichu* *Aristida chideana* y plantas de *Rhus standleyi* (SPP 1987a; Rodríguez 2001; Hudson y cols. 2005). El área de estudio corresponde con un fragmento de aproximadamente diez hectáreas de bosque monoespecífico de *J. deppeana* que está rodeado por áreas de cultivo y por fragmentos de bosque inducido de *Eucaliptus globulus*. Además de ello, dicha zona está sujeta a una constante actividad de perturbación antropogénica por pastoreo, cambio de uso de suelo e incendios.

### 6.2. Recolección de material fúngico

**Muestreo de carpóforos:** Se realizó el muestreo en un bosque de *Juniperus* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala. La estrategia de muestreo fue de manera dirigida, considerando las zonas en las que en una exploración inicial se observó mayor abundancia de carpóforos de este grupo de hongos. Los ejemplares se recolectaron en papel encerado, se tomaron las coordenadas correspondientes, se etiquetaron las muestras con fecha, nombre del recolector y tipo de sustrato donde se encontraba el ejemplar y número de colección de acuerdo con el orden en que fueron encontrados. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la UATx donde se tomaron datos de ciertas características morfológicas como tamaño, color (Munsell 1975), textura, además de tomarles registro fotográfico, para su posterior identificación a nivel genérico y

específico. De los hongos recolectados, se llevó a cabo una primera selección a través de pruebas de aislamiento y cultivo en diferentes medios de cultivo: EMA (extracto de malta), PDA (agar papa dextrosa) y Lignina (agar adicionado con lignina al 0.1%).

### **6.3 Aislamiento**

El proceso de aislamiento se realizó mediante dos métodos con la finalidad de conseguir cepas de la mayoría de los especímenes recolectados, considerando las posibles diferencias de los mismos.

a) Aislamiento a partir del contexto de los carpóforos: Este método se utilizó para hongos carnosos y de tamaño relativamente grande. Se seleccionaron basidiomas jóvenes, no maltratados y libres de insectos, los cuales se limpiaron en su superficie. Posteriormente y en condiciones estériles, los hongos se partieron y con una aguja de disección previamente flameada se tomaron de cuatro a cinco pequeños fragmentos del tejido interno, que fueron colocados sobre los medios de cultivo seleccionados. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a temperatura ambiente y fueron revisadas diariamente para observar si había desarrollo de las colonias y si no existía presencia de contaminantes.

b) Aislamiento a partir de esporas: Para basidiomas pequeños y poco carnosos, se cortó el píleo de un basidioma maduro y se pegó con glicerina estéril en la tapa de una caja Petri que contenía medio de cultivo. La caja se colocó en posición inclinada durante 24 horas para que se liberaran las esporas. Al día siguiente, las cajas fueron revisadas para detectar las esporas y determinar el tiempo que éstas tardaron en germinar. Las cajas fueron revisadas diariamente para observar el crecimiento de las colonias.

De los hongos que lograron desarrollarse en los medios de cultivo, se seleccionaron aquéllos que presentaron crecimiento constante y cuyo crecimiento logró mantenerse en al menos dos resiembras.

Los ejemplares recolectados fueron sometidos al proceso de aislamiento, ya sea por esporas o sembrando parte del tejido, en todos los medios de cultivo o al menos en uno de ellos; EMA, PDA y agar-lignina. Sin embargo, no todos los ejemplares lograron una esporulación ni todos lograron un crecimiento micelial a partir del contexto. Al respecto, aquellos en los que se

observaba en el microscopio que ya existían algunos tubos de germinación y posteriormente crecimiento micelial, fueron sembrados en el mismo medio de cultivo para asegurar su efectivo crecimiento. Posteriormente fueron sometidos a un ensayo de crecimiento.

## **6.4 Identificación**

Se realizó la descripción morfológica de los carpóforos y se hizo un registro fotográfico. En cada caso se tomaron en cuenta características como color, tamaño de sus estructuras (pileo, estípites, etc.), olor y sustrato en el que se encontró.

### **6.4.1 Aislamiento de ADN**

Para la primera parte de esta sección se realizó la identificación molecular para lo cual, se llevó a cabo la generación de biomasa para extracción de ADN; para ello, los micelios se propagaron en medio de cultivo líquido, en este caso, medio PMY para generar biomasa y posteriormente se procedió a la extracción de ADN. También se utilizó parte del material del carpóforo; utilizando el kit de extracción comercial Power Lyzer, Powersoil DNA Isolation Kit (Mo-Bio) y se llevó a cabo el protocolo según las indicaciones del proveedor, se usó para este protocolo 0.25 gramos de biomasa. Cabe resaltar que además de utilizar el kit de extracción se utilizó también el protocolo de extracción con Fenol-Cloroformo, para este método se utilizó aproximadamente 100 mg de biomasa por muestra.

### **6.4.2 Amplificación de las regiones ITS**

Amplificación de regiones génicas del ADNr (18S, ITS, 28S) por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés). Se utilizaron los primers universales degenerados ITS1 e ITS4 reportados previamente (Carranza 2006). La reacción se realizó en tubos Eppendorf para PCR en un volumen total de reacción de 50  $\mu$ L, con 5  $\mu$ L buffer libre de  $MgCl_2$  para la polimerasa, 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ L de dNTP's, 34.5  $\mu$ L de  $H_2O$  libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de cada primer (F y R), 3 ó 5  $\mu$ L del ADN molde y 0.5  $\mu$ L de la enzima Taq. Polimerasa. La reacción se incubó en un termociclador T100 <sup>TM</sup> BIO-RAD, con los siguientes parámetros: desnaturalización durante 2 min a 94° C, la hibridación se probó a 50° C durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 4 minutos, durante 30 ciclos.

### **6.4.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Después de las extracciones de ADN total se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % para comprobar la extracción y visualizar la concentración e integridad del ADN total. Por otro lado, los productos de amplificación se mezclaron con 2  $\mu$ L de buffer de carga y se cargaron en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1X. Transcurrida la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Se tomó la imagen del gel con el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 (BIO-RAD). En el gel también se colocó un marcador de peso molecular para determinar el tamaño en pb (pares de bases) de las bandas obtenidas a través del software Quantity One (BIO-RAD). Posteriormente se llevó a cabo la purificación de las bandas obtenidas con el protocolo del Kit Wizard Sv Gel and PCR Clean up System (Promega), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

### **6.4.4 Secuenciación**

La secuenciación de los amplicones obtenidos se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI-Prism en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Cabe mencionar que la secuenciación se realizó en ambos sentidos, de esta manera se obtiene una secuencia forward y una reverse, lo que permite que, en secuencias incompletas, se pueda realizar un ensamblaje de ambas para conseguir la secuencia completa del amplicón.

### **6.4.5 BLAST**

Por otro lado, las secuencias obtenidas de cada muestra fueron ensambladas con el programa bioinformático Geneious R10.2.2 y la secuencia consenso resultante se utilizó para el análisis de similitud con el programa BLAST el cual compara secuencias problema con las secuencias de la base de datos de Genbank.

### **6.4.6 Identificación morfológica**

Al llevar a cabo el análisis de similitud e identificando los respectivos organismos se procedió a la observación de estructuras microscópicas para corroborar los resultados. Para la identificación morfológica se utilizaron claves especializadas y fichas de descripción respecto a los grupos que se lograron aislar y basándonos en los resultados de la identificación molecular.

## **6.5 Ensayo de velocidad media de crecimiento**

Para este ensayo se propuso utilizar los mismos medios de cultivo donde se logró el aislamiento, además de utilizar un medio sólo con agar-agar para descartar que éste sea el factor del efecto y no los otros nutrientes que se adicionan, a una temperatura estable de 25°C. El diseño experimental quedó como sigue: Se utilizaron cinco medios de cultivo: EMA, PDA, agar-lignina, medio mineral con glucosa y agar-agar, para cada una de las cepas, con una n de 3 en cada medio de cultivo. Cabe aclarar que para las primeras cepas aisladas que fueron los especímenes 1 y 6, se usaron todos los medios con excepción del medio mineral con glucosa, siendo éste utilizado ya para las cepas que se aislaron posteriormente que fueron los especímenes 13, 18, 22, 29, 30 y 31. Por otro lado, a partir de esta sección dejaremos de nombrarlos como especímenes y les asignaremos nombre a las cepas con las siglas del centro de investigación, el número de cepa, las iniciales del recolector y el número de colección.

El parámetro que se evaluó fue la velocidad media de crecimiento, la cual se obtuvo midiendo el diámetro radial de la colonia del hongo cada 24 días hasta completar el llenado de la superficie de la caja Petri, se obtuvieron dos datos de dicho diámetro los cuales se promediaron para obtener un solo dato. El objetivo de esta evaluación de crecimiento fue la elección del medio en el que se debían someter a conservar las diferentes cepas, por lo tanto, se utilizaron como criterios de selección tanto el resultado de un análisis de varianza (ANOVA) para saber si existían diferencias significativas entre las medias, una prueba post-hoc de Tukey para saber entre qué medios existían dichas diferencias (en el caso de que hubiera), además de tomar en cuenta las observaciones respecto a la densidad del micelio.

*MEDIOS DE CULTIVO*

<i>Cepa</i>	EMA	PDA	Lignina	Mineral	Agar-agar
001	3	3	3	NC	3
002	3	3	3	NC	3
003	3	3	3	3	3
004	3	3	3	3	3
005	3	3	3	3	3
006	3	3	3	3	3
007	3	3	3	3	3
008	3	3	3	3	3

Tabla 1: Diseño experimental de la caracterización del crecimiento. Con una n=3 para cada medio de cultivo. NC: No contemplado.

### 6.6 Ensayo de conservación

Para esta etapa se probó el método de conservación en glicerol. Se sometieron las diferentes cepas a preservar en dos concentraciones de glicerol, al 10 % y al 15 % y a tres temperaturas que fueron, temperatura ambiente, 4°C y -20°C, para evaluar su viabilidad después de uno, tres y seis meses. A continuación, se muestra el diseño experimental para cada cepa, con seis tratamientos para cada tiempo y una n=5 por cada tratamiento.

<i>Temperatura</i>	<i>Concentración de glicerol</i>	
	10 %	15 %
<i>Temperatura ambiente</i>	5	5
4°C	5	5
-20°C	5	5

Tabla 2: Diseño experimental del ensayo de preservación

De manera alternativa se evaluó la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas (ocho en total) y la generación de biomasa. Estos parámetros fueron utilizados para comparar a las cepas después de haber pasado por el proceso de conservación con la cepa testigo, es decir, la misma cepa pero antes de ser sometida a conservación.

Posteriormente y pasado el tiempo definido para correr el ensayo de viabilidad y recuperación de la cepa después de someterla a los distintos tratamientos, se procedió a sembrar los pellets



conservados en cajas Petri con el mismo medio de cultivo en el que se realizó la conservación. Se removió completamente el glicerol contenido dentro de los tubos donde se conservaron los pellets, posteriormente dichos pellets se enjuagaron perfectamente con agua fisiológica estéril, retirando de manera cuidadosa el exceso de líquido. Después de esto se procedió a la siembra de cada uno de los pellets en su respectivo medio de cultivo.

De esta manera se obtuvieron los datos de porcentaje de sobrevivencia, el cual es evaluado por el número de cajas en las que se presentó crecimiento, la velocidad de crecimiento, midiendo el crecimiento radial diario hasta el llenado de la superficie del medio de cultivo en la caja Petri y la biomasa que fue evaluada mediante la obtención de la biomasa crecida en la caja hasta el llenado de la misma o hasta el día en el que dejaron de crecer, según fuera el caso; la biomasa se obtuvo mediante el método de diferencia de peso seco, retirando el micelio de la superficie del agar de cada unidad experimental, una vez retirada esta biomasa fue colocada en papel filtro Whatman No. 1 previamente puesto a peso constante y se colocó en un horno de secado a 45° C durante 48 horas o hasta conseguir su peso constante, fue pesada y se realizaron los cálculos para determinar la diferencia de pesos con respecto al peso constante inicial del papel. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para saber entre qué comparaciones se encontraban dichas diferencias se realizó una prueba post-hoc de Dunnet, la cual nos permite saber si existen diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos. Con los datos obtenidos se determinó la efectividad del ensayo de preservación y/o del tratamiento respectivo dentro del ensayo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Muestreo

Se realizaron 4 visitas al bosque de *Juniperus*, dos durante el mes de septiembre: en fechas 8 y 22 de septiembre, 7 de octubre de 2015 y una visita el 13 de junio de 2016. Se recolectaron 31 colecciones en total, de las cuales 18 fueron localizadas en el sustrato suelo (Figura 2), ocho en madera (Figura 3) y cinco en hojarasca (Figuras 4).



Figura 2: Colecciones encontradas en suelo como sustrato. A) OAR01, B) OAR003, C) OAR007, D) OAR008, E) OAR009, F) OAR010, G) OAR011, H) OAR016, I) OAR017, J) OAR020, K) OAR021, L) OAR023, M) OAR024, N) OAR025, O) OAR026, P) OAR027, Q) OAR028, R) OAR030.



Figura 3: Colecciones encontradas en madera. A) OAR002, B) OAR004, C) OAR005, D) OAR013, E) OAR014, F) OAR018, G) OAR019, H) OAR022.



Figura 4: Colecciones encontradas en hojarasca. A) OAR006, B) OAR012, C) OAR015, D) OAR029, E) OAR031.

## 7.2 Aislamiento

Los procedimientos utilizados para el aislamiento se probaron en las 31 colecciones. De estos esfuerzos se lograron aislar ocho cepas, cada una de ellas correspondiente con cada una de ocho colecciones, lo que representa 25 % aproximadamente del total de colecciones. En este caso el procedimiento de aislamiento a partir de esporas resultó ser el más efectivo, ya que a partir de este se obtuvieron los ocho aislamientos. En el caso del aislamiento a partir del contexto se pudo observar que las cepas mostraron crecimiento pobre, nulo y en ocasiones contaminación.

Considerando el aislamiento como la obtención de crecimiento de micelio sobre un medio de cultivo determinado y bajo condiciones particulares de laboratorio, podemos considerar que los medios EMA, PDA y lignina fueron adecuados para tal propósito en las ocho cepas mencionadas. Sin embargo, cada cepa mostró diferencias en cuanto al crecimiento micelial primario y para continuar con las pruebas de esta investigación se utilizó el medio en el cual dicho crecimiento fue mayor. De este modo, en siete de las cepas se observó mejor crecimiento cuando se usó EMA como medio de cultivo y en la cepa restante el mejor crecimiento se obtuvo en PDA. De manera general, cuando las cepas fueron aisladas en medio con lignina se puede describir el crecimiento de las ocho como lento y laxo, a pesar de que tres de las cepas pueden catalogarse como hongos lignícolas.

### 7.3 Identificación

#### 7.3.1 Amplificación de las regiones ITS

Los amplicones obtenidos muestran tamaños en el intervalo de 700 a 950 pb aproximadamente, longitud que concuerda con los tamaños reportados para el fragmento de interés en otras especies de hongos. Existe correspondencia entre los tamaños de las amplificaciones obtenidas a partir de ADN extraído del cuerpo fructífero y del ADN extraído a partir del micelio cultivado, resultados que sugieren que no tuvimos contaminación. En las figuras 5, 6 y 7 se muestran las fotografías de los geles de electroforesis que muestran el tamaño estimado de los amplicones para cada cepa.

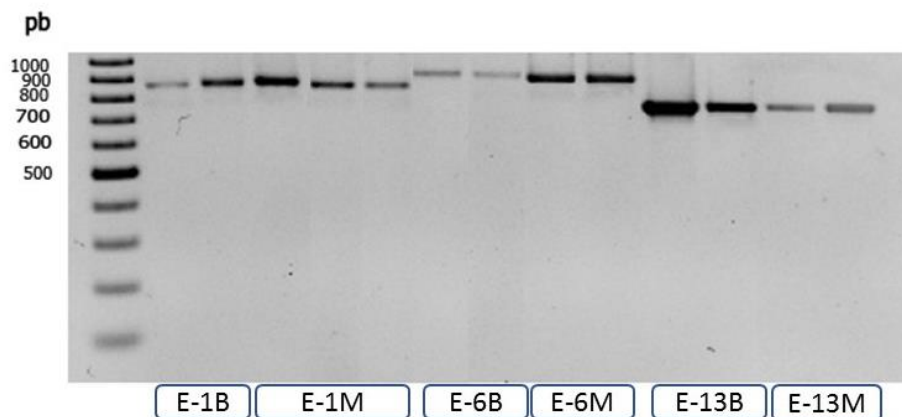


Figura 5: Amplificaciones obtenidas de los especímenes 1, 6 y 13. La letra B indica que fue obtenido a partir de ADN extraído del basidioma, la letra M del micelio.

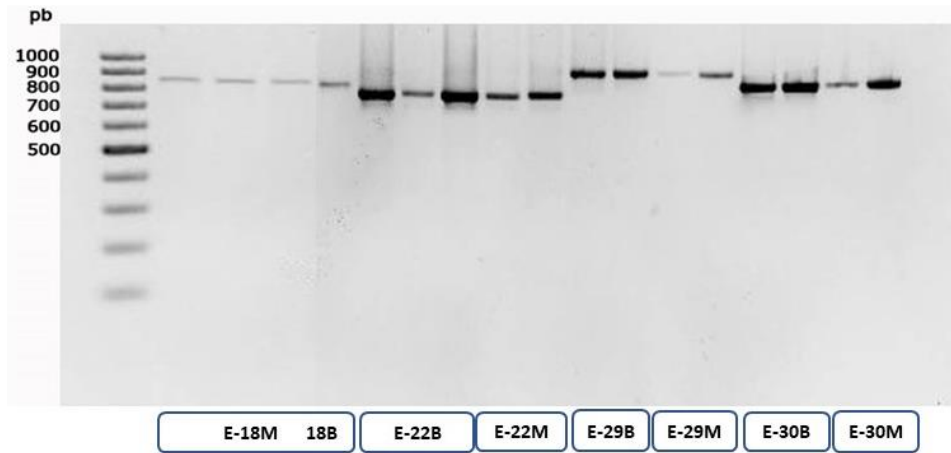


Figura 6: Amplificaciones obtenidas de los especímenes 18, 22, 29, 30.

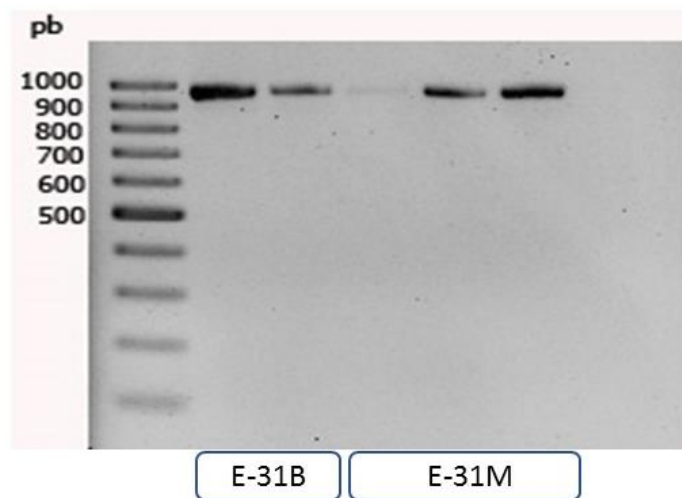


Figura 7: Amplicones obtenidos del espécimen 31.



### 7.3.2 Identificación de *Coniophora aff. arida*

#### Datos moleculares

Se obtuvo una secuencia consenso de 776 pb, con la siguiente clave de acceso en genbank, MG817374, de un amplicón de aproximadamente 830 pb, con la cual el análisis BLAST nos muestra un 99% de similitud con diversas secuencias de la región ITS de la especie *Coniophora arida* y con una cobertura máxima del 86% con una secuencia de una cepa de *Coniophora arida* con clave en genbank de GU187510.1 perteneciente a los Estados Unidos (Figura 8).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora sp. HHB-17606 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1197	1197	87%	0.0	99%	<a href="#">GU187518.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida CFMR-FP-104367 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1186	1186	86%	0.0	99%	<a href="#">GU187510.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida var. suffocata MUCL 30844 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1177	1177	85%	0.0	99%	<a href="#">GU187511.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida 5.8S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), isolate P294</a>	1133	1133	82%	0.0	99%	<a href="#">AJ344113.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida 5.8S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), isolate P 232 (MUCL 30844)</a>	1133	1133	82%	0.0	99%	<a href="#">AJ345007.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida strain VL389 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene</a>	1107	1107	80%	0.0	99%	<a href="#">JF440589.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate FP103970</a>	1079	1079	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747500.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate DAOM137396</a>	1066	1066	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747513.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate FP 100307</a>	1059	1059	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747510.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate RLG-6888</a>	1059	1059	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747506.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate DAOM176418</a>	1057	1057	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747499.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate DAOM196973</a>	1053	1053	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747514.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Coniophora arida ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate MUCL40342</a>	1053	1053	75%	0.0	99%	<a href="#">AM747504.1</a>

Figura 8: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 18 con secuencias de la base de datos de GenBank.

#### Descripción morfológica

**Descripción macroscópica:** Basidioma resupinado. Lignícola. De color café amarillento en el centro (10 YR 5/4) y café muy pálido a blanquecino en el margen (10 YR 8/4) (Figura 9).

**Descripción microscópica:** Esporas ovoides. Tamaño de esporas de: 6.01-8.94  $\mu\text{m}$  X 9.96-14.17  $\mu\text{m}$ ,  $A_m=7.51 \mu\text{m}$ ,  $L_m=12.27 \mu\text{m}$  (Figura 9).

Especimen estudiado: ROA-0018, Ixtacuixtla, Mpio. de Ixtacuixtla, Tlaxcala, N 19°20'0.08'' N, 98°21'52.3'' W, 2,160 msnm; Sobre madera como sustrato en bosque de *Juniperus deppeana*.

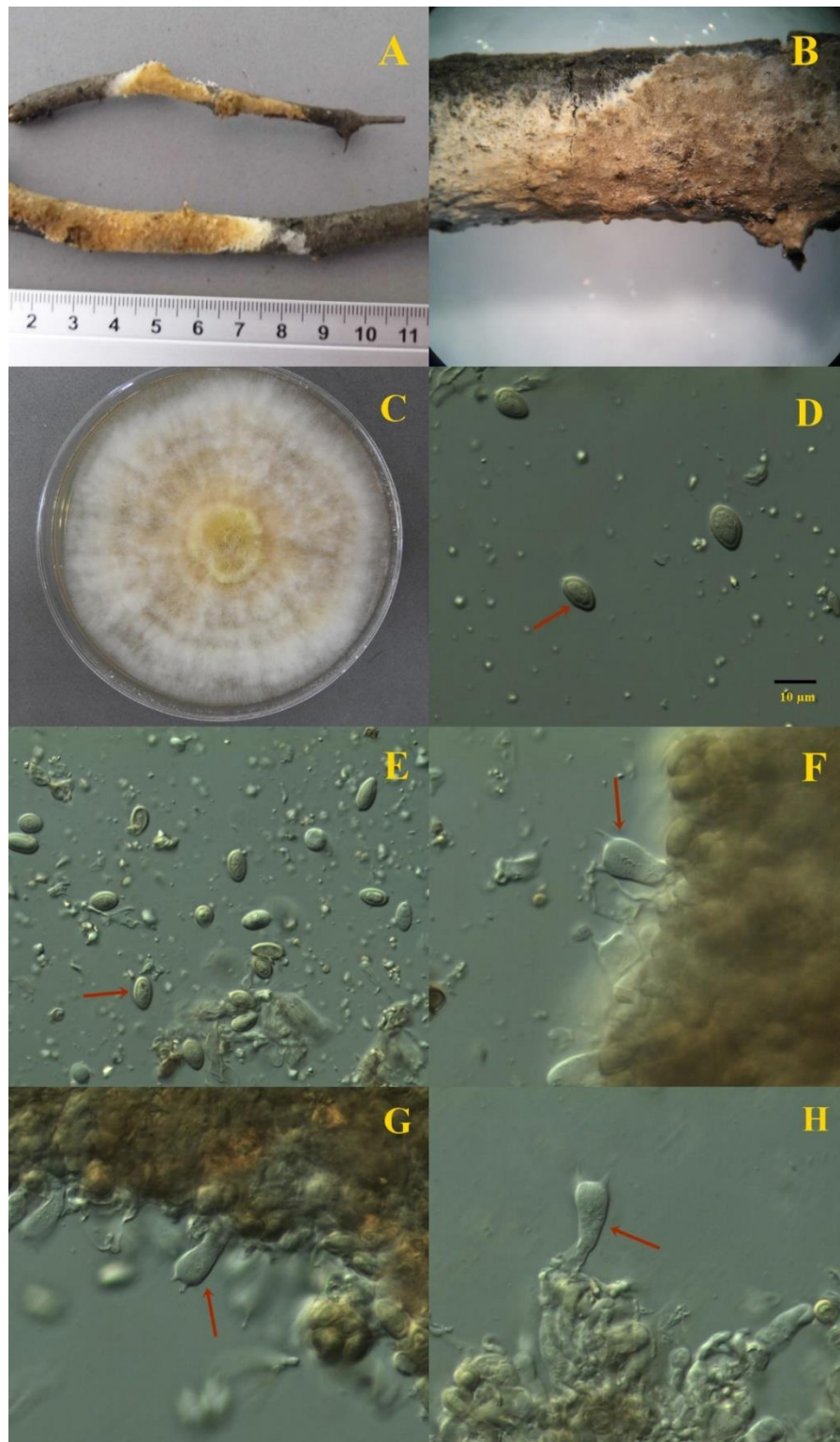


Figura 9: Estructuras de *Coniophora* sp. A-B) Basidioma, C) Cepa aislada, D-E) Esporas — 10  $\mu$ m, F, G y H) Basidios.

