



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**TÍTULO DE LA TESIS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS, Y  
 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE HONGOS DE  
 IMPORTANCIA CULTURAL EN LA HUASTECA POTOSINA**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**BIÓL. DANIEL ALICIA TORRES ANAYA**

DIRIGIDO POR

**DR. FIDEL LANDEROS JAIME**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE DE 2017



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Biológicas

### TÍTULO DE LA TESIS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS, Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE HONGOS DE IMPORTANCIA CULTURAL EN LA HUASTECA POTOSINA

### Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

### Presenta:

Biól. Daniela Alicia Torres Anaya

### Dirigido por:

Dr. Fidel Landeros Jaime

### SINODALES


Dr. Fidel Landeros Jaime  
Presidente


Dr. Gerardo Mata Montes de Oca  
Secretario


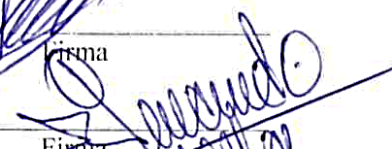



Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo  
Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Suplente

Dr. Elhadi Yahia Kazuz  
Suplente

  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de investigación y Posgrado

  
Firma  
  
Firma  
  
Esquivel Naranjo Edgardo U.  
Firma  
  
Firma  
  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
21 de Noviembre de 2017  
México

Ser el adulto del que el niño que fuiste estaría orgulloso

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la labor que hace por la educación e investigación en este país; a la UAQ, institución a la que he pertenecido por más de 10 años, y a la cual debo una gran parte de mi formación académica y personal; a la Maestría en Ciencias Biológicas, por proporcionarme los medios y las herramientas para llevar a cabo este proyecto; a Ulises, Toño y el Dr. Elhadi, por ser parte de mi comité, por dedicarme algo de su tiempo y por todos sus comentarios y observaciones; al Dr. Gerardo Mata, por aceptar formar parte de este trabajo, pero sobre todo, por recibirme y permitirme trabajar en su laboratorio, experiencia terriblemente agradable; al Dr. Rigoberto y a la Dra. Dulce, por compartir sus conocimientos y ampliar mi visión sobre el cultivo de los hongos. A las personas en las comunidades de la huasteca potosina, por siempre recibirnos tan amablemente y porque, sin saberlo, contribuyeron de manera muy importante en este trabajo. Agradezco de manera MUY especial a Fidel (Dr. Fidel Landeros), por la confianza y paciencia que me ha tenido, y porque sé que en él, más que un profesor y/o director de tesis, tengo un amigo; del mismo modo, a Wazus (citado aquí como Jiménez-Zárate), por hacer equipo conmigo, por brindarme su apoyo todo este tiempo, y porque en él también he encontrado un buen amigo.

A Yuno e Isa, quienes siempre aportan risas y cosas bonitas a mi vida; a todas esas personas que siguieron este proceso tesístico, preguntándome ocasionalmente cómo iba y dándome ánimos. Agradezco infinitamente a toda mi familia (que incluye a Kobe), por siempre estar conmigo, apoyarme, alentarme y creer en mí; a mi hermano, por cuidarme y estar al tanto de mí desde que conocí el mundo exterior; pero sobre todo, estoy agradecida con mi mamá, la persona más influyente en mi vida y un gran ejemplo de amor, perseverancia, esfuerzo y fortaleza. Te amo, mamá.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....                             | 3  |
| A. GENERALIDADES.....                                      | 3  |
| B. DIVERSIDAD DE HONGOS .....                              | 5  |
| C. VALOR CULTURAL.....                                     | 6  |
| D. VALOR NUTRICIONAL.....                                  | 7  |
| E. ANTIOXIDANTES .....                                     | 8  |
| F. ANTIFÚNGICOS .....                                      | 10 |
| G. ANTIHELMÍNTICOS.....                                    | 11 |
| H. CULTIVO DE HONGOS COMESTIBLES.....                      | 13 |
| I. JUSTIFICACIÓN .....                                     | 16 |
| CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....                                | 18 |
| A. OBJETIVO GENERAL.....                                   | 18 |
| B. OBJETIVOS PARTICULARES .....                            | 18 |
| CAPÍTULO III. MÉTODOS.....                                 | 19 |
| A. ÁREA DE COLECTA.....                                    | 19 |
| B. COLECTA DE EJEMPLARES .....                             | 19 |
| C. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....                              | 20 |
| Preparación de extractos metanólicos .....                 | 20 |
| Ensayo antifúngico .....                                   | 21 |
| Cálculos de actividad antifúngica.....                     | 22 |
| D. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA .....                          | 23 |
| Ensayo antihelmíntico.....                                 | 23 |
| E. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....                            | 24 |
| Conservación de cuerpos fructíferos de los HSC.....        | 24 |
| Preparación de extractos lipofílico e hidrofílico .....    | 26 |
| Curva de calibración Trolox .....                          | 27 |
| Método FRAP .....  | 28 |
| Método DPPH.....   | 29 |
| Cálculos de capacidad antioxidante.....                    | 30 |
| F. ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES .....                      | 31 |
| Determinación de porcentaje de humedad y materia seca..... | 32 |
| Determinación de cenizas.....                              | 33 |
| Determinación de nitrógeno total (proteína cruda) .....    | 34 |
| Determinación de fibra cruda.....                          | 35 |

|  |    |
|--|----|
| Determinación de extracto etéreo .....   | 37 |
| Determinación de extracto libre de nitrógeno.....  | 38 |
| Determinación de porcentajes en base húmeda .....  | 38 |
| G. AISLAMIENTO DE CEPAS.....   | 39 |
| H. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS .....  | 39 |
| Tasa de crecimiento .....  | 40 |
| Caracterización macroscópica y microscópica.....   | 41 |
| I. PRODUCCIÓN DE INÓCULO .....   | 42 |
| Limpieza y esterilización de semilla .....   | 42 |
| Inoculación e incubación.....  | 42 |
| J. CRIOCONSERVACIÓN.....   | 43 |
| Preparación de solución crioprotectora.....  | 43 |
| Criogenización.....  | 43 |
| Descongelación .....   | 44 |
| Evaluación de viabilidad .....   | 44 |
| Tasa de crecimiento .....  | 45 |
| K. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO.....   | 46 |
| Preparación de medio líquido .....   | 46 |
| Inoculación e incubación.....  | 46 |
| Evaluación de producción de biomasa.....   | 46 |
| L. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA O “POTENCIAL BIOLÓGICO” EN SUSTRATO<br>MEDIANTE LA HIDRÓLISIS DEL DIACETATO DE FLUORESCÉINA (FDA)..... | 47 |
| Preparación de muestras.....   | 48 |
| Peso seco.....   | 48 |
| Preparación de reactivos .....   | 48 |
| Gamma (curva de calibración) .....   | 48 |
| Ensayo .....   | 49 |
| Cálculo de resultados .....  | 50 |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 52 |
| A. COLECTA DE EJEMPLARES.....  | 52 |
| B. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....  | 52 |
| C. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA.....   | 55 |
| D. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....   | 61 |
| DPPH .....   | 61 |
| Base seca .....  | 61 |
| Base húmeda.....   | 63 |
| FRAP.....  | 65 |

|   |     |
|---|-----|
| Base seca .....   | 66  |
| Base húmeda.....  | 67  |
| E. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL .....   | 72  |
| F. ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES .....   | 78  |
| Base seca.....  | 78  |
| Base húmeda .....   | 83  |
| G. AISLAMIENTO DE CEPAS.....  | 85  |
| H. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS .....   | 85  |
| <i>Lentinus crinitus</i> .....  | 85  |
| <i>Panus lecomtei</i> .....   | 87  |
| <i>Phillipsia domingensis</i> .....   | 88  |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 89  |
| I. CRIOCONSERVACIÓN .....   | 90  |
| Tasa de crecimiento .....   | 92  |
| J. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO.....  | 93  |
| K. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA EN SUSTRATO MEDIANTE LA HIDRÓLISIS DEL DIACETATO DE FLUORESCÉINA.....     | 96  |
| L. DISCUSIÓN GENERAL .....  | 99  |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES .....  | 101 |
| PERSPECTIVAS .....  | 102 |
| CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA.....   | 104 |
| CAPÍTULO VII. ANEXOS.....   | 118 |
| ANEXO 1. SOLUCIÓN FRAP (BUFFER DE ACETATO DE SODIO / TPTZ / FeCl <sub>3</sub> (10 : 1 : 1 v/v/v)).    | 118 |
| ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS .....   | 119 |
| ANEXO 3. SOLUCIONES PARA LA ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA EN SUSTRATO MEDIANTE LA HIDRÓLISIS DEL FDA ..... | 126 |
| ANEXO 4. ESPECIES COLECTADAS .....  | 127 |
| ANEXO 5. MICROSCOPIAS.....  | 128 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Actividad antifúngica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.....   | 53 |
| Tabla 2. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos. En rojo: especie con la mayor actividad antihelmíntica. Datos obtenidos de: * Jiménez-Zárate (2017). ..... | 59 |
| Tabla 3. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de <i>Daldinia</i> sp. en cinco diferentes concentraciones.....  | 60 |
| Tabla 4. Capacidad antioxidante en base seca con el método DPPH. ....  | 62 |
| Tabla 5. Capacidad antioxidante con DPPH en $\mu\text{mol}$ y $\text{mg}$ equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda.....  | 63 |
| Tabla 6. Capacidad antioxidante con FRAP en $\mu\text{mol}$ y $\text{mg}$ equivalente de Trolox/100g de hongo en base seca. ....   | 67 |
| Tabla 7. Capacidad antioxidante con FRAP en $\mu\text{mol}$ y $\text{mg}$ equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda.....  | 68 |
| Tabla 8. Capacidad antioxidante total en $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda y base seca, en método DPPH y método FRAP.....   | 70 |
| Tabla 9. Capacidad antioxidante total en $\text{mg}$ equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda y base seca, en método DPPH y método FRAP.....   | 71 |
| Tabla 10. Comparación de actividad antioxidante total con método DPPH y método FRAP.....   | 73 |
| Tabla 11. Comparación de actividad antioxidante total con otras siete especies de la misma región.....   | 74 |
| Tabla 12. Comparación de actividad antioxidante total con frutas y verduras, y diferentes métodos.....   | 76 |
| Tabla 13. Porcentajes en base húmeda y base seca de AQP de las especies analizadas, comparadas con otros alimentos.....  | 81 |
| Tabla 14. Tasa de crecimiento de dos especies de hongos silvestres, después de haber sido sometidas a tres diferentes temperaturas.....  | 93 |
| Tabla 15. Miligramos de biomasa (peso seco) producidos en 100 ml de medio de sacarosa y extracto de levadura ( $\text{mg}/100\text{ ml}$ ).....  | 94 |
| Tabla 16. Actividad metabólica en inóculo de cuatro cepas de hongos silvestres. En rojo: valores de actividad más altos para cada especie. ....  | 98 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Actividad antifúngica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.....   | 54 |
| Figura 2. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.....  | 56 |
| Figura 3. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de <i>Daldinia</i> sp., en cinco diferentes concentraciones.....   | 57 |
| Figura 4. Curva de calibración Trolox utilizada como referencia para el ensayo con DPPH.....  | 61 |
| Figura 5. Actividad antioxidante de extractos hidrofílico y lipofílico en base húmeda, utilizando el método DPPH.....   | 65 |
| Figura 6. Curva de calibración Trolox utilizada como referencia para el ensayo con FRAP.....  | 66 |
| Figura 7. Actividad antioxidante de extractos hidrofílico y lipofílico en base húmeda, utilizando el método FRAP.....   | 69 |
| Figura 8. Actividad antioxidante total, en base seca y base húmeda, con el método DPPH y el método FRAP.....  | 75 |
| Figura 9. Porcentaje de recuperación del crecimiento micelial de cuatro especies de hongos silvestres, en inóculo, después de haber permanecido en criogenización durante un mes a -80°C.....   | 91 |
| Figura 10. Porcentaje de recuperación del crecimiento micelial de cuatro especies de hongos silvestres, en inóculo, después de haber permanecido en criogenización durante un mes a -196°C..... | 92 |
| Figura 11. Producción de micelio en medio líquido de tres especies de hongos silvestres.....  | 95 |
| Figura 12. Curva de calibración (gama) utilizada como referencia en los ensayos de estimación del potencial biológico, mediante la hidrólisis de FDA.....                                       | 97 |
| Figura 13. Actividad metabólica semanal de cuatro especies de hongos silvestres, expresada como microgramos de FDA por cada gramo de sustrato seco.....   | 98 |

## RESUMEN

Desde hace mucho tiempo, los hongos silvestres han sido parte de la dieta humana, por lo que se colectan en muchos países, como México, donde se conoce una gran diversidad de especies comestibles, muchas de las cuales tienen potencial para ser cultivadas en condiciones de invernadero. Los hongos son una fuente valiosa de nutrientes, y se les considera alimentos funcionales; además de tener potencial para usos biotecnológicos. El presente trabajo se llevó a cabo con especies de hongos silvestre colectados en la huasteca potosina. Se determinó que los extractos metanólicos de estas especies no tienen una actividad antifúngica significativa; sin embargo, especies como *Daldinia* sp., *Laetiporus sulphureus*, *Panus lecomtei*, *Polyporus* sp. y *Volvariella bombycina*, sí demostraron tener un efecto antihelmíntico. Por medio de dos ensayos (DPPH y FRAP), se detectó una gran capacidad antioxidante total en *Cookeina sulcipes* y *Cookeina tricholoma*; asimismo, *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* presentaron los valores nutricionales más altos (porcentaje de ceniza, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda y extracto libre de nitrógeno). Se aislaron y caracterizaron cepas de *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* y *Pycnoporus sanguineus*; su criogenización no afectó la recuperación del crecimiento micelial ni la tasa de crecimiento posterior a su descongelación. Las cepas de *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus* produjeron cantidades pequeñas de biomasa en un medio líquido de sacarosa y extracto de levadura, sin embargo, bajo condiciones fisicoquímicas y nutricionales adecuadas, podrían producir cantidades más altas de micelio. Por último, por medio de un ensayo de hidrólisis de diacetato de fluoresceína, se determinó que la máxima actividad metabólica del inóculo de las cuatro cepas aisladas se presenta a los 28 días, lo que sugiere que en este tiempo podría darse una rápida iniciación de invasión del sustrato, en el que posteriormente se llevará a cabo la fructificación.

Palabras clave: Hongos silvestres comestibles, actividad antifúngica, actividad antihelmíntica, capacidad antioxidante, análisis químicos proximales, crioconservación, potencial biológico.

## SUMMARY

For long time, wild mushrooms have been part of the human diet, so they are collected in many countries, such as Mexico, where a great biodiversity of edible species is known, many of which, have the potential to be cultivated in greenhouse conditions. Fungi are a valuable source of nutrients, and are considered functional foods; in addition, it is known that they have potential for biotechnological uses. The present work was carried out with species of wild mushrooms collected in the huasteca potosina. It was determined that the methanolic extracts of these species do not have a significant antifungal activity; however, species like *Daldinia* sp., *Laetiporus sulphureus*, *Panus lecomtei*, *Polyporus* sp. and *Volvariella bombycina*, did show an antihelminthic effect. By means of two assays (DPPH and FRAP), a significant antioxidant capacity was detected in *Cookeina sulcipes* and *Cookeina tricholoma*; also *C. tricholoma*, *C. sulcipes* and *P. lecomtei* had the highest nutritional values (percentage of ashes, ethereal extract, raw fiber, raw protein and nitrogen free extract. Strains of *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* and *Pycnoporus sanguineus* were isolated; their cryogenization did not affect the recovery of micelial growth, or the growth rate after thawing. Strains of *P. lecomtei*, *P. domingensis* and *P. sanguineus* produced small amounts of biomass in a liquid medium of sucrose and yeast extract, however, under adequate physicochemical and nutritional conditions, they might produce higher amounts of mycelium. Finally, by means of a fluorescein diacetate hydrolysis assay, it was determined that the maximum metabolic activity of the inoculum of the four isolated strains occurs at 28 days, which suggests that at this time, a rapid initiation of substrate invasion, in which fruiting will take place, might occur.

Key words: Wild edible mushrooms, antifungal activity, antihelminthic activity, antioxidant capacity, proximal chemical analysis, cryopreservation, biological potentia

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## A. GENERALIDADES

Los hongos son organismos que durante mucho tiempo fueron considerados parte del grupo de las plantas, sin embargo, desde hace varias décadas, se les ha reconocido como un grupo independiente, el reino Fungi. Estos organismos se alimentan por medio de la absorción de los nutrientes disponibles en el medio en el que se encuentran, necesitando pocas cantidades para su desarrollo (Guzmán, 2007).

Desde tiempos remotos, el hombre consume hongos como parte de su alimentación (Mata *et al.*, 2007), la colecta de hongos silvestres comestibles (HSC) es una práctica que se realiza en muchos países de todo el mundo, incluyendo México, ya sea para para autoconsumo o con fines comerciales. Tal actividad se ha practicado de manera tradicional durante miles de años (Boa, 2005), y actualmente se sigue llevando a cabo, prueba de ello es la gran variedad de especies silvestres que se recolectan en los campos, y que posteriormente son vendidos en los mercados locales.

Los HSC son muy apreciados debido a que: 1) son una fuente muy valiosa de nutrientes, aportan proteínas, minerales y fibra, además de poseer un bajo contenido de grasa; 2) son una fuente importante de beneficios económicos para las comunidades, y también para economías de nivel nacional; 3) muchas especies, principalmente las micorrícicas, contribuyen a mantener los bosques saludables y con un buen crecimiento; 4) porque tienen un gran valor cultural para las poblaciones rurales de los países en desarrollo, como México; y 5) algunas de sus especies también son medicinales y/o tienen propiedades antioxidantes (Boa, 2005; Mata *et al.*, 2007).

El principal beneficio que se le atribuye a los HSC es por su valor alimenticio, además de su agradable sabor y textura, por lo que existe un gran interés por el conocimiento y cultivo de estos organismos; sin embargo, los hongos son poco conocidos por la población, sobre todo la urbana, aun cuando han formado parte de la dieta mexicana desde épocas prehispánicas (Boa, 2005; Sánchez & Mata, 2012; Martínez-Carrera *et al.*, 2012).

A pesar de que en México se tiene conocimiento sobre una amplia diversidad local de hongos comestibles, y éstos son aprovechados en varias localidades de distintos estados del país, la producción a gran escala para su comercialización se limita a unas pocas especies, principalmente de los géneros *Agaricus*, *Pleurotus*, y recientemente, *Lentinula* (Martínez-Carrera, 2002a). En la actualidad, además, la mayoría de las cepas utilizadas en México para su producción provienen de América del Norte, Europa y Asia (Arana-Gabriel *et al.*, 2014), por lo que es importante el desarrollo de investigaciones enfocadas a la generación de cepas nativas, lo que podría llevarnos a un aprovechamiento económico de nuestros recursos naturales, pues en los últimos 30 años ha aumentado el comercio de una gran cantidad de especies de HSC (Boa, 2005).

La diversidad de climas en México, junto con la variedad de sustratos disponibles (subproductos de la agricultura y de la actividad forestal), generan la posibilidad para el cultivo de diversas especies de HSC; aun así, y a pesar de los avances que se han tenido con algunas especies (p. ej. *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes* y *Auricularia* spp.), son pocos los estudios que se han hecho en México con esta finalidad. Es por esto que aún queda mucho trabajo por hacer, con respecto a la generación de inóculo e introducción al mercado de variedades locales, además de la selección de sustratos que se pueden encontrar en diferentes regiones del país, con la finalidad de impulsar la productividad de los sistemas agrícolas (Mata *et al.*, 2007).