### 7.3.3 Identificación de *Agroclybe cf. pediades*

#### Datos moleculares

Se obtuvieron dos secuencias consenso con una longitud de 887 y 896 pb, con clave de acceso en genbank MG817375 y MG817376. Ambas nos muestran porcentajes altos de similitud con secuencias de *Agroclybe pediades*, 98 y 99 %, además de exhibir alta similitud con una secuencia de *Agroclybe semiorbicularis* de 97 y 99 % (Figuras 10 y 11).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured soil fungus clone 167-20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1258	1258	82%	0.0	97%	DQ421093.1
<b>Agroclybe pediades strain dd08006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</b>	<b>1243</b>	<b>1243</b>	<b>81%</b>	<b>0.0</b>	<b>98%</b>	<b>FJ810133.1</b>
<b>Agroclybe pediades strain dd08004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</b>	<b>1238</b>	<b>1238</b>	<b>81%</b>	<b>0.0</b>	<b>98%</b>	<b>FJ810131.1</b>
Agroclybe pediades strain AAU_P3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1199	1199	78%	0.0	97%	KM375928.1
Agroclybe pediades strain 33RC12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1190	1190	77%	0.0	98%	KT272410.1
Agroclybe semiorbicularis specimen-voucher MSC 378490 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1177	1177	77%	0.0	97%	AY194536.1
Agroclybe cf. ochracea isolate MP1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit of 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1175	1175	77%	0.0	97%	KY706177.1
Agroclybe pediades strain ASI 19009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1162	1162	74%	0.0	98%	AY168829.1
Agroclybe pediades KACC500300 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1157	1157	74%	0.0	98%	AF345806.1
Uncultured Agroclybe clone B20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1155	1155	83%	0.0	95%	JX135083.1

Figura 10: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 1 con secuencias de la base de datos de GenBank.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured soil fungus clone 167-20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1267	1267	79%	0.0	99%	DQ421093.1
<b>Agroclybe pediades strain dd08006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</b>	<b>1254</b>	<b>1254</b>	<b>78%</b>	<b>0.0</b>	<b>99%</b>	<b>FJ810133.1</b>
<b>Agroclybe pediades strain dd08004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</b>	<b>1247</b>	<b>1247</b>	<b>78%</b>	<b>0.0</b>	<b>99%</b>	<b>FJ810131.1</b>
Agroclybe pediades strain AAU_P3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1208	1208	75%	0.0	99%	KM375928.1
Agroclybe pediades strain 33RC12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1203	1203	75%	0.0	99%	KT272410.1
Agroclybe semiorbicularis specimen-voucher MSC 378490 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1184	1184	74%	0.0	99%	AY194536.1
Agroclybe cf. ochracea isolate MP1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit of 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	74%	0.0	99%	KY706177.1
Agroclybe pediades strain ASI 19009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1179	1179	73%	0.0	99%	AY168829.1
Agroclybe pediades KACC500300 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1170	1170	73%	0.0	99%	AF345806.1

Figura 11: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 30 con secuencias de la base de datos de GenBank.



## **Descripción morfológica**

**Descripción macroscópica:** Basidiomas pequeños de 2.5 a 6 cm, de color café amarillento (10 YR 8/6). Tamaño del estípite de 2.2 a 5.1 cm, se muestra más oscuro conforme se acerca al píleo, de color amarillo-café (de 10 YR 7/6 a 10 YR 8/6). Diámetro del píleo de 0.6 a 2.3 cm, de color amarillo pardusco (10 YR 6/6). Láminas adnatas, de color café oscuro (7.5 YR 5/6 y 5/8). Carece de anillo (Figuras 12 y 13).

**Descripción microscópica:** Esporada de color marrón y/o café amarillento, forma de las esporas ovoide, sin ornamentación, lisas, tamaño de esporas de 8.24-11.64  $\mu\text{m}$  X 14.27-18.93  $\mu\text{m}$ ,  $A_m=9.65 \mu\text{m}$ ,  $L_m=16.06 \mu\text{m}$ . Basidios bispóricos, cistidios hialinos. Presencia de fíbulas (Figuras 12 y 13).

Especímenes estudiados: ROA-001, Ixtacuixtla, Mpio. de Ixtacuixtla, Tlaxcala, 19°20'0.03'' N, 98°21'52.8'' W, 2,166 msnm; ROA-030, Íbidem, 19°19'58.4'' N, 98°21'56.9'' W, 2166 msnm. Sobre suelo como sustrato, asociado a pastizal, en bosque de *Juniperus deppeana*.

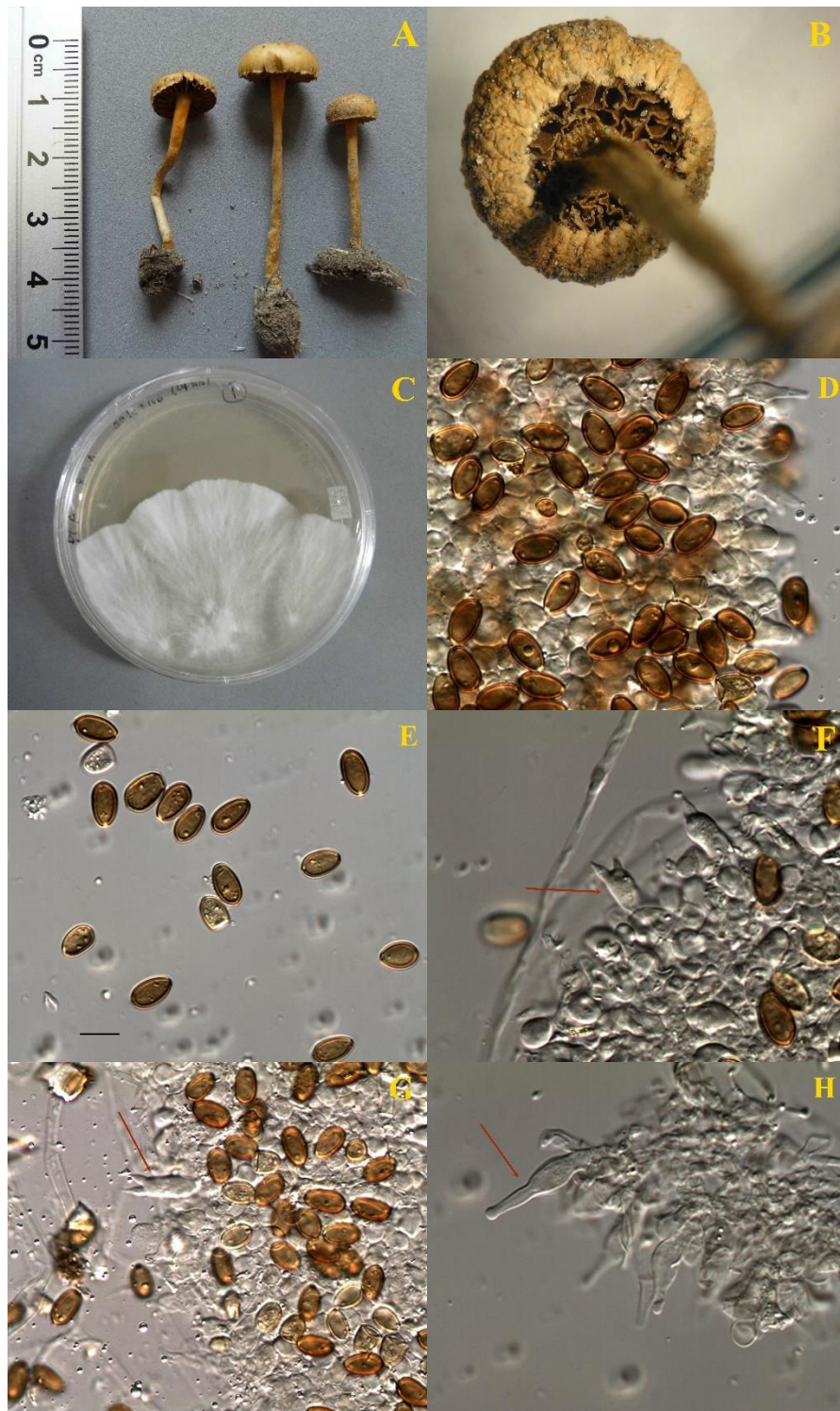


Figura 12: Estructuras del espécimen OAR-001. A) Basidiomas. B) Láminas, C) Cepa aislada en EMA (Extracto de malta), D-E) Esporas — 15  $\mu\text{m}$ , F-G) Basidios y H) Queilocistidios.

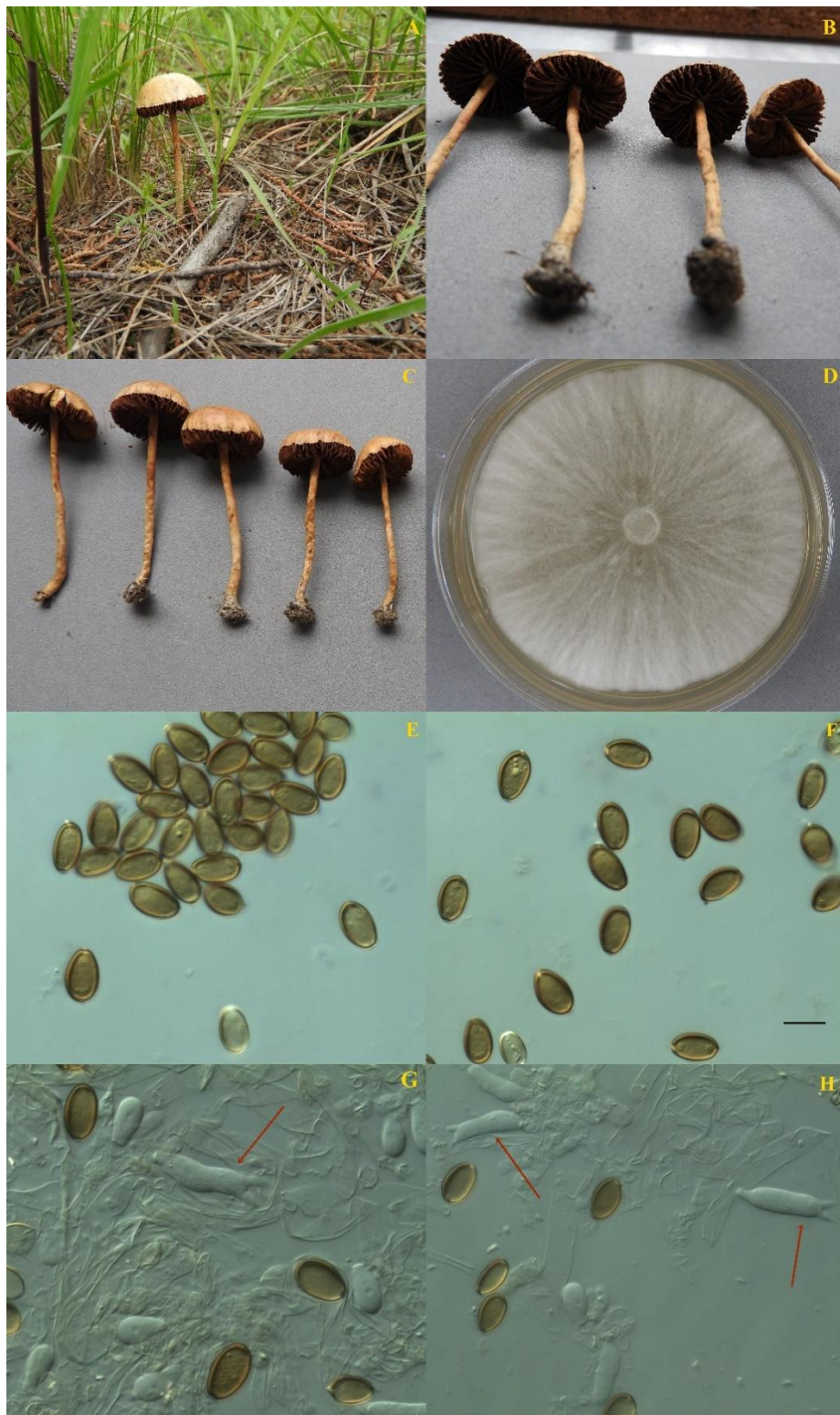


Figura 13: Estructuras del espécimen OAR-0030. A, B y C) Basidiomas. D) Cepa aislada en EMA (Extracto de malta), E-F) Esporas — 15  $\mu\text{m}$ , G-H) Basidios.



### 7.3.4 Identificación de *Byssomerulius* aff. *corium*

#### Datos moleculares

Se obtuvieron dos secuencias consenso de 805 y 797 pb, con las siguientes claves de acceso en genbank, MG817377 y MG817378. Dichas secuencias muestran en el análisis BLAST una similitud de 96 y 97 % con la especie *Byssomerulius corium* (Figuras 14 y 15).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Uncultured fungus clone CMH528 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1345	1345	93%	0.0	99%	<a href="#">KF800617.1</a>
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU40</a>	1245	1245	89%	0.0	98%	<a href="#">AM902085.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain Champ-85 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1098	1098	81%	0.0	96%	<a href="#">KX449489.1</a>
<a href="#">Byssomerulius sp. voucher Miettinen 16710 (H) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1096	1096	78%	0.0	98%	<a href="#">KY948746.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain MA-52 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1081	1081	80%	0.0	96%	<a href="#">KP135006.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain Champ-46 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1074	1074	80%	0.0	96%	<a href="#">KX449451.1</a>
<a href="#">Uncultured fungus clone S36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1066	1066	81%	0.0	96%	<a href="#">FJ820524.1</a>
<a href="#">Uncultured fungus clone ZSH201206-42 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1055	1055	81%	0.0	95%	<a href="#">KX515537.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain FP-107055 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1048	1048	76%	0.0	97%	<a href="#">KP135008.1</a>

Figura 14: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 13 con secuencias de la base de datos de GenBank.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Uncultured fungus clone CMH528 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1341	1341	93%	0.0	99%	<a href="#">KF800617.1</a>
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU40</a>	1253	1253	92%	0.0	97%	<a href="#">AM902085.1</a>
<a href="#">Byssomerulius sp. voucher Miettinen 16710 (H) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1120	1120	79%	0.0	99%	<a href="#">KY948746.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain Champ-85 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1118	1118	82%	0.0	97%	<a href="#">KX449489.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain MA-52 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1099	1099	81%	0.0	97%	<a href="#">KP135006.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain Champ-46 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1096	1096	81%	0.0	97%	<a href="#">KX449451.1</a>
<a href="#">Uncultured fungus clone S36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1081	1081	81%	0.0	97%	<a href="#">FJ820524.1</a>
<a href="#">Uncultured fungus clone ZSH201206-42 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1075	1075	83%	0.0	96%	<a href="#">KX515537.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain FP-107055 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1059	1059	78%	0.0	97%	<a href="#">KP135008.1</a>
<a href="#">Byssomerulius corium strain FP-102382 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1031	1031	81%	0.0	95%	<a href="#">KP135007.1</a>
<a href="#">Uncultured fungus clone CMH526 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1018	1018	93%	0.0	91%	<a href="#">KF800615.1</a>
<a href="#">Polyporales sp. 1 SR-2012 strain 718 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1018	1018	93%	0.0	91%	<a href="#">JQ312208.1</a>

Figura 15: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 22 con secuencias de la base de datos de GenBank.

### **Descripción morfológica**

**Descripción macroscópica:** Cuerpo fructífero al principio resupinado después el margen tiende a levantarse, de aproximadamente 7 cm de largo. De hábito lignícola. En algunas partes blanquecino (10 YR 8/4), en el centro amarillento-pardo (5Y 7/6), en otras de un tono amarillento (10YR 7/6) y en la periferia amarillo pálido (2.5 Y 7/6) con el margen blanquecino. Suave al tacto. Frágil cuando está seco. Himenio conformado con pliegues porosos (pseudoporos), contexto blanco (Figura 16 y 17).

**Descripción microscópica:** Presencia de basidios inmaduros, la mayoría son basidiolos. En el caso de estos especímenes no se lograron observar esporas (Figura 16 y 17).

Especímenes estudiados: ROA-013, Ixtacuixtla, Mpio. de Ixtacuixtla, Tlaxcala, 19°19'59.7'' N, 98°21'52.2'' W, 2261 msnm; ROA-022, Íbidem, 19°20'00.1'' N, 98°21'55.8'' W, 2277 msnm. Sobre madera como sustrato en bosque de *Juniperus deppeana*.

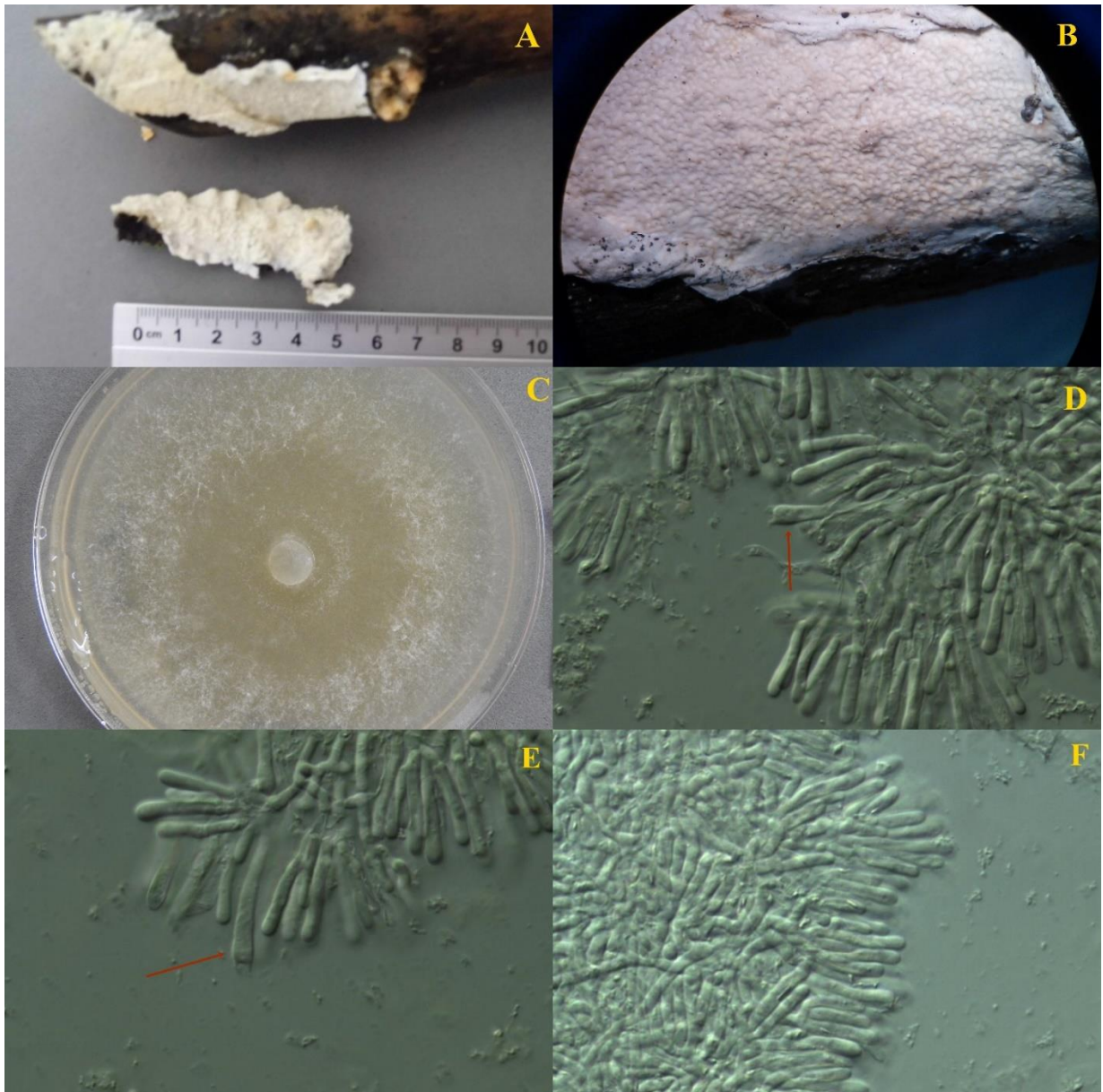


Figura 16: Estructuras del espécimen OAR-013. A) Basidioma, B) Pliegues porosos, C) Cepa aislada sembrada en EMA, D-E) Basidios inmaduros y F) Basidiospores.



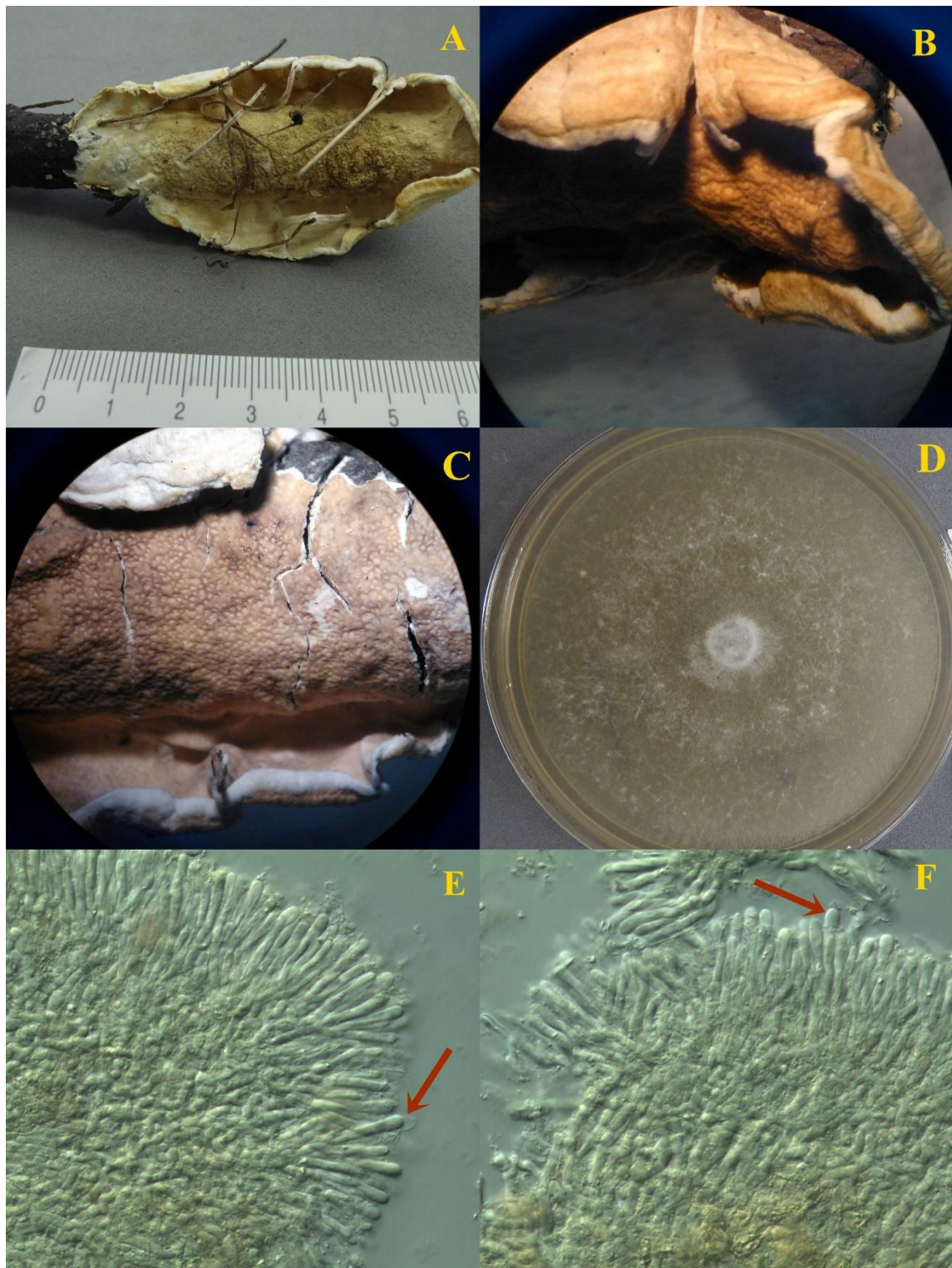


Figura 17: Estructuras del espécimen OAR-022. A-B) Basidioma, C) Pliegues porosos, D) Cepa aislada sembrada en EMA, E-F) Basidios.

### 7.3.5 Identificación de *Gymnopus* sp.

#### Datos moleculares

Se obtuvieron tres secuencias, una con el primer ITS1 de una longitud de 553 pb y dos más de 892 y 891 pb, estas últimas con las siguientes claves de acceso en genbank MG817379 y MG817380. Todas ellas muestran porcentajes de similitud de 97 y 98 % con secuencias de la especie *Gymnopus barbipes* (Figuras 18, 19 y 20).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU122</a>	704	704	98%	0.0	90%	<a href="#">AM901880.1</a>
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU123</a>	701	701	98%	0.0	90%	<a href="#">AM902062.1</a>
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU121</a>	697	697	98%	0.0	90%	<a href="#">AM901936.1</a>
<a href="#">Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU124</a>	689	689	98%	0.0	90%	<a href="#">AM901996.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14110 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna</a>	675	675	73%	0.0	97%	<a href="#">KJ416269.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-4 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter</a>	675	675	73%	0.0	97%	<a href="#">KJ416266.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-2 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter</a>	675	675	73%	0.0	97%	<a href="#">KJ416265.1</a>

Figura 18: Resultados de la comparación de la secuencia del espécimen 6-primer ITS1 en la base de datos GenBank

<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-4 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern</a>	1007	1215	78%	0.0	98%	<a href="#">KJ416266.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes TENN 67855 ITS region, from TYPE material</a>	1003	1217	78%	0.0	97%	<a href="#">NR_152901.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14110 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal</a>	1003	1217	78%	0.0	97%	<a href="#">KJ416269.1</a>
<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-2 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern</a>	1002	1215	78%	0.0	97%	<a href="#">KJ416265.1</a>
<a href="#">Gymnopus trabzonensis KATO Funqi 3375 ITS region, from TYPE material</a>	992	1180	78%	0.0	97%	<a href="#">NR_152913.1</a>
<a href="#">Gymnopus trabzonensis voucher KATO Funqi 3375 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib</a>	992	1180	78%	0.0	97%	<a href="#">KT271754.1</a>
<a href="#">Gymnopus sp. RR-2015b voucher BRNM 718713 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequer</a>	990	990	81%	0.0	91%	<a href="#">KP336691.1</a>
<a href="#">Micromphale brassicolens voucher TFB8930 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa</a>	987	987	79%	0.0	92%	<a href="#">DQ449989.1</a>
<a href="#">Gymnopus varicolor genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, specimen voucher BRNM 714959</a>	985	985	79%	0.0	92%	<a href="#">LT594121.1</a>
<a href="#">Gymnopus dysodes strain CRG005 (TENN) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri</a>	981	981	86%	0.0	90%	<a href="#">MF773622.1</a>

Figura 19: Resultados de la comparación de la secuencia consenso del espécimen 29 con secuencias de la base de datos de GenBank.



<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-4 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern</a>	1014	1217	78%	0.0	98%	<a href="#">KJ416266.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus barbipes TENN 67855 ITS region: from TYPE material</a>	1011	1219	78%	0.0	98%	<a href="#">NR_152901.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14110 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal</a>	1011	1219	78%	0.0	98%	<a href="#">KJ416269.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus barbipes isolate TFB14106-2 voucher TENN 67855 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern</a>	1009	1217	78%	0.0	98%	<a href="#">KJ416265.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus trabzonensis KATO Fungi 3375 ITS region: from TYPE material</a>	1002	1184	78%	0.0	97%	<a href="#">NR_152913.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus trabzonensis voucher KATO Fungi 3375 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib</a>	1002	1184	78%	0.0	97%	<a href="#">KT271754.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus sp. RR-2015b voucher BRNM 718713 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequer</a>	994	994	81%	0.0	91%	<a href="#">KP336691.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gymnopus varicolor genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, specimen voucher BRNM 714959</a>	989	989	79%	0.0	92%	<a href="#">LT594121.1</a>

Figura 20: Resultados de la comparación de la secuencia del espécimen 31-primer ITS1 en la base de datos GenBank.

## Descripción morfológica

**Descripción macroscópica:** Basidiomas de tamaño variable de 3 a 7.7 cm, con variación de color a lo largo del cuerpo. Tamaño del estípite de 1.4 a 6.2 cm, blanco y tomentoso en la base (10 YR 8/1), de marrón rojizo a café oscuro en el ápice (5YR 5/3), (7.5 YR 5/4). Diámetro del píleo de 0.7 a 5.5 cm, color del píleo en individuos jóvenes de rojo oscuro (10R 3/2, 10R 2.5/2) (Color 1975) en la parte central a rojo débil (10R 5/4) en el margen. Color del píleo en ejemplares adultos de marrón rojizo oscuro a café oscuro (5YR 3/4), (7.5 YR 4/6) en la parte central a marrón rojizo (5YR 4/4), (7.5 YR 6/6) en el disco. Píleo expandido cuando adulto con protuberancia en el centro. Color de las laminillas rosado (7.5 YR 7/4). Olor fuerte y desagradable (Figuras 21, 22 y 23).

**Descripción microscópica:** Esporas hialinas, elipsoides, sin ornamentación, lisas, tamaño de esporas variable, de 2.95-5.22  $\mu\text{m}$  X 5.75-10.4  $\mu\text{m}$ ,  $A_m=4.05 \mu\text{m}$ ,  $L_m=7.95 \mu\text{m}$ . Basidios tetraspóricos. Tamaño de basidios de 4.67-7.26  $\mu\text{m}$  X 18.12-26.37  $\mu\text{m}$ ,  $A_m=6.10 \mu\text{m}$ ,  $L_m= 22.34 \mu\text{m}$ . Presencia de fíbulas (Figuras 21, 22 y 23).

Especímenes estudiados: ROA-006, Ixtacuixtla, Mpio. de Ixtacuixtla, Tlaxcala, 19°19'59.8'' N, 98°21'52.9'' W, 2264 msnm; ROA-029, Íbidem, 19°19'58.8'' N, 98°21'58.4'' W, 2166 msnm; ROA-031 Íbidem 19°19'57.9'' N, 98°21'57.0'' W, 2166 msnm. Sobre hojarasca como sustrato, en bosque de *Juniperus deppeana*.

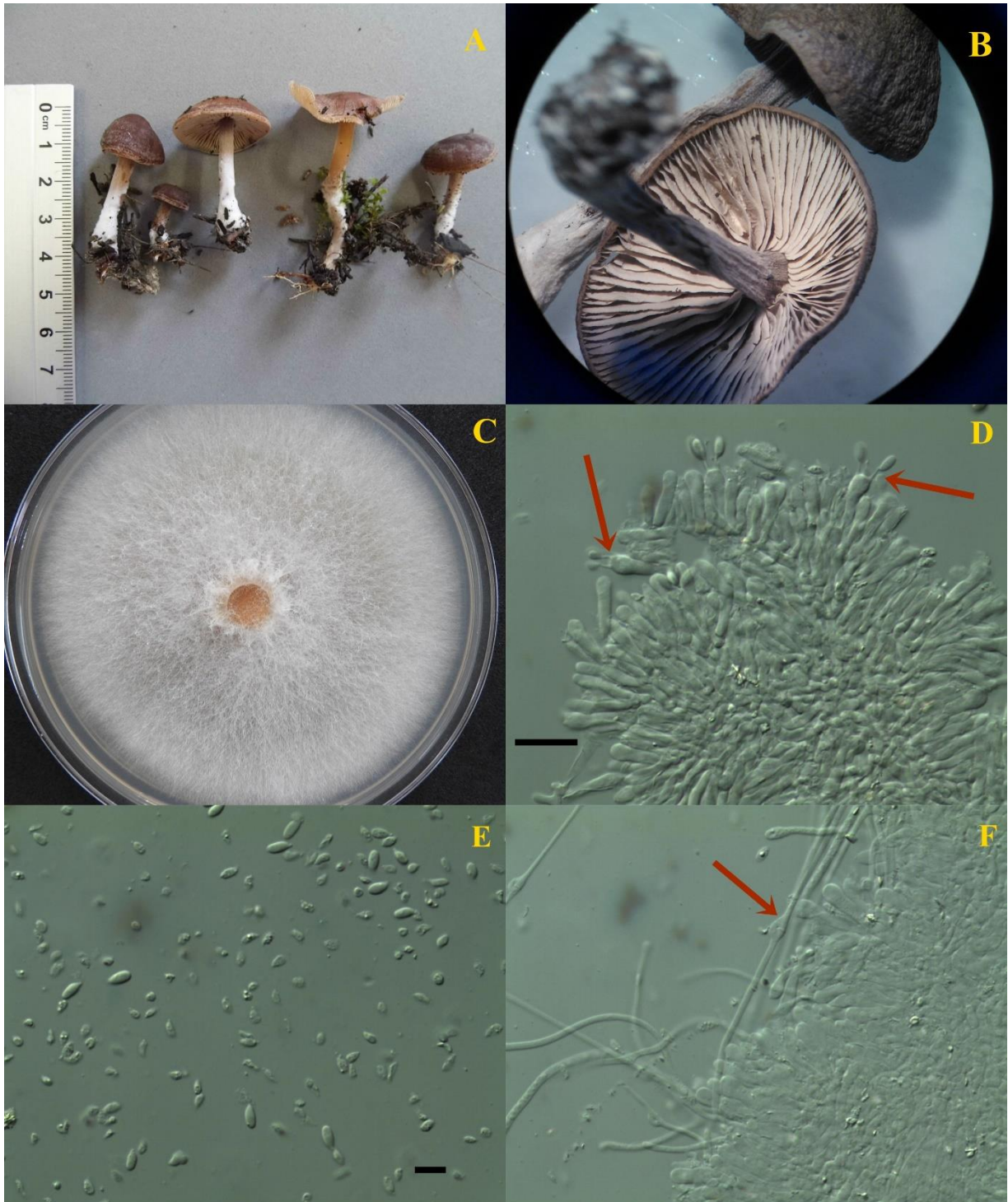


Figura 21: Estructuras 6: A) Basidiomas, B) Láminas, C) Cepa aislada sembrada en PDA, D) Basidios — 20  $\mu\text{m}$ , E) Esporas — 10  $\mu\text{m}$ , F) Fíbula.



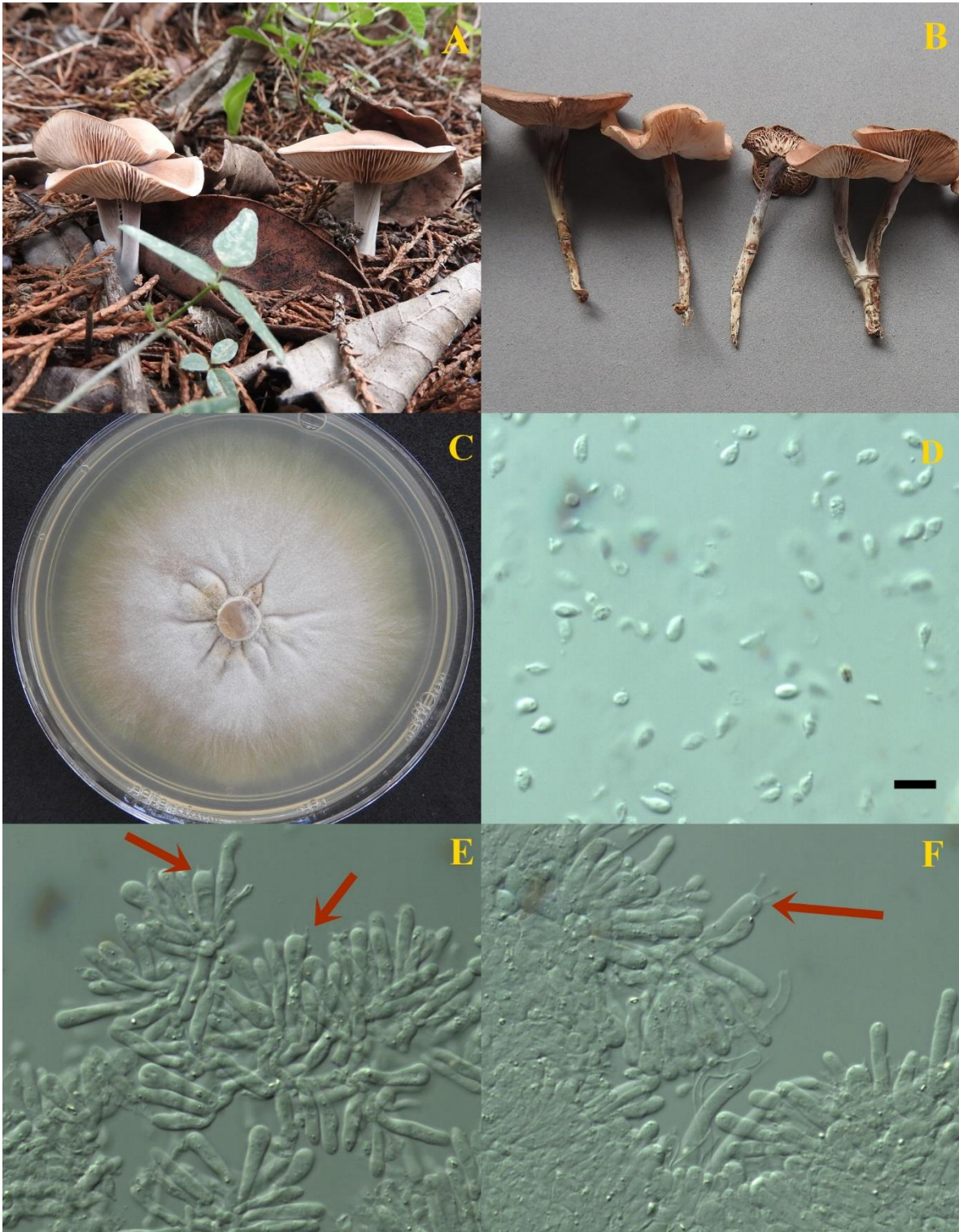


Figura 22: Estructuras del espécimen 29. A-B) Basidiomas, C) Cepa aislada sembrada en PDA, D) Esporas — 10  $\mu$ m, E-F) Basidios.

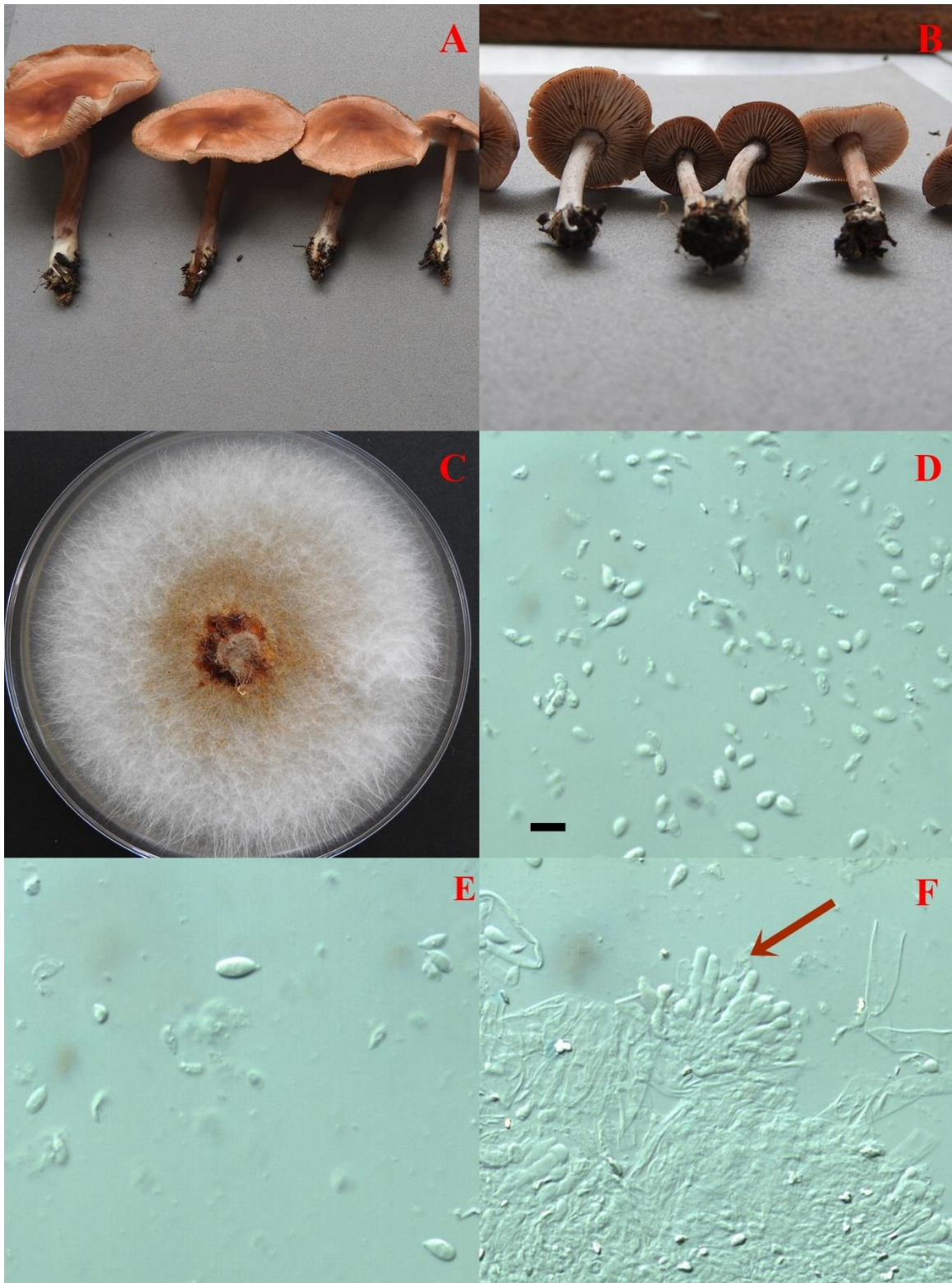


Figura 23: Estructuras del espécimen 31. A-B) Basidiomas, C) Cepa aislada sembrada en PDA, D-E) Esporas — 10  $\mu$ m, F) Basidio.



## 7.4 Evaluación de la velocidad media de crecimiento

### 7.4.1 Velocidad media de crecimiento de *Coniophora aff. arida*, cepa CIGyA001-OAR018.

En el caso de esta cepa se observaron diferencias en el tiempo de crecimiento sobre los diferentes medios. Al día ocho el micelio inoculado sobre medio mineral ya había invadido en su totalidad el espacio de las cajas, mientras que en los otros medios aún no, además de notarse las diferencias respecto a la densidad del micelio (Figura 24).

En el análisis de varianza se muestran diferencias significativas respecto a la velocidad media de crecimiento ( $F_{4, 10} = 292.015$   $p = 0.0001$ ), mientras que la prueba post-hoc indica que hay diferencias significativas entre todas las comparaciones, siendo el medio mineral con glucosa el que presenta la mayor velocidad de crecimiento con 11.440 mm/d (milímetros por día), mientras que agar-agar mostró el menor valor con 5.116 mm/d (Figura 25).



Figura 24: Colonias de *Coniophora aff. arida*, cepa CIGyA001-OAR018 al día ocho en diferentes medios de cultivo: A) Medio de cultivo EMA, B) PDA, C) Medio mineral con glucosa, D) Agar-lignina y E) Agar-agar

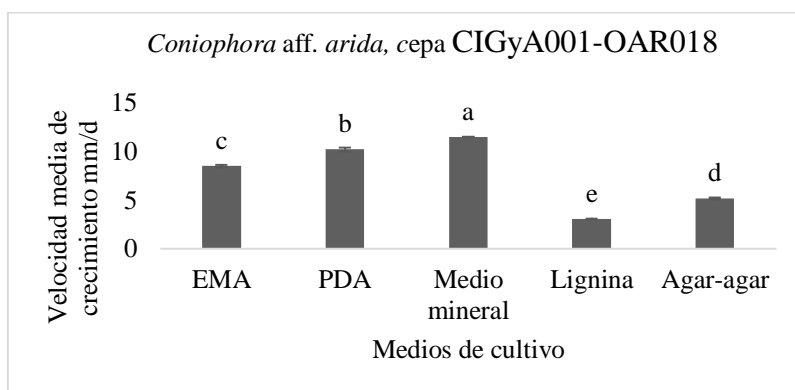


Figura 25: Valor promedio de velocidad de crecimiento para *Coniophora aff. arida*, cepa CIGyA001-OAR018 en diferentes medios de cultivo. Cada barra representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo a la prueba post-hoc.

#### 7.4.2 Velocidad media de crecimiento de *Agrocybe cf. pediades* cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030.

Las cepas de esta especie mostraron diferencias en el crecimiento en los diferentes medios de cultivo, expresando preferencias por algunos de ellos. Para la cepa CIGyA002-OAR001 se observó un micelio más denso en los medios EMA y PDA, mientras que éste fue laxo en agar-lignina y agar-agar (Figura 26). De igual manera, la cepa CIGyA003-OAR030 presentó un micelio denso tanto en EMA, PDA y medio mineral con glucosa, aunque en los dos últimos su crecimiento fue más lento. Al igual que en la cepa anterior, el micelio presentó un crecimiento laxo en agar-lignina y agar-agar (Figura 27). La primera cubrió por completo la superficie de la caja a los 13 días, mientras que la segunda lo hizo hasta el día 16.

Respecto a la velocidad de crecimiento, la cepa CIGyA002-OAR001 obtuvo su mayor velocidad en el medio EMA con un valor de 6.396 mm/d, mientras que el menor valor se obtuvo en el medio de agar-agar con solo 3.895 mm/d. Por otro lado, la cepa CIGyA003-OAR030 obtuvo su valor mayor en el medio con lignina con 5.14 mm/d y el valor menor fue en PDA con 3.29 mm/d. En ambas cepas, el ANOVA indicó diferencias ( $F_{3,8} = 25.786$ ,  $p = 0.0001$ , para la cepa CIGyA002-OAR001 y  $F_{4,10} = 3.602$ ,  $p = 0.046$  para la cepa CIGyA003-OAR030). La prueba Tukey especifica que en la primera cepa la mayoría de las comparaciones muestran diferencias significativas con excepción de la comparación entre PDA y lignina. Para la segunda cepa solo se presentan diferencias entre agar-lignina y PDA (Figura 28).

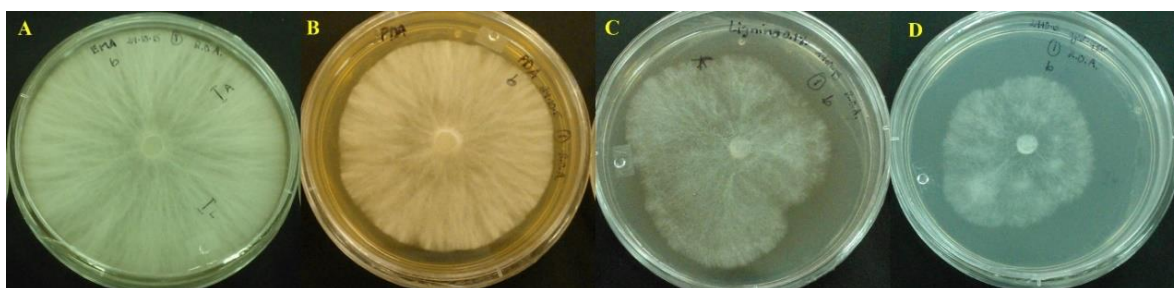


Figura 26: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 al día 13 en diferentes medios de cultivo: A) Medio de cultivo EMA, B) PDA, C) Agar-lignina y D) Agar-agar.

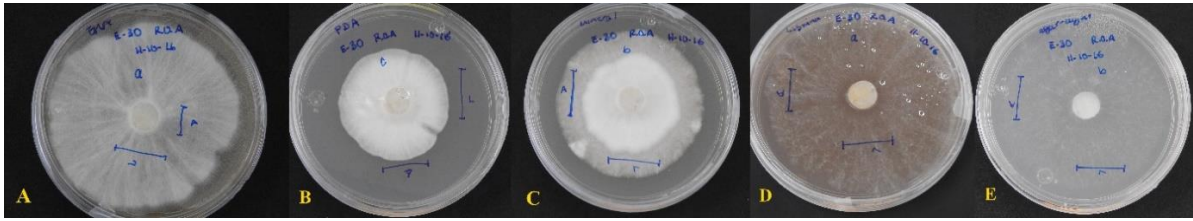


Figura 27: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 al día 16 en diferentes medios de cultivo: A) Medio de cultivo EMA, B) PDA, C) Medio mineral con glucosa, D) Agar-lignina y E) Agar-agar

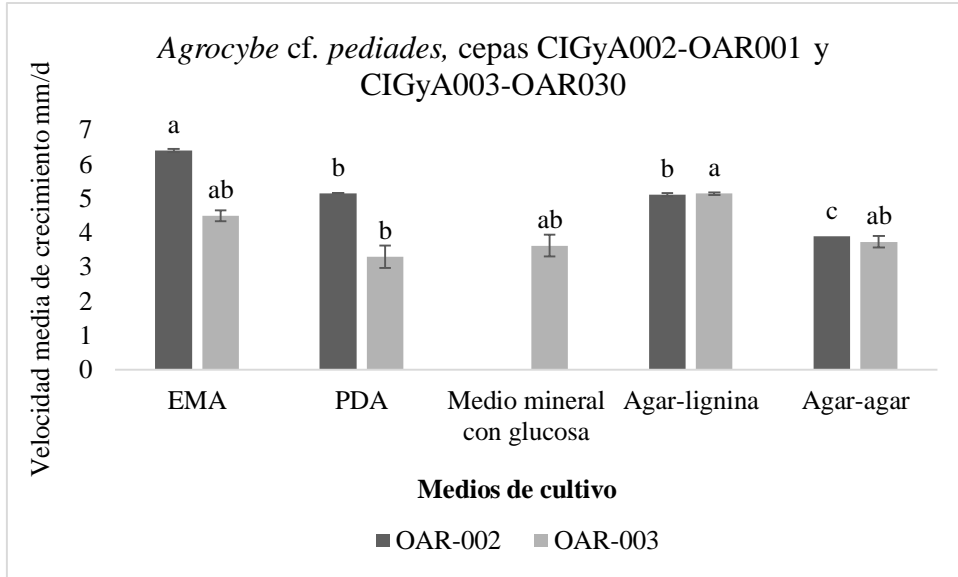


Figura 28: Valor promedio de velocidad de crecimiento para *Aagrocybe cf. pediades*, cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030 en diferentes medios de cultivo. Cada barra representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Letras iguales para la misma cepa indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba post-hoc.

### 7.4.3 Velocidad de crecimiento de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR022.

Las cepas correspondientes con el género *Byssomerulius* presentaron un crecimiento muy similar. Ambas mostraron un micelio laxo en la mayoría de los medios, no obstante, en el medio mineral con glucosa y en PDA, el micelio presentaba velocidad de crecimiento lenta, pero se observaba crecimiento más denso que en los otros medios (Figuras 29 y 30).

Ambas cepas exhibieron su mayor velocidad media de crecimiento en el medio EMA. Para la cepa CIGyA004-OAR013 se obtuvo en este medio un valor de 10.098 mm/d y para agar-lignina con 6.2736 mm/d con el valor más bajo, al día nueve. Por su parte, la cepa CIGyA005-OAR022 muestra para EMA un valor de 8.0708 mm/d y PDA con 6.4885 mm/d con el valor más bajo, al día 11.