## B. DIVERSIDAD DE HONGOS

Los hongos constituyen un importante linaje de organismos eucarióticos, se estima que existen alrededor de 5.1 millones de especies, por lo que representan el segundo grupo más diverso, superado sólo por los artrópodos (O'Brien *et al.*, 2005; Blackwell, 2011), sin embargo, sólo se han descrito alrededor de 100 000 especies (Kirk *et al.*, 2008), es decir, menos del 2% del total de las especies que se estima existe en el mundo.

Esta gran diversidad se atribuye a que, debido a sus bajos requerimientos nutricionales y su capacidad para resistir condiciones extremas, se desarrollan en prácticamente todos los ambientes de la superficie de la Tierra; se encuentran en el agua, en el suelo, en una gran variedad de materiales orgánicos (p. ej. restos vegetales o de animales) e incluso como parásitos de otros organismos, o de ellos mismos (Guzmán, 2007; Blackwell, 2011).

Guzmán (1998) estimó que en México hay 200 000 especies de hongos, de las cuales apenas se conocen 8 000, por lo que el conocimiento de la micobiota nacional es apenas del 4%. El mismo autor señala que Veracruz es el Estado en el que más atención se ha prestado a este grupo, y es ahí donde se calcula que existen alrededor de 50 000 especies de hongos, aunque el conocimiento también es limitado.

De toda la diversidad de hongos que se conocen a nivel mundial, se considera que aproximadamente 5 000 especies tienen algún grado de comestibilidad, y que más de 2 000 de éstas representan a las especies comestibles principales; algunos de los géneros más comunes son: *Agaricus*, *Auricularia*, *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Morchella*, *Pleurotus*, *Ramaria*, *Tuber* y *Volvariella*; sólo por mencionar algunos. A pesar de esta gran variedad, son 30 las especies que son cultivadas comercialmente, sin embargo, sólo seis de ellas han alcanzado una escala industrial de producción a nivel global (APCAEM, 2012; Boa, 2005).

## C. VALOR CULTURAL

El conocimiento micológico tradicional es aquel que las comunidades locales han generado sobre los hongos en su ambiente, como resultado de un proceso de observación, ensayo y error; dicho conocimiento es la base del aprovechamiento de los hongos silvestres, pues debido a éste las personas han aprendido a distinguir entre los hongos tóxicos y los comestibles, o bien, hongos con otro tipo de usos, como medicinal o alucinógeno (Garibay-Orijel *et al.*, 2010).

Los HSC han sido recolectados y consumidos alrededor del mundo desde hace miles de años; en Latinoamérica, la tradición micofílica se restringe casi exclusivamente a México, con cierta ocurrencia en otros países (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Perú, Uruguay y Venezuela) (Boa, 2005; Garibay-Orijel *et al.*, 2010). Garibay-Orijel y Ruan-Soto (2014) han reconocido 371 especies de hongos comestibles en México, y conforme se desarrollan estudios etnomicológicos en el país, este número incrementa en un promedio de tres especies por año (Moreno-Fuentes, 2014).

En el centro de México se encuentran comunidades que se reconocen a sí mismas como comunidades hongueras, debido a que muchas familias se dedican a la recolecta y venta de hongos comestibles, principalmente durante la temporada de lluvias (Montoya *et al.*, 2004; Ruan-Soto, 2005); cuando esto es con fines de autoconsumo, el conocimiento tradicional les proporciona una dieta más variada y de alta calidad, sin un costo económico directo (Garibay-Orijel *et al.*, 2010).

Los conocedores locales relacionan las especies con sustratos específicos (p. ej. hojarasca, madera viva o en descomposición, estiércol, suelo forestal), así como también identifican los períodos de fructificación de las especies; es así que separan a los hongos que fructifican antes o después del periodo de lluvias, de aquellos propios de esta temporada. De esto depende su decisión de salir al monte a coleccionar hongos, o posponerlo dadas las pocas probabilidades de encontrar

cantidades suficientes (Garibay-Orijel *et al.*, 2006; Ruan-Soto *et al.*, 2004). Además, distinguen a los hongos de llano de aquellos que crecen en el bosque.

Dado que la cocina es considerada una expresión cultural que da identidad a una región o grupo social, en ésta se puede apreciar la relevancia cultural de los hongos en nuestro país. En algunos documentos específicos de alimentación y cultura de México, es común que los hongos estén representados, aunque en menor proporción respecto a las plantas y los animales; aun así, en las culturas locales se pueden encontrar diversas formas tradicionales de preparar y guisar los hongos (hervidos, asados, fritos o como el elemento principal del platillo); esto es un indicador de que estos organismos forman parte del conocimiento tradicional de estos pueblos (Garibay-Orijel *et al.*, 2010; Moreno-Fuentes, 2014).

#### **D. VALOR NUTRICIONAL**

En varias partes del mundo, los hongos comestibles son considerados un valioso y nutritivo complemento de la dieta de la población rural, incluso, en algunos lugares donde la ingesta de proteínas animales es baja, se considera a los hongos como sustitutos de la carne (Boa, 2005; Garibay-Orijel *et al.*, 2010).

Los hongos, al constituir un reino de la naturaleza independiente de las plantas y los animales, aportan propiedades nutrimentales que son únicas y diferentes de otros alimentos ampliamente consumidos (Chang & Miles, 2004; Martínez-Carrea *et al.*, 2010). Estas propiedades pueden variar debido a la influencia de factores como la especie, el desarrollo del cuerpo fructífero, la región del mundo donde crecen, la época del año y el tipo de suelo, por mencionar algunos; los métodos analíticos utilizados influyen en el conocimiento que se tiene sobre su valor nutrimental (Moreno-Fuentes, 2014).

En general, los hongos son muy apreciados porque se sabe que contienen proteínas de alta calidad, debido a que éstas son ricas en aminoácidos esenciales,



particularmente en lisina y leucina. En términos de base seca, los hongos suelen contener entre 19 y 35% de proteína; en comparación, el arroz contiene 7.3%, la soya 39.1%, y la leche, un producto de origen animal, 25.2%. Estas especies también son valoradas por su bajo contenido de grasa total; porque contienen un alto porcentaje de ácidos grasos no saturados; y porque aportan cantidades considerables de fibra nutricionalmente valiosa. Incluso, por su contenido de vitaminas, entre las que destacan el complejo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>12</sub>), la vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina D, así como por su contenido de minerales como potasio, fósforo, sodio, calcio y fierro, los hongos pueden ser comparables con algunos vegetales (Mata, 2007; Chang & Miles, 2004).

La preferencia por algunos alimentos no necesariamente está relacionada con el valor nutricional de éstos; la apariencia, el sabor y el aroma, a menudo son factores importantes en la estimulación del apetito y la determinación del gusto por algunos productos. Así pues, además de su valor nutritivo, los hongos comestibles tienen características únicas en cuanto a color, sabor, aroma y textura, que hacen que algunos sean más atractivos para el consumo humano (Chang & Miles, 2004).

## **E. ANTIOXIDANTES**

Los hongos comestibles pueden ser consumidos como alimentos frescos, o transformados en productos alimenticios de alto valor agregado (Bruijn *et al.*, 2010). A éstos se les considera un *alimento funcional*, debido a que no sólo cumplen con los estándares nutrimentales básicos, sino que además tienen efectos positivos en una o más funciones del organismo, más allá de la adecuada nutrición, de tal manera que su consumo beneficia la salud y el bienestar, al mismo tiempo que reduce el riesgo de contraer ciertas enfermedades (p. ej. cáncer o trastornos cardiovasculares); estos mismo beneficios son aportados por nutracéuticos y complementos alimenticios o medicinales, elaborados a base de diversas especies de hongos (Suárez-Medellín *et al.*, 2007).

Algunas enfermedades degenerativas que son consecuencia del envejecimiento, como el cáncer, disminución del sistema inmunológico, enfermedades cardiovasculares, disfunción cerebral y cataratas, entre otras, están asociadas con el daño oxidativo ocasionado por radicales libres en el ADN, los lípidos y las proteínas (Bruijn *et al.*, 2010). El consumo de hongos comestibles, o sus extractos, puede proveer protección contra este tipo de enfermedades, debido a que estas especies son ricas en metabolitos secundarios, como fenoles y polisacáridos, que tienen la capacidad de eliminar los radicales libres, o suprimir sus efectos; es por esto que a los hongos se les atribuyen propiedades antioxidantes (Bruijn *et al.*, 2010; Mau *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Un ejemplo es el del hongo *shiitake* (*Lentinula edodes*), cuyo extracto hidrofílico tiene una potente actividad de eliminación de radicales, así como de inhibición de la hemólisis de eritrocitos, que se atribuye a la presencia de fenoles, demostrando así la relación entre el contenido de éstos y la actividad antioxidante (Cheung *et al.*, 2003). Otro ejemplo es de los poliporáceos, los cuales tienen una gran variedad de metabolitos secundarios, particularmente polisacáridos, como los  $\beta$ -glucanos, con efectos anticancerígenos, pues se ha visto que estimulan y mejoran el sistema inmunológico, el cual tiene una importante función para evitar la propagación del cáncer (Bruijn *et al.*, 2010).

Aunque el ser humano posee defensas y sistemas de reparación contra el daño oxidativo, éstos no son suficientes para su total prevención; es por esto que los antioxidantes juegan un papel importante en la dieta humana como posibles agentes que refuerzan estos sistemas. Si bien ya se han desarrollado algunos productos, aún no se ha sabido aprovechar la gran diversidad fúngica de México, que en su mayoría permanece aún inexplorada (Suárez-Medellín *et al.*, 2007).

## F. ANTIFÚNGICOS

Muchos hongos habitantes del suelo se desarrollan en plantas vivas, causando grandes daños a las raíces y otras partes subterráneas de sus hospederos; estas especies patógenas son los principales agentes infecciosos de las plantas, debido a que causan alteraciones durante sus diferentes etapas de desarrollo, incluso tras su cosecha; además, pueden afectar la calidad de las plantas, sobre todo en lo relacionado a su aspecto, valor nutricional, características organolépticas, su vida de anaquel y, en algunos casos, son indirectamente responsables de desórdenes alérgicos o tóxicos entre los consumidores debido a la producción de micotoxinas o alérgenos (Agrios, 2005; Agrios, 2004; Díaz-Dellavalle *et al.*, 2011).

Entre los hongos del suelo que causan grandes pérdidas en cultivos de importancia económica están especies de géneros como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia* (Agrios, 2005). Generalmente, los hongos fitopatógenos son controlados con fungicidas sintéticos; sin embargo, el uso indiscriminado de productos químicos está cada vez más restringido, debido a que éstos tienen efectos dañinos en la salud humana, animal y en el ambiente; incluso, se han encontrado cepas de especies de hongos que han generado resistencia a fungicidas comerciales (Harris, *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2005). Se sabe también que las especies fitopatógenas empobrecen el suelo, contrarrestando la acción de organismos benéficos, disminuyendo así los nutrientes disponibles para las plantas (Lizcano-González, 2007).

Se conoce un grupo importante de hongos que tienen un efecto antagónico sobre otros microorganismos; éstos contribuyen a atenuar los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas, donde existen las condiciones para su desarrollo y conservación. Para esto, las especies antagonistas presentan diferentes mecanismos de acción que les permitan ejercer un efecto regulador sobre los hongos patógenos, siendo así consideradas para su selección como agentes de control biológico (Fernández-Larrea, 2001). En su ambiente natural, los hongos

necesitan compuestos antifúngicos para sobrevivir, por lo que no es raro que dichos compuestos, con una actividad relativamente efectiva, puedan ser aislados y utilizados por el hombre; sin embargo, a nivel comercial, esto sólo se ha hecho con especies de hongos microscópicos (Lindequist *et al.*, 1990; Lindequist *et al.*, 2005).

Entre los hongos más utilizados están especies del género *Trichoderma*, debido a su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación. Se sabe que éstas tienen importantes efectos antagónicos sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella fijensis*, entre otros (Correa *et al.*, 2007; Ezziyyani *et al.*, 2004; Sempere *et al.*, 2007; Djonovié *et al.*, 2006). También se ha demostrado que algunos extractos obtenidos a partir de macromicetos (p. ej. *Auricularia polytircha*, *Lentinula edodes*, *Stropharia semiglobata* y *Volvariella volvacea*) tienen estos efectos sobre especies fitopatógenas de los géneros *Alternaria*, *Ceratocistys*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia* (Reinoso *et al.*, 2013; Radhajeyalakshmi *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que estos resultados no son constantes, debido a que diferentes condiciones ambientales pueden aumentar o disminuir la efectividad de las especies antagónicas, por lo que es necesario buscar otras alternativas que actúen contra diferentes hongos fitopatógenos en diversas condiciones, a fin de obtener resultados satisfactorios (Osorio-Hernández, 2009). Además, la creciente demanda de producción y regulación del uso de agroquímicos, así como la aparición de patógenos resistentes a los productos empleados, justifica la búsqueda de nuevas moléculas activas y nuevas estrategias de control (Díaz-Dellavalle *et al.*, 2011).

## **G. ANTIHELMÍNTICOS**

De las más de 26,000 especies de nematodos que se conocen, aproximadamente 4,000 son parásitos de plantas (Nicol *et al.*, 2011). Este grupo constituye el *phylum* animal más abundante y exitoso (Boucer & Lambshed, 1994),

causando grandes pérdidas económicas en cultivos agrícolas y forestales (Li *et al.*, 2007; Zasada *et al.*, 2008; Anwar & McKenry, 2010; Renčo, 2013). Hussey & Janssen (2002) estiman que 2,000 especies de plantas son susceptibles a la infección por nematodos, lo que causa una pérdida de aproximadamente el 5% de los cultivos en todo el mundo.

Los nematodos pueden dañar todas las partes de la planta, aunque, de acuerdo a su forma de vida, algunas especies pueden atacar partes específicas (tallos, hojas, flores o semillas); a su vez, también pueden subdividirse en ectoparásitos de vida libre, especies migratorias y endoparásitos sedentarios, como es el caso de los nematodos de las raíces (Dowe, 1987). Estos últimos son considerados los patógenos de plantas más dominantes y extensivos, debido a que atacan una gran variedad de plantas, incluyendo cultivos vegetales, árboles frutales y ornamentales (Jansson & López-Llorca, 2004; Regaieg *et al.*, 2010); además, tienen tiempos de generación muy cortos y una alta tasa de reproducción, por lo que no son fácilmente controlados (Manzanilla-López *et al.*, 2004). Algunos géneros de este grupo son *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Globodera* (Degenkolb & Vilcinskis, 2016).

A pesar de que *Caenorhabditis elegans* no es un fitoparásito, muchos estudios sobre la relación planta-nematodos parásitos se pueden facilitar usando la información y los recursos disponibles para esta especie modelo, debido a que la genómica comparativa de los procesos compartidos puede proporcionar conocimientos sobre esta relación (Costa *et al.*, 2007).

El uso de microorganismos antagonistas beneficiosos es una estrategia alternativa para evitar el uso de pesticidas químicos para disminuir la población de nematodos parásitos (Stirling, 1999; Berg *et al.*, 2005). Se han identificado varios hongos que tienen la capacidad de reducir la densidad de nematodos en el suelo; éstos tienen varias estrategias, incluyendo el parasitismo de nematodos, y la producción de compuestos que tienen propiedades nematicidas (Bird & Herd, 1995;

Kerry, 2000; López-Llorca & Jansson, 2006; Zouhar *et al.*, 2013). Degenkolb y Vilcinskis (2016), reportaron 183 metabolitos secundarios con potencial actividad nematocida, los cuales son sintetizados tanto por ascomicetos como basidiomicetos. Entre las especies que producen estos compuestos, están especies de los géneros *Pleurotus*, *Coprinus*, *Penicillium* y *Trichoderma*, por mencionar algunos.

Debido a que los mecanismos de acción de los nematocidas químicos no son específicos, éstos son potencialmente tóxicos y pueden causar daños al ambiente, por lo que su uso ha sido cada vez más restringido. Los hongos, al ser antagonistas naturales de los nematodos parásitos, representan una alternativa a los productos químicos, y tiene un gran potencial para desarrollar nuevas y mejores estrategias de biocontrol (Degenkolb & Vilcinskis, 2016).

Además, las enfermedades ocasionadas por helmintos que afectan el aparato digestivo y sus vísceras anexas, principalmente en personas que viven en condiciones de pobreza, están incluídas dentro del grupo de las llamadas *enfermedades desatendidas* y representan un problema para la salud pública, por lo que la investigación para la búsqueda de antihelmínticos naturales es importante, y los hongos, por sus metabolitos secundarios, son una alternativa prometedora (Cañete-Villafranca *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2015; Anke & Sterner, 1997).

## **H. CULTIVO DE HONGOS COMESTIBLES**

De manera general, el cultivo de hongos comestibles se lleva a cabo en cuatro etapas: 1) aislamiento de cepas en medios de cultivo artificiales; 2) producción de inóculo (en semilla) a partir de las cepas seleccionadas; 3) selección y esterilización del sustrato para el cultivo; y 4) inoculación del sustrato, fructificación y cosecha. Esta práctica inició hace aproximadamente 1 000 - 1 400 años en China, con el cultivo empírico de las *orejas de ratón* (*Auricularia* spp.) y el *shiitake* (*Lentinula edodes*), como una auténtica biotecnología tradicional basada en técnicas sencillas de propagación; del mismo modo, pero con procesos independientes, hace más o

menos 350 años comenzó el cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus*) en Francia. Con el transcurso del tiempo, se han incorporado y desarrollado tecnologías que han mejorado esta producción comercial a gran escala, no sólo de los hongos mencionados, sino de otras especies potencialmente cultivables (Chang & Miles, 2004; Martínez-Carrera, 2002b).

La producción de HSC tiene cierta importancia ecológica, la cual radica en el uso y reciclaje acelerado de millones de toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales, que son utilizados como sustrato, evitando así que este tipo de materiales tengan que ser incinerados, y por lo tanto, que contaminen el aire (Chang, 1999; Kues y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004; APCAEM, 2012).

Actualmente, la producción mundial de hongos comestibles cultivados supera las 7 millones de toneladas por año, cuyo valor económico aproximado supera los 30 billones de dólares estadounidenses, y la tasa promedio de incremento anual en la producción es superior al 11%. A nivel mundial, el champiñón (*A. bisporus*) es el hongo comestible más importante, seguido por el shiitake (*L. edodes*) y las setas (*Pleurotus* spp.); estas especies representan alrededor del 75% de la producción total de las especies cultivadas en el mundo (Martínez-Carrera *et al.*, 2007; Chang, 1999), sin embargo, el número de especies cultivadas está en constante crecimiento (Stamets, 2000).

México es el mayor productor de hongos comestibles cultivados de Latinoamérica, debido a que genera aproximadamente el 58.9% de la producción total de esta región, y está ubicado como el 16° productor a nivel mundial. De los hongos comestibles que se cultivan comercialmente en nuestro país (*Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Ganoderma* y *Grifola*) la mayor proporción es de champiñón (95.35%), seguido por las setas (4.62%) y el shiitake (0.038%). Comparativamente, en 2004, el volumen de producción de hongos comestibles en el país fue superior al del cacao, equivalente al del ajo, y un poco inferior al del chícharo y el jitomate

cherry, por lo que la producción de hongos se considera una actividad relevante a nivel nacional (Martínez-Carrera, 2002b; Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Sin embargo, en la actualidad, la sostenibilidad del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles silvestres y cultivados (SPC-HC) en México se está viendo amenazada por la gran competitividad generada por la globalización (Martínez-Carrera *et al.*, 2007); la constante entrada de importaciones de hongos cultivados al mercado nacional, además de la falta de apoyos, servicios y acciones estratégicas por parte de los sectores social y privado, podrían llevar a un estancamiento y retroceso de esta actividad en nuestro país (Martínez-Carrera, 2002b).