El ANOVA en ambas cepas muestra diferencias significativas ( $F_{4, 10} = 140.736$   $p = 0.0001$  para la cepa CIGyA004-OAR013 y  $F_{4, 10} = 10.295$   $p = 0.001$  para la cepa CIGyA005-OAR022). La prueba de Tukey muestra diferencias significativas en la mayoría de las comparaciones para la cepa CIGyA004-OAR013, con excepción de tres (agar-agar vs PDA, agar-agar vs medio mineral y medio mineral con glucosa vs PDA), siendo EMA en donde se presenta la mayor velocidad media. En la cepa CIGyA005-OAR022, EMA muestra diferencias con PDA, agar-lignina y medio mineral con glucosa, siendo el medio en el que se presenta la mayor velocidad de crecimiento (Figura 31).

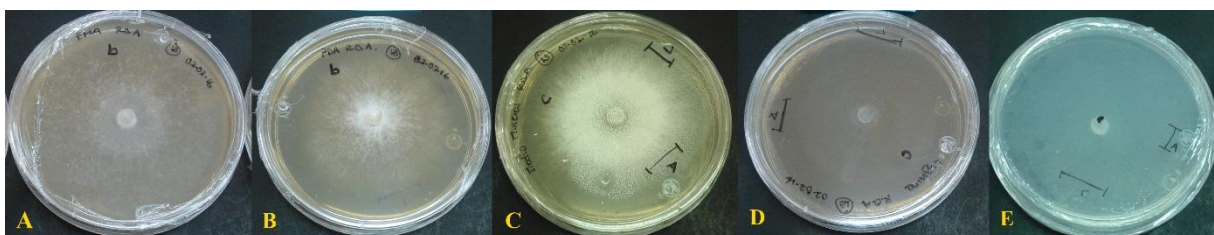


Figura 29: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA004-OAR013 al día nueve en diferentes medios de cultivo. A) EMA, B) PDA, C) medio mineral con glucosa, D) agar-lignina y E) agar-agar



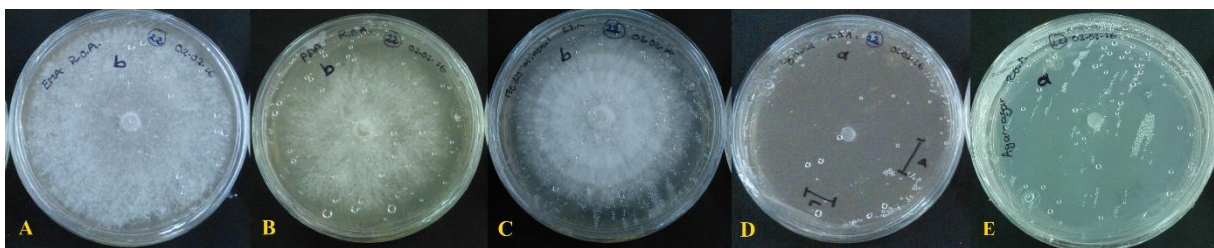


Figura 30: Colonias de *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA005-OAR022 al día 11 en diferentes medios de cultivo. A) EMA, B) PDA, C) medio mineral con glucosa, D) agar-lignina y E) agar-agar

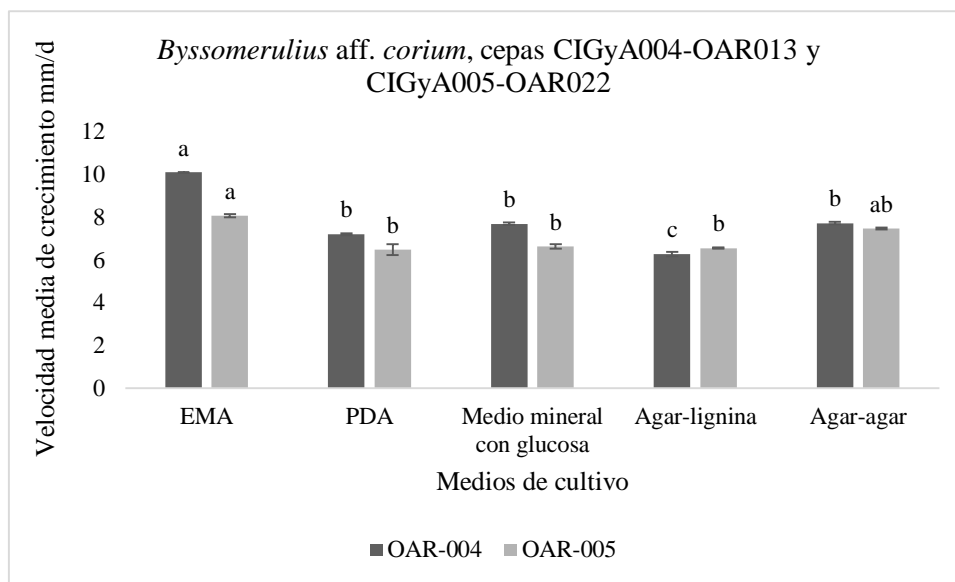


Figura 31: Valor de crecimiento para *Byssomerulius aff. corium*, cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR022 en diferentes medios de cultivo. Cada barra representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Letras iguales para la misma cepa indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba post-hoc.

#### 7.4.4 Velocidad de crecimiento de *Gymnopus sp.* cepas CIGyA006-OAR006, CIGyA007-OAR029 y GIGyA008-OAR031.

Las tres cepas de esta especie mostraron similitud en su crecimiento muy lento en los medios utilizados. Las tres cepas presentan un micelio más denso en PDA, característica que comparten las cepas CIGyA007-OAR029 y GIGyA008-OAR031 también en el medio mineral con glucosa (Figuras 32, 33 y 34).

Tanto la cepa CIGyA006-OAR006 como la cepa CIGyA007-OAR029 mostraron su valor mayor de velocidad media de crecimiento en el medio EMA, mientras que la cepa GIGyA008-OAR031 lo obtuvo en PDA. La primera cepa obtuvo el valor mayor de 6.4970 mm/d en EMA

y el menor en agar-lignina con 0.6520 mm/d. La cepa CIGyA007-OAR029 cepa tuvo su valor mayor en medio EMA con 4.58 mm/d y el menor en agar-agar con 0.6754 mm/d. Por su parte, la cepa GIGyA008-OAR031 para PDA muestra el mayor valor de 5.32 mm/d y el menor en agar-lignina con 1.85 mm/d respectivamente.

Los análisis estadísticos indican diferencias significativas ANOVA ( $F_{3,8} = 201.971$ ,  $p = 0.0001$  para la cepa CIGyA006-OAR006,  $F_{4,10} = 56.612$ ,  $p = 0.0001$  para la cepa CIGyA007-OAR029 y  $F_{4,10} = 16.805$ ,  $p = 0.0001$  para la cepa GIGyA008-OAR031). La prueba de Tukey exhibe para la primera cepa diferencias significativas en la mayoría de las comparaciones, excepto entre agar-agar y agar-lignina. Para la segunda cepa se presentan diferencias entre casi todas las comparaciones excepto entre medio mineral con glucosa vs PDA y agar-lignina vs agar-agar. Para la tercera, solo se observaron diferencias entre la velocidad de crecimiento en PDA y las encontradas en medio mineral con glucosa, agar-lignina y agar-agar, mientras que la velocidad media de crecimiento en EMA solo difirió estadísticamente de la encontrada en los dos últimos medios (Figura 35).

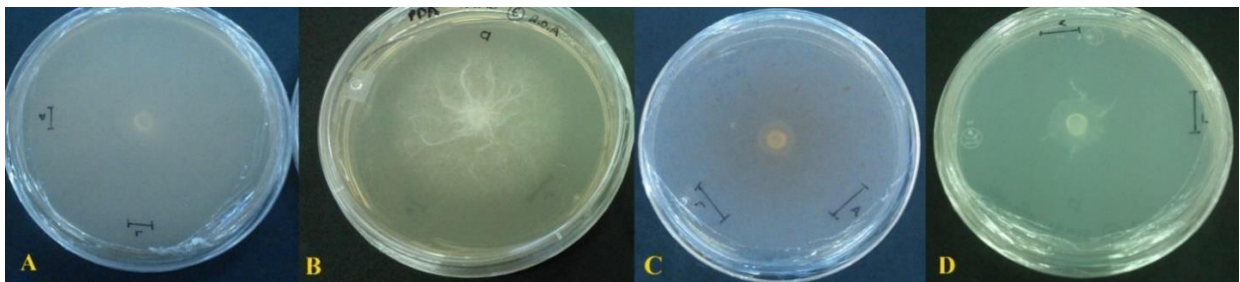


Figura 32: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA006-OAR006, crecimiento al día 14 en diferentes medios de cultivo. A) EMA, B) PDA, C) agar-lignina, D) agar-agar

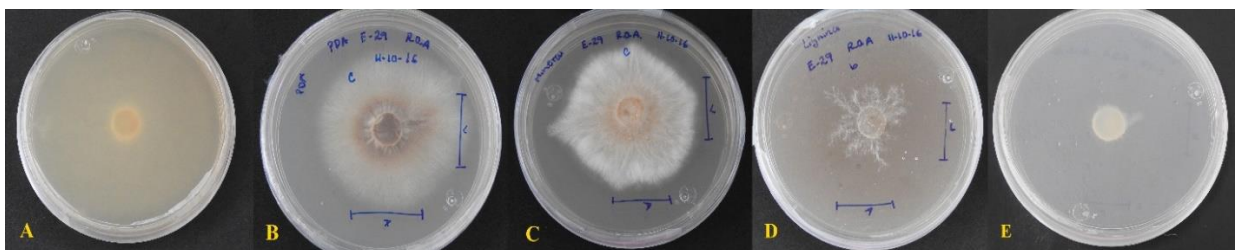


Figura 33: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA007-OAR029, crecimiento al día 18. A) EMA, B) PDA, C) medio mineral con glucosa, D) agar-lignina, E) agar-agar.

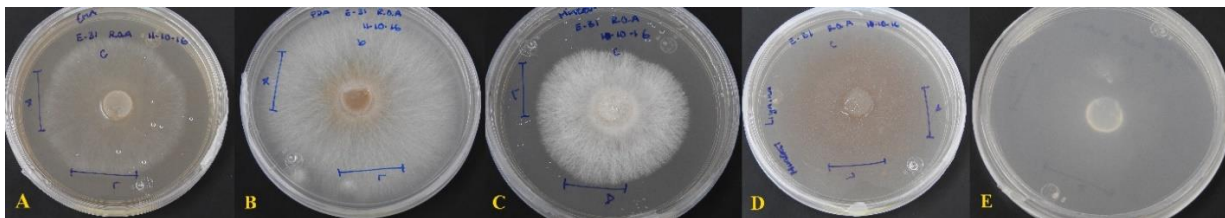


Figura 34: Colonias de de *Gymnopus* sp. cepa GIGyA008-OAR031, crecimiento al día 14. A) EMA, B) PDA, C) medio mineral con glucosa, D) agar-lignina, E) agar-agar.

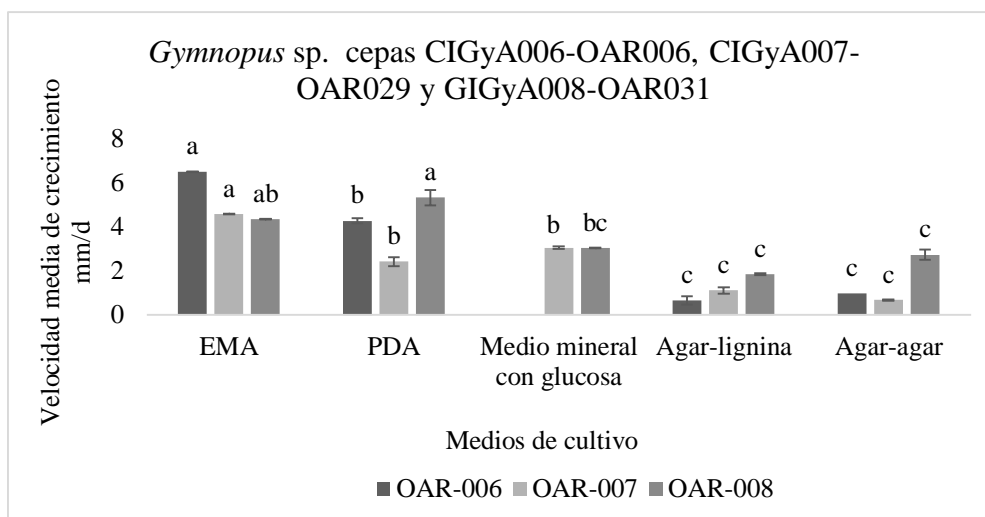


Figura 35: Valor de velocidad media de crecimiento para *Gymnopus* sp. cepas CIGyA006-OAR006, CIGyA007-OAR029 y GIGyA008-OAR031 en diferentes medios de cultivo. Cada barra representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Letras iguales para la misma cepa indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba post-hoc.

## **7.5 Resultados del ensayo de preservación**

Para esta fase los resultados reportados sólo corresponden con siete de las ocho cepas aisladas, ya que la cepa CIGyA006-OAR006 del género *Gymnopus*, no presentó resultados positivos en ningún tiempo de preservación. Cabe resaltar, que, para las otras dos cepas de dicho género, en las que, si se obtuvieron resultados, estos corresponden solo con los tiempos de tres y seis meses de preservación, debido a que al mes de preservadas ambas cepas presentaron un porcentaje de sobrevivencia bajo (20 %), motivo por el cual los datos de ese tiempo no pudieron someterse a los análisis estadísticos. Sin embargo, se decidió considerar los resultados de los tiempos restantes.

### **7.5.1 *Coniophora aff. arida*. cepa CIGyA0036-OAR018.**

Esta cepa mostró un crecimiento muy similar al testigo en los tres tiempos de recuperación después del tratamiento de preservación, sin embargo, se logra apreciar un cambio en una especie de pigmento, ya que al parecer con el paso del tiempo dicha característica no se presenta, además de que el micelio se logra observar más algodonoso (Figuras 36, 3 y 38). Se obtuvieron porcentajes altos de sobrevivencia solo en cuatro de los seis tratamientos. Con 100 % para la mayoría de ellos en los tres tiempos, con excepción del 60 % a los seis meses en el tratamiento a temperatura ambiente 15% de glicerol. Cabe mencionar que al mes de preservación solo se presentó el 20 % de sobrevivencia en los tratamientos a -20° C (Tabla3).

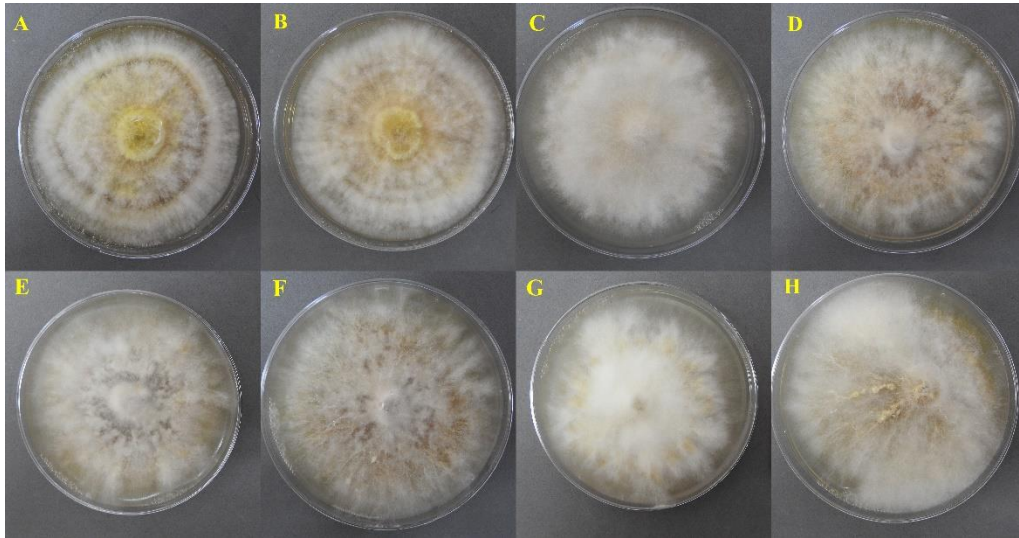


Figura 36: Colonias *Coniophora* aff. *arida*, cepa CIGyA0036-OAR018 después de un mes de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente 15% de glicerol., E) 4°C 10% de glicerol, F) 4°C 15% de glicerol, G) -20°C 10% de glicerol, H) -20°C 15 % de glicerol.

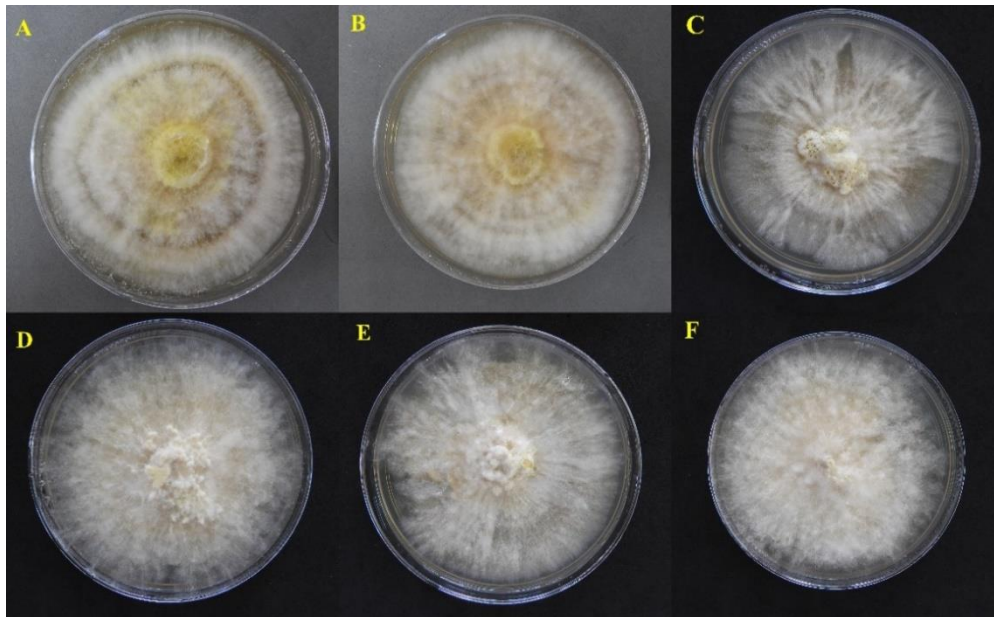


Figura 37: Colonias *Coniophora* cf. *arida*, cepa CIGyA0036-OAR018 después de tres meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente 15% de glicerol., E) 4°C 10% de glicerol, F) 4°C 15% de glicerol.



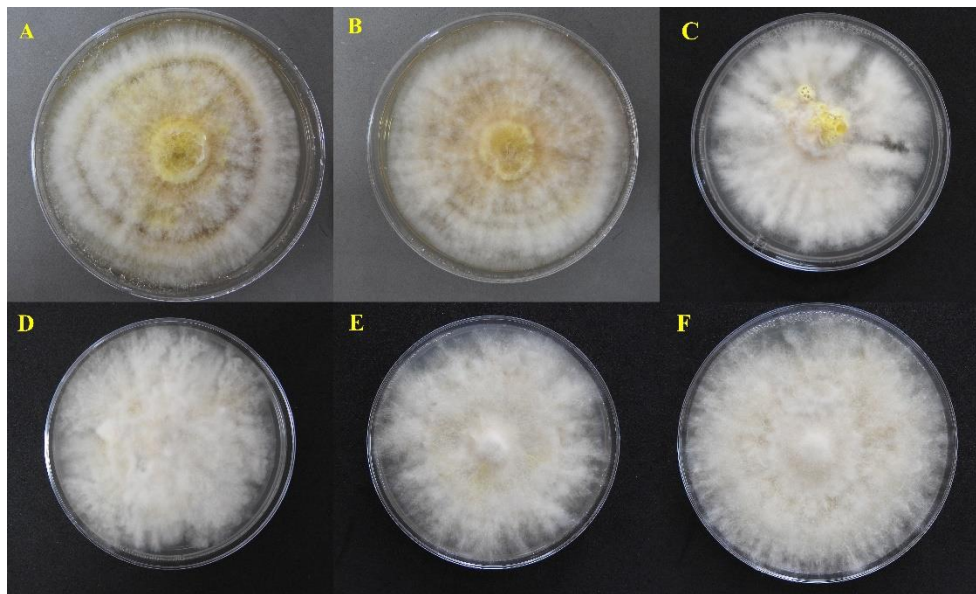


Figura 38: Colonias *Coniophora cf. arida*, cepa CIGyA0036-OAR018 después de seis meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente 15% de glicerol., E) 4°C 10% de glicerol, F) 4°C 15% de glicerol.

**Sobrevivencia %**

<i>Categoría</i>	<i>Un mes</i>	<i>Tres meses</i>	<i>Seis meses</i>
<i>Temperatura ambiente 10% de glicerol</i>	100	100	100
<i>Temperatura ambiente 15 %</i>	100	100	60
<i>4° C 10 % de glicerol</i>	100	100	100
<i>4° C 15 % de glicerol</i>	100	100	100

Tabla 3: Porcentaje de sobrevivencia de *Coniophora aff. arida*, cepa CIGyA0036-OAR018 en cuatro tratamientos después de un mes, tres y seis meses de preservación.

### **7.5.1.1 Velocidad media de crecimiento**

Respecto a este parámetro, en el testigo se obtuvo un valor promedio de crecimiento de 4.874 mm/d. es importante señalar que la mayoría de los tratamientos evaluados en los tres tiempos mostraron valores mayores a este. Por un lado, los tratamientos a T.A. tuvieron una mayor fluctuación y disminuyeron su velocidad de crecimiento a los seis meses de haber sido preservadas, en tanto los tratamientos a 4° C mantuvieron cierta estabilidad durante los tres tiempos.

Al mes de haber sido preservada esta cepa, se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento en el tratamiento a temperatura ambiente 10 % de glicerol con 5744 mm/d. A los tres meses el valor mayor fue de 5.832 mm/d a temperatura ambiente 15 % de glicerol. Mientras que, a los seis meses el tratamiento con el valor más alto fue a 4° C 10 % de glicerol con 5.470 mm/d.

De acuerdo a los análisis estadísticos, el ANOVA indica que existen diferencias entre los tratamientos en los tres tiempos evaluados ( $F_{4, 20} = 8.285$ ,  $p = 0.0001$  al mes de preservación,  $F_{4, 20} = 25.679$ ,  $p = 0.0001$ , a los tres meses y  $F_{4, 18} = 23.693$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett es empleada para comparar exclusivamente cada tratamiento con respecto al testigo. En este sentido, al mes de preservación dichas diferencias se presentaron en la mayoría de los tratamientos con excepción del tratamiento a 4° C 10 %. A los tres meses, solo hubo diferencias con los tratamientos a 15 % de glicerol independientemente de la temperatura, en tanto a los seis meses solo se presentaron diferencias significativas para los tratamientos a temperatura ambiente (Figura 39).

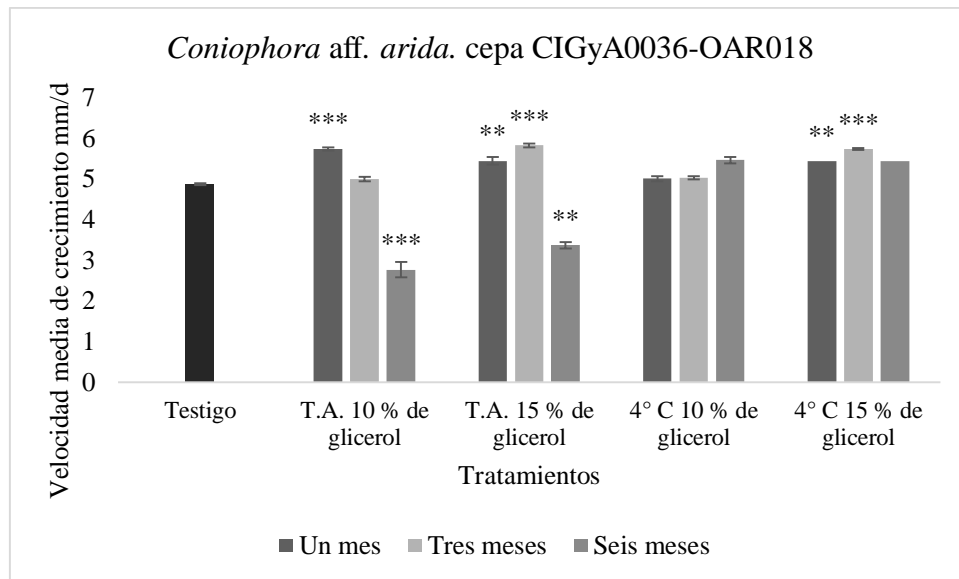


Figura 39: Valor promedio de crecimiento para *Coniophora aff. arida*. cepa CIGyA0036-OAR018 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

### 7.5.1.2 Biomasa

Para el parámetro de biomasa, la mayoría de los tratamientos mostraron valores similares al testigo el cual fue de 0.175 g, sin embargo, tres de los cuatro tratamientos disminuyeron a los seis meses.

Al mes de preservación el tratamiento a 4° C 10 % de glicerol obtuvo el valor mayor de 0.185 g. A los tres meses el valor mayor fue de 0.172 g en el mismo tratamiento. Y a los seis meses el tratamiento a temperatura ambiente 10 % de glicerol obtuvo el valor mayor con 0.164 g (Figura 40).

El ANOVA solo indica diferencias estadísticas a los seis meses ( $F_{4, 20} = 0.585$ ,  $p = 0.677$  al mes de preservación.  $F_{4, 20} = 1.002$ ,  $p = 0.430$ , a los tres meses y  $F_{4, 18} = 25.483$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). La prueba post-hoc indica tales diferencias en los tratamientos a 4° C y en el tratamiento a temperatura ambiente con 15 % de glicerol.



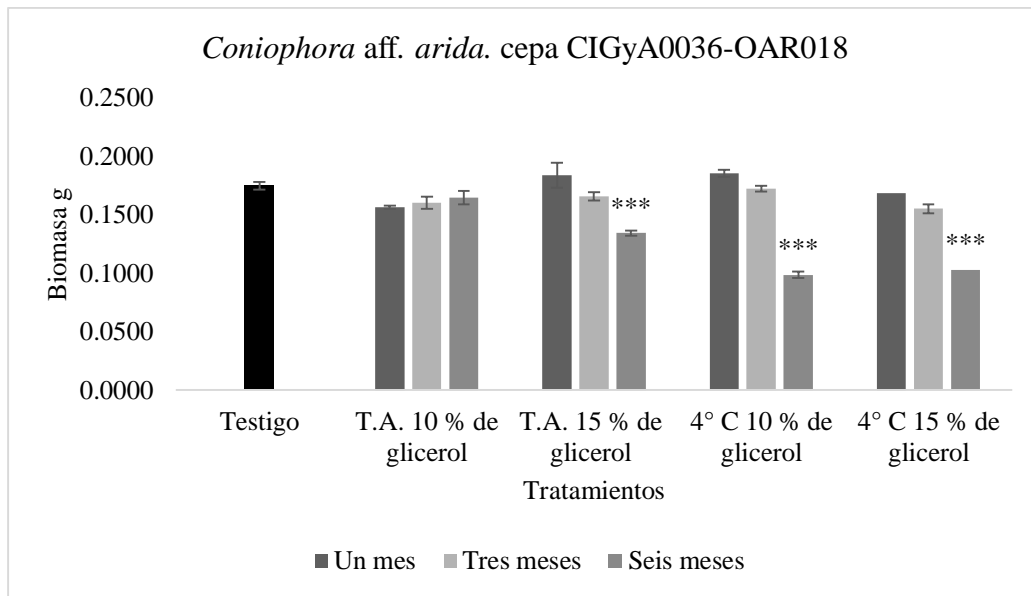


Figura 40: Valor promedio de biomasa para *Coniophora* aff. *arida*. cepa CIGyA0036-OAR018 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

### 7.5.2 *Agrocybe* cf. *pediades*, cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030.

Para las cepas correspondientes al género *Agrocybe*, estas presentaron ciertas similitudes en el presente ensayo. Se observó que el micelio se presentó igual de denso en los tres tiempos (Figuras de la 41 a la 46). Ambas cepas exhibieron porcentajes altos de sobrevivencia al primer tiempo en todos los tratamientos, sin embargo, para los siguientes tiempos solo mostraron sobrevivencia en los tratamientos a 4° C y a temperatura ambiente (Tablas 4 y 5).

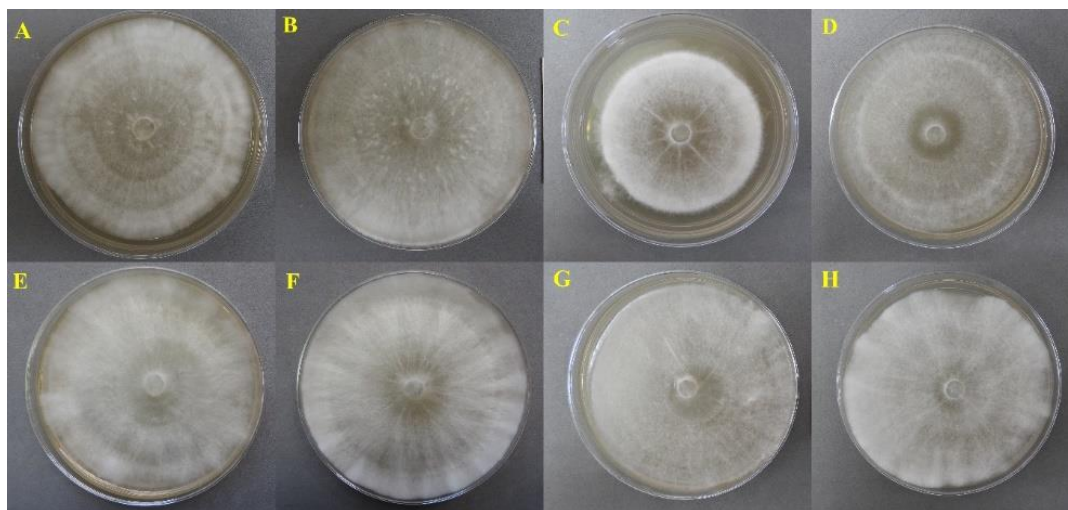


Figura 41: Colonias de *Agrocybe* cf. *pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 después de un mes de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4°C en 10% de glicerol, F) A 4°C en 15% de glicerol, G) A -20°C en 10% de glicerol y H) A -20°C en 15% de glicerol.

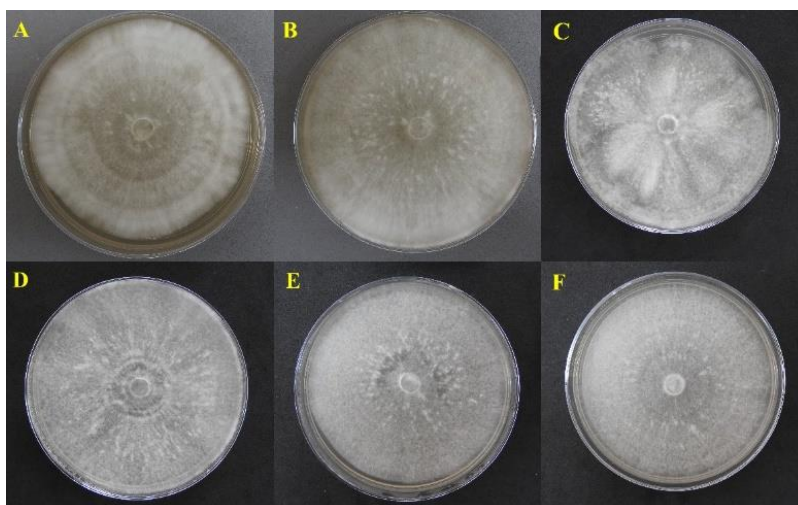


Figura 42: Colonias de *Agrocybe* cf. *pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 después de tres meses de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

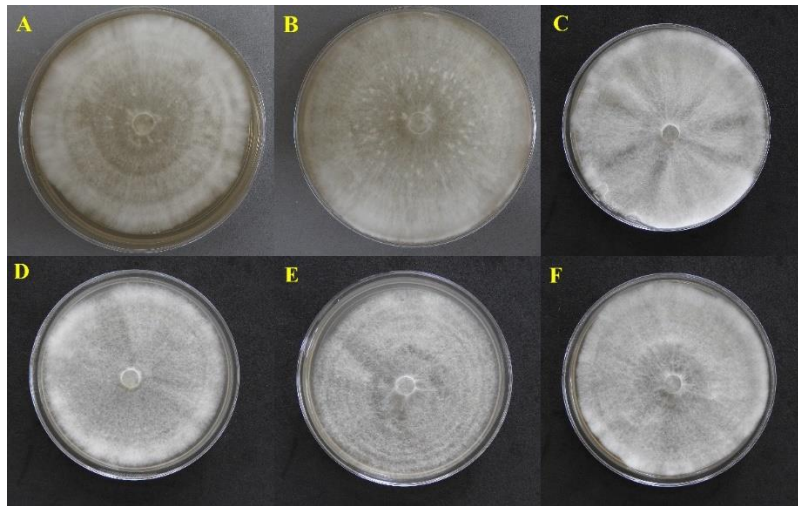


Figura 43: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 después de seis meses de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

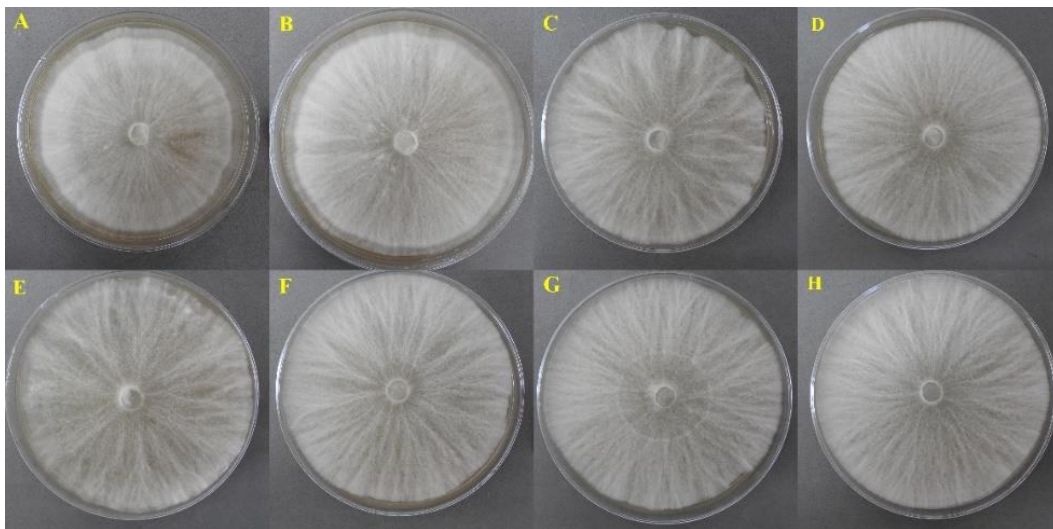


Figura 44: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 después de un mes de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4°C en 10% de glicerol, F) A 4°C en 15% de glicerol, G) A -20°C en 10% de glicerol y H) A -20°C en 15% de glicerol.

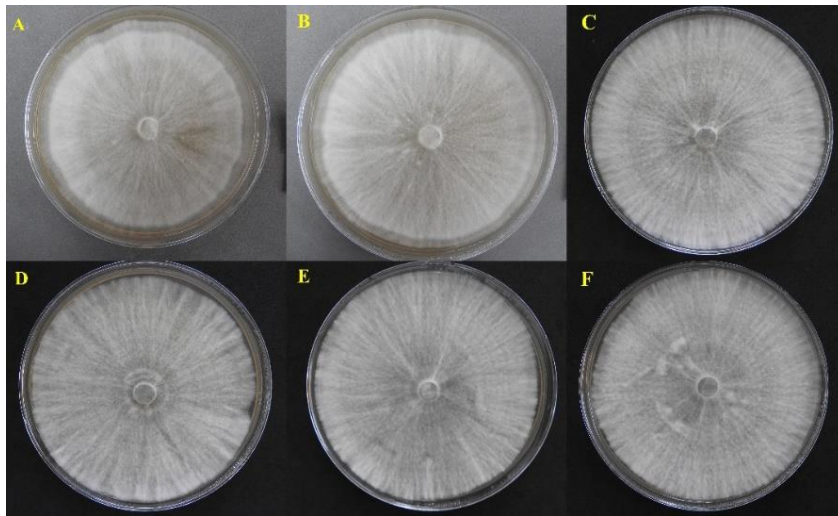


Figura 45: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 después de tres meses de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

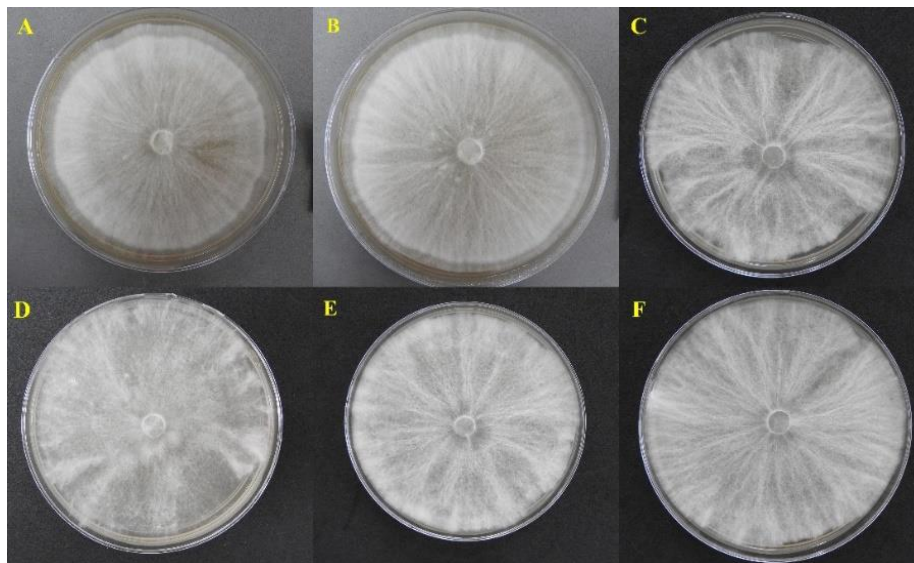


Figura 46: Colonias de *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 después de seis meses de preservación. A y B) Colonias del testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

<i>Sobrevivencia %</i>			
Categoría	Un mes	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 10% de glicerol	100	80	100
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	80	100
4° C 10 % de glicerol	100	80	100
4° C 15 % de glicerol	100	100	100
-20° C 10 % de glicerol	100	0	0
-20° C 15 % de glicerol	80	0	0

Tabla 4: Porcentaje de sobrevivencia de *Agrocybe cf. pediades* cepa CIGyA002-OAR001 en seis tratamientos después de un mes y en cuatro tratamientos después de tres y seis meses de preservación.

<i>Sobrevivencia %</i>			
Categoría	Un mes	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 10% de glicerol	100	100	100
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	100	100
4° C 10 % de glicerol	100	60	100
4° C 15 % de glicerol	100	100	100
-20° C 10 % de glicerol	100	0	0
-20° C 15 % de glicerol	100	0	0

Tabla 5: Porcentaje de sobrevivencia de *Agrocybe cf. pediades* cepa CIGyA003-OAR030 en seis tratamientos después de un mes y en cuatro tratamientos después de tres y seis meses de preservación.

### 7.5.2.1 Velocidad media de crecimiento

Para la cepa CIGyA002-OAR001 se obtuvo un valor de 6.523 mm/d para el testigo. Al mes de preservación el tratamiento con el mayor valor fue a 4° C 10 % con 6.442 mm/d. A los tres meses el valor más alto fue de 7.197 mm/d para el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol. Mientras que a los seis meses el tratamiento que obtuvo el valor mayor fue a 4° C 10 % con 6.553 mm/d. Por su parte, el ANOVA indica diferencias estadísticas en los tres tiempos ( $F_{6,27} = 13.910$ ,  $p = 0.0001$  al mes de preservación,  $F_{4,17} = 4.890$ ,  $p = 0.008$ , a los tres meses y  $F_{4,20} = 8.808$ ,  $p = 0.0003$  a los seis meses). La prueba post-hoc solo muestra tales diferencias en el

primer y tercer tiempo. En el primer tiempo las hay para los tratamientos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y para el tratamiento de 10 % T.A. y en el tercero solo para los tratamientos a T.A. (Figura 47).

Para la cepa CIGyA003-OAR030 se obtuvo un valor de 6.7733 mm/d para el testigo. Al mes de preservación se obtuvo el valor mayor en el tratamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  10 % de glicerol con 6.381 mm/d. a los tres meses de preservación el valor más alto fue de 7.871 mm/d en el tratamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  15% de glicerol. A los seis meses el tratamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  10 % de glicerol fue en el que se presentó el valor más alto con 6.238 mm/d (Figura). Para esta cepa el ANOVA indica diferencias estadísticas en los tres tiempos ( $F_{6, 28} = 40.944$ ,  $p = 0.0001$ , para el mes de preservación,  $F_{4, 18} = 14.151$ ,  $p = 0.0001$ , a los tres meses y  $F_{4, 20} = 56.173$ ,  $p = 0.0001$ , para los seis meses). La prueba post-hoc exhibe que se presentan diferencias significativas en todos los tratamientos respecto al testigo, durante todos los tiempos (Figura 48).

Ambas cepas coinciden en que, en la mayoría de los tratamientos en los tres tiempos se obtuvieron valores similares al testigo y algunos valores mayores a este en el tiempo dos.

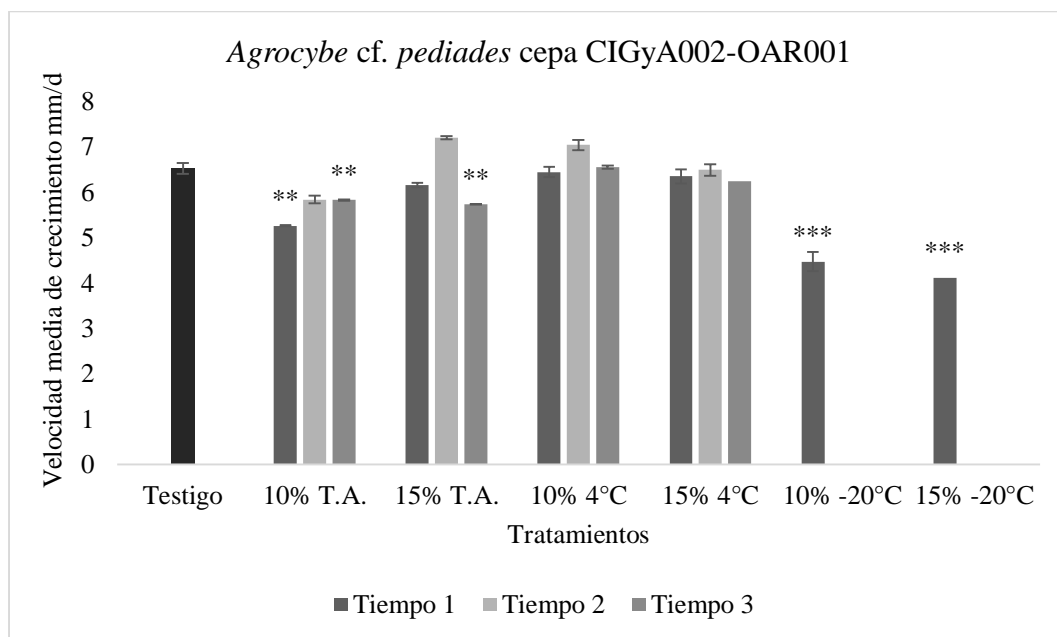


Figura 47: Valor promedio de crecimiento para *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.



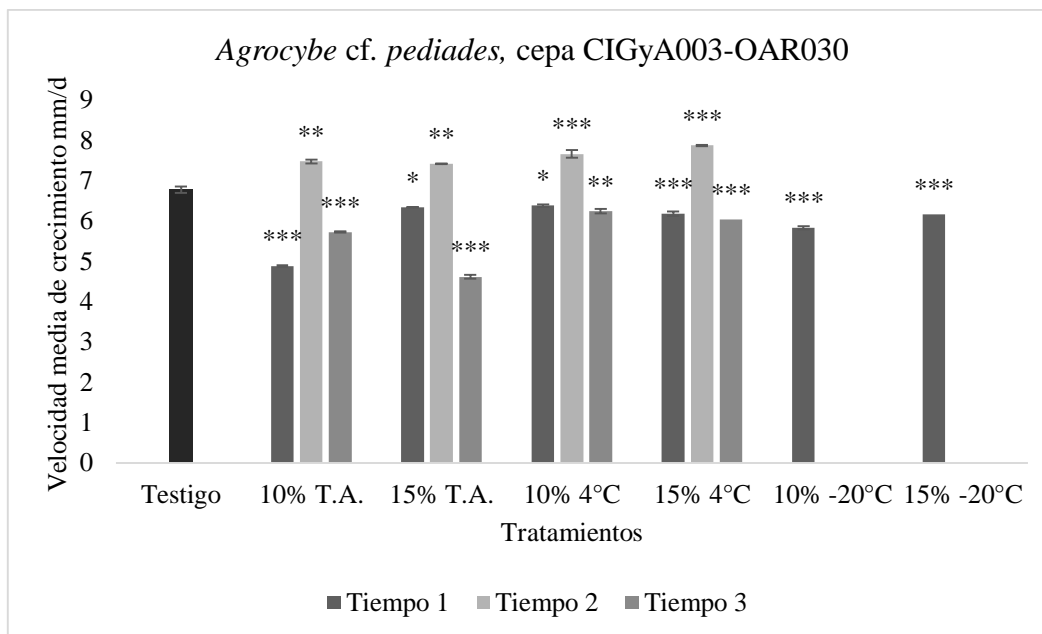


Figura 48: Valor promedio de crecimiento para *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

### 7.5.2.2 Biomasa

Para la cepa CIGyA002-OAR001 el valor del testigo fue de 0.0075 g. Para la mayoría de los tratamientos en los tres tiempos se muestran valores menores al testigo. Al mes de preservación el tratamiento con el valor mayor de biomasa fue el de 4° C 15 % de glicerol con 0.0083 g. A los tres meses el valor mayor fue de 0.0046 g también en el tratamiento de 4° C 15%. A los seis meses el tratamiento con valor mayor fue a temperatura ambiente 10 % con 0.0061 g. El ANOVA indica diferencias estadísticas en los tres tiempos, entre los tratamientos con respecto al control ( $F_{6,27}=3.474$ ,  $p=0.011$ , al mes de preservación,  $F_{4,17}=4.836$ ,  $p=0.009$ , a los tres meses y  $F_{4,20}=15.876$ ,  $p=0.0001$ , a los seis meses). Por otro lado, la prueba de Dunnett muestra diferencias al mes solo para el tratamiento de temperatura ambiente al 15 % de glicerol, a los tres meses se exhiben diferencias con todos los tratamientos y a los seis meses solo no hay diferencias para el tratamiento a temperatura ambiente 10 % de glicerol (Figura 49).

Para la cepa CIGyA003-OAR030 el valor de biomasa del testigo fue de 0.0048 g. Al mes la mayoría de los tratamientos muestran valores poco mayores al testigo, el valor más grande fue

de 0.0078 g en el tratamiento a -20° C 15 % de glicerol. A los tres meses todos los tratamientos mostraron valores mayores al testigo, el valor más alto fue de 0.0067 g en el tratamiento a temperatura ambiente con 10 % de glicerol. A los seis meses el valor mayor fue de 0.0051 g a 4° C 15 5 de glicerol. El ANOVA indica diferencias estadísticas solo a los tres y seis meses ( $F_{6, 28} = 1.633$ ,  $p = 0.175$ , al mes,  $F_{4, 18} = 7.071$ ,  $p = 0.001$ , a los tres meses y  $F_{4, 20} = 11.111$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). A los tres meses la prueba de Dunnett indica diferencias en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol, mientras que a los seis meses solo se exhibe diferencias en el tratamiento antes mencionado (Figura 50).

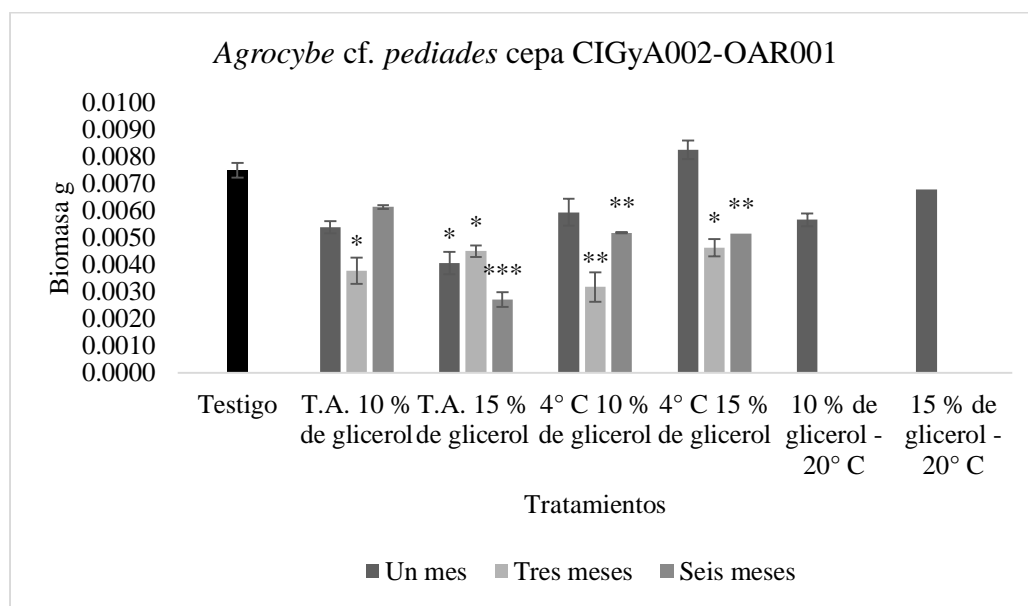


Figura 49: Valor promedio de biomasa para *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA002-OAR001 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

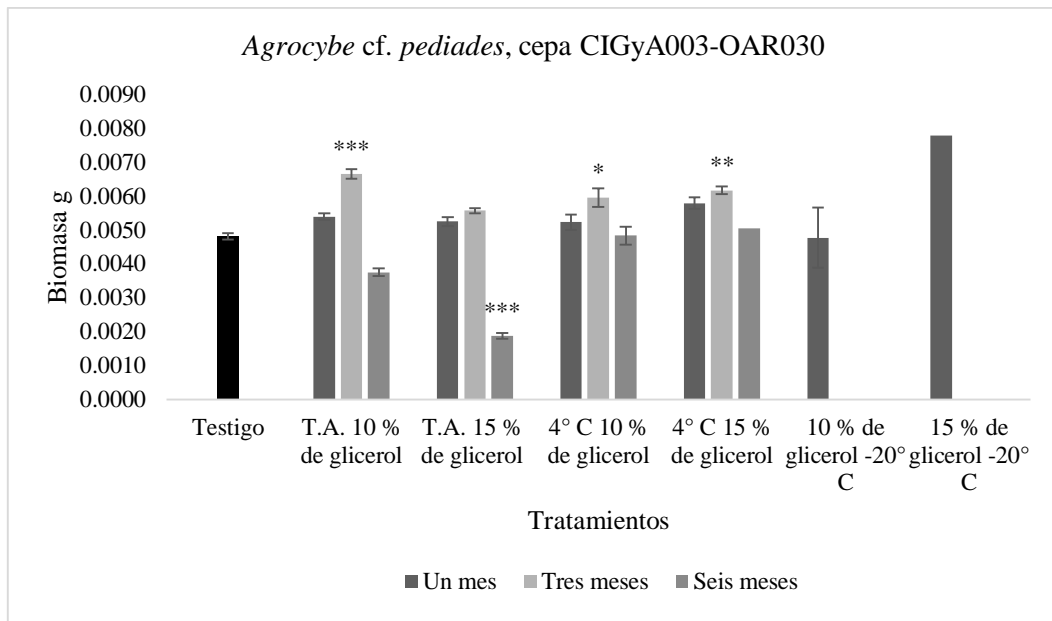


Figura 50: Valor promedio de biomasa para *Agrocybe cf. pediades*, cepa CIGyA003-OAR030 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

### 7.5.3 *Byssomerulius* aff. *corium* cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR022

Respecto a las cepas pertenecientes al género *Byssomerulius*, ambas mostraron crecimiento solo en los tratamientos a temperatura ambiente y a 4° C. De manera similar ambas mostraron un 100 % de sobrevivencia en los cuatro tratamientos durante los tres tiempos registrados (Tablas 6 y 7), además de presentar características del micelio muy similares al testigo (Figuras 51-56).