Son varios los problemas que pueden presentarse en la producción de hongos; uno de ellos es que algunas cepas comerciales pueden disminuir su producción después de varios subcultivos consecutivos, o bien, después de haber sido almacenados en medio de cultivo durante un largo periodo de tiempo, ocasionando una reducción en su rendimiento. Una solución a este problema podría ser la obtención de nuevas cepas naturales, que pudieran ser más productivas y con aspectos de calidad más deseables. Alrededor del mundo, hay una gran variedad de hongos comestibles que son ampliamente conocidos y consumidos por personas *micófagas* en cada región, por lo que el uso del *conocimiento popular* para la búsqueda de nuevas especies naturales con potencial para ser producidas intensivamente, podría incrementar la disponibilidad de más especies de hongos comestibles, así como de productos hechos a base de éstas (Albertó, 2014).

Las especies saprobias, específicamente, son la base para un comercio global de hongos cultivados tan importante, que se estima en 23 mil millones de dólares estadounidenses por año; además, esta actividad es una fuente de ingresos para las empresas en pequeña escala de los países en desarrollo. La producción sostenible de especies de HSC no sólo es una forma de maximizar el rendimiento de los recursos naturales, sino de re-equilibrar éstos con los demás usos y usuarios de los bosques (Boa, 2005). Garibay-Orijel *et al.* (2010) han reportado 376 especies



de HSC para Latinoamérica, de las cuales 157 son saprobias, es decir, son susceptibles de poder ser cultivadas, por lo que la información y los métodos para impulsar y llevar a cabo esta práctica son cada vez más necesarios.

## I. JUSTIFICACIÓN

En el siglo XIX, el consumo de alimentos naturales no sólo de buen sabor, sino también inocuos, nutritivos y con propiedades benéficas para la salud, representa la gran tendencia mundial en la alimentación humana; en este sentido, los hongos comestibles cultivados tienen un amplio potencial, no sólo para satisfacer la creciente demanda interna de este tipo de alimentos, sino porque sus propiedades nutricionales y medicinales los hacen una excelente opción alimenticia. Este potencial puede aprovecharse con estrategias que desarrollen nuevos productos, al mismo tiempo que se promueve el consumo en el sector urbano que actualmente no compra hongos comestibles, y que representa el 50.6% de la población urbana en el país (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

En México tenemos con una gran diversidad de especies de HSC, muchas de las cuales son saprobias, por lo que son un recurso natural que tiene un gran potencial para ser ampliamente aprovechado por medio de prácticas sencillas de propagación, y que son (antes, durante, y después del proceso) amigables con el ambiente, las cuales, además, pueden involucrar y beneficiar a diferentes sectores de la sociedad, dependiendo de la escala en la que se lleve a cabo.

A pesar de que en nuestro país hay una gran tradición de consumo de hongos comestibles que se remonta a tiempos prehispánicos, y que en la actualidad aún se mantiene viva en varias regiones del país, existe la preocupación de que esta tradición se pierda con la llamada *modernidad*, pues la venta de hongos silvestres comestibles es una actividad cada vez menos frecuente, debido a que cada día es más difícil recolectarlos por la intensa deforestación y destrucción de sus hábitats (Mata *et al.*, 2007); es por esto que se plantea la necesidad de llevar a cabo

investigación y trabajar en estrategias que permitan disponer de este recurso durante todo el año y de un modo lo menos invasivo posible, y el cultivo de especies comestibles bajo condiciones controladas es una buena opción para lograr este objetivo.

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Obtener cepas de HSC utilizados por personas en comunidades de la huasteca potosina, y producir su inóculo, como un primer paso para determinar las condiciones para el cultivo *ex situ* de estas especies.

### **B. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aportar conocimiento sobre la actividad antifúngica, actividad antihelmíntica, capacidad antioxidante y propiedades bromatológicas, de algunas especies de HSC con importancia cultural en la huasteca potosina.
- Determinar las condiciones *in vitro* (medio de cultivo y temperatura) para el aislamiento y preservación de las cepas de HSC aisladas.
- Estimar el potencial biológico del inóculo de cada cepa, para detectar cambios metabólicos y determinar el tiempo en el que el micelio puede colonizar un sustrato de manera más eficiente.

## **CAPÍTULO III. MÉTODOS**

### **A. ÁREA DE COLECTA**

El presente trabajo se desarrolló con especies de hongos silvestres comestibles (HSC) colectadas en San Luis Potosí, México, en cuatro diferentes localidades: 1) San José Barrio Arriba, 2) Barrio el Tamarindo, 3) Coatzontitla, y 4) Comoca; el primero perteneciente al municipio de Matlapa, y el resto a Axtla de Terrazas. Estos dos municipios se localizan al Sureste del San Luis Potosí y forman parte de la huasteca potosina, región donde se distribuye el 23.20% de la población indígena del Estado, y que está conformada por huastecos, nahuas y pames (INEGI, 2015; CDI, 2016).

Esta área se encuentra inmersa en la Sierra Madre Oriental, entre los 50 y 800 msnm, en la zona ecológica tropical cálido-subhúmeda; la temperatura media anual es de 20 a 24 °C, con precipitaciones anuales de 1000 a 2600 mm. Los tipos de vegetación que predominan en esta zona son: bosque tropical perennifolio (selva alta perennifolia o subperennifolia), bosque tropical subcaducifolio (selva mediana caducifolia), y bosque tropical caducifolio (selva baja caducifolia) (Rzedowski, 1978).

### **B. COLECTA DE EJEMPLARES**

De Junio a Septiembre del 2016 se realizaron salidas al campo para la obtención de los ejemplares con los que se trabajó en el laboratorio, tanto para la determinación de sus propiedades bioquímicas, como para el aislamiento de cepas; esto se hizo mediante: la compra de los cuerpos fructíferos en los mercados locales; su colecta directa en las salidas al campo, guiadas por algunos de los habitantes; y por encargos especiales, hechos a estas mismas personas.

Cuando los ejemplares se colectaron en campo, con ayuda de una navaja se removió parte del sustrato (suelo o madera), para así poder sacar completo el esporoma; posteriormente, éste se envolvió en papel encerado y se colocó en una canasta, para evitar maltratarlo durante su traslado. Se tomó registro de la fecha y la zona de colecta de cada ejemplar, y algunos esporomas se secaron como material de referencia para su determinación taxonómica.

## **C. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

En el presente trabajo se determinó el efecto antifúngico del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos sobre *Trichoderma atroviridae* y las especies fitopatógenas: *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Los extractos fueron preparados en el Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición, y los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Biología molecular de microorganismos, ambos de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.

### **Preparación de extractos metanólicos**

La preparación de extractos se hizo utilizando metanol, debido a que, de acuerdo a Radhajeyalakshmi *et al.* (2012), éste es un buen solvente para la extracción de compuestos antifúngicos presentes en macromicetos. Las extracciones se hicieron a partir de material liofilizado y pulverizado, siguiendo el método descrito por Ko *et al.* (2010), modificado por Jiménez-Zárate (2017).

Por especie, se pesaron 2 g de material pulverizado, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agregaron 50 ml de metanol. Estos matraces fueron colocados en un agitador orbital durante 24 horas, a una velocidad de 100 rpm y a temperatura ambiente.

Transcurridas las 24 horas, el extracto se repartió en dos tubos de centrífuga de 50 ml, colocando 25 ml de la solución en cada uno. Los tubos se centrifugaron a

1,500 gravedades durante cinco minutos; al término de la centrifugación se tomaron 15 ml de sobrenadante de cada uno de los dos tubos, y ambos sobrenadantes se depositaron en un mismo matraz de fondo redondo. Los 30 ml de sobrenadante se llevaron a sequedad total, colocando el matraz en un rotovapor a 40°C y presión baja, durante un tiempo indeterminado. El residuo se resuspendió en 6 ml de agua grado HPLC y se depositó en un tubo de centrífuga de 14 ml.

Por último, el extracto se filtró usando una membrana de nitrato de celulosa Whatman (25 mm de diámetro) con microporos de 0.45 µm. La concentración final del extracto fue de 200 mg/ml.

### **Ensayo antifúngico**

El ensayo consistió en la inhibición del crecimiento radial de *C. gloeosporoides*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *T. atroviride*, por medio del contacto del micelio de estas cuatro especies con los extractos metanólicos de los macromicetos.

En cajas Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), se vertió 200 µl de extracto metanólico y se distribuyó uniformemente en la superficie del medio con un asa de vidrio. A parte, se cortaron discos de agar con micelio (5 mm de diámetro) de colonias de las cuatro especies patógenas crecidas en PDA, procurando que éstos fueran de la parte más externa de cada cultivo. Posteriormente se colocó un disco al centro de cada una de las cajas con extracto.

Se utilizaron dos controles, uno negativo (testigo) y otro positivo. El primero consistió en cajas con medio de cultivo sin extracto metanólico, e inoculadas con discos de agar con micelio de las especies patógenas; para el control positivo se colocaron 125 µl de fungicida Benomilo (ANTRAK 50) al 2% (a partir de una solución de concentración 10 g/l) en cajas con medio PDA, el fungicida se distribuyó en todo el medio del mismo modo que el extracto metanólico, y las cajas fueron inoculadas con los patógenos.

Se hicieron triplicados, tanto para los testigos (2 testigos x 4 patógenos x 3 repeticiones), como para las cajas con los extractos y los patógenos (10 extractos x 4 patógenos x 3 repeticiones); todas las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente en completa oscuridad, hasta que el micelio del testigo estuvo a aproximadamente 5 mm de tocar el margen de la caja Petri. El tiempo de incubación dependió de la velocidad de crecimiento de cada especie patógena.

Finalmente, se tomaron fotografías de los cultivos con una cámara digital, colocando a un costado una regla como referencia métrica.

### **Cálculos de actividad antifúngica**

Para determinar la actividad antifúngica de los extractos, primero se midieron los diámetros de crecimiento micelial de cada caja, utilizando el software ImageJ versión 1.45; se tomaron tres medidas por caja y éstas se promediaron. A partir del promedio de crecimiento, se calculó el porcentaje de crecimiento micelial respecto al testigo (100%), del cual se obtuvo el crecimiento micelial final promediando las medias de sus tres repeticiones.

Cálculos por caja

D1 = Diámetro 1

D2 = Diámetro 2

D3 = Diámetro 3

Promedio de crecimiento =  $[(D1 + D2 + D3) / 3]$

Porcentaje de crecimiento micelial =  $\frac{(\text{Promedio de crecimiento})(100)}{\text{Crecimiento micelial final del testigo}}$

Se promediaron los tres valores del porcentaje de crecimiento micelial de cada extracto con su respectivo patógeno, y se obtuvo la desviación estándar.

Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento con la siguiente fórmula:

Porcentaje de inhibición de crecimiento = (100 - Porcentaje final de crecimiento)

El resultado se expresó como *porcentaje de inhibición*.  
(% de inhibición)

## **D. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA**

Para evaluar la actividad antihelmíntica de 10 especies de hongos macromicetos, se llevó a cabo un ensayo utilizando extractos metanólicos de estas especies, pues a diferencia de otros extractos, como el hidrofílico y lipofílico, éste tiene un mayor efecto antihelmíntico (Jiménez-Zárate, 2017). Estas pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva, de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, utilizando nematodos de la especie *Caenorhabditis elegans*.

### **Ensayo antihelmíntico**

Para este ensayo se utilizaron los mismos extractos metanólicos empleados para la determinación de la actividad antifúngica. El método utilizado fue el descrito por Piña-Vázquez *et al.* (2017), el cual consistió en realizar conteos, en determinados tiempos, de nematodos inmersos en una solución 1:1 de medio M9 y extracto metanólico (200 mg/ml).

Se utilizaron placas de 24 pozos, y en cada uno de éstos se agregaron 500 µL de medio M9, se depositaron 10 nematodos, y posteriormente se agregaron 500 µL del extracto metanólico correspondiente; se hicieron triplicados por cada especie



de hongo. Además, a manera de control, se prepararon pozos con medio M9 (100%) y Levamisol (50% v/v). Finalmente las placas se incubaron a 24°C.

Los pozos fueron numerados y se revisaron aleatoriamente al cabo de: 1, 2, 4, 6, 8, 24, 36 y 48 hora(s), a partir de su incubación. En cada revisión, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se contó el número de nematodos totalmente paralizados.

Como cada individuo representó el 10% de la población en cada pozo, se obtuvo un promedio final por cada especie de hongo, y el resultado del efecto antihelmíntico se expresó como *porcentaje de parálisis*.

*(% de parálisis)*

Debido a que la especie *Daldinia* sp. presentó actividad antihelmíntica significativa, se evaluó su efectividad, utilizando el mismo método, a cinco diferentes concentraciones: 75, 50, 25, 10 y 1% (v/v).

## **E. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Por medio de un ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (antioxidante comercial, análogo a la vitamina E), se determinó esta propiedad para 10 especies de hongos macromicetos, utilizando dos métodos: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición, y en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, de la FCN, UAQ.

### **Conservación de cuerpos fructíferos de los HSC**

Con la finalidad de conservar las propiedades bioquímicas de los ejemplares obtenidos en campo, hasta su uso en el laboratorio, éstos fueron picados en

pequeños trozos, se envolvieron en papel aluminio, y se sumergieron en un contenedor con nitrógeno líquido hasta su congelación. Inmediatamente se sacaron los paquetes y fueron almacenados en un ultracongelador a -86 °C.

Una vez que se retiraron las muestras del ultracongelador, el contenido de los paquetes se depositó en tubos de centrifuga de 50 ml, previamente pesados y marcados, y éstos se cubrieron con una gasa, sostenida con una liga de hule. Nuevamente se pesaron los tubos, y la cantidad exacta de hongo contenida en cada uno de éstos se determinó por la diferencia de peso del tubo, antes y después de depositada la muestra.

$W_1$  = Peso inicial del tubo

$W_2$  = Peso del tubo + muestra

$(W_2 - W_1)$  = Peso de la muestra contenida en el tubo

Se colocaron los tubos con muestra en vasos liofilizadores, y éstos se colocaron en una liofilizadora FreeZone 1 (LABCONCO) a una presión de 0.080 mBar y una temperatura aproximada de -40°C. Las muestras se retiraron después de 48 horas, y los tubos se volvieron a pesar para conocer la cantidad de muestra libre de humedad (liofilizada) contenida en cada uno.

$W_1$  = Peso inicial del tubo

$W_3$  = Peso del tubo + muestra libre de humedad

$(W_3 - W_1)$  = Peso de la muestra liofilizada contenida en el tubo

Utilizando estos datos se determinó el porcentaje de materia seca y el porcentaje de humedad con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ materia seca} = \frac{(W_3 - W_1) * (100)}{(W_2 - W_1)}$$

$$\% \text{ humedad} = 100 - \% \text{ materia seca}$$

Al final, las muestras liofilizadas fueron pulverizadas usando un molino (IKA M20), se almacenaron en frascos de vidrio y se guardaron en refrigeración. Este material se utilizó tanto para la preparación de extractos, como para los análisis químicos proximales.

### **Preparación de extractos lipofílico e hidrofílico**

#### Extracto lipofílico

La preparación de extractos se realizó a partir del material pulverizado, de acuerdo al método descrito por Corral-Aguayo *et al.* (2008).

Por triplicado, para cada especie de hongo (10 especies x 3 repeticiones), se colocó 1 g de muestra en un tubo de centrífuga de 50 ml, y se le agregó 10 ml de solución hexano / diclorometano (1:1 v/v); la muestra y el solvente se homogeneizaron durante un minuto utilizando un vortex. Luego, para tener una solución aún más homogénea, se usó un homogeneizador (IKA-T25) a una velocidad de 8,000 rpm, durante un minuto. Posteriormente, los tubos se sometieron a sonicación en un equipo Branson 2510, por cinco minutos, y después fueron centrifugados a 19 000 gravedades durante 10 minutos, a 4°C.

Al término de la centrifugación, se colectó el sobrenadante de cada uno de los tubos, y éste se depositó en otro tubo cubierto completamente con papel aluminio. Al *pellet* restante en el primer tubo, nuevamente se le agregaron 10 ml de hexano / diclorometano, y se repitió el mismo proceso hasta obtener un segundo sobrenadante, el cual se vertió en el mismo tubo que la primera vez. Una vez mezclados los sobrenadantes, éstos fueron depositados en un matraz de fondo redondo y la solución se llevó a sequedad total colocando el matraz en un rotovapor, a presión baja y una temperatura de 40°C.

Por último, el extracto seco se resuspendió en 5 ml de acetona grado HPLC y se almacenó en un tubo de centrífuga de 14 ml.

## Extracto hidrofílico

Este extracto se preparó a partir del pellet restante de la segunda centrifugación del extracto lipofílico, el cual fue expuesto a una corriente de nitrógeno, con la finalidad de secar el residuo de la solución de hexano / diclorometano. Una vez que la muestra estuvo completamente seca, se le agregó 10 ml de una solución de acetona / agua / ácido acético (7 : 2.95 : 0.05), y se llevó a cabo el mismo proceso de extracción, obteniendo dos sobrenadantes por repetición, y juntándolos en un mismo tubo. Para este extracto las soluciones no se rotovaporaron.

Al término del proceso se obtuvieron tres tubos (A, B, C) para cada especie, por cada extracto (10 especies x 3 repeticiones x 2 extractos).

### **Curva de calibración Trolox**

Se preparó una solución stock de Trolox (ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) 2 mM, diluyendo 0.001 g de Trolox en 2 ml de metanol grado HPLC.

Por otra parte, se añadió 1 ml de metanol (HPLC) en nueve frascos pequeños de vidrio color ámbar; en éstos se hicieron diluciones seriadas a partir de la solución stock. Se vertió 1 ml de la solución inicial de Trolox en uno de los frascos ámbar y se agitó manualmente, posteriormente se tomó 1 ml de esta solución y se colocó en otro frasco, agitando nuevamente; este procedimiento se repitió hasta completar los nueve frascos. Al final se obtuvieron las siguientes concentraciones: 1.0 (1.0), 1/2 (0.5), 1/4 (0.25), 1/8 (0.125), 1/16 (0.0625), 1/32 (0.03125), 1/64 (0.015625), 1/128 (0.0078125), 1/256 (0.00390625), 1/512 (0.001953125).

Antes de llevar a cabo cada ensayo, se hizo la curva de calibración para cada uno de éstos, con las 10 concentraciones de Trolox y su respectivo blanco (FRAP y DPPH), utilizando microplacas de 96 pocillos. Tres de estos pocillos se llenaron con 300 µl de la solución blanco, y para el Trolox (por triplicado), primero se agregaron 280 µl de FRAP o DPPH, y luego se adicionaron 20 µl de cada una de las

concentraciones de la solución stock, de menor a mayor (10 concentraciones de Trolox x 3 pocillos). Al terminar se colocó la tapa de la microplaca, cubierta con papel aluminio, y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad.

Las lecturas se hicieron usando un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Ascent, con el programa Ascent Software versión 2.6; la longitud de onda para las curvas con FRAP y DPPH, fue de 630 y 490 nm, respectivamente. Para cada método se hicieron dos curvas de calibración, se promediaron los triplicados de cada una de las muestras en cada curva y se calculó su porcentaje de inhibición con las siguientes fórmulas:

- Curvas con FRAP

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( 1 - \left( \frac{\text{Absorbancia del blanco}}{\text{Absorbancia de la muestra}} \right) \right) * 100$$

- Curvas con DPPH

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia de la muestra}} \right) * 100$$

Estos resultados se graficaron, y se trabajó con aquellas curvas cuyo valor de  $R^2$  (coeficiente de relación) fue  $> 0.98$ . Finalmente se obtuvieron los valores de  $m$  y  $b$  para la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ) de cada una las curvas.