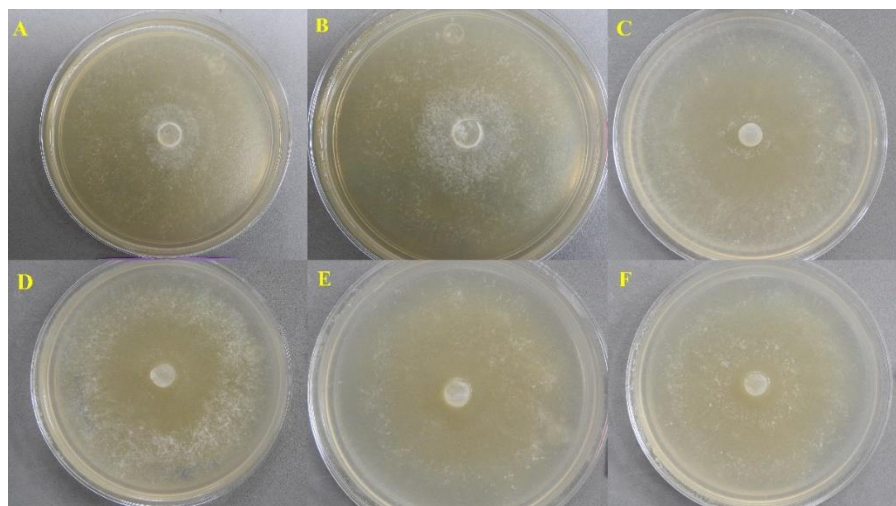


Figura 51: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA004-OAR013 después de un mes de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

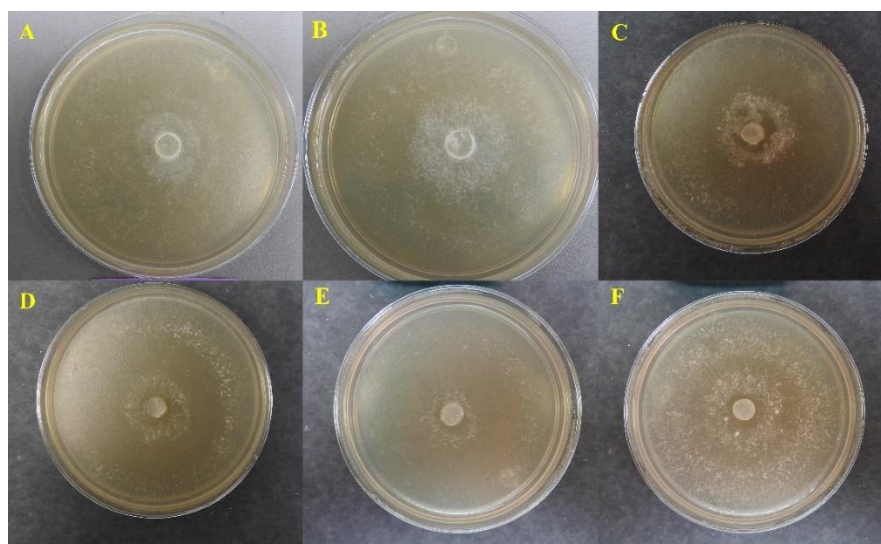


Figura 52: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA004-OAR013 después de tres meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

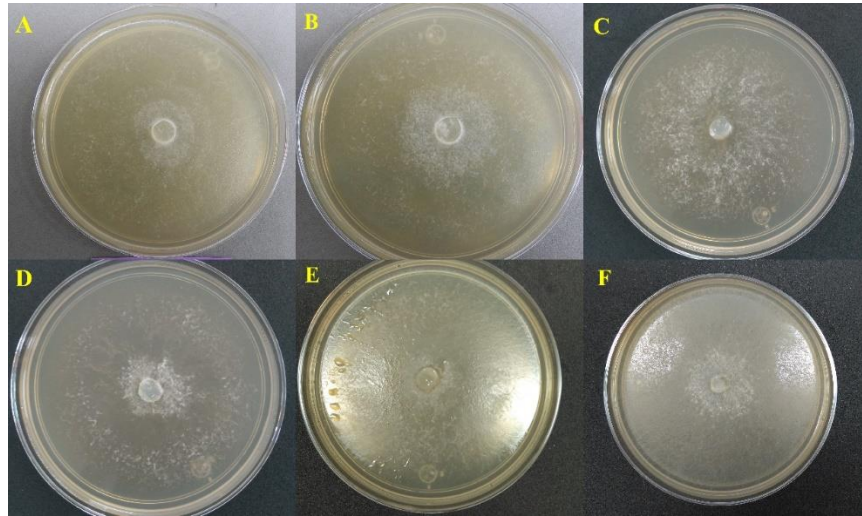


Figura 53: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA004-OAR013 después de seis meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

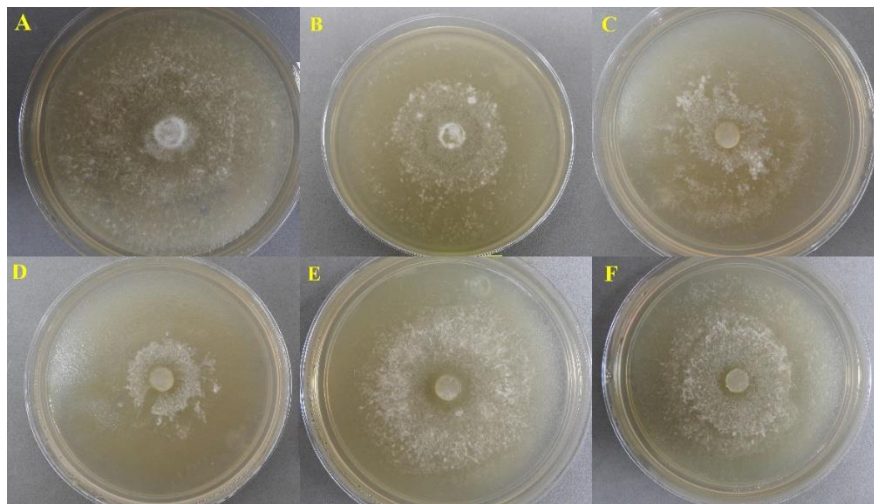


Figura 54: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA005-OAR022 después de un mes de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.



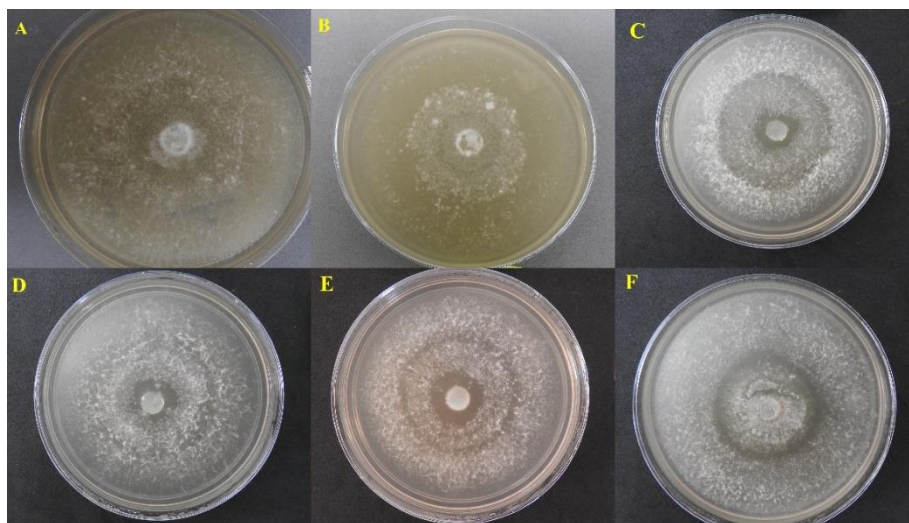


Figura 55: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA005-OAR022 después de tres meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.

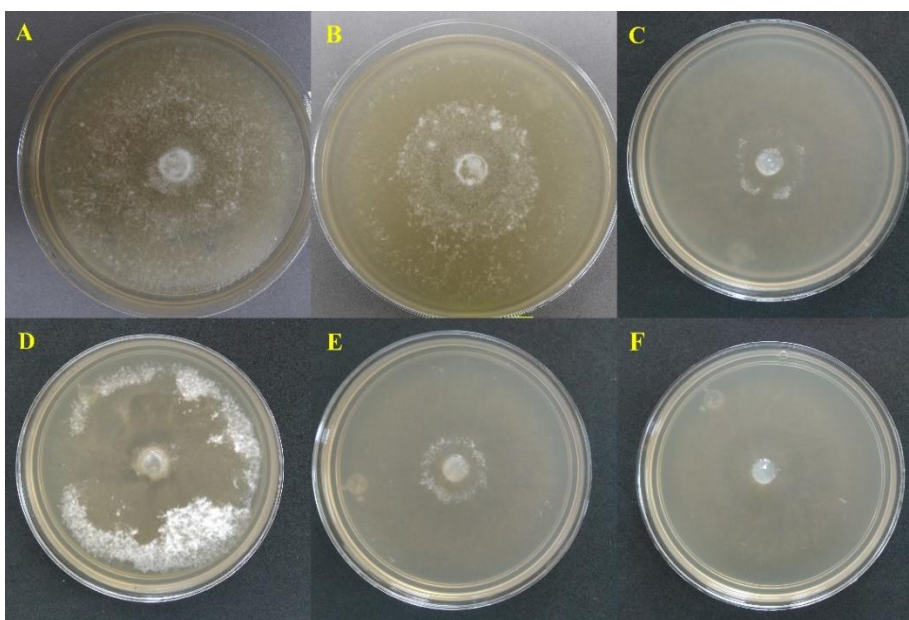


Figura 56: Colonias de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA005-OAR022 después de seis meses de preservación. A y B) Testigo, C) Temperatura ambiente en 10% de glicerol, D) Temperatura ambiente en 15% de glicerol, E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.



Categoría	<i>Sobrevivencia %</i>		
	Un mes	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 10% de glicerol	100	100	100
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	100	100
4° C 10 % de glicerol	100	100	100
4° C 15 % de glicerol	100	100	100

Tabla 6: Porcentaje de sobrevivencia de *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA004-OAR013 en cuatro tratamientos después de uno, tres y seis meses de preservación

Categoría	<i>Sobrevivencia %</i>		
	Un mes	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 10% de glicerol	100	100	100
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	100	100
4° C 10 % de glicerol	100	100	100
4° C 15 % de glicerol	100	100	100

Tabla 7: Porcentaje de sobrevivencia de *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA005-OAR022 en cuatro tratamientos después de uno, tres y seis meses de preservación

### 7.5.3.1 Velocidad media de crecimiento

Para la cepa CIGyA004-OAR013 la mayoría de los tratamientos en los tres tiempos mostraron valores similares al testigo cuyo valor fue de 10.8734 mm/d. Al mes de preservación el valor mayor en lo obtuvo el tratamiento a 4° C 10 % de glicerol con 10.1736 mm/d. A los tres meses el valor más grande fue de 10.8534 mm/d a temperatura ambiente 10 % de glicerol. Mientras que a los seis meses el tratamiento a 4° C 15 % de glicerol obtuvo el valor mayor con 10.9842 mm/d. El ANOVA indica diferencias significativas en los tres tiempos ( $F_{4, 20} = 73.545$ ,  $p = 0.0001$ , al mes de preservación,  $F_{4, 20} = 4.152$ ,  $p = 0.013$ , a los tres meses y  $F_{4, 20} = 73.576$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett muestra que, al mes de preservación, dichas diferencias se presentan en todos los tratamientos. A los tres meses de preservación se presentan

en la mayoría con excepción del tratamiento a temperatura ambiente 10 % de glicerol y a los seis meses de preservación solo muestran diferencias los tratamientos a temperatura ambiente (Figura 57).

Para la cepa CIGyA005-OAR022, el valor del testigo fue de 9.6534 mm/d. Esta cepa mostró una velocidad menor a la anterior, sin embargo, al igual que la cepa anterior la mayoría de los tratamientos en los tres tiempos se muestran similares al testigo, con excepción de los tratamientos a 4° C los cuales muestran disminución al tiempo uno y dos. El valor más grande al mes de preservación fue de 9.1150 mm/d para el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol. A los tres meses el valor más alto fue de 8.7884 mm/d a temperatura ambiente 10 % de glicerol. Mientras que a los seis meses el más alto fue de 9.6377 mm/d en el tratamiento a temperatura ambiente 10 % de glicerol. El ANOVA indica diferencias estadísticas ( $F_{4, 20} = 6.748$ ,  $p = 0.0001$ , al mes de preservación,  $F_{4, 20} = 77.345$ ,  $p = 0.0001$ , a los tres meses y  $F_{4, 20} = 9.324$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). La prueba post-hoc muestra diferencias en todos los tratamientos al mes como a los tres meses y solo muestra diferencias en el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol a los seis meses (Figura 58).

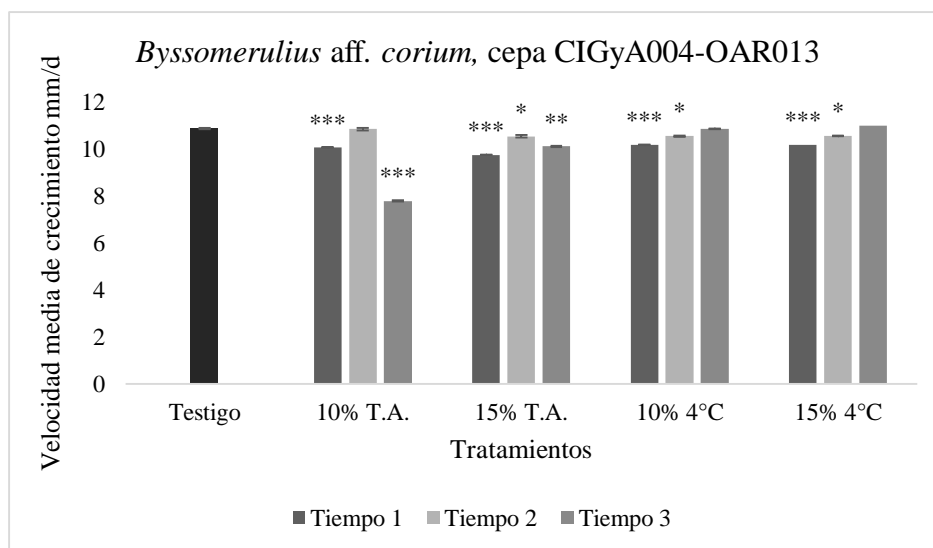


Figura 57: Valor promedio de crecimiento para *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA004-OAR013 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada

barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

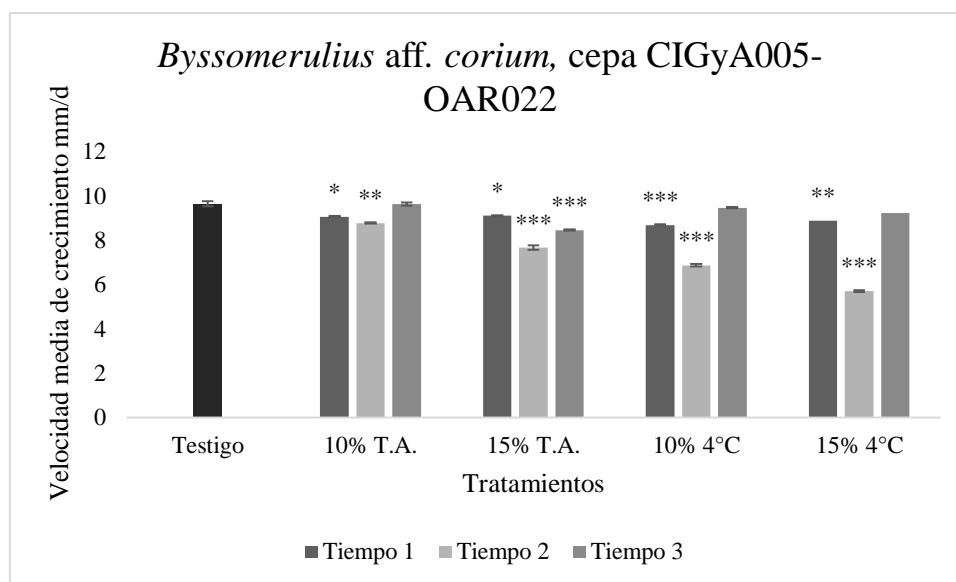


Figura 58: Valor promedio de crecimiento para *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA005-OAR022 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

### 7.5.3.2 Biomasa

Para la cepa CIGyA004-OAR013 el valor promedio del testigo fue de 0.0023 g. Al mes de preservación el valor mayor fue de 0.0024 g en el tratamiento a 4° C 10 % de glicerol. A los tres meses hubo una disminución en los valores, el dato mayor fue de 0.0009 g en el tratamiento a 4° C 15 % de glicerol. A los seis meses el valor mayor fue de 0.0015 g a temperatura ambiente 15 % de glicerol. El ANOVA indica diferencias en los tres tiempos ( $F_{4, 20} = 4.464$ ,  $p = 0.010$ , al mes,  $F_{4, 20} = 12.727$ ,  $p = 0.0001$ , a los tres meses, y  $F_{4, 20} = 4.575$ ,  $p = 0.009$ , a los seis meses). Mientras que la prueba de Dunnett exhibe estas diferencias al mes solo para el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol, a los tres meses muestra diferencias para todos los tratamientos y a los seis meses solo para los tratamientos a 4° C (Figura 59).

Para la cepa CIGyA005-OAR022 el valor promedio de biomasa del testigo fue de 0.0050 g. La mayoría de los tratamientos mostraron valores más bajos que el testigo. Al mes de preservación el valor mayor fue de 0.0052 g a T.A. 10 % de glicerol. A los tres meses el dato mayor fue de g en el mismo tratamiento que el tiempo anterior. A los seis meses el valor más alto fue de 0.0040 g a 4° C 15 % de glicerol. El ANOVA solo indica diferencia a los tres y seis meses ( $F_{4,20}=1.814$ ,  $p=0.166$ , al mes,  $F_{4,20}=2.414$ ,  $p=0.083$ , a los tres meses y  $F_{4,20}=5.667$ ,  $p=0.003$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett indica que a los tres meses hubo diferencias solo en el tratamiento a 4° C 15 % y a los seis meses en los tratamientos a T.A. 10 % y 4° C 10 % (Figura 60).

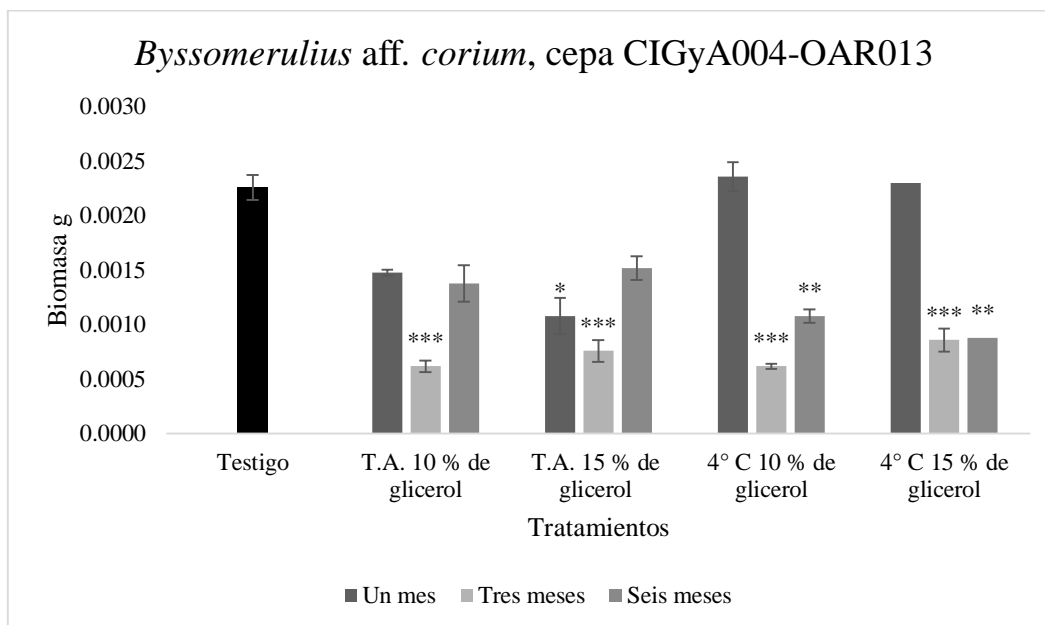


Figura 59: Valor promedio de biomasa para *Byssomerulius aff. corium*, cepa CIGyA004-OAR013 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

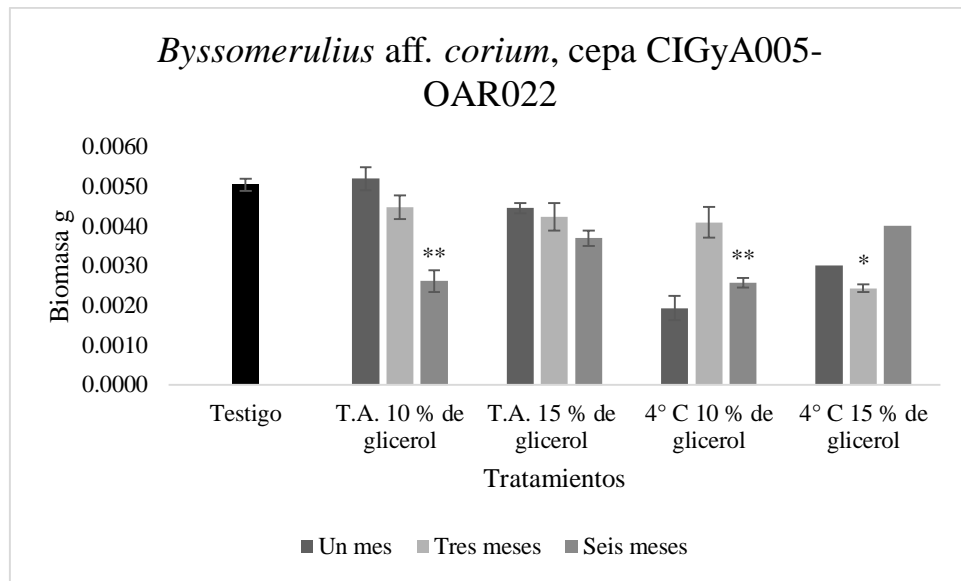


Figura 60: Valor promedio de biomasa para *Byssomerulius* aff. *corium*, cepa CIGyA005-OAR022 en diferentes tratamientos a tres tiempos de preservación (uno, tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

#### 7.5.4 *Gymnopus* sp. cepas CIGyA007-OAR029 y CIGyA008-OAR031.

La cepa CIGyA007-OAR029 mostró un crecimiento micelial muy similar al testigo (Figuras 53 y 54). Con 100 % de sobrevivencia a los tres meses de preservación en los cuatro tratamientos, mientras que a los seis meses solo se presenta sobrevivencia en tres tratamientos (Tabla 8).

La cepa CIGyA008-OAR031 también mostró un crecimiento micelial muy similar al testigo (Figuras 55 y 56). Solo presentó sobrevivencia en tres tratamientos, a temperatura ambiente 15 % de glicerol. y en los tratamientos a 4° C con 100 % en los dos tiempos (Tabla 9).

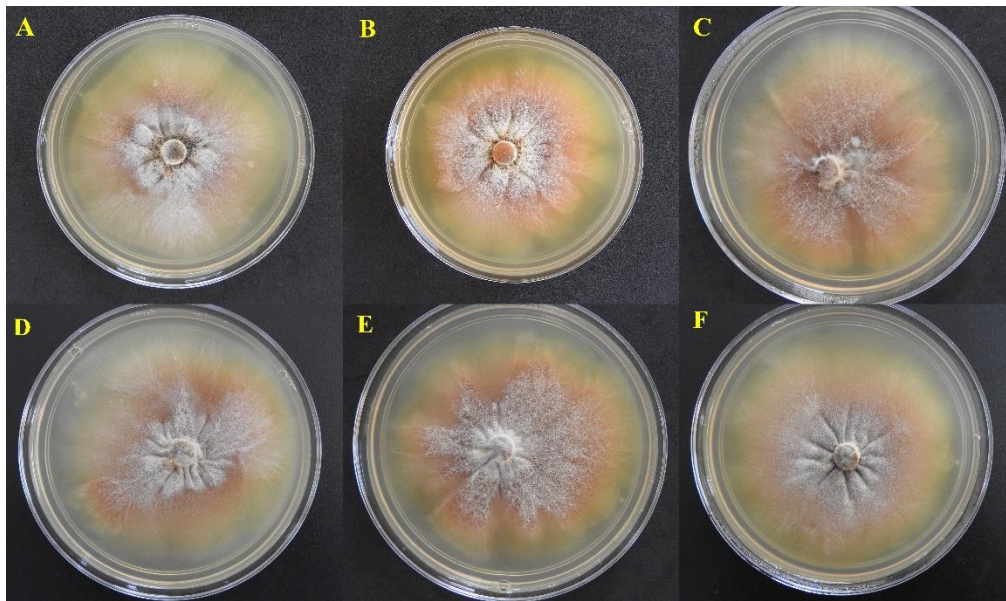


Figura 61: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA007-OAR029 a los tres meses de preservación: A-B) Testigo, C) Temperatura ambiente 10 % de glicerol, D) Temperatura ambiente 15 % de glicerol. E) 4° C 10 %, F) 4° C 15 %.



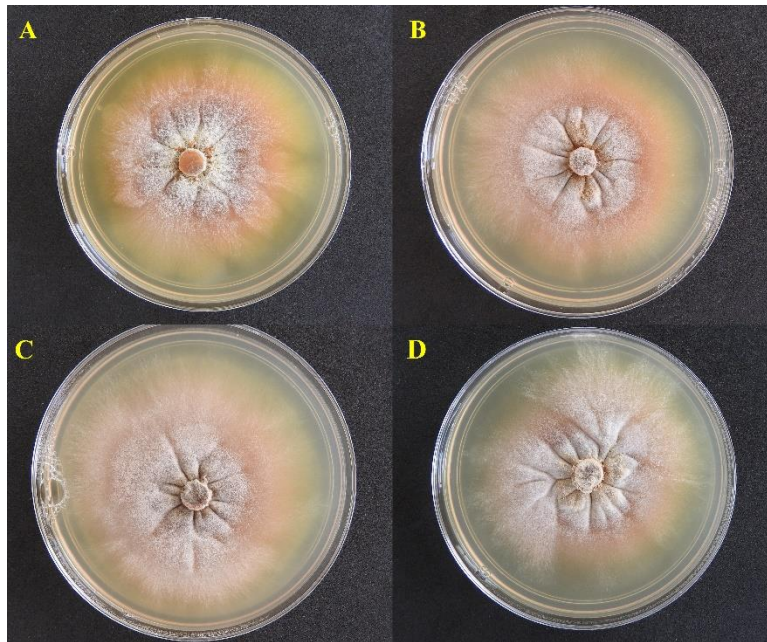


Figura 62: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA007-OAR029 a seis meses de preservación: A) Testigo, B) Temperatura ambiente 10 % de glicerol. C) 4° C, 10 % D) 4° C 15 %

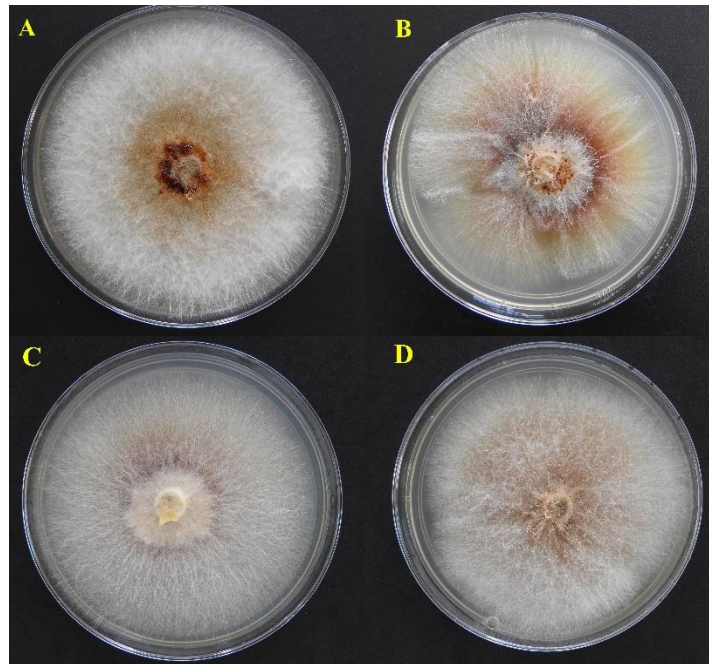


Figura 63: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA008-OAR031 a tres meses de preservación. A) Testigo, B) Temperatura ambiente 15% de glicerol, C) 4°C 10% glicerol, D) 4°C 15%.

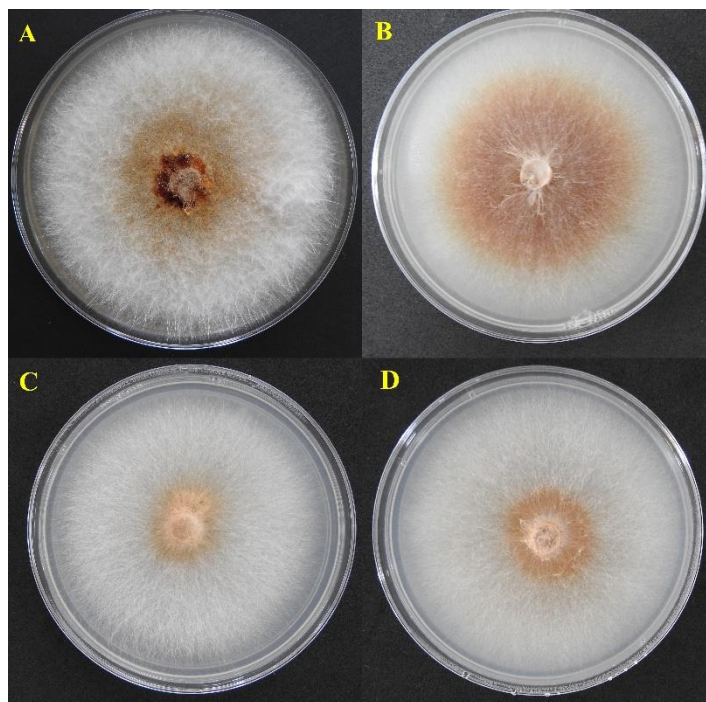


Figura 64: Colonias de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA008-OAR031 a seis meses de preservación. A) Testigo, B) Temperatura ambiente 15% de glicerol, C) 4°C 10% glicerol, D) 4°C 15%.

Categoría	<i>Sobrevivencia %</i>	
	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 10% de glicerol	100	100
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	--
4° C 10 % de glicerol	100	80
4° C 15 % de glicerol	100	80

Tabla 8. Porcentaje de sobrevivencia de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA007-OAR029 en cuatro tratamientos a los tres meses de preservación y en tres tratamientos después de seis meses de preservación

Categoría	Sobrevivencia %	
	Tres meses	Seis meses
Temperatura ambiente 15 % de glicerol	100	100
4° C 10 % de glicerol	100	100
4° C 15 % de glicerol	100	100

Tabla 9. Porcentaje de sobrevivencia de *Gymnopus* sp. cepa CIGyA008-OAR031 en tres tratamientos a los tres y seis meses de preservación

#### 7.5.4.1 Velocidad media de crecimiento

Para la cepa CIGyA007-OAR029 el valor promedio del testigo fue de 1.9033 mm/d. Todos los valores de los tratamientos en ambos tiempos fueron mayores el testigo. El valor mayor a los tres meses de preservación se presentó en el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol con 2.277 mm/d. A los seis meses el valor más alto fue de 2.202 mm/d a 4° C 10 % de glicerol. El ANOVA indican diferencias ( $F_{4,20} = 3.340$ ,  $p = 0.0001$ , a los tres meses y  $F_{3,14} = 2.270$ ,  $p = 0.0001$ , a los seis meses). La prueba post-hoc muestra que a los tres meses solo hay diferencias para el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol, mientras que a los seis meses ningún tratamiento presenta dichas diferencias (Figura 65).

Para la cepa CIGyA008-OAR031 el valor promedio del testigo fue de 3.6858 mm/d, mucho mayor a la cepa anterior. A los tres meses el valor mayor se presentó en el tratamiento a temperatura ambiente 15 % de glicerol con 3.030 mm/d. A los seis meses el valor mayor fue de 4.230 mm/d a 4° C 15 % de glicerol. El ANOVA indican diferencias estadísticas ( $F_{3,16} = 2.690$ ,  $p = 0.081$ , a los tres meses y  $F_{3,16} = 6.622$ ,  $p = 0.004$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett exhibe tales diferencias solo en el tratamiento 4° C 15 % de glicerol a los tres meses, mientras que a los seis meses para los tratamientos a 4° C (Figura 66).

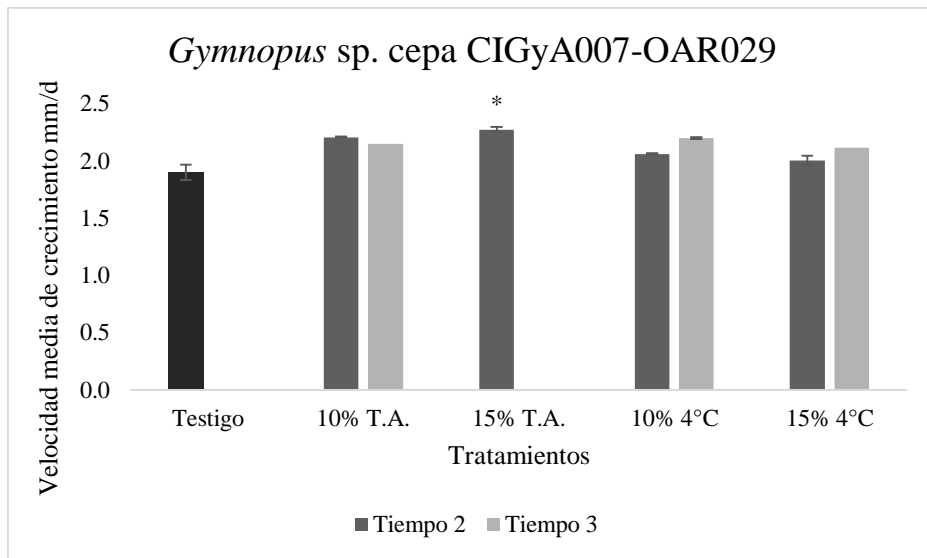


Figura 65: Valor promedio de crecimiento para *Gymnopus sp. cepa CIGyA007-OAR029* en diferentes tratamientos a dos tiempos de preservación (tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

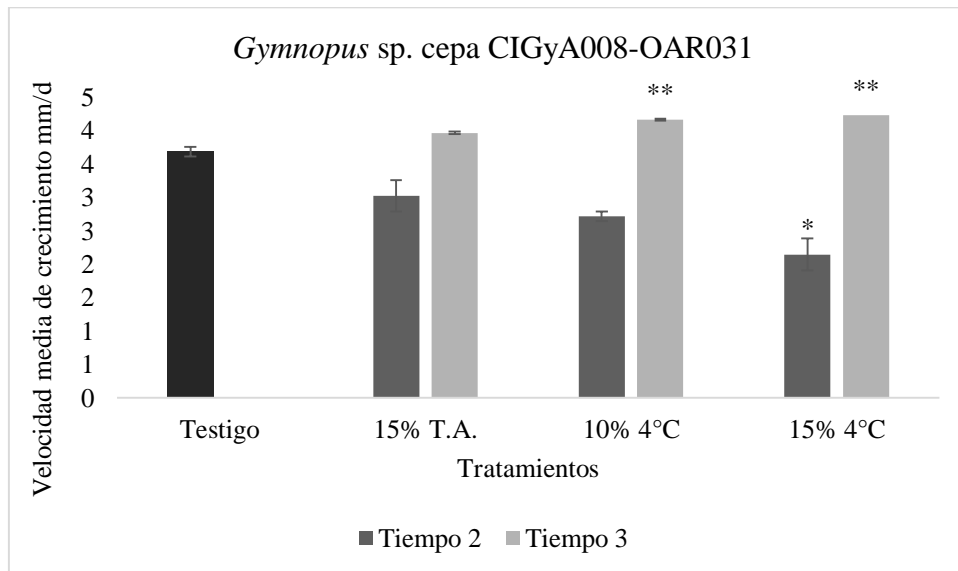


Figura 66: Valor promedio de crecimiento para *Gymnopus sp. cepa CIGyA008-OAR031* en diferentes tratamientos a dos tiempos de preservación (tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

#### 7.5.4.2 Biomasa

Para la cepa CIGyA007-OAR029 el valor promedio de biomasa para el testigo fue de 0.079 g. El valor mayor a los tres meses fue de 0.071 g en el tratamiento a 4° C 15 % de glicerol. A los seis meses el mismo tratamiento obtuvo el valor más alto con 0.119 g. El ANOVA indica diferencias estadísticas ( $F_{4,20} = 2.138$ ,  $p = 0.114$ , a los tres meses y  $F_{3,14} = 3.505$ ,  $p = 0.044$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett indica diferencias a los tres meses solo para el tratamiento de 10 % a 4° C y a los seis meses dichas diferencias se presentan solo en el tratamiento a 4° C 15% (Figura 67).

Para la cepa CIGyA008-OAR031, el valor promedio del testigo es de 0.078 g. A los tres meses el valor mayor fue de 0.104 g en el tratamiento de 15 % T.A. y a los seis meses fue de 0.062 g para el tratamiento a 4° C 15 % de glicerol. El ANOVA indica diferencias estadísticas en ambos tiempos ( $F_{3,16} = 7.953$ ,  $p = 0.002$ , a los tres meses y  $F_{3,16} = 5.605$ ,  $p = 0.008$ , a los seis meses). La prueba de Dunnett exhibe diferencias a los tres meses para el tratamiento a 4° C 10 % y a los seis meses para el tratamiento a T.A. 15 % de glicerol (Figura 68).

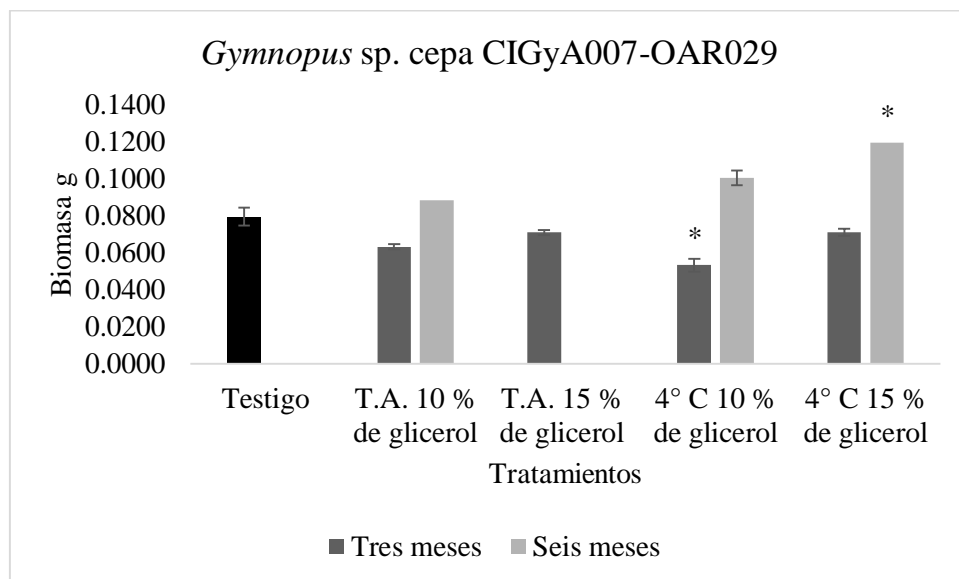


Figura 67: Valor promedio de biomasa para *Gymnopus* sp., cepa CIGyA007-OAR029 en diferentes tratamientos a dos tiempos de preservación (tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.

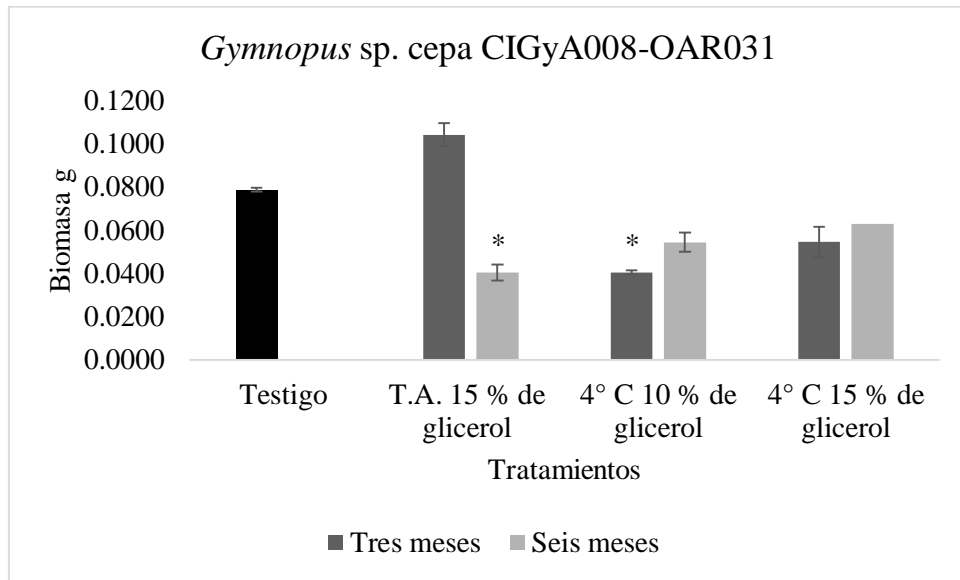


Figura 68: Valor promedio de biomasa para *Gymnopus* sp., cepa CIGyA008-OAR031 en diferentes tratamientos a dos tiempos de preservación (tres y seis meses), comparadas con un testigo. Cada barra representa el promedio de cinco réplicas  $\pm$  EE (Error estándar). Mayor número de \* indica mayores diferencias significativas.



## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Aislamiento**

El método de aislamiento utilizado en el presente estudio no fue tan selectivo, respecto a que no se utilizaron antibióticos y/o fungicidas para evitar crecimiento de organismos no deseados, sin embargo, resultó factible para los aislamientos obtenidos, no obstante, considero que el número de cepas aisladas pudo haber sido mayor utilizando métodos más selectivos como lo hicieron Thorn y cols. (1996) quienes obtuvieron 67 aislados utilizando un medio adicionado con benomilo, el cual evitó el crecimiento de hongos sensibles a este. Ahora bien, dichos aislamientos se realizaron a partir de muestras de suelo, lo que implica usar métodos de aislamiento más específicos.

El medio de cultivo EMA resultó ser el más eficaz para dichos aislamientos, al igual que en el trabajo de Thorn y cols. (1996) donde fue utilizado, siendo un medio adecuado para aislar basidiomicetos saprótrofos a partir de muestras de suelo. Esto ha sido ventajoso para este trabajo porque podemos decir que se puede echar mano de las herramientas y reactivos básicos existentes en el laboratorio, sin necesidad de diseñar un medio de cultivo muy elaborado, al menos para el aislamiento, a pesar de ello, cabe recalcar que si se desean hacer experimentos más específicos si es necesario recurrir a otras estrategias, todo ello dependerá de los objetivos.

No obstante, es importante tomar en cuenta que tanto para el aislamiento como para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio son importantes diversos factores ya que diferentes organismos prosperan en entornos distintos y pueden tener diversos requisitos de crecimiento, entre los que destacan los nutrientes, el pH, las condiciones osmóticas y la temperatura, de tal modo que, el medio de cultivo adecuado es uno de los requisitos previos indispensables para comenzar a estudiarlos (Basu y cols. 2015).

### **8.2 Identificación**

#### **8.2.1 *Coniophora aff. arida***

De acuerdo a la descripción de Bernicchia y cols. (2010) el tamaño de esporas para *Coniophora arida* es de 5, 5-8 X 9-13  $\mu\text{m}$ , mientras que nuestros datos nos muestran un tamaño de esporas donde el ancho concuerda, sin embargo, el largo difiere un poco, ya que muestra datos de

longitudes mayores, aunque los valores promedio si se encuentran dentro del intervalo que muestra dicha referencia.

Por otro lado O. Schmidt y cols. (2002), secuenciaron regiones ITS de diversas muestras del género *Coniophora*, llamados como hongos del sótano u hongos domésticos, debido a su importancia como uno de los principales descomponedores de la madera de edificios en Europa, con el objetivo de obtener un método confiable de diferenciación y detección y de esta manera adquirir un mayor conocimiento de las especies domésticas de *Coniophora*. Por un lado, el intervalo de longitud para las secuencias obtenidas fue de 525 a 729 pb, por otra parte, las secuencias designadas para *Coniophora arida* mostraron una longitud de 672 pb, por lo que la secuencia obtenida en nuestro estudio es incluso de mayor longitud.

Mientras que para el año 2007, Kauserud y cols. realizaron un estudio para evaluar la variación genética y la estructura geográfica entre los aislados de *Coniophora arida* y *Coniophora olivaceae* de América del norte, con el objetivo de revelar si se presentaba especies crípticas en estos taxones. Utilizando los siguientes marcadores moleculares, la beta tubulina (tub), las regiones ITS y el factor de elongación de traducción 1 alfa (tef). Cuyo resultado reveló tres linajes principales en *Coniophora arida* los cuales podrían representar especies crípticas por alopatría, lo que podría sugerir una especiación geográfica reciente o en curso.

Por otra parte, Skrede y cols. (2012) compararon la capacidad de tres loci de ADN y datos de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) para discernir entre linajes fúngicos crípticos en tres morfoespecies, *Coniophora olivacea*, *Coniophora arida* y *Coniophora puteana*. Al respecto, sus resultados muestran un patrón consistente para dividir las tres morfoespecies en especies crípticas, es decir, que corroboran los resultados obtenidos por Kauserud en 2007. Por lo tanto, dichos análisis indican que algunos loci secuenciados, en este caso tres, podrían ser suficientes para separar entre especies crípticas, sin embargo, esto obviamente depende de cuán recientemente divergieron los linajes crípticos.

Por otro lado, Contreras-Pacheco y cols. (2014) reportan un registro de *Coniophora arida* para México, en el municipio de Pueblo Nuevo, Durango. Sin embargo, el tamaño de las esporas en dicha descripción difiere un poco con nuestros resultados, ya que en dicho estudio muestran que

el tamaño de las esporas es de 5  $\mu\text{m}$  X 8-10  $\mu\text{m}$ , mientras que nuestros resultados muestran datos de 7.5  $\mu\text{m}$  x 12.2  $\mu\text{m}$ .

Por todo lo anterior, no podríamos discernir si en nuestros resultados se trata efectivamente de la especie de *Coniophora arida* ya que aún existe conflicto por la determinación de dicha especie o si existen en dicho taxón especies crípticas, sin embargo, estos resultados muestran un acercamiento al conocimiento de este taxón en el ecosistema del bosque de *Juniperus*. De tal manera que nuestro ejemplar queda determinado como *Coniophora* aff. *arida* (Fr.) Karst.

### 8.2.2 *Agrocybe* cf. *pediades*

Macroscópicamente, ambos ejemplares estudiados son muy similares en morfología, coloración y sustrato sobre el que se desarrollan. Microscópicamente, la forma y color de las esporas es también similar y en ambos ejemplares se presentan basidios bispóricos. La diferencia más importante radica en el tamaño de las esporas, que en el ejemplar ROA-001 van de 8.2-10.2  $\mu\text{m}$  X 14.3-16.8  $\mu\text{m}$ , en tanto en el ROA-030 son ligeramente mayores, de 9.2-11.6  $\mu\text{m}$  X 15.2-18.9  $\mu\text{m}$ . Esta diferencia podría indicar que se trata de especies diferentes del mismo género. Las especies más cercanas, de acuerdo con las secuencias obtenidas, son *A. pediades* y *A. semiorbicularis*.

Por un lado, en la base de datos mundial INDEXFUNGORUM estas especies son consideradas como sinónimos, sin embargo, otros autores puntualizan características, como el tamaño de las esporas, que apenas los diferencian, por ejemplo, según Thomas (2000), *A. pediades* tiene esporas que van de 9 a 14.5  $\mu\text{m}$  y presenta basidios tetraspóricos, mientras que *A. semiorbicularis* presenta esporas con un tamaño de 11-19  $\mu\text{m}$  y basidios bispóricos. De acuerdo con lo anterior, el espécimen ROA-001 correspondería más con *A. pediades*, en tanto el ROA-030 se acercaría más a *A. semiorbicularis*. Dado que estas especies se han considerado sinónimas y debido a que no existe una revisión taxonómica crítica de las especies de *Agrocybe*, por el momento los especímenes estudiados serán considerados como *A. cf. pediades* Fr.: (Fayod).

Por otro lado, *Agrocybe pediades* es una especie considerada de amplia distribución mundial. Watling (1985) lo reportó para Islandia, en tanto Picón (2007) lo citó de España. Thomas (2000) lo registró de la región de Kerala, en la India, en el sur del continente asiático. En México, ha

sido reportado para el Distrito Federal asociado con gramíneas (Herrera y cols. 2006), Baja California Norte (Ayala y cols. 1984) y Michoacán (Cifuentes y cols. 1990).

Aunado a ello nuestro resultado coincide con el obtenido por Ramírez (2000) el cual de manera similar a nosotros aisló una cepa de esta especie, la cual según sus resultados fue una de las que presentó mejores resultados de antagonismo contra especies fúngicas fitopatógenas.

Respecto a estudios biotecnológicos, Lassen y cols. (2001) realizaron un trabajo sobre expresión, clonación y caracterización de cinco enzimas fitasas de cuatro basidiomicetos, *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., y *Trametes pubescens*, encontrando que por lo menos la fitasa proveniente de *A. pediades* muestra no ser estrictamente específica en la hidrólisis del fitato, es decir que exhibe dos sitios de acción lo que la hace más eficiente.