### **Método FRAP**

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Benzie y Strain (1996), modificado por Szöllősi y Szöllősi-Varga (2002).

Primero, justo antes del ensayo, se preparó la solución FRAP (buffer de acetato de sodio / TPTZ /  $\text{FeCl}_3$ ) (Anexo 1).

En tres de los pocillos de la microplaca, se colocaron 300  $\mu\text{l}$  de la solución FRAP, y posteriormente se depositaron 280  $\mu\text{l}$  de ésta misma solución en cada uno de los pocillos que se utilizaron; para lo cual se consideraron los triplicados de los extractos lipofílico e hidrofílico de cada una de las especies de hongos (A, B, C) (10 especies x 2 extractos x 3 repeticiones x 3 pocillos), y sus respectivos solventes (acetona, y acetona / agua / ácido acético) (2 solventes x 3 pocillos). Después, en los pocillos correspondientes, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de los extractos y los solventes; una vez llenados los pocillos, del mismo modo que para la curva de calibración, se tapó la microplaca y se dejó en reposo por 30 minutos en oscuridad. Las lecturas al espectrofotómetro se hicieron con una longitud de onda de 630 nm, y los valores de éstas se registraron en una matriz de datos, para el posterior cálculo de resultados.

### **Método DPPH**

El ensayo se realizó de acuerdo al método descrito por Kim *et al.* (2002), y modificado por Corral-Aguayo *et al.* (2008), el cual se llevó a cabo del mismo modo que el método con FRAP, con la diferencia de que se utilizó una solución de DPPH / metanol (100  $\mu\text{M}$ ). Esta solución se preparó justo antes del ensayo, diluyendo 0.0035 g de reactivo DPPH en 90 ml de metanol.

Por triplicado, se depositaron 300  $\mu\text{l}$  de la solución de DPPH y, en el resto de los pocillos, se añadieron 280  $\mu\text{l}$  del blanco, más 20  $\mu\text{l}$  de los extractos lipofílico e hidrofílico, y sus solventes. Las lecturas al espectrofotómetro se hicieron a 490 nm, y los valores de las absorbancias se registraron en una matriz de datos independiente a aquella del método FRAP.

## Cálculos de capacidad antioxidante

Los cálculos se hicieron a partir de los promedios de los triplicados de cada una de las muestras (A, B, C). Posteriormente, se determinó su porcentaje de inhibición del mismo modo que las diferentes concentraciones de Trolox en la curva de calibración, utilizando una fórmula para el método con FRAP, y otra diferente para el método con DPPH.

### Cálculos por muestra

- Se despejó  $x$  en la ecuación de la recta ( $y = ax + b$ ) de cada curva, y se calculó el valor de ésta, siendo  $y$  el porcentaje de inhibición de la muestra. Para posteriores cálculos, este valor representó la concentración inicial ( $C_1$ ).

$$x = \frac{y-b}{a}$$

- Debido a que la concentración de la muestra era *milimolar* (mM), se hizo una conversión para que en adelante el resultado pudiera ser expresados como *micromolar* ( $\mu\text{M}$ ).
- A partir de la fórmula:  $C_1V_1 = C_2V_2$ , se despejó  $C_2$  (concentración final) y se calculó su valor. Se tomó como volumen inicial ( $V_1$ ) los 300  $\mu\text{l}$  contenidos en el pocillo, como volumen final ( $V_2$ ) los 20  $\mu\text{l}$  de extracto, y como concentración inicial ( $C_1$ ) el valor de  $x$ , anteriormente calculado.

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

- El valor de  $C_2$  se multiplicó por el factor de dilución de cada extracto, es decir, 5 ml para el extracto lipofílico y 20 ml para el extracto hidrofílico.

- Este resultado se dividió entre 10, para poder expresar la cantidad de *micromoles (μmol) equivalentes de Trolox* contenidos en 100 ml de extracto de hongo (en base seca).
- Posteriormente, se determinó la cantidad de μmol equivalentes de Trolox en 1 g de muestra, con la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{mol equivalentes de Trolox}}{100 \text{ ml de extracto de hongo}} * \frac{\text{Factor de dilución (ml de extracto de hongo)}}{1 \text{ g de muestra de hongo}}$$

- Para conocer la cantidad de μmol equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra, el resultado anterior se multiplicó por 100.
- Después se determinó la cantidad de *miligramos (mg) equivalentes de Trolox* contenidos en 100 g de muestra (peso molecular del Trolox = 250.29 g/mol).

Por último, por especie, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los resultados de las tres muestras (A, B, C). Los resultados se expresaron en *mg equivalentes de Trolox / 100 g de muestra*.

*(mg Trolox / 100 g)*

## F. ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES

La información composicional de los alimentos puede obtenerse a partir del análisis químico proximal (AQP), el cual se emplea para conocer el contenido de: humedad, materia seca, cenizas, proteína cruda, fibra cruda, extracto etéreo y extracto libre de nitrógeno. La determinación de éstos es útil como punto inicial para un análisis más detallado de nutrientes específicos en los alimentos (Shimada-Miyasaka, 2003).



En este trabajo se determinó la composición del material liofilizado y pulverizado de seis especies de hongos silvestres comestibles (HSC), de acuerdo a los métodos establecidos por la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC, por sus siglas en inglés) (1990). Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal, de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN), UAQ.

### **Determinación de porcentaje de humedad y materia seca**

El porcentaje de humedad y materia seca que componen las seis especies de hongos, se determinó usando el método por estufa de secado, para lo cual, por duplicado para cada especie, se llevaron crisoles a peso constante (6 especies x 2 crisoles).

Posteriormente, los crisoles fueron pesados en una balanza analítica y se colocaron 0.5 o 1 g de la muestra de hongo (dependiendo de la especie), registrando la cantidad exacta en cada uno de los crisoles. Estos recipientes fueron colocados en la estufa a 100°C, durante 24 horas, para obtener el peso constante de la muestra; transcurrido este tiempo se pesaron. Los porcentajes de materia seca y humedad, se determinaron con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ materia seca} = \frac{(W_3 - W_1) * 100}{W_2}$$

$$\% \text{ humedad} = 100 - \% \text{ materia seca}$$

Donde:

$W_1$  = Peso inicial del crisol sin muestra (peso constante)

$W_2$  = Peso exacto de la muestra (0.5 o 1 g)

$W_3$  = Peso del crisol con la muestra (peso constante)

Se promediaron los duplicados de cada especie, y los resultados se expresaron como *porcentaje de humedad* y *porcentaje de materia seca*.

(% humedad, % materia seca)

### **Determinación de cenizas**

A partir de las muestras con las que se determinó el porcentaje de humedad y el porcentaje de materia seca, se cuantificó el contenido de cenizas. Después de haber pesado los crisoles con las muestras a peso a constante, éstos fueron colocados en una mufla a una temperatura de 556°C, hasta que se obtuvieron cenizas blancas o grises (24 horas); en ese punto se apagó el equipo para permitir que bajara la temperatura (48 horas).

Los crisoles fueron retirados de la mufla y se pasaron a la estufa, dejándolos ahí por 45 minutos a 80°C. Al retirar los recipientes, se colocaron en un desecador con sílica, durante 30 minutos, antes de pesarlos. El porcentaje de cenizas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(W_3 - W_1) * 100}{W_2}$$

Donde:

$W_1$  = Peso inicial del crisol sin muestra (peso constante)

$W_2$  = Peso exacto de la muestra (0.5 o 1 g)

$W_3$  = Peso del crisol con la muestra (peso constante)

Se promediaron los duplicados de cada especie, y los resultados se expresaron como *porcentaje de cenizas*.

(% cenizas)

## Determinación de nitrógeno total (proteína cruda)

Debido a que una gran porción del nitrógeno de los alimentos se encuentra en forma de proteínas, el contenido de éstas puede calcularse químicamente a partir del contenido de nitrógeno (AOAC, 1990). En este trabajo se determinó el porcentaje de nitrógeno total contenido en las muestras de hongo, por medio de una digestión, utilizando un método basado en el descrito por Kjeldahl (1883).

Se pesó 0.5 g de la muestra de hongo, y cada una se depositó en un tubo de digestión Büchi junto con dos pastillas catalizadoras. Los tubos fueron tapados con la chimenea de vidrio y posteriormente se colocaron en un digestor previamente calentado (Speed Digester K-436 BÜCHI) (conectando la manguera del evaporador (Scrubber K-415)), durante 10 minutos en la posición 10, controlando la formación de espuma; eventualmente se cambiaron a las posición ocho para continuar la digestión, hasta que el contenido en los tubos adquirió una coloración verde claro transparente (30 - 45 minutos). Finalmente el aparato de digestión fue apagado, manteniendo conectado el Scrubber, y los tubos permanecieron ahí hasta que se enfriaron completamente (20 minutos).

Posterior a la digestión se llevó a cabo la destilación, para lo cual los tubos se colocaron en una unidad de destilación (BÜCHI B-324), donde se evaporó todo el nitrógeno contenido en la muestra, se destiló, y se retuvo en ácido bórico. Por último, se hizo una titulación utilizando un titulador automático con punto final: pH 4.65.

El porcentaje de nitrógeno se calculó con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{A * B * C}{M} * 100$$

$$\% \text{ proteína cruda o bruta (PC o PB)} = \% \text{ nitrógeno} * \text{factor de conversión}$$

Donde:

A = ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gastados en la muestra problema

B = mili equivalentes de nitrógeno (0.014)

C = normalidad del ácido sulfúrico (0.1)

M = peso de la muestra (g)

Factor de conversión = 6.25 (por ser un valor promedio)

Se promediaron los duplicados y los resultados se expresaron como *porcentaje de proteína cruda*.

*(% proteína cruda)*

### **Determinación de fibra cruda**

Con este análisis se pueden determinar los compuestos orgánicos de la membrana celular y los compuestos estructurales de soporte de los hongos. La determinación consistió en una digestión ácida y una básica, a partir de muestras previamente desengrasadas.

Para realizar este análisis, se utilizaron dos bolsitas filtrantes (ANKOM F57) por especie; éstas, al tener un contenido de humedad despreciable, no necesitaron ser pre-secadas. Una a una, las bolsas fueron marcadas, se registró su peso, y la balanza se taró para después depositar 0.5 g de la muestra de hongo, registrando su peso exacto. Se pesó una bolsa extra sin muestra (blanco), para poder determinar la corrección de la bolsa vacía.

Utilizando un sellador de calor (ANKOM), las bolsas fueron selladas, y las muestras se distribuyeron uniformemente dentro de éstas. Las muestras se colocaron en la canastilla y ésta se introdujo en un digestor de fibra (ANKOM 200); posteriormente, se agregó al contenedor del digestor 1900 – 2000 ml de una solución de ácido sulfúrico (0.255 N) a temperatura ambiente, se sumergió la canastilla con las bolsas, y se dejaron en agitación a 100°C durante 45 min. Al término, el equipo se apagó y se abrió la válvula para purgar, antes de abrir la tapa, para dejar salir la solución. Después de que la solución fue purgada, se agregaron

1900 – 2000 ml de agua caliente para enjuagar (90 – 100°C) y las muestras se dejaron en agitación por 5 min; el proceso de enjuague se repitió dos veces más.

Una vez que las muestras fueron enjuagadas, se agregó al contenedor 1900 – 2000 ml de hidróxido de sodio (NaOH 0.313 N) (solución base) a temperatura ambiente, y las bolsas se agitaron nuevamente, durante 45 minutos a 100°C. Pasado este tiempo, se abrió la válvula para dejar salir la solución, y se repitió el proceso de enjuague (tres veces). Al terminar este proceso, se retiraron las bolsas de la canastilla, se apretaron sutilmente para eliminar el exceso de agua y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 ml, en el cual se agregó acetona hasta cubrir las bolsas. Las muestras se remojaron durante 3 min, se sacaron del vaso y nuevamente se apretaron ligeramente para eliminar el exceso de acetona.

Las bolsas se extendieron y se dejaron secar al aire, para luego colocarlas en una estufa de secado a 105°C, de 2 a 3 horas, hasta que éstas se secaron por completo. Al retirar las bolsas, se colocaron en un desecador con sílica hasta que estuvieron a temperatura ambiente; finalmente las muestras se pesaron, y el porcentaje de fibra cruda se calculó con esta fórmula:

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{W_3 - (W_1 * C_1)}{W_2 * 100}$$

Donde:

$W_1$  = Peso inicial de la bolsa

$W_2$  = Peso exacto de la muestra contenida en la bolsa

$W_3$  = Peso final de la bolsa, después del proceso de extracción

$C_1$  = Corrección de la bolsa vacía (peso final después del secado en la estufa / peso inicial de la bolsa vacía)

Se obtuvo el promedio de los duplicados de cada especie y los resultados se expresaron como *porcentaje de fibra cruda*.

(% fibra cruda)

### **Determinación de extracto etéreo**

Por medio de una extracción, usando éter etílico como solvente, se separó la fracción lipídica de las muestras de hongos, la cual no sólo contiene la grasa verdadera, sino que además incluye las ceras, lípidos complejos (p. ej., fosfolípidos), compuestos derivados de los lípidos, como los esteroides y algunos pigmentos, hormonas y aceites volátiles.

Por duplicado, se pesó 1 g de muestra, se envolvió en papel filtro, y cada una se colocó dentro de un cartucho poroso, el cual fue cerrado con algodón; estos cartuchos se colocaron dentro de un vaso de extracción, previamente llevado a peso constante. A parte, se pusieron a calentar las parrillas y se abrió la llave del agua, la cual debía estar fría para poder condensar el éter; al trabajar con un extractor de grasa BÜCHI (Soxhlet B-810), en seguida se encendió el aparato Lauda, el cual controla el calentamiento del aceite que posteriormente calienta los vasos en el extractor.

Se agregó 60 ml de éter etílico en cada vaso, se colocaron en el extractor y se bajaron las jarras de extracción; las muestras permanecieron ahí durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se subieron las jarras de extracción y se inició la destilación automática del éter para su recolección. Al finalizar, se apagaron las parrillas y se retiraron los vasos, colocándolos en la campana de extracción para la evaporación total del éter; posteriormente se metieron a la estufa a 60°C por tres horas, se dejaron enfriar y se pesaron. La fracción de extracto etéreo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} * 100$$

Donde:

W1 = Peso exacto de la muestra

W2 = Peso inicial del vaso (peso constante)

W3 = Peso final del vaso con el residuo lipídico

Se promediaron los duplicados de cada especie y los resultados se expresaron como *porcentaje de extracto etéreo*.

*(% extracto etéreo)*

### **Determinación de extracto libre de nitrógeno**

Con esta determinación se obtiene cuantitativamente la materia soluble en agua que no estuvo incluida en ninguna de las fracciones anteriores, tales como: carbohidratos, pigmentos, vitaminas, etc. Esta fracción se obtiene restando al 100% de la muestra las determinaciones previamente efectuadas.

$\% \text{ extracto libre de nitrógeno} = 100 - (\% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína cruda} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ extracto etéreo})$

Se promediaron los duplicados, y el resultado se expresó como *porcentaje de extracto libre de nitrógeno*. Algunos autores consideran a esta fracción como inexacta, consideran que el valor obtenido es subestimado debido a que las fracciones determinadas son sobreestimadas.

*(% extracto libre de nitrógeno)*

### **Determinación de porcentajes en base húmeda**

Finalmente, tomando como referencia el porcentaje de humedad y el porcentaje de materia seca de cada una de las especies, los porcentajes de ceniza, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda y extracto libre de nitrógeno, se determinaron en base húmeda, por medio de una regla de tres.

## **G. AISLAMIENTO DE CEPAS**

Las cepas se obtuvieron por aislamiento vegetativo, a partir de los ejemplares colectados en campo, en los medios agar extracto de malta (EMA), y agar papa dextrosa (PDA).

En un ambiente aséptico, incluyendo los materiales previamente esterilizados (agujas, navajas y pinzas de disección), se colocó el hongo, en buen estado y libre de tierra y/o insectos. Éste fue cortado longitudinalmente con una navaja, y con ayuda de unas pinzas se tomaron fragmentos de la parte carnosa del hongo, los cuales fueron colocados en las cajas Petri con medio de cultivo. Las cajas con los aislamientos se incubaron a una temperatura entre 24 – 27°C, en completa oscuridad.

Transcurridos dos o tres días, a partir del aislamiento, aquellos fragmentos que presentaron crecimiento micelial sobre la superficie del medio, fueron transferidos a nuevas cajas con medio de cultivo. Posteriormente, cuando el micelio invadió el medio, se tomó una muestra de éste y se observó al microscopio para corroborar la presencia de fíbulas, así como la ausencia de hongos contaminantes.

Las cepas se preservaron transfiriendo periódicamente fragmentos de agar con micelio en nuevas cajas Petri con medio de cultivo.

## **H. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS**

Con la finalidad de conocer el medio de cultivo sólido y la temperatura más adecuados para el crecimiento y desarrollo óptimo de las cuatro cepas de especies de HSC obtenidas en este trabajo, se hicieron evaluaciones con dos medios de cultivo de uso común en el aislamiento de hongos: EMA (Difco), y PDA (BIOXON). Los cultivos, además, se evaluaron a tres diferentes temperaturas: 23, 25 y 27°C.



## Tasa de crecimiento

Los dos medios de cultivo empleados se vertieron en cajas Petri de 90 mm de diámetro x 15 mm de altura. Al centro de cada caja se colocó un disco de agar con micelio (5 mm de diámetro); por cada una de las cepas evaluadas se inocularon 18 cajas (2 medios x 3 temperaturas x 3 réplicas). Las cajas fueron incubadas a 23, 25 y 27°C (de siete a 10 días, dependiendo de la especie), en completa oscuridad.

Para determinar la tasa de crecimiento, se trazaron dos ejes cartesianos sobre la base de cada caja, tomando como intersección el centro del disco, y sobres estos ejes se midió el crecimiento micelial, por lo que cada día se tomaron fotografías y, posteriormente, se midieron los diámetros con el software ImageJ versión 1.45.

Los diámetros de crecimiento micelial se registraron en una matriz de datos, y la tasa de crecimiento por día se determinó por la diferencia de los valores de estos diámetros, entre un día y otro. Los valores por día se promediaron.

$D_f$  = Diámetro final de crecimiento

$D_i$  = Diámetro inicial de crecimiento (valor del día anterior)

$(D_f - D_i)$  = Crecimiento micelial por día

Se obtuvo un promedio general por cepa, con desviación estándar, y los resultados se expresaron en *milímetros / día*.

$(mm / d)$  o  $(mm * d^{-1})$

El análisis estadístico se hizo con el programa Design-Expert versión 9. Los datos se sometieron a un ANOVA multifactorial, considerando la temperatura de incubación y el medio de cultivo como factores, y la velocidad de crecimiento como variable de respuesta.

## **Caracterización macroscópica y microscópica**

Al final del periodo de incubación se realizó la caracterización morfológica de cada cepa, con base a la descripción de caracteres utilizados en las claves de Hutchinson (1991) y Stalpers (1978) (Anexo 2). El orden en la descripción de las cepas es el siguiente para los caracteres macroscópicos:

- 1) Zona de avance
- 2) Textura del micelio,
- 3) Color de la colonia
- 4) Color del reverso/agar
- 5) Tasa de crecimiento

Para los caracteres microscópicos:

- 1) Color de las hifas
- 2) Diámetro de las hifas
- 3) Diferenciación morfológica de las hifas
- 4) Tipo de fíbulas
- 5) Distribución de las fíbulas
- 6) Estructuras de propagación

Para determinar: color de la colonia, color del reverso, y color de las hifas; se utilizó el manual de color de Kornerup y Wanscher (1978).

Las hifas, fíbulas y estructuras de propagación, fueron observadas con un microscopio Carl Zeiss modelo Axio Scope A1. El diámetro de las hifas se determinó midiendo el ancho de 10 de éstas, utilizando el software AxioVision 4.8; para su clasificación se obtuvo un promedio con desviación estándar.

## **I. PRODUCCIÓN DE INÓCULO**

La preparación de inóculo, o semilla, constituye la base para el cultivo de los hongos comestibles en sustrato, y se refiere a la propagación del micelio de éstos en granos de gramíneas. En el presente trabajo, se utilizó sorgo (*Sorghum* sp.).

### **Limpieza y esterilización de semilla**

Se separaron las semillas enteras de las quebradas, desechando éstas últimas, utilizando un cernidor con malla metálica (abertura: 3 mm). Las semillas fueron lavadas, enjuagándolas varias veces, y posteriormente se hidrataron por inmersión en agua por un periodo de 8 – 24 horas. Transcurrido el tiempo de hidratación, los granos se enjuagaron y se retiró el exceso de humedad pasando un lienzo seco sobre éstos.

Posteriormente las semillas se sometieron a un proceso de cocción (aproximadamente 10 minutos), evitando que no se deshicieran, con la finalidad de romper el endospermo y permitir que la hifas penetren con mayor facilidad (Arana-Gabriel *et al.*, 2014); nuevamente, el exceso de humedad fue retirado con un lienzo seco.

Se colocaron 300 g de estas semillas en bolsas de polipapel (30 x 20 cm), se sellaron con cinta adhesiva y se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C.

### **Inoculación e incubación**

Las semillas esterilizadas se inocularon colocando dos pedazos de agar con micelio, de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, en cada una de las bolsas, procurando que el área del agar con micelio quedara en contacto directo con el sorgo. Las bolsas fueron cerradas y selladas, y finalmente se incubaron a 24°C.

## **J. CRIOCONSERVACIÓN**

A temperaturas muy bajas, cualquier actividad química o enzimática que pueda dañar un organismo puede ser detenida de manera efectiva. El objetivo de la crioconservación es preservar material biológico a bajas temperaturas, por periodos de tiempo prolongados, sin causar al organismo un daño adicional, además del ocasionado por la formación de hielo durante la congelación, por lo que comúnmente se usan soluciones crioprotectoras. Esta técnica es la utilizada en el cepario del Laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles, del Instituto de Ecología (INECOL), para preservar especies de interés, a partir de su inóculo en semilla de sorgo.

Con fines para su conservación, se evaluó la viabilidad de las cepas obtenidas en el presente trabajo, después de haber sido sometidas a dos diferentes temperaturas:  $-80^{\circ}\text{C}$  (ultracongelador) y  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido), durante un periodo de tiempo de un mes. El inóculo utilizado fue preparado dos semanas previas a la criogenización.

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles, del Instituto de Ecología (INECOL).

### **Preparación de solución crioprotectora**

Se preparó una solución de glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_5[\text{OH}]_3$ ) al 10% (v/v), y posteriormente se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### **Criogenización**

El material utilizado: viales de policarbonato y cajas especiales para su almacenaje, fue esterilizado previo a la criogenización.

Se depositaron 25 semillas en cada uno de los viales, debidamente marcados. Posteriormente, utilizando una jeringa estéril, se colocó la solución de

glicerol hasta que ésta cubrió todas las semillas (aproximadamente 1.5 ml). Las semillas se dejaron en contacto con la solución crioprotectora durante una hora; transcurrido este tiempo, los viales fueron colocados en las cajas, y éstas fueron introducidas en el ultracongelador y en el contenedor de nitrógeno líquido, según correspondiera. Se hicieron duplicados por cada especie, para cada una de las temperaturas de criogenización (2 réplicas x 2 temperaturas).

### **Descongelación**

Un mes después, a partir de la criogenización, las cajas que contenían los viales fueron retiradas, tanto del nitrógeno líquido, como del ultracongelador. Tan pronto se sacaron las cajas, éstas fueron puestas en baño maría (30°C) durante 10 minutos, con la finalidad de descongelar las semillas y evitar dañar el micelio.

Posteriormente, el contenido de los viales se vació en cajas Petri estériles, las cuales estaban en una posición inclinada, para permitir que el exceso de glicerol se escurriera de las semillas. Las 50 semillas, pertenecientes a cada especie, fueron distribuidas en grupos de 10, en cajas Petri con medio PDA. Finalmente, éstas fueron incubadas a 24°C, en completa oscuridad.

### **Evaluación de viabilidad**

Un día después de haber descongelado las muestras, utilizando un microscopio estereoscópico, se contaron y marcaron las semillas que presentaron crecimiento micelial. Este procedimiento se repitió al día siguiente, revisando aquellas semillas que no habían sido marcadas la primera vez.

Con base en estos datos se obtuvo el porcentaje de viabilidad de cada especie, para cada una de las temperaturas. El resultado se expresó como *porcentaje de recuperación*.

*(% de recuperación)*

## Tasa de crecimiento

Las semillas recuperadas se mantuvieron en incubación (24 °C), y una vez que hubo suficiente micelio, se hicieron resiembras en cajas Petri con medio PDA; esto para atemperar el hongo, después de haber sido sometido a tan bajas temperaturas. Después de algunos días, cuando el micelio había invadido la superficie del medio, se resembraron discos de agar con micelio (5 mm de diámetro). Esto se hizo con las muestras de ambas temperaturas de criogenización y, además, con muestras de micelio que no habían sido congeladas; éstas últimas a manera de control. En total se inocularon nueve cajas por especie (3 temperaturas x 3 réplicas).

La tasa de crecimiento se determinó del mismo modo en el que se hizo la caracterización de las cepas: 1) se trazaron los ejes cartesianos en cada caja; 2) cada día se tomaron fotografías (durante siete a 10 días, dependiendo de la especie); 3) los diámetros del crecimiento micelial se midieron con el software ImageJ; 4) los datos se registraron en una matriz; y 5) se obtuvo la tasa de crecimiento por día, por medio de la diferencia entre los valores de los diámetros.

Se obtuvo un promedio general por cepa, con desviación estándar, y los resultados se expresaron en *milímetros / día*.

$$(mm / d) \text{ o } (mm * d^{-1})$$

El análisis estadístico se hizo con el programa Design-Expert versión 9. Los datos se sometieron a un ANOVA unifactorial, considerando la temperatura como factor, y la velocidad de crecimiento como variable de respuesta.

## **K. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO**

En este trabajo se evaluó la producción de micelio en un medio líquido de sacarosa, como fuente de carbono, y extracto de levadura, como proveedor de nutrientes.

La producción de biomasa de cada especie se evaluó después de dos semanas, y después de un mes, a partir de la inoculación del medio. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles, del INECOL.

### **Preparación de medio líquido**

Se disolvieron 5 g de sacarosa, más 5 g de extracto de levadura, por cada litro de agua destilada. Se vertieron 100 ml de este medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y finalmente éstos fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

Se prepararon duplicados por especie, y por tiempo de evaluación (dos semanas, y un mes).

### **Inoculación e incubación**

La inoculación del medio líquido se hizo depositando en cada matraz dos pedazos de agar con micelio, de aproximadamente 5 mm de diámetro. Posteriormente, los matraces fueron tapados con papel aluminio y se colocaron en un agitador orbital, a velocidad constante, dentro de un cuarto de incubación a una temperatura de 24 °C. Estas condiciones se mantuvieron hasta el momento en el que se retiraron los matraces para determinar la cantidad de micelio producido.

### **Evaluación de producción de biomasa**

Transcurrido el tiempo determinado, el micelio contenido en los matraces se separó del medio líquido utilizando papel filtro Whatman grado 1; este papel fue

previamente llevado a peso constante, colocándolo un día anterior en un horno a 50°C.

Una vez filtrado el medio, el papel, que ahora contenía el micelio, nuevamente fue llevado a peso constante, permaneciendo en el horno al menos 24 horas, antes de ser pesado. Finalmente se pesó la muestra, y la cantidad de biomasa producida se determinó por medio de la diferencia de peso del papel filtro, antes y después de contener el micelio.

A = peso del papel filtro (peso constante)

B = peso del papel filtro + micelio (peso constante)

(B – A) = biomasa producida

Se obtuvo un promedio, con desviación estándar, para cada una de las especies. Los resultados se expresaron en *mg de micelio producido / ml de medio líquido*.

(*mg / ml*)

## **L. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA O “POTENCIAL BIOLÓGICO” EN SUSTRATO MEDIANTE LA HIDRÓLISIS DEL DIACETATO DE FLUORESCEÍNA (FDA)**

El método utilizado fue el descrito por Swisher y Carrol (1980), modificado por Inbar *et al.* (1991), el cual consistió en hacer ensayos, semanalmente, utilizando muestras homogéneas de sustrato invadido por el micelio. El ensayo se llevó a cabo en dos partes: 1) determinación del peso seco de las muestras, y 2) determinación de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) mediante el uso de reactivos. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles, del INECOL.



### **Preparación de muestras**

Se produjo inóculo en frascos pequeños de vidrio, con aproximadamente 40 g de semilla de sorgo, colocando tres discos de agar con micelio (5 mm de diámetro) en cada frasco. Posteriormente, los frascos se taparon con papel aluminio y se incubaron a 24°C, en completa oscuridad. Se prepararon dos frascos por especie, por cada semana en la que se realizó el ensayo (2 réplicas x 5 semanas).

### **Peso seco**

Se colocó 0.5 g de muestra en un analizador de humedad halógeno modelo MB35-2A0, en el cuál la muestra fue sometida a 150°C, durante un tiempo indeterminado, hasta que el equipo terminó de analizar el porcentaje de humedad contenido en las semillas con micelio. Se hicieron cinco repeticiones para cada una de las cuatro especies.

### **Preparación de reactivos**

Se preparó solución madre, tampón fosfato de potasio, reactivo FDA y reactivo "A" (Anexo 3).

### **Gamma (curva de calibración)**

Se hizo la gamma una sola vez a partir del reactivo "A", la cual se usó como referencia en todos los ensayos. Se utilizaron siete diferentes diluciones, que correspondieron a la concentración de  $\mu\text{g}$  de FDA hidrolizados. La densidad óptica (DO) se leyó a 490 nm, con un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 200 serie UV-Visible, utilizando el software INSIGHT 2.

| No. de muestra | Reactivo "A" | H <sub>2</sub> O destilada | Acetona | Concentración µg de FDA hidrolizados |
|----------------|--------------|----------------------------|---------|--------------------------------------|
| 1              | 3.0 ml       | 7.0 ml                     | 10 ml   | 180 µg                               |
| 2              | 2.5 ml       | 7.5 ml                     | 10 ml   | 150 µg                               |
| 3              | 2.0 ml       | 8.0 ml                     | 10 ml   | 120 µg                               |
| 4              | 1.5 ml       | 8.5 ml                     | 10 ml   | 90 µg                                |
| 5              | 1.0 ml       | 9.0 ml                     | 10 ml   | 60 µg                                |
| 6              | 0.5 ml       | 9.5 ml                     | 10 ml   | 30 µg                                |
| 7              | 0 ml         | 10 ml                      | 10 ml   | 0 µg                                 |

Esta gamma se vuelve a hacer sólo si se cambia de solución madre para preparar el reactivo "A".

### Ensayo

Se tomaron dos frascos por especie, y las semillas contenidas se mezclaron para obtener una muestra homogénea. Estas muestras fueron *destructivas*, es decir, una vez utilizadas se descartaron, utilizando frascos nuevos cada semana.

Antes de iniciar el ensayo, todos los tubos y el papel filtro utilizados fueron esterilizados durante una hora a 121°C.

Para determinar la concentración de µg de FDA hidrolizados, se colocó 0.7 g de muestra homogeneizada en cada uno de los tubos previamente marcados (E1, E2, E3, T, TF). Se agregó 2.5 ml de reactivo FDA, más 7.5 ml de tampón fosfato en los tubos de *ensayo* (E1, E2, E3); 2.5 ml de tampón fosfato de potasio, más 7.5 ml de agua destilada en el tubo *testigo* (T); y 0.5 ml de reactivo "A", más 9.5 ml de tampón fosfato en el tubo del *testigo fluorescente* (TF).

Adicionalmente se marcaron dos tubos extras; el *súper testigo* (ST), al que se le añadió 2 ml de reactivo "A", más 8 ml de tampón fosfato; y el *blanco* (B), al que se le agregó 5 ml de reactivo FDA, más 5 ml de acetona. A ninguno de estos dos

tubos se les colocó muestra, por lo que no fue necesario hacer repetición por especie.

Es importante mencionar que las cantidades de los reactivos que se colocaron en cada uno de los tubos, fue del 25% respecto al método descrito por Inbar *et al.* (1991) (excepto para el súper testigo y el blanco), debido a que siguiendo el método original, los valores de las concentraciones de FDA sobrepasaban los establecidos en la gamma.

Después de haber agregado los reactivos a cada uno de los tubos, éstos fueron incubados en baño maría durante 30 minutos, a una temperatura de 30°C. Posteriormente, se les adicionó 10 ml de acetona, con la finalidad de detener la reacción; los tubos se agitaron manualmente y las soluciones fueron filtradas en tubos limpios y debidamente marcados (E1, E2, E3, T, TF).

Finalmente se leyó la DO de cada muestra en el espectrofotómetro a 490 nm, tomando como referencia la gamma previamente hecha.

### **Cálculo de resultados**

El cálculo de los resultados se hizo inicialmente para cada una de las muestras, para después hacer un cálculo final por cepa. Para que los resultados pudieran ser expresados en  $\mu\text{g}$  de FDA hidrolizados por gramo de sustrato seco, se realizaron los siguientes cálculos.

#### Cálculos por muestra

- Se determinó para cada una de las muestras:

A = cantidad de sustrato fresco

B = cantidad de sustrato seco

C = cantidad exacta de sustrato por tubo

- Se calcularon los promedios de las cinco muestras para A y B; con estos promedios se pudo saber a cuántos gramos de sustrato seco equivale 1 g de sustrato fresco (por cepa).
- Este resultado se utilizó para conocer el peso exacto del sustrato seco contenido en cada tubo.
- Los resultados obtenidos de las lecturas en el espectrofotómetro, fueron los correspondientes a una cantidad determinada de  $\mu\text{g}$  de FDA hidrolizados por una cierta cantidad de sustrato seco. Esta cantidad se ajustó a 1 g de peso, por medio de una regla de tres (por tubo).
- Debido a que el método se ajustó al 25%, para cada uno de los valores anteriores, así como para el testigo y el súper testigo de cada especie, se realizó una regla de tres, para así tener resultados en una concentración del 100%.

Cálculos finales por cepa

- A los valores de los ensayos (E1, E2, E3) se les restó el valor de su respectivo testigo
- El porcentaje de recuperación de la fluorescencia (R) para cada muestra, se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$R = (\text{DO testigo fluorescente}) - (\text{DO testigo}) / \text{DO súper testigo}$$

$$E1 / E2 / E3 = (\text{DO ensayo}) - (\text{DO respectivo testigo}) / R$$

Por último se obtuvo un promedio, con desviación estándar, de E1, E2 y E3. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de FDA hidrolizados / g de sustrato seco.

$$(\mu\text{g} / \text{gr}) \text{ o } (\mu\text{g} * \text{gr}^{-1})$$

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. COLECTA DE EJEMPLARES

Se colectaron esporomas de 10 especies de macromicetos: *Auricularia nigricans*, *Cookeina sulcipes*, *Cookeina tricholoma*, *Daldinia* sp., *Laetiporus sulphureus*, *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Polyporus* sp., *Pycnoporus sanguineus* y *Volvariella bombycina* (Anexo 4).

### B. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Trichoderma atroviridae*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, por el efecto de los extractos metanólicos de 10 especies de macromicetos, se muestran en la Tabla 1.

Los valores negativos indican que al contacto con algunos de los extractos, los micromicetos tuvieron una mejor tasa de crecimiento respecto a su testigo; efecto contrario al que se esperaba obtener. En cuanto a los valores positivos, que indican inhibición del crecimiento, éstos no fueron significativos, comparados con el efecto de un fungicida comercial (Antrak) (Figura 1).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con aquellos reportados por Jiménez-Zárate (2017), para siete especies de HSC encontrados en la misma región (Tabla 1), cuyos extractos metanólicos tampoco presentaron un efecto antifúngico importante contra estas mismas cuatro especies de micromicetos, y que, por el contrario, en algunos casos también promovieron un mejor crecimiento de éstos.

Tabla 1. Actividad antifúngica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.

| Especie                    | % de inhibición de micromicetos |                     |                     |                       |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
|                            | <i>C. gloeosporioides</i>       | <i>F. oxysporum</i> | <i>R. solani</i>    | <i>T. atroviridae</i> |
| Testigo                    | 0.00 ± 1.89                     | 0.00 ± 0.78         | 0.00 ± 0.50         | 0.00 ± 2.16           |
| <i>A. nigricans</i>        | -                               | 10.62 ± 0.74        | -                   | -11.24 ± 1.44         |
| <i>C. sulcipes</i>         | <b>-12.53 ± 2.89</b>            | 1.45 ± 1.36         | 25.77 ± 0.97        | 4.80 ± 1.92           |
| <i>C. tricholoma</i>       | 2.22 ± 1.31                     | <b>0.70 ± 1.28</b>  | -1.20 ± 2.66        | -7.82 ± 2.37          |
| <i>Daldinia</i> sp.        | 2.97 ± 1.77                     | 3.11 ± 0.26         | 28.98 ± 2.39        | -5.06 ± 1.18          |
| <i>L. sulphureus</i>       | -8.78 ± 0.77                    | 4.42 ± 0.44         | <b>30.82 ± 2.91</b> | -0.70 ± 1.81          |
| <i>L. crinitus</i>         | -1.77 ± 0.14                    | 4.55 ± 1.32         | 10.02 ± 1.98        | <b>5.75 ± 0.46</b>    |
| <i>P. lecomtei</i>         | -10.63 ± 0.72                   | 4.55 ± 0.67         | 4.53 ± 1.18         | -26.93 ± 1.41         |
| <i>Polyporus</i> sp.       | 7.42 ± 2.19                     | 5.02 ± 0.91         | 9.95 ± 2.20         | <b>-31.93 ± 4.97</b>  |
| <i>P. sanguineus</i>       | 2.87 ± 0.49                     | <b>14.83 ± 1.05</b> | <b>-5.43 ± 1.05</b> | -3.59 ± 1.88          |
| <i>V. bombycina</i>        | <b>19.37 ± 3.47</b>             | 5.04 ± 1.79         | 3.61 ± 1.68         | -7.03 ± 4.28          |
| Antrak                     | 98.45 ± 2.68                    | 86.25 ± 2.27        | 59.89 ± 1.81        | 100.00 ± 0.00         |
| Otros hongos               |                                 |                     |                     |                       |
| Testigo *                  | 0.00 ± 3.59                     | 0.00 ± 1.53         | 0.00 ± 0.45         | 0.00 ± 1.30           |
| <i>A. delicata</i> *       | -1.12 ± 1.37                    | 20.88 ± 4.47        | 2.09 ± 2.36         | 3.42 ± 4.50           |
| <i>A. fuscossuccinea</i> * | 3.82 ± 2.94                     | 17.83 ± 8.24        | 2.60 ± 1.50         | -5.82 ± 1.57          |
| <i>C. lateritius</i> *     | 13.44 ± 2.18                    | 10.31 ± 0.98        | 7.85 ± 1.28         | 9.13 ± 0.32           |
| <i>F. brasiliensis</i> *   | 8.61 ± 3.24                     | 3.08 ± 0.62         | 4.02 ± 2.53         | -3.97 ± 1.26          |
| <i>P. domingensis</i> *    | -                               | 27.20 ± 1.62        | 17.26 ± 0.94        | 16.01 ± 2.90          |
| <i>P. djamor</i> *         | -1.37 ± 0.85                    | 29.33 ± 2.34        | -3.44 ± 1.85        | -4.96 ± 1.20          |
| <i>S. commune</i> *        | -4.38 ± 3.46                    | 28.94 ± 4.16        | -4.07 ± 0.50        | -5.27 ± 0.63          |
| Antrak *                   | 100 ± 0.00                      | 100 ± 0.00          | 83.55 ± 0.84        | 100 ± 0.00            |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo para ambos métodos. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

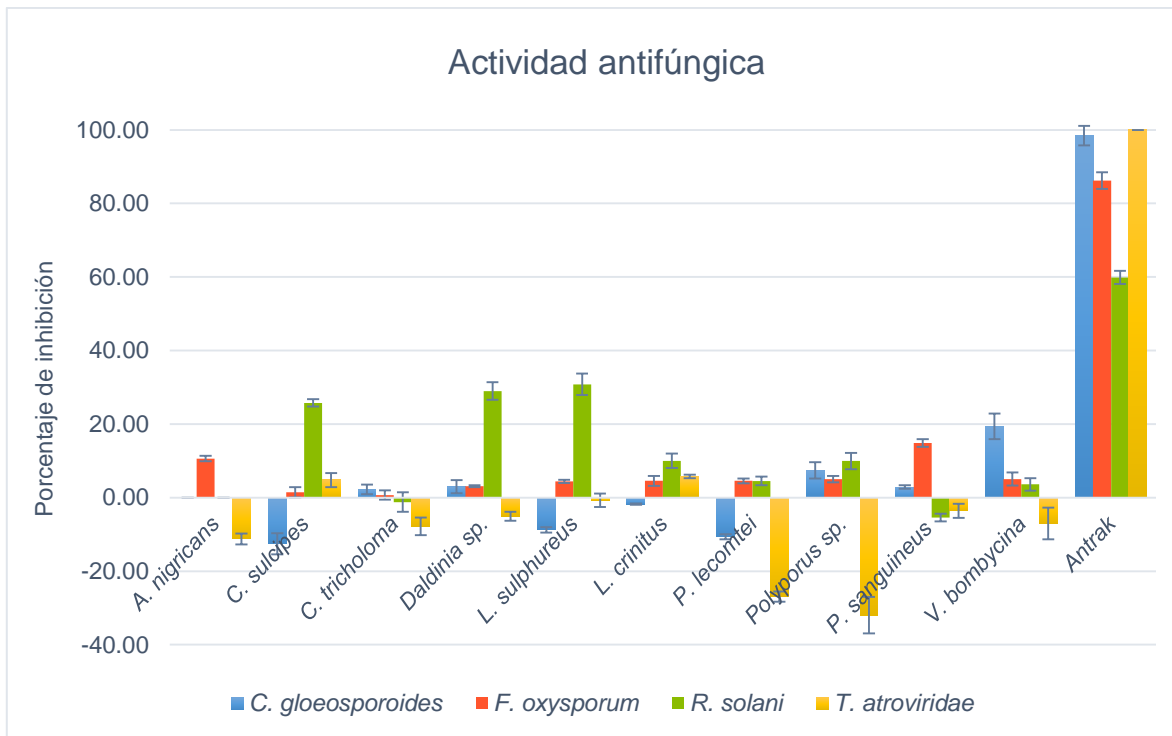


Figura 1. Actividad antifúngica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.

En su ambiente natural, todos los hongos contienen sustancias activas que les confieren ventajas sobre sus potenciales competidores. Los hongos fitopatógenos, por ejemplo, producen enzimas hidrolíticas extracelulares que les permiten penetrar e infectar el tejido de sus hospederos, contribuyendo así a la patogénesis; su grado de virulencia puede surgir de diferencias en la producción de enzimas extracelulares (Kikot *et al.*, 2008). Demain y Fang (2000) mencionan que los metabolitos secundarios son más comunes en los hongos ascomicetos y mitospóricos, incluyendo especies del género *Fusarium* y *Trichoderma*, lo que influye en la supervivencia del organismo, aumentando su fuerza competitiva. Los basidiomicetos también producen este tipo de metabolitos, aunque en menor proporción.

Por otro lado, los basidiomicetos son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias y otros hongos que se encuentran en su microhábitat, lo que indica que las sustancias antimicrobianas que producen tienen una implicación ecológica

importante (Sidorova & Velikanov, 2000); de hecho, a partir de algunas especies, se han logrado aislar varios compuestos que inhiben el crecimiento de hongos saprófitos y fitopatógenos (Anke, 1997), como en el caso de *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes* y *Auricularia polytricha*, cuyos extractos a base de metanol y acetato de etilo, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos patógenos foliares (*Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*) (Radhajejalakshmi *et al.*, 2012), o como las especies del género *Phellinus*, que producen citotoxinas capaces de inhibir el crecimiento de hongos como *Colletotrichum lagenarium*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes* (Hwang *et al.*, 2000). Considerando estos ejemplos, los resultados de este trabajo no deben ser interpretados como que los macromicetos (ascomicetos o basidiomicetos) tienen una muy baja, o nula, capacidad antifúngica, sino que la metodología aquí seguida no funcionó para obtener compuestos que sean capaces de inhibir el crecimiento de otros hongos de importancia económica, sin embargo, no sabemos si bajo otra técnica sí pudiera encontrarse el efecto esperado.

### C. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

A las 36 horas, a partir de que inició el ensayo, se observaron nematodos inmóviles en el medio M9, por lo que se consideró que aquellos extractos que produjeron parálisis en los nematodos antes, o a partir de las 24 horas, a más del 50% de los individuos, tuvieron una actividad antihelmíntica importante; estas especies fueron *Daldinia* sp., *L. sulphureus*, *P. lecomtei*, *Polyporus* sp. y *V. bombycina*. A las 36 horas se observó este efecto en los extractos de *A. nigricans*, *L. crinitus* y *P. sanguineus*, el cual fue del 93.33, 100 y 56.67% de los nematodos, respectivamente. *C. sulcipes* y *C. tricholoma* no tuvieron un efecto significativo, sino hasta las 48 horas (Figura 2).

Jiménez-Zárate (2017) reportó tres especies de macromicetos, que se encuentran en la misma zona de estudio, cuyos extractos metanólicos también



tuvieron un efecto antihelmíntico a partir de las 24 horas (*P. djamor*, *P. domingensis* y *S. commune*), y una más que tuvo este efecto a las 36 horas (*A. fuscusuccinea*) (Tabla 2).

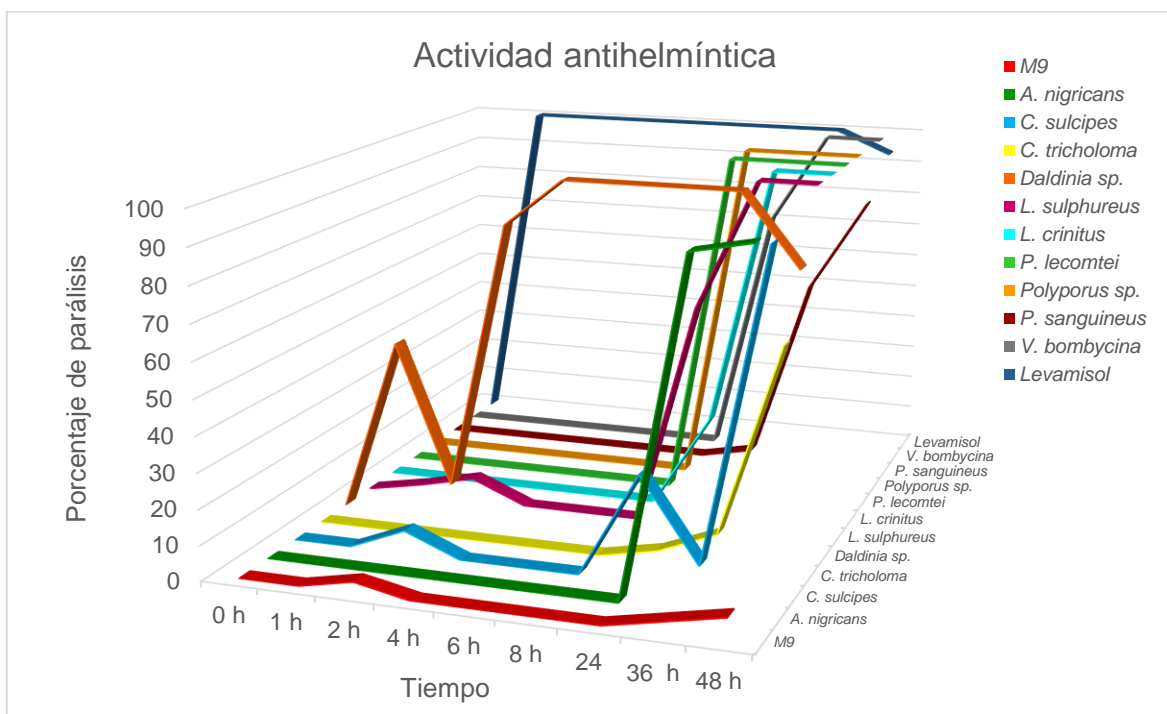


Figura 2. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos.

El efecto nematocida de algunas especies del género *Daldinia* ya ha sido reportado anteriormente; asimismo, se conocen algunos de los metabolitos involucrados (p. ej. benzofenonas, policétidos, citocalasinas y triterpenos) (Yumaya *et al.*, 2013; Anke, 1995). El extracto metanólico de *Daldinia* sp. obtenido en este trabajo, tuvo una notable actividad antihelmíntica a partir de la primera hora, tiempo en el que se observó que el 50% de los nematodos estaban paralizados, siendo así la especie más efectiva. Por este motivo se realizó un ensayo para determinar la capacidad antihelmíntica de este extracto bajo diferentes concentraciones (Figura 3). En éste, las diluciones al 75 y 50%, fueron aquellas que tuvieron un efecto significativo (Tabla 3); en el caso de la solución al 75%, los resultados fueron semejantes a aquellos observados durante el primer ensayo.

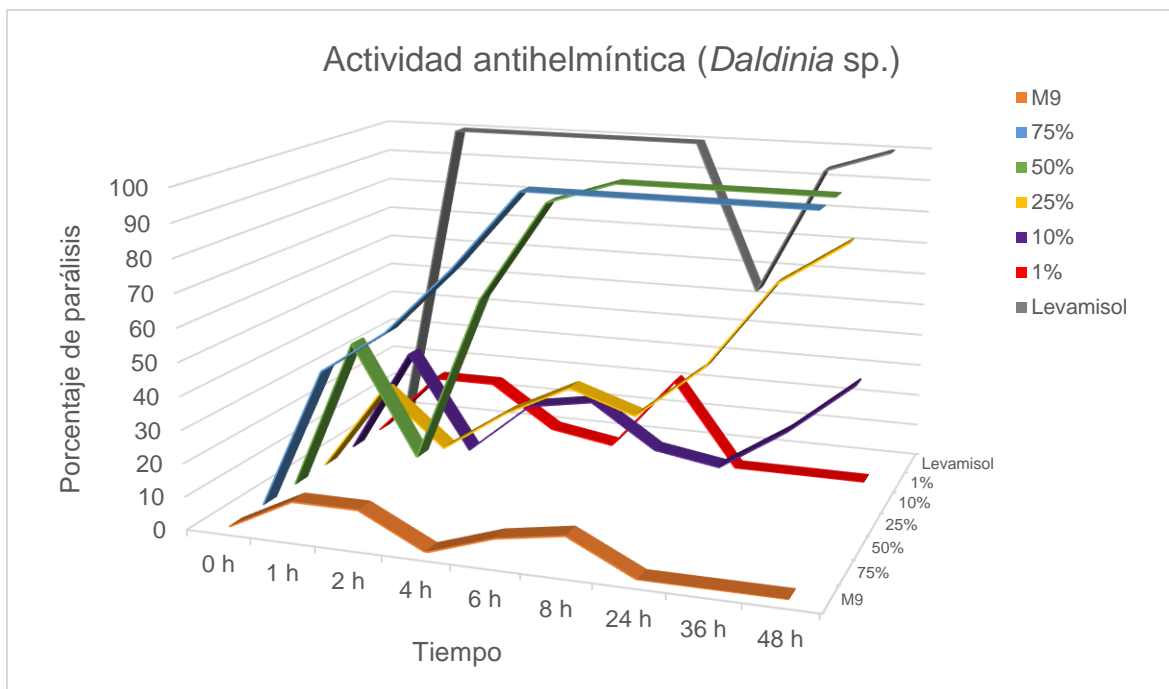


Figura 3. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de *Daldinia* sp., en cinco diferentes concentraciones.

En 2014, Li & Zhang mencionaron el reporte de cerca de 280 especies, pertenecientes a 150 géneros, tanto de ascomicetos como basidiomicetos, que producen compuestos tóxicos que son activos contra nematodos; entre las especies que mencionan se encuentra *P. sanguineus* y *Daldinia concentrica*. Por otro lado, existen pesticidas biodegradables que tienen una actividad similar a aquella de los nematocidas comerciales, y que están compuestos por uno o varios metabolitos extraídos de hongos de géneros como *Laetiporus* y *Lentinus* (Hiromoto, 2000), lo que tiene correspondencia con los resultados aquí obtenidos. Para *A. nigricans*, *P. lecomtei* y *V. bombycina* no se encontraron registros de actividad antihelmíntica.

En ambas gráficas (Figura 2 y 3) se puede observar que, aun cuando en un determinado tiempo hubo parálisis de nematodos, esto no fue constante en las siguientes observaciones, pues algunos individuos paralizados eventualmente recuperaron su movilidad. Esto podría deberse a que algunos compuestos contenidos en los extractos, ingresaron en el organismo del nematodo teniendo este

efecto; sin embargo, después de un tiempo, el organismo pudo asimilar o desechar estos compuestos, regresando a su estado normal (com. per. Mayoral-Peña, 2017). Se ha visto que este efecto nematistático puede suprimir el desarrollo de los individuos en las plantas, disminuyendo el número de hembra, así como la producción de huevos (Decker, 1989).

En general, los nematodos son resistentes a muchos químicos, pues su cutícula y la de la membrana de sus huevos, les proporciona una cobertura de protección. En las larvas, esta cutícula no es completa, lo que permite que el veneno entre a través de la abertura oral; en cambio, los huevos sí tienen una cobertura completa, la cual es extremadamente difícil de penetrar (Decker, 1989). Sin embargo, debido a sus diferentes mecanismos de defensa, entre los que se encuentra la producción de toxinas nematocidas o nematistáticas, los hongos son una excelente alternativa como estrategia para el control de poblaciones de nematodos parásitos de plantas, y disminuir el uso de productos químicos y sus potenciales efectos negativos; así como tratamiento o preventivo contra infecciones del aparato digestivo ocasionadas por helmintos.

Tabla 2. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de 10 especies de macromicetos. En rojo: especie con la mayor actividad antihelmíntica.

| Especie                   | Horas          |                |                     |                |                |                |               |               |
|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
|                           | 1              | 2              | 4                   | 6              | 8              | 24             | 36            | 48            |
| M9                        | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77    | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77   | 6.67 ± 5.77   |
| <i>A. nigricans</i>       | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 93.33 ± 11.55 | 96.67 ± 5.77  |
| <i>C. sulcipes</i>        | 0 ± 0          | 6.67 ± 11.55   | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 30 ± 20        | 6.67 ± 11.55  | 93.34 ± 5.77  |
| <i>C. tricholoma</i>      | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77    | 10 ± 10       | 63.33 ± 55.08 |
| <i>Daldinia</i> sp.       | <b>50 ± 10</b> | <b>10 ± 10</b> | <b>86.67 ± 5.77</b> | <b>100 ± 0</b> | <b>100 ± 0</b> | <b>100 ± 0</b> | 100 ± 0       | 80 ± 10       |
| <i>L. sulphureus</i>      | 3.00 ± 5.77    | 6.67 ± 11.55   | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 63.33 ± 55.08  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>L. crinitus</i>        | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 26.67 ± 28.87  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>P. lecomtei</i>        | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 100 ± 0        | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>Polyporus</i> sp.      | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 100 ± 0        | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>P. sanguineus</i>      | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77    | 56.67 ± 15.28 | 83.33 ± 15.28 |
| <i>V. bombycina</i>       | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 73.33 ± 25.17  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| Levamisol                 | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0             | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0       | 93.33 ± 11.55 |
| Otros hongos              |                |                |                     |                |                |                |               |               |
| M9 *                      | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0         | 3.33 ± 5.77   |
| <i>A. delicata</i> *      | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 6.67 ± 11.55   | 0 ± 0         | 16.67 ± 15.28 |
| <i>A. fuscusuccinea</i> * | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 33.33 ± 41.63  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>C. lateritius</i> *    | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0         | 3.33 ± 5.77   |
| <i>F. brasiliensis</i> *  | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77         | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 3.33 ± 5.77    | 6.67 ± 5.77   | 16.67 ± 5.77  |
| <i>P. domingensis</i> *   | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 63.33 ± 11.55  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| <i>P. djamor</i> *        | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 66.67 ± 15.28  | 93.33 ± 5.77  | 96.67 ± 5.77  |
| <i>S. commune</i> *       | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 0 ± 0               | 0 ± 0          | 0 ± 0          | 63.33 ± 40.41  | 100 ± 0       | 100 ± 0       |
| Levamisol *               | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0             | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0        | 100 ± 0       | 86.67 ± 15.28 |

Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

Tabla 3. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico de *Daldinia* sp. en cinco diferentes concentraciones.

| Concentración | Horas        |              |              |              |              |              |              |              |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               | 1            | 2            | 4            | 6            | 8            | 24           | 36           | 48           |
| M9            | 10 ± 1       | 10 ± 1       | 0 ± 0        | 6.67 ± 1.15  | 10 ± 1.73    | 0 ± 0        | 0 ± 0        | 0 ± 0        |
| 75 %          | 43.33 ± 3.21 | 56.67 ± 2.31 | 76.67 ± 2.08 | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      |
| 50 %          | 46.67 ± 2.08 | 13.33 ± 1.53 | 63.33 ± 3.06 | 93.33 ± 1.15 | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      |
| 25 %          | 26.67 ± 4.62 | 10 ± 1.73    | 23.33 ± 1.53 | 33.33 ± 4.04 | 26.67 ± 3.79 | 43.33 ± 3.79 | 70 ± 3       | 83.33 ± 2.89 |
| 10 %          | 33.33 ± 2.89 | 3.33 ± 0.58  | 20 ± 1.73    | 23.33 ± 3.21 | 10 ± 1.73    | 6.67 ± 1.15  | 20 ± 2.46    | 36.67 ± 5.51 |
| 1 %           | 20 ± 1       | 20 ± 1       | 6.67 ± 0.58  | 3.33 ± 0.58  | 26.67 ± 2.08 | 0 ± 0        | 0 ± 0        | 0 ± 0        |
| Levamisol     | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 100 ± 0      | 53.33 ± 1.15 | 93.33 ± 1.15 | 100 ± 0      |

## D. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

### DPPH

El método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se basa en la habilidad de un potencial antioxidante para eliminar los radicales libres por medio de la transferencia de un átomo de hidrógeno; asimismo, detecta la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón, y así reducir cualquier compuesto, incluyendo metales y radicales libres (Prior *et al.*, 2005).

Para la curva de calibración, se tomaron como referencia ocho concentraciones de Trolox, cuyo valor de coeficiente de relación ( $R^2$ ) fue de 0.9978 (Figura 4).

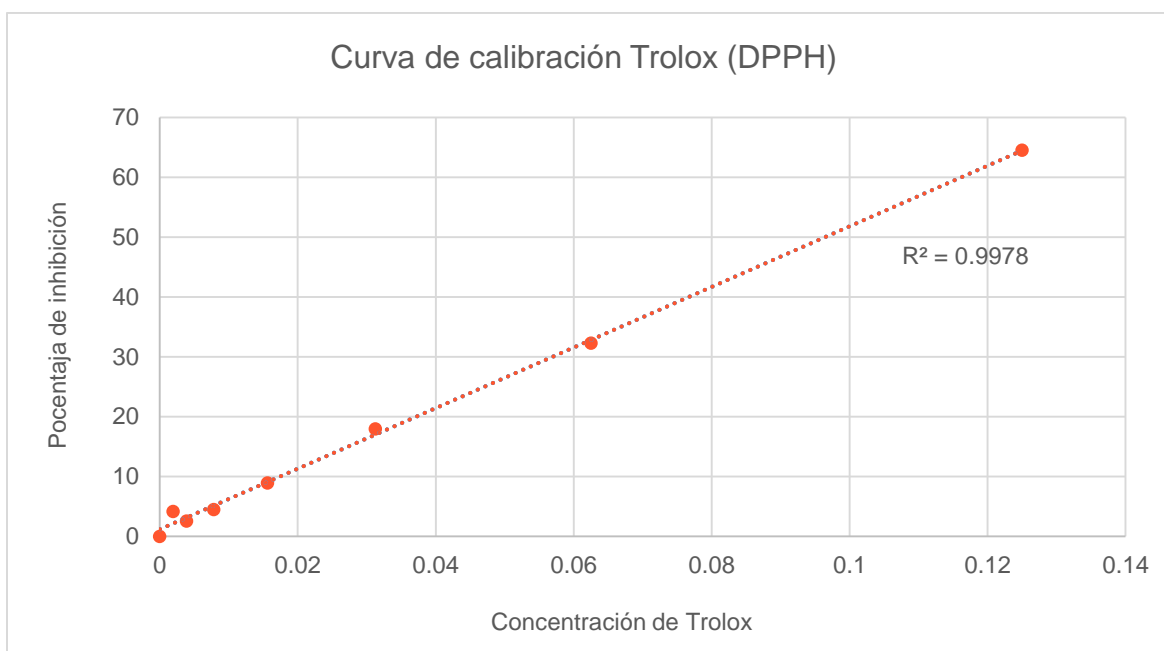


Figura 4. Curva de calibración Trolox utilizada como referencia para el ensayo con DPPH.

### Base seca

Los valores de la capacidad antioxidante (CAO) de los extractos lipofílico e hidrofílico, en base seca, de cada una de las 10 especies evaluadas se muestran

en la Tabla 4; donde, además, estos valores están dados en micromoles equivalentes de Trolox/100 g de muestra, y miligramos equivalentes de Trolox/100 g de muestra. De acuerdo al método DPPH, *Daldinia* sp. fue la especie en cuyo extracto lipofílico hay mayor actividad antioxidante (AAO), lo que podría atribuirse a su alto contenido de extracto etéreo (5.61%) (Tabla 13).

De las especies comestibles, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus* sp. y *V. bombycina*, presentaron los valores más altos, y del mismo modo que *Daldinia* sp., hubo una relación con su porcentaje de extracto etéreo en base seca. *Panus lecomtei*, a pesar de tener un bajo porcentaje de lípidos (0.56%), presentó una AAO comparable al de *Polyporus* sp. y *V. bombycina* (Tabla 4), lo que indica que en este extracto, esta especie podría contener compuestos antioxidantes de buena calidad. El resto de las especies, en promedio, presentaron valores similares a los de algunas especies de HSC reportadas por Jiménez-Zárate (2017).

Tabla 4. Capacidad antioxidante en base seca con el método DPPH.

| Especie                    | Actividad antioxidante con DPPH en base seca |                        |                           |                           |
|----------------------------|--|------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                            | Extracto lipofílico                          |                        | Extracto hidrofílico      |                           |
|                            | µmol/100g                                    | mg/100g                | µmol/100g                 | mg/100g                   |
| <i>A. nigricans</i>        | 714.04 ± 505.73                              | 178.71 ± 126.58        | 52659.61 ± 4386.87        | 13180.17 ± 1097.99        |
| <i>C. sulcipes</i>         | 832.11 ± 153.66                              | 208.26 ± 38.46         | <b>56152.02 ± 5475.51</b> | <b>14054.28 ± 1370.47</b> |
| <i>C. tricholoma</i>       | 683.40 ± 90.97                               | 171.04 ± 22.77         | 48350.25 ± 2003.27        | 12101.58 ± 501.40         |
| <i>Daldinia</i> sp.        | <b>4817.88 ± 293.12</b>                      | <b>1205.86 ± 73.36</b> | 52455.37 ± 8083.75        | 13129.05 ± 2023.28        |
| <i>L. sulphureus</i>       | 1856 ± 212.60                                | 464.65 ± 53.21         | <b>24413.93 ± 1452.94</b> | <b>6110.56 ± 363.66</b>   |
| <i>L. crinitus</i>         | 971.88 ± 98.70                               | 243.25 ± 24.70         | 35606.00 ± 4136.10        | 8911.82 ± 1035.22         |
| <i>P. lecomtei</i>         | 1344.61 ± 199.31                             | 336.54 ± 49.89         | 44326.82 ± 6411.58        | 11094.56 ± 1604.75        |
| <i>Polyporus</i> sp.       | 1437 ± 209.09                                | 359.86 ± 52.33         | 44388.09 ± 4811.32        | 11109.89 ± 1204.23        |
| <i>P. sanguineus</i>       | <b>408.96 ± 374.39</b>                       | <b>102.35 ± 93.71</b>  | 28723.28 ± 3034.18        | 7189.15 ± 759.42          |
| <i>V. bombycina</i>        | 1405 ± 226.03                                | 351.87 ± 56.57         | 33461.53 ± 2958.16        | 8375.08 ± 740.40          |
| Otros hongos               |  |                        |                           |                           |
| <i>A. delicata</i> *       | 135.73 ± 93.98                               | 33.97 ± 23.52          | 83130.09 ± 5160.53        | 20806.63 ± 1291.63        |
| <i>A. fuscossuccinea</i> * | 61.67 ± 17.22                                | 15.44 ± 4.31           | 66583.46 ± 2025.35        | 16665.18 ± 506.92         |
| <i>C. lateritius</i> *     | 2544.57 ± 189.03                             | 318.44 ± 47.31         | 64654.47 ± 2770.50        | 16182.37 ± 693.43         |
| <i>S. commune</i> *        | 1251.74 ± 210.18                             | 313.30 ± 52.61         | 81360.72 ± 8163.02        | 20363.77 ± 2043.12        |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

En el extracto hidrofílico hubo mucha mayor AAO, comparada con aquella del extracto lipofílico, lo que puede atribuirse a que, por el alto contenido de humedad de los hongos, la mayoría de sus compuestos se encuentran concentrados en el agua.

Las especies en cuyo extracto hidrofílico se detectó mayor CAO en base seca fueron *C. sulcipes*, *A. nigricans*, *Daldinia* sp. y *C. tricholoma*. En estos resultados no se vio una relación entre el contenido de humedad de cada especie, con su AOC; por lo que no se pudo determinar si ésta estuvo dada por la abundancia de compuestos antioxidantes, o por su calidad.

#### Base húmeda

Del mismo modo que en los análisis químicos proximales, la determinación de la capacidad antioxidante en base húmeda es importante, pues de esta manera se sabe cuál es su aporte al ser consumidas estas especies en estado fresco. Los valores de la CAO de los extractos lipofílico e hidrofílico, en base húmeda, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Capacidad antioxidante con DPPH en  $\mu\text{mol}$  y  $\text{mg}$  equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda.

| Especie              | Actividad antioxidante con DPPH en base húmeda |                                    |  |  |
|----------------------|--|------------------------------------|--|--|
|                      | Extracto lipofílico                            |                                    | Extracto hidrofílico                   |  |
|                      | $\mu\text{mol}/100\text{g}$                    | $\text{mg}/100\text{g}$            | $\mu\text{mol}/100\text{g}$            | $\text{mg}/100\text{g}$                |
| <i>A. nigricans</i>  | 14.07 $\pm$ 9.96                               | 3.52 $\pm$ 2.49                    | 1037.39 $\pm$ 86.42                    | 259.65 $\pm$ 21.63                     |
| <i>C. sulcipes</i>   | 128.98 $\pm$ 23.82                             | 32.28 $\pm$ 5.96                   | 8073.56 $\pm$ 848.70                   | 2178.41 $\pm$ 212.42                   |
| <i>C. tricholoma</i> | 140.30 $\pm$ 18.68                             | 35.12 $\pm$ 4.67                   | <b>9926.31 <math>\pm</math> 411.27</b> | <b>2484.46 <math>\pm</math> 102.94</b> |
| <i>Daldinia</i> sp.  | 140.68 $\pm$ 8.56                              | 35.21 $\pm$ 2.14                   | 1531.70 $\pm$ 236.05                   | 383.37 $\pm$ 59.08                     |
| <i>L. sulphureus</i> | 97.65 $\pm$ 11.18                              | 24.44 $\pm$ 2.80                   | 1284.17 $\pm$ 76.42                    | 321.42 $\pm$ 19.13                     |
| <i>L. crinitus</i>   | 15.36 $\pm$ 1.56                               | 3.84 $\pm$ 0.39                    | 562.57 $\pm$ 65.35                     | 140.81 $\pm$ 16.36                     |
| <i>P. lecomtei</i>   | <b>241.63 <math>\pm</math> 35.82</b>           | <b>60.48 <math>\pm</math> 8.96</b> | 7965.53 $\pm$ 1152.16                  | 1993.69 $\pm$ 288.37                   |
| <i>Polyporus</i> sp. | 48.31 $\pm$ 7.03                               | 12.09 $\pm$ 1.76                   | 1491.44 $\pm$ 161.66                   | 373.29 $\pm$ 40.46                     |
| <i>P. sanguineus</i> | <b>7.16 <math>\pm</math> 6.55</b>              | <b>1.79 <math>\pm</math> 1.64</b>  | <b>502.66 <math>\pm</math> 53.10</b>   | <b>125.81 <math>\pm</math> 13.29</b>   |
| <i>V. bombycina</i>  | 58.06 $\pm$ 9.34                               | 14.53 $\pm$ 2.34                   | 1381.96 $\pm$ 122.17                   | 345.89 $\pm$ 30.58                     |
| Otros hongos         |  |                                    |  |  |



|                          |                |               |                    |                  |
|--------------------------|----------------|---------------|--------------------|------------------|
| <i>A. delicata</i> *     | 18.64 ± 12.90  | 4.66 ± 3.23   | 11413.76 ± 708.54  | 2856.75 ± 177.34 |
| <i>A fuscosuccinea</i> * | 6.12 ± 1.71    | 1.53 ± 0.43   | 6605.08 ± 200.91   | 1653.19 ± 50.29  |
| <i>P. djamor</i> *       | 141.76 ± 80.28 | 35.48 ± 20.09 | 9183.06 ± 632.66   | 2298.43 ± 158.35 |
| <i>S. commune</i> *      | 237.66 ± 39.91 | 59.48 ± 9.99  | 15447.69 ± 1549.89 | 3866.40 ± 387.92 |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

Para el extracto lipofílico, las especies comestibles con la mayor AOC fueron *P. lecomtei*, *C. tricholoma*, y *C. sulcipes*, cuyos porcentajes de humedad fueron los más bajos (Tabla 13), por lo que sus compuestos antioxidantes se encuentran menos disueltos, y disponibles en mayores cantidades en los ejemplares frescos; en contraste con *L. sulphureus*, *Polyporus* sp. y *V. bombycina*, las tres especies con los valores más altos de CAO en base seca, y que presentaron porcentajes de humedad superiores al 95%.

En el caso de *C. tricholoma* y *C. sulcipes*, su contenido de extracto etéreo en base húmeda tiene relación con su AAO, pues estas especies fueron las de mayor porcentaje de lípidos disueltos; en este aspecto, es importante destacar que *P. lecomtei*, en base húmeda, fue la especie con la más alta CAO, siendo que su porcentaje de extracto etéreo fue de los más bajos (0.10%), lo que, al igual que en base seca, es un indicio de que los compuestos antioxidantes en su extracto lipofílico si bien no son abundantes, sí son muy eficientes para el control de radicales libres.

Para el extracto hidrofílico, al igual que en el lipofílico, *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* fueron las especies comestibles que presentaron mayor AAO (Figura 5). Como ya se ha mencionado, estos resultados aparentemente tienen una correspondencia con su bajo contenido de humedad, pero además, cabe destacar que estas tres especies tuvieron los mejores resultados en cuanto a aporte nutricional en base húmeda, lo que podría sugerir que es en alguna(s) de esas fracciones (cenizas, proteína cruda, fibra cruda y/o extracto libre de nitrógeno) es

donde se encuentran los agentes que les confieren esta propiedad como potenciales antioxidantes.

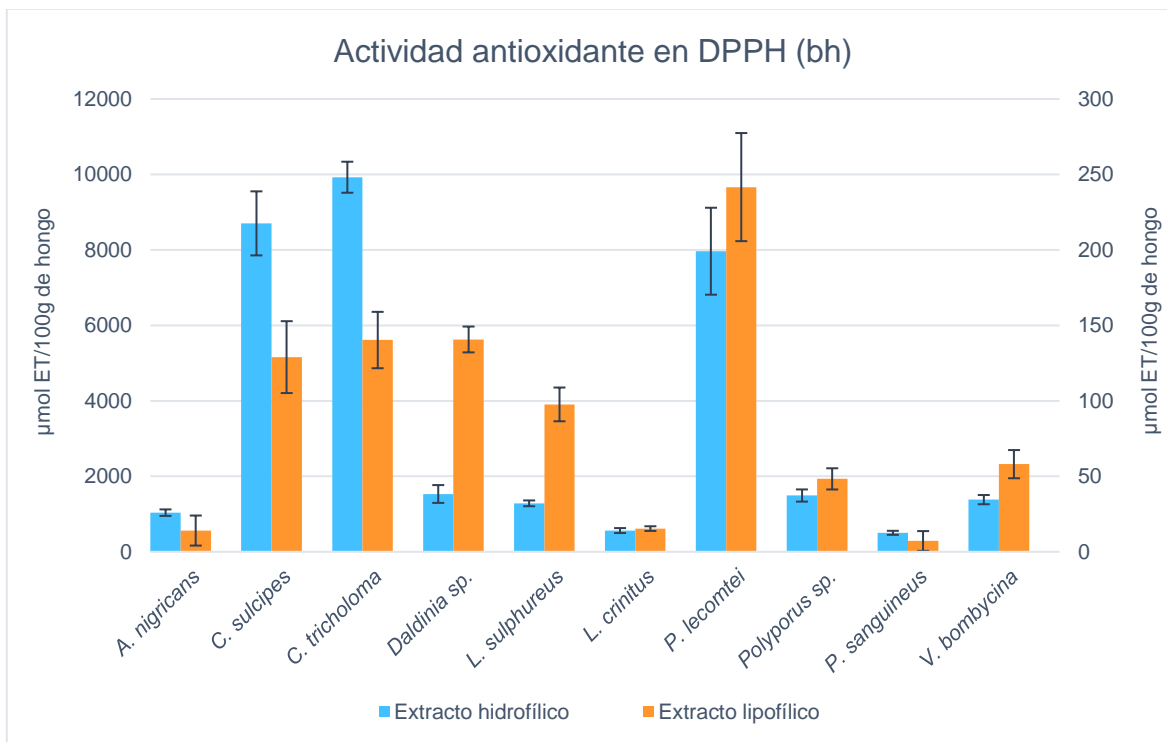


Figura 5. Actividad antioxidante de extractos hidrofílico y lipofílico en base húmeda, utilizando el método DPPH.

## FRAP

El método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) detecta aquellos antioxidantes que tienen la habilidad de eliminar los radicales libres mediante la transferencia de un electrón (Prior *et al.*, 2005). Para la curva de calibración, se tomaron como referencia cinco concentraciones de Trolox, cuyo coeficiente de relación ( $R^2$ ) fue de 0.9948 (Figura 6).

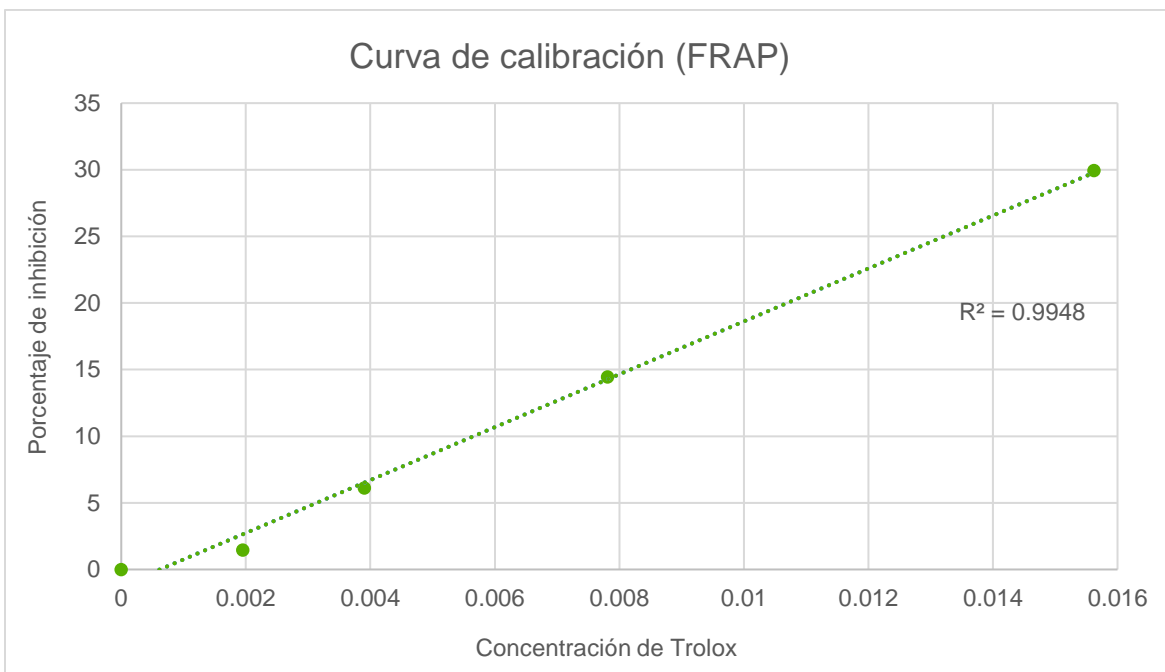


Figura 6. Curva de calibración Trolox utilizada como referencia para el ensayo con FRAP.

#### Base seca

En la Tabla 6 se muestran los valores, en base seca, de la CAO de los extractos lipofílico e hidrofílico para las todas las especies evaluadas ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100 g de muestra y mg equivalentes de Trolox/100 g de muestra) mediante el método FRAP.

Al igual que con el método DPPH, las especies con mayor AAO fueron *Daldinia* sp., *L. sulphureus*, *Polyporus* sp. y *V. bombycina*, habiendo, nuevamente, una correspondencia con sus porcentajes de lípidos; sin embargo, a pesar de que entre las 10 especies hubo diferencias significativas en su contenido de extracto etéreo (Tabla 13), para el ensayo con el método FRAP, los valores de AAO no fueron tan diferentes unos de otros, como ocurrió en el ensayo con DPPH.

Todas estas especies, presentaron valores inferiores a aquellos reportados para algunas especies de HSC de la misma región (Jiménez-Zárata, 2017).

Tabla 6. Capacidad antioxidante con FRAP en  $\mu\text{mol}$  y  $\text{mg}$  equivalente de Trolox/100g de hongo en base seca.

| Especie                   | Actividad antioxidante con FRAP en base seca |                         |                             |                         |
|---------------------------|--|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                           | Extracto lipofílico                          |                         | Extracto hidrofílico        |                         |
|                           | $\mu\text{mol}/100\text{g}$                  | $\text{mg}/100\text{g}$ | $\mu\text{mol}/100\text{g}$ | $\text{mg}/100\text{g}$ |
| <i>A. nigricans</i>       | <b>1057.10 ± 255.00</b>                      | <b>264.58 ± 63.82</b>   | 12703.46 ± 783.63           | 3179.55 ± 196.13        |
| <i>C. sulcipes</i>        | 1355.54 ± 37.36                              | 339.28 ± 9.35           | 21534.61 ± 157.52           | 5389.90 ± 39.43         |
| <i>C. tricholoma</i>      | 1331.38 ± 105.70                             | 333.23 ± 26.46          | 19516.06 ± 888.68           | 4884.68 ± 222.43        |
| <i>Daldinia</i> sp.       | <b>1624.39 ± 47.05</b>                       | <b>406.57 ± 11.78</b>   | <b>27001.70 ± 699.11</b>    | <b>6758.26 ± 174.98</b> |
| <i>L. sulphureus</i>      | 1607.95 ± 24.32                              | 402.45 ± 6.09           | <b>9164.78 ± 334.79</b>     | <b>2293.85 ± 83.79</b>  |
| <i>L. crinitus</i>        | 1331.49 ± 54.63                              | 333.26 ± 13.67          | 12437.38 ± 275.84           | 3112.95 ± 69.04         |
| <i>P. lecomtei</i>        | 1180.40 ± 100.80                             | 295.44 ± 25.23          | 16283.47 ± 843.45           | 4075.59 ± 211.11        |
| <i>Polyporus</i> sp.      | 1430.84 ± 20.05                              | 358.12 ± 5.02           | 18238.39 ± 628.67           | 4564.89 ± 157.35        |
| <i>P. sanguineus</i>      | 1195.50 ± 174.75                             | 299.22 ± 43.74          | 16314.35 ± 1566.20          | 4083.32 ± 392.00        |
| <i>V. bombycina</i>       | 1542.23 ± 42.54                              | 386.01 ± 10.65          | 23344.05 ± 880.88           | 5842.78 ± 220.48        |
| Otros hongos              |  |                         |                             |                         |
| <i>A. delicata</i> *      | 2759.51 ± 365.10                             | 690.68 ± 91.38          | 46595.29 ± 408.80           | 11662.34 ± 102.32       |
| <i>A. fuscosuccinea</i> * | 2453.37 ± 207.47                             | 614.05 ± 51.93          | 41979.13 ± 1495.22          | 10506.96 ± 374.24       |
| <i>C. lateritius</i> *    | 2856.46 ± 373.46                             | 714.94 ± 93.47          | 52898.21 ± 3837.47          | 13239.89 ± 960.48       |
| <i>F. brasiliensis</i> *  | 2879.78 ± 544.22                             | 720.78 ± 136.21         | 22079.38 ± 5743.15          | 5526.25 ± 1437.45       |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

*Daldinia* sp., *L. sulphureus*, *C. sulcipes* y *C. tricholoma*, fueron las especies en cuyo extracto hidrofílico hubo mayor AAO; excepto por *L. sulphureus*, estos resultados fueron los mismos que con el método DPPH, y de la misma forma, no se vio una relación entre la CAO de las 10 especies con su contenido de humedad, además de que sus valores no difirieron significativamente entre ellos. Una vez más, los valores de estas 10 especies, fueron por mucho inferiores a los de otras especies.

#### Base húmeda

En base húmeda, los extractos lipofílicos de *C. tricholoma*, *P. lecomtei* y *C. sulcipes* presentaron los valores de CAO más altos (Tabla 7); de nuevo, hubo una correspondencia con su bajo contenido de humedad, respecto a las otras especies,

así como con su porcentaje de extracto etéreo en base húmeda, cuyos valores fueron los más altos (Tabla 13).

Asimismo, para este ensayo, al igual que con el método DPPH, estas tres especies fueron las más eficientes en el control de radicales libres; sin embargo, sus valores son inferiores a los reportados para otras especies comestibles. Respecto a *A. nigricans*, *Daldinia* sp., *L. sulphureus*, *L. crinitus*, *Polyporus* sp., *P. sanguineus* y *V. bombycina*, su AAO es por mucho inferior al de las tres principales (Imagen 3).

Tabla 7. Capacidad antioxidante con FRAP en  $\mu\text{mol}$  y  $\text{mg}$  equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda.

| Especie                   | Actividad antioxidante con FRAP en base húmeda |                         |                             |                         |
|---------------------------|--|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                           | Extracto lipofílico                            |                         | Extracto hidrofílico        |                         |
|                           | $\mu\text{mol}/100\text{g}$                    | $\text{mg}/100\text{g}$ | $\mu\text{mol}/100\text{g}$ | $\text{mg}/100\text{g}$ |
| <i>A. nigricans</i>       | <b>20.82 ± 5.02</b>                            | <b>5.21 ± 1.26</b>      | 250.26 ± 15.44              | 62.64 ± 3.86            |
| <i>C. sulcipes</i>        | 210.11 ± 5.79                                  | 52.59 ± 1.45            | 3337.86 ± 24.42             | 835.43 ± 6.11           |
| <i>C. tricholoma</i>      | <b>273.33 ± 21.70</b>                          | <b>68.41 ± 5.43</b>     | <b>4006.65 ± 182.45</b>     | <b>1002.82 ± 45.66</b>  |
| <i>Daldinia</i> sp.       | 47.43 ± 1.37                                   | 11.87 ± 0.34            | 788.45 ± 20.41              | 197.34 ± 5.11           |
| <i>L. sulphureus</i>      | 84.58 ± 1.28                                   | 21.17 ± 0.32            | 482.07 ± 17.61              | 120.66 ± 4.41           |
| <i>L. crinitus</i>        | 21.04 ± 0.86                                   | 5.27 ± 0.22             | <b>196.51 ± 4.36</b>        | <b>49.18 ± 1.09</b>     |
| <i>P. lecomtei</i>        | 212.12 ± 18.11                                 | 53.09 ± 4.53            | 2926.14 ± 151.57            | 732.38 ± 37.94          |
| <i>Polyporus</i> sp.      | 48.08 ± 0.67                                   | 12.03 ± 0.17            | 612.81 ± 21.12              | 153.38 ± 5.29           |
| <i>P. sanguineus</i>      | 20.92 ± 3.06                                   | 5.24 ± 0.77             | 285.50 ± 27.41              | 71.46 ± 6.86            |
| <i>V. bombycina</i>       | 63.69 ± 1.76                                   | 15.94 ± 0.44            | 964.11 ± 36.38              | 241.31 ± 9.11           |
| Otros hongos              |  |                         |                             |                         |
| <i>A. delicata</i> *      | 378.88 ± 50.13                                 | 94.83 ± 12.55           | 6397.53 ± 56.13             | 1601.24 ± 14.05         |
| <i>A. fuscosuccinea</i> * | 243.37 ± 20.58                                 | 60.91 ± 5.15            | 4164.33 ± 148.33            | 1042.29 ± 37.12         |
| <i>F. brasiliensis</i> *  | 418.72 ± 79.13                                 | 104.80 ± 19.81          | 3210.34 ± 835.05            | 803.52 ± 209.01         |
| <i>S. commune</i> *       | 327.65 ± 7.69                                  | 82.01 ± 1.93            | 5493.43 ± 514.41            | 1374.95 ± 128.75        |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

En el extracto hidrofílico, *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* presentaron la mayor AAO (Figura 7), muy por encima del resto de las especies, y con valores comparables a los de otras especies de HSC de esta misma región. Estos

resultados coinciden con aquellos del método DPPH y, de igual manera, sugieren que en alguna de las fracciones no lipídicas de estas tres especies se podrían encontrar compuestos con buena CAO.

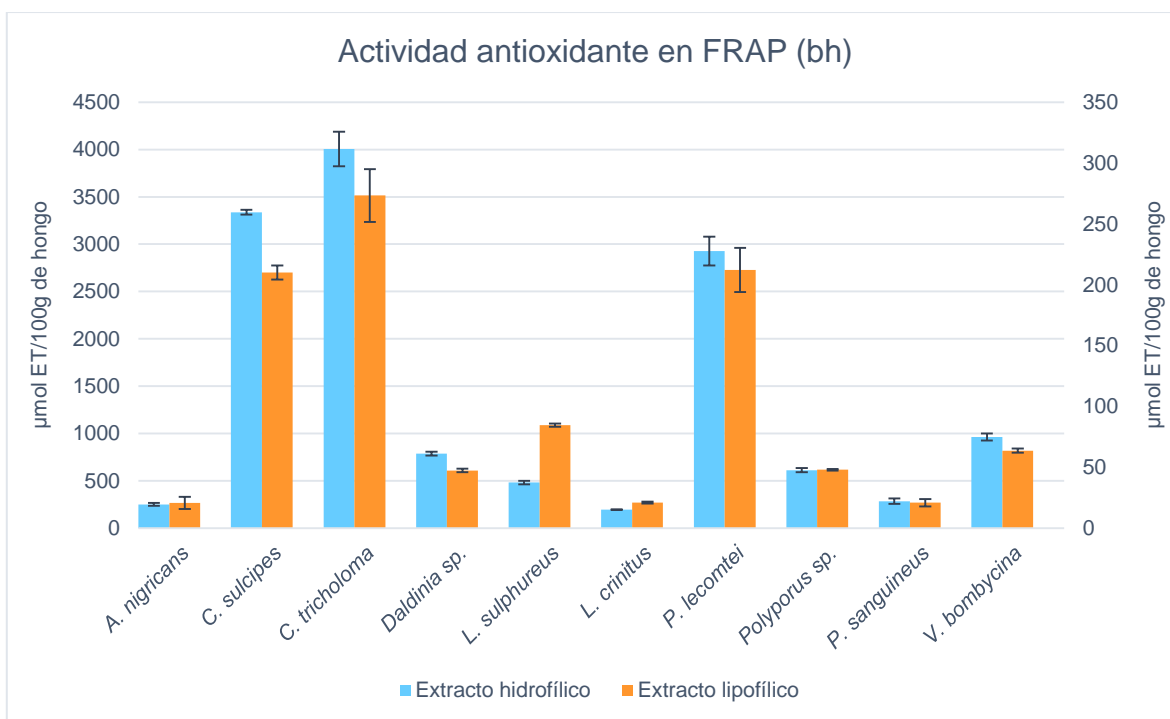


Figura 7. Actividad antioxidante de extractos hidrofílico y lipofílico en base húmeda, utilizando el método FRAP.

Tabla 8. Capacidad antioxidante total en  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda y base seca, en método DPPH y método FRAP.

| Especie                   | Actividad antioxidante total            |  |  |   |
|---------------------------|---|--|--|---|
|                           | DPPH                                    |  | FRAP                                   |   |
|                           | BH                                      | BS                                       | BH                                     | BS                                      |
|                           | $\mu\text{mol}/100\text{g}$             | $\mu\text{mol}/100\text{g}$              | $\mu\text{mol}/100\text{g}$            | $\mu\text{mol}/100\text{g}$             |
| <i>A. nigricans</i>       | 1051.46 $\pm$ 96.17                     | 53373.64 $\pm$ 4881.97                   | 271.08 $\pm$ 15.47                     | 13760.56 $\pm$ 785.08                   |
| <i>C. sulcipes</i>        | 8832.54 $\pm$ 872.40                    | 56984.13 $\pm$ 5628.41                   | 3547.97 $\pm$ 22.72                    | 22890.15 $\pm$ 146.55                   |
| <i>C. tricholoma</i>      | <b>10066.61 <math>\pm</math> 404.23</b> | 49033.65 $\pm$ 1968.97                   | <b>4279.98 <math>\pm</math> 166.46</b> | 20847.44 $\pm$ 810.80                   |
| <i>Daldinia</i> sp.       | 1672.38 $\pm$ 228.65                    | <b>57273.25 <math>\pm</math> 7830.41</b> | 835.88 $\pm$ 21.71                     | <b>28626.09 <math>\pm</math> 743.47</b> |
| <i>L. sulphureus</i>      | 1381.82 $\pm$ 68.88                     | <b>26270.40 <math>\pm</math> 1309.57</b> | 566.65 $\pm$ 18.48                     | <b>10772.73 <math>\pm</math> 351.24</b> |
| <i>L. crinitus</i>        | 577.93 $\pm$ 66.35                      | 36577.88 $\pm$ 4199.05                   | <b>217.55 <math>\pm</math> 4.11</b>    | 13768.87 $\pm$ 260.02                   |
| <i>P. lecomtei</i>        | 8207.16 $\pm$ 1177.55                   | 45671.44 $\pm$ 6552.87                   | 3138.26 $\pm$ 146.64                   | 17463.88 $\pm$ 816.04                   |
| <i>Polyporus</i> sp.      | 1539.75 $\pm$ 160.86                    | 45825.89 $\pm$ 4787.49                   | 660.89 $\pm$ 20.57                     | 19669.22 $\pm$ 612.15                   |
| <i>P. sanguineus</i>      | <b>509.81 <math>\pm</math> 59.61</b>    | 29132.24 $\pm$ 3406.45                   | 306.42 $\pm$ 29.42                     | 17509.84 $\pm$ 1681.20                  |
| <i>V. bombycina</i>       | 1440.02 $\pm$ 117.14                    | 34867.41 $\pm$ 2836.27                   | 1027.80 $\pm$ 34.72                    | 24886.29 $\pm$ 840.77                   |
| Otros hongos              |   |  |  |   |
| <i>A. delicata</i> *      | 11432.40 $\pm$ 704.15                   | 83265.83 $\pm$ 5117.55                   | 6776.41 $\pm$ 47.23                    | 49354.80 $\pm$ 343.96                   |
| <i>A. fuscosuccinea</i> * | 6611.20 $\pm$ 195.90                    | 66645.14 $\pm$ 2001.30                   | 4407.70 $\pm$ 161.90                   | 44432.50 $\pm$ 1632.09                  |
| <i>C. lateritius</i> *    | 7629.92 $\pm$ 276.30                    | 67199.03 $\pm$ 2387.43                   | 6452.67 $\pm$ 401.20                   | 55754.67 $\pm$ 3466.57                  |
| <i>F. brasiliensis</i> *  | 5031.64 $\pm$ 1403.17                   | 34605.49 $\pm$ 9650.44                   | 3629.06 $\pm$ 913.84                   | 24959.16 $\pm$ 6285.01                  |
| <i>P. domingensis</i> *   | 4604.22 $\pm$ 158.24                    | 65400.79 $\pm$ 2247.68                   | 2844.30 $\pm$ 160.62                   | 40401.93 $\pm$ 2281.52                  |
| <i>P. djamor</i> *        | 9324.82 $\pm$ 591.82                    | 71729.38 $\pm$ 4552.42                   | 4556.87 $\pm$ 579.16                   | 35052.88 $\pm$ 4455.08                  |
| <i>S. commune</i> *       | 15685.35 $\pm$ 1514.64                  | 82612.46 $\pm$ 7977.39                   | 5821.08 $\pm$ 521.92                   | 30658.79 $\pm$ 2748.85                  |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

Tabla 9. Capacidad antioxidante total en mg equivalente de Trolox/100g de hongo en base húmeda y base seca, en método DPPH y método FRAP.

| Especie                   | Actividad antioxidante total |                           |                        |                         |
|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
|                           | DPPH                         |                           | FRAP                   |                         |
|                           | BH                           | BS                        | BH                     | BS                      |
|                           | mg/100g                      | mg/100g                   | mg/100g                | mg/100g                 |
| <i>A. nigricans</i>       | 263.17 ± 24.07               | 13358.89 ± 1221.91        | 67.85 ± 3.87           | 3444.13 ± 196.50        |
| <i>C. sulcipes</i>        | 2210.70 ± 218.35             | 14262.56 ± 1408.74        | 888.02 ± 5.69          | 5729.18 ± 36.68         |
| <i>C. tricholoma</i>      | <b>2519.57 ± 101.17</b>      | 12272.63 ± 492.81         | <b>1071.24 ± 41.66</b> | 5217.91 ± 202.94        |
| <i>Daldinia</i> sp.       | 418.58 ± 57.23               | <b>14334.92 ± 1959.87</b> | 209.21 ± 5.43          | <b>7164.83 ± 186.08</b> |
| <i>L. sulphureus</i>      | 345.86 ± 17.24               | <b>6575.22 ± 327.77</b>   | 141.83 ± 4.62          | <b>2696.31 ± 87.91</b>  |
| <i>L. crinitus</i>        | 144.65 ± 16.61               | 9155.08 ± 1050.98         | <b>54.45 ± 1.03</b>    | 3446.21 ± 65.08         |
| <i>P. lecomtei</i>        | 2054.17 ± 294.73             | 11431.10 ± 1640.12        | 785.47 ± 36.70         | 4371.03 ± 204.25        |
| <i>Polyporus</i> sp.      | 385.38 ± 40.26               | 11469.76 ± 1198.26        | 165.41 ± 5.15          | 4923.01 ± 153.22        |
| <i>P. sanguineus</i>      | <b>127.60 ± 14.92</b>        | 7291.51 ± 852.60          | 76.69 ± 7.36           | 4382.54 ± 420.79        |
| <i>V. bombycina</i>       | 360.42 ± 29.32               | 8726.96 ± 709.89          | 257.25 ± 8.69          | 6228.79 ± 210.44        |
| Otros hongos              |                              |                           |                        |                         |
| <i>A. delicata</i> *      | 2861.41 ± 176.24             | 20840.60 ± 1280.87        | 1696.07 ± 11.82        | 12353.01 ± 393.69       |
| <i>A. fuscosuccinea</i> * | 1654.72 ± 49.03              | 16680.61 ± 494.26         | 1103.20 ± 40.52        | 11121.01 ± 408.50       |
| <i>C. lateritius</i> *    | 1909.69 ± 69.16              | 16500.81 ± 597.55         | 1615.04 ± 100.42       | 13954.84 ± 867.65       |
| <i>F. brasiliensis</i> *  | 1259.37 ± 351.20             | 8661.41 ± 2415.41         | 908.32 ± 228.73        | 6247.03 ± 1573.08       |
| <i>P. domingensis</i> *   | 1152.39 ± 39.61              | 16369.16 ± 562.57         | 711.90 ± 40.20         | 10112.20 ± 571.04       |
| <i>P. djamor</i> *        | 2333.91 ± 148.13             | 17953.15 ± 1139.43        | 1140.54 ± 144.96       | 8773.39 ± 1115.06       |
| <i>S. commune</i> *       | 3925.89 ± 379.10             | 20677.07 ± 