### **8.2.3 *Byssomerulius aff. corium***

Respecto a esta especie, es muy poca la información reportada. Zmitrovich y cols. (2006) discute sobre la variabilidad de *B. corium* en el mediterráneo. Describe morfológicamente a la especie y propone una nueva variedad llamada *Byssomerulius corium* var. *Halileensis*, que crece en madera de *Quercus calliprinos* en una región sub-árida del Mediterráneo Oriental en Israel. Sin embargo, concluye que la autenticidad de estos taxones merece un estudio mucho más detallado, especialmente cuando se usan métodos moleculares y de apareamiento.

En la referencia anterior mencionan también que es una especie encontrada en Europa, Asia, África, Australia; Norte, Centro y Sudamérica. Se distribuye ampliamente en el hemisferio norte, pero es claramente más frecuente en las zonas subáridas. El sustrato más típico para la especie son ramas secas de olmo, pero el hongo también se encuentra en tilos, robles, arces, sauces, alisos, serbales, abedules, álamos temblones, además de muchos árboles y arbustos subtropicales.

De acuerdo a la escasa información encontrada se considera dejar a esta especie como *B. aff. corium* (Pers. : Fr.) Parmasto.

### **8.2.3 *Gymnopus* sp.**

Al respecto, para esta especie es muy poca la información que ha sido reportada. En el trabajo de Petersen y Hughes (2014) reportan como nuevas especies a *Gymnopus barbipes*, *G.*

*disjunctus*, *G. micromphaleoides* y *G. pseudoluxurians* para el norte de América. Sin embargo, las descripciones microscópicas como el tamaño de las esporas difiere de nuestros resultados, ya que nuestros ejemplares presentan esporas más grandes (2.95-5.22  $\mu\text{m}$  X 5.75-10.4  $\mu\text{m}$ ) contra (2.5-3  $\mu\text{m}$  X 6-6.5  $\mu\text{m}$ ), además de que al comparar imágenes de los basidiomas, existen ciertas diferencias como el color y grosor del estípite, por lo se podría estar hablando de una especie distinta en nuestro estudio, no obstante, nuestros resultados exhiben un acercamiento certero a la identidad del organismo y plantean un preámbulo para estudios posteriores en los que se pueda aclarar de manera concreta dicha identidad. Por lo tanto, dicha identificación quedará restringida a nivel genérico, solo como *Gymnopus* sp.

Respecto a estudios con este género, Valasková y cols. (2007) aislaron tres basidiomicetos de un bosque de *Quercus petraea*. *Gymnopus* sp. *Hypholoma fasciculare* y *Rhodocollybia butyracea*, con el objetivo de obtener información detallada sobre la producción de enzimas extracelulares que degradan la ligninocelulosa y describir los cambios en la composición del sustrato después de la acción fúngica. Donde *Gymnopus* sp. excretó una enzima más estable durante el periodo de incubación y mostró resultados de la degradación de la hojarasca similares a los producidos por hongos de podredumbre blanca, además de mostrar una mayor degradación de lignina y una mayor actividad de Manganese peroxidasa.

Tal estudio demuestra que esta especie juega un papel importante en la degradación de compuestos complejos presentes en el sustrato donde se desarrolla, lo que fortalece su valor ecológico.

### **8.3 Determinación de la velocidad de crecimiento**

Para la cepa CIGyA001-OAR018 de *Coniophora* aff. *arida* es claramente visible la preferencia que esta tuvo por el medio mineral, ya que no solo creció más rápido, sino con mayor densidad. Esto puede deberse a que dicho medio se encuentra constituido por diversas fuentes de nutrientes, lo que hace que estos estén disponibles para el hongo. Por otro lado, el medio con lignina fue en el que se obtuvo la menor velocidad de crecimiento, a pesar de que este espécimen se ha considerado como lignícola, sin embargo, con tales resultados podemos notar que esto no

implica que pueda asimilar la lignina presente en este medio de manera eficiente, probablemente por la ausencia de otros nutrientes importantes como el nitrógeno, por ejemplo.

Respecto a las cepas pertenecientes a la especie de *Agrocybe* cf. *pediades*, se muestran algunas diferencias en respuesta a los medios de cultivo. Mientras la cepa CIGyA002-OAR001 ha preferido sin mayor problema EMA obteniendo en éste la mayor velocidad de crecimiento en menos tiempo, la cepa CIGyA003-OAR030 presentó una velocidad de crecimiento mayor en el medio con lignina. Respecto a lo anterior cabe resaltar que, aunque en ciertos casos el hongo mostraba un crecimiento rápido en determinados medios, en el medio EMA siempre presentó mayor densidad micelial, lo que es importante para poder ser usado en el laboratorio, ya que en la mayoría de los experimentos *in vitro* es significativa la generación de biomasa para evaluar ciertos parámetros dentro de un ensayo de cinética, por ejemplo.

Por otro lado, las cepas referentes a la especie *Byssomerulius* aff. *corium* también mostraron preferencia por el medio EMA, ya que en éste mostraron el valor mayor de velocidad de crecimiento, por lo que se considera que es el más adecuado para mantener la cepa y propagarla, sin embargo, se debe tomar en cuenta que tanto en PDA como en el medio mineral mostraban un crecimiento denso. En este caso ambas cepas mostraron una similitud en tiempo, ya que solamente les tomó 8 días para completar el crecimiento en toda la caja Petri, además de mostrar una homogeneidad en la densidad del micelio, lo que muestra cierta semejanza en cepas de la misma especie, al menos de manera superficial y aun siendo cepas nuevas.

Respecto a las cepas pertenecientes a *Gymnopus* sp. se observaron algunas diferencias respecto a la preferencia de los medios, ya que mientras las cepas CIGyA006-OAR006 y CIGyA007-OAR029 han referido crecer más rápido en EMA, la cepa CIGyA008-OAR031 lo ha hecho mejor en PDA, contrario a las cepas de la especie anterior, estas no muestran una semejanza al respecto, sin embargo, no podemos suponer una implicación en similitud siendo de la misma especie. Por otro lado, como en todas las cepas anteriores tanto PDA como el medio mineral han sido medios adecuados para una mayor generación de biomasa.

Es importante recordar que en esta etapa del trabajo el comportamiento de las cepas en los distintos medios de cultivo nos proporciona información no solo de la respuesta de las cepas a estos, sino de la viabilidad de los medios para su uso posterior. Debido a que, los nutrientes en



el medio de cultivo son un factor principal que influye en los resultados de las pruebas realizadas y tomando en cuenta que un medio con nutrientes óptimos debe proporcionar no solo un crecimiento bueno y adecuado, sino el mejor crecimiento de los microorganismos, además la definición de un medio adecuado es un requisito mínimo que debe cumplirse para que este sea candidato para ser usado en pruebas posteriores (Meletiadis y cols. 2001).

Respecto al comportamiento de los aislados podemos mencionar que las diferentes cepas tuvieron respuestas distintas a los diferentes medios de cultivo. Es probable que la diferencia en la composición de cada medio de cultivo haya desplegado dichas respuestas diferenciales, además de que dicho comportamiento pudo deberse a la fisiología propia del organismo que conlleva a optimizar su función en el ecosistema.

Por un lado, se sabe que, en este grupo de hongos, la superficie del medio es explorada por hifas que irradian desde un centro de nutrientes, hasta que se detecta una nueva fuente de estos, dando como resultado la formación de un complejo hifal y la posterior transferencia en masa desde el foco de nutrientes agotado hasta el nuevo encontrado (Gow N. A. y Gadd G. M. 1995) considerando incluso la posibilidad de que al no encontrar nuevas fuentes de nutrientes, las hifas puedan usar a otras hifas para este fin. Se dice que las células apicales (o células de hifas-punta) generalmente se dedican a la adquisición de nutrientes y la detección del entorno local, mientras que las células sub-apicales generan nuevas hifas por ramificación lateral (Harris 2008).

Por otro lado, los hongos saprótrofos son considerados los descomponedores más eficientes en muchos compartimentos de los ecosistemas, como suelo, hojarasca o madera en proceso de desintegración, por lo que algunos autores plantean la hipótesis de que los filamentos en crecimiento y su capacidad para traslocar nutrientes les permite dominar ciertos nichos en descomposición (Eichlerova y cols. 2015). Sin embargo, como lo plantea Grinhut (2007), dicha capacidad está altamente relacionada con la producción de enzimas extracelulares que poseen la facultad de degradar diversos compuestos complejos en el ambiente, no obstante, la vía de degradación no depende solo de las enzimas y sustratos implicados, sino de las condiciones de reacción como el pH, la humedad, el porcentaje de oxígeno, la conductividad eléctrica y la presencia de otros compuestos, además de tener en cuenta que los sistemas enzimáticos difieren

de un hongo a otro y son altamente dependientes de un arsenal más amplio de enzimas capaces de degradar macromoléculas recalcitrantes.

De tal modo que, la información generada en el presente trabajo muestra un panorama general sobre el comportamiento de cepas de basidiomicetos que a nivel ecosistémico pueden estar jugando un papel importante en el reciclaje de nutrientes, ya que como lo menciona Šnajdr y cols. (2008) muchos de los basidiomicetos saprótrofos del suelo de los bosques pueden ser responsables de la variación espacial en las actividades enzimáticas extracelulares en los horizontes superiores del suelo, sin afectar a las comunidades microbianas del suelo de forma cuantitativa durante su colonización.

Sin embargo, es importante señalar que, el comportamiento de dichos hongos *in vitro* no siempre se acerca a lo que sucede en los ambientes naturales, ya que, en estos últimos, una infinidad de factores son los que influyen en el crecimiento y la respuesta de las colonias fúngicas.

#### **8.4 Ensayo de preservación**

De acuerdo a los resultados de las pruebas estadísticas, para la cepa CIGyA001-OAR018 de *Coniophora* aff. *Arida* han sido más convenientes los tratamientos a T.A. y a 4° C, ya que en éstos ha obtenido un porcentaje de sobrevivencia de 100 % en todos los tiempos, exceptuando solo el tratamiento de 15 % a T.A. en el tercer tiempo, en el que se obtuvo solo un 60 %. Respecto a la velocidad de crecimiento por lo menos los tratamientos a 4° C durante todos los tiempos fueron mayores al control, es decir, han crecido más rápido que la cepa sin conservar, esto puede tener que ver con el hecho de haber estado sometidas a una temperatura baja, ya que al momento de la recuperación la cepa aumentó su velocidad de crecimiento. Por otro lado, la biomasa se ha mantenido sin diferencias significativas por lo menos hasta los tres meses, ya que a los seis meses dicho parámetro ha disminuido, más aún en los tratamientos a 4° C. Luego entonces, al parecer esta cepa ha invertido energía en crecer rápido, pero en disminuir un poco la generación de biomasa, no obstante, debemos contemplar que esto ha sido solo para la recuperación de la cepa, ya que, si posteriormente dichas colonias se siembran en condiciones de confort, es probable que su crecimiento sea lo más parecido al testigo. Por lo tanto, estos tratamientos son viables para esta cepa, al menos en un periodo de tiempo considerable, tomando

en cuenta la temperatura como factor determinante, recordando que hubo crecimiento nulo en los tratamientos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Por su parte, las cepas CIGyA002-OAR001 y CIGyA003-OAR030 de *Agrocybe* aff. *pediades*, fueron las únicas que presentaron porcentajes de sobrevivencia en los tratamientos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por lo menos al primer tiempo. Para ambas cepas la velocidad media de crecimiento fue similar en los tres tiempos, mientras hubo una disminución en los tiempos uno y tres, en el tiempo dos se registraron incluso valores mayores al testigo, sin embargo, para el parámetro de biomasa hubo un comportamiento fluctuante y variable durante los tres tiempos para ambas, con cierta disminución para el tiempo tres. Los valores obtenidos para velocidad son similares entre cepas, aunque los valores de biomasa si difieren entre ellas. Parece ser que, los tratamientos a temperatura ambiente y a  $4^{\circ}\text{C}$  han sido los más factibles para la conservación. Por lo cual, de manera general estas cepas parecen ser muy prometedoras por su forma de adaptarse y de crecer sin mayor problema en la mayoría de los medios, además de ser poco susceptibles a la contaminación.

Mientras tanto, las cepas CIGyA004-OAR013 y CIGyA005-OAR0122 de *Byssomerulius* aff. *corium* sólo tuvieron respuesta positiva respecto a su crecimiento en los tratamientos a  $4^{\circ}\text{C}$  y a T.A. durante los tres tiempos, sin embargo mientras su velocidad de crecimiento se comportó de manera similar al testigo, los valores de biomasa mostraron un decremento a mayor tiempo de conservación, no obstante, son cepas que no mostraron problema para el crecimiento, ya que siempre registraron un porcentaje de sobrevivencia alto, del 100 %, lo que puede dar pauta para seguir probando a tiempos mayores a los establecidos en este experimento.

Las cepas pertenecientes al género *Gymnopus* mostraron ciertas particularidades. Para la cepa CIGyA007-OAR029 se encontraron resultados favorables en 4 tratamientos con alta sobrevivencia al tiempo dos, sin embargo, al tiempo tres hubo 0 % en uno de los tratamientos, luego entonces tanto la velocidad de crecimiento como la biomasa se mostraron similares e incluso mayores al testigo, no obstante, fue una cepa que ha crecido muy lento, esto podría deberse a que tal vez no se le ha podido asignar las condiciones adecuadas y/o viables para su desarrollo. Por su parte la cepa CIGyA008-OAR031 solo tuvo respuesta favorable en tres

tratamientos, con resultados de velocidad de crecimiento y biomasa muy fluctuantes respecto al tiempo.

De manera general todas las cepas mostraron diferencias marcadas en su crecimiento en respuesta al tiempo y las condiciones de preservación, algo que de cierto modo se podía esperar bajo la premisa de que son cepas recién aisladas y sobre las que existe poco estudio y por ende poca información.

Por un lado, es importante mencionar que la viabilidad de los diferentes métodos de preservación estará influenciada por diversos factores, entre ellos la biología propia del organismo y la temperatura ya que a diferencia de nuestro trabajo donde no se obtuvieron resultados positivos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en el trabajo de Voyron y cols. (2009) en el que probaron diferentes protocolos de liofilización y crioconservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en diferentes especies de hongos de pudrición blanca, evaluando la reactivación de los aislamientos mediante características morfofisiológicas y actividades enzimáticas, encontraron que, dichos aislamientos no presentaron pérdida de vitalidad después de 18 meses de preservación, por lo que sus métodos son viables a largo y mediano plazo.

Por otro lado, a nivel de hongos, como lo mencionan algunos autores (Homolka y cols. 2014) no se pueden generalizar ciertos tratamientos y/o ciertas condiciones para todos, además de que es de suma importancia desarrollar nuevos métodos de conservación y/o mejorar los ya existentes, sin embargo considero que estos resultados nos muestran un preámbulo para estudios posteriores respecto a qué factores se pueden y deben tomar en cuenta para este tipo de ensayos, ya que como lo presenta Karaduman y cols. (2012) quienes encontraron un efecto positivo solo en tratamientos a  $4$  y  $20^{\circ}\text{C}$ , por lo que, la temperatura baja ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) no es del todo adecuada para la conservación, aunque haya funcionado en otros organismos.

## 9. CONCLUSIONES

Se logró la identificación de cuatro especies afines. *Coniophora* aff. *arida*, *Agrocybe* cf. *pediades*, *Byssomerulius* aff. *corium* y *Gymnopus* sp. De las cuales se logró el aislamiento de ocho cepas, una perteneciente a *C. arida*, dos a *A. pediades*, dos a *B. corium* y tres a *Gymnopus* sp.

Las dos cepas de *Agrocybe pediades*, las de *Byssomerulius corium* y una cepa de *Gymnopus* tuvieron preferencia en su crecimiento por el medio de cultivo EMA, mientras que las otras dos cepas de *Gymnopus* prefirieron PDA y la cepa de *Coniophora* obtuvo mejor crecimiento en el medio de cultivo mineral más glucosa.

Respecto al método de preservación, para cinco de las ocho cepas aisladas han sido favorables los tratamientos a temperatura ambiente y 4° C independientemente de la concentración de glicerol.

## 10. PERSPECTIVAS

Por un lado, debido a que las especies aisladas no tienen suficiente información asociada en el campo de la ecología y taxonomía, sería conveniente realizar análisis filogenéticos para una mejor circunscripción de las especies, así como plantear estudios encaminados a saber un poco más de su papel ecológico.

Por otro lado, sería conveniente comprobar los métodos de preservación utilizados, a largo plazo, de tal manera que dichos métodos sean factibles de ser usados en trabajos próximos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Acosta E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J. y Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S76-S81.

Ayala N. y G. Guzmán. 1984. Los hongos de la Península de Baja California. I. Las especies conocidas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19: 73-91.

Basu S., Bose C., Ojha N., Das N., Das J., Pal M. & Khurana S. 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*, 11(4), 182.

Bolívar F. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Segunda edición. México, D.D. El Colegio Nacional. Pág. 10.

Bässler C., Halbwachs, H., Karasch P., Holzer H., Gminder A., Krieglsteiner L. & Brandl R. 2016. Mean reproductive traits of fungal assemblages are correlated with resource availability. *Ecology and evolution*, 6(2), 582-592.

Bernicchia A., Gorjón, S. P. & Arras L. 2010. Corticiaceae sl Fungi europaei n° 12. *Candusso. Italia*.

Cabo T. Á. 2012. Influencia de la edad de la masa en la fructificación de hongos silvestres comestibles en un bosque de Pinus pinaster Ait. de Soria. Tesis de licenciatura. Universidad de Valladolid, Campus de Palencia, España.

Carabajal M. L. 2014. Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Carlile M. J., Watkinson S. C. & Gooday G. W. 2001. The fungi. Gulf Professional Publishing. Pp. 57-59. Libro.

Carranza Z. 2006. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Tesis Ingeniería industrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Challenger A. y Soberón J. 2008. Los ecosistemas terrestres, en *Capital natural de México*, vol. 1: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, pp. 87-108.



- Cifuentes J., M Villegas, L. Pérez-Ramírez, M. Bulnes, V. Corona, M. Rocio González, I. Jiménez, A. Pompa y G. Vargas. 1990. Observación sobre la distribución, hábitat e importancia de los hongos de Los Azufres, Michoacán. *Revista Mexicana de Micología* 6: 133-149.
- Contreras-Pacheco M. M., Raymundo T., Bautista-Hernández S., Díaz-Moreno R. & Valenzuela R. 2014. Hongos corticioides del Bosque Las Bayas, municipio de Pueblo Nuevo, Durango, México. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 38, 33-40.
- Cooke R. C. 1984. Ecology of saprotrophic fungi. Primera edición. *Longman Group Limited*. Pp. 98-107.
- Crowther T. W., Boddy L., Jones T. H. 2012. Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME journal*, 6 (11), 1992-2001.
- Dighton J., White J., Oudemans P. 2005. The fungal community. Its organization and role in the ecosystem. Third edition. Tylor and Francis Groups, LLC.. Pp. 349.
- Eichlerová I., Homolka L., Žifčáková L., Lisá L., Dobiášová P. & Baldrian P. 2015. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal ecology*, 13, 10-22.
- Galindo-Flores H., Martínez-Álvarez J. C., Nava-Pérez E., García-Estrada R. S. y Maldonado-Mendoza I. E. 2005. A saprotrophic fungal isolate from Northern Sinaloa, Mexico, with homology to members of the Chaetomiaceae behaves as an antagonist of phytopathogenic fungi in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 130-139.
- García M. D. y Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30, 12-6.
- Gato-Cárdenas Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(3), 189-195.
- Gow, N. A., & Gadd, G. M. 1995. *Growing fungus*. First edition. Springer Science & Business Media.
- Grinhut T., Hadar Y., Chen Y. 2007. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews*, 21(4), 179-189.

- Gutiérrez Y. A. P., Bustamante S. L., & Buitrago G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 8-18.
- Harris S. D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823-832.
- Hawksworth D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Hernández A. 2003. Microbiología industrial. *Edición gráfica. Editorial EUNED*. San José. Pp. 27-28.
- Herrera T., Pérez-Silva E. & Valenzuela V. H. 2006. Nueva contribución al conocimiento de los macromicetos de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, DF, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 77(1), 51-57.
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E. & Lumbsch H. T. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Homolka L. 2014. Preservation of live cultures of Basidiomycetes—recent methods. *Fungal biology*, 118(2), 107-125.
- Hudson R., Rodríguez-Martínez L., Distel H., Cordero C., Altbácker V., Martínez-Gómez M. 2005. A comparison between vegetation and diet records from the wet an dry season in the cottontail rabbit *Sylvilagus floridanus* at Ixtacuixtla, central México. *Acta Theriologica* 50:377-390.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (Mexico). 2009. *Guía para la interpretación de cartografía uso del suelo y de vegetación: Escala 1: 250 000*. INEGI.
- Kauserud H., Shalchian-Tabrizi K. & Decock C. 2007. Multilocus sequencing reveals multiple geographically structured lineages of *Coniophora arida* and *C. olivacea* (Boletales) in North America. *Mycologia*, 99(5), 705-713.

- Karaduman A. B., Atli, B. & Yamac M. 2012. An example for comparison of storage methods of macrofungus cultures: *Schizophyllum commune*. *Turkish Journal of Botany*, 36(2), 205-212.
- Lassen S. F., Breinholt J., Østergaard P. R., Brugger R., Bischoff A., Wyss M. & Fuglsang, C. C. 2001. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4701-4707.
- Meletiadis J., Meis J. F., Mouton J. W. & Verweij P. E. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 478-484.
- Mueller G. M., Schmit J. P., Leacock P. R., Buyck B., Cifuentes J., Desjardin D. E. y Wu Q. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 37-48.
- Munsell 1975. Soil colour charts. *Baltimore, Maryland*, 21218.
- Nevalainen H., Kautto L., Te'o J. 2014. Methods for isolation and cultivation of filamentous fungi. In *Environmental Microbiology*. Human Press (pp. 3-16).
- Prescott, L. M. Harley, I P. and Klein, DA. 2002. *Tuberculosis. Microbiology*. 5th edition, *Mc Grow Hill higher education. North America*, 906-908.
- Peay K. G., Kennedy P. G., Bruns, T. D. 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience*, 58(9), 799-810.
- Petersen R. & Hughes K. 2014. New North American species of *Gymnopus*. *North American Fungi*, 9, 1-22.
- Picón R. M. 2007. Macromicetos de las dunas del litoral cantábrico II. *Edición*, 51.
- Ramírez M. 2000. Detección de hongos saprótrofos del bosque de *Juniperus* del municipio de Ixtacuixtla, Tlax. Inhibidores de crecimiento de hongos fitopatógenos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- Reverchon F., del Ortega-Larrocea P. M. y Pérez-Moreno J. 2010. Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico. *Annals of microbiology*, 60(2), 217-226.
- Rodríguez MML. 2001. Hábitos alimentarios del conejo Silvestre *Sylvilagus floridanus* y un análisis de la vegetación en Ixtacuixtla Tlaxcala. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Romero O., Huerta M., Huato M. A. D., Macías A., Tapia A. M., Lezama J. F. P. y Juárez, J. 2010. Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L var. *roatan*) deshidratada, en relación con otros sustratos Agrícolas. *Agronomía Costarricense*, 34(1).
- Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. 1ra Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Editorial Limusa. Capítulo 17: Bosque de coníferas. Pp. 324-325
- Sánchez O. 2003. *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México*. Primera edición. Instituto Nacional de Ecología. Pp. 40-41
- Schmidt, O., Grimm, K., & Moreth, U. 2002. Molecular Identity of Species and Isolates of the Coniophora Cellar Fungi. *Holzforschung*, 56(6), 563-571.
- Secretaría de Programación y Presupuesto, 1987b. Clima. Carta estatal del Estado de Tlaxcala Dirección General del Territorio Nacional. SPP.
- Skrede I., Carlsen T., Stensrud Ø. & Kauserud, H. 2012. Genome wide AFLP markers support cryptic species in Coniophora (Boletales). *Fungal biology*, 116(7), 778-784.
- Šnajdr J., Valášková V., Merhautová V., Cajthaml T., & Baldrian P. 2008. Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 186-192.
- Spatafora J. W., Chang Y., Benny G. L., Lazarus K., Smith M. E., Berbee M. L. & James T. Y. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.

- Thomas K. A. 2000. Floristic studies on some dark spored agarics of Kerala. Thesis. Department of Botany, University of Calicut, 2000
- Thorn R. G., Reddy C. A., Harris D. y Paul E. A. 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4288-4292
- Todaro A. R., Nascimento V. X., Souza N. C. C., Silva P. P., Santos J. M., Ramalho E. A. V. F. y Neto, E. R. 2013. Genetic variability in the ITS and IGS regions of the ribosomal DNA of *Acremonium cavarraeanum* exhibiting antimicrobial activity. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 12(4), 6983.
- Toledo C. V., Barroetaveña C. y Rajchenberg M. 2014. Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1093-1103.
- Voyro, S., Roussel S., Munaut F., Varese G. C., Ginepro M., Declerck S. & Marchisio V. F. 2009. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *mycological research*, 113(10), 1027-1038.
- Watling R. 1985. Icelandic species of Bolbitiaceae. *Acta. bot. Islandica*, 8, 3-19.
- Watkinson S. C., Boddy L. & Money N. 2016. The fungi, Third edition. Academic Press. Pp. 19-22.
- Webster J., y Weber R. 2007. *Introduction to fungi*. Tercera edición. Cambridge University Press. Pag. 1.
- Zmitrovich I. V., Spirin W. A. & Wasser, S. P. 2006. Variability of *Byssomerulius corium* in the Mediterranean. *Mycotaxon*, 97, 83-90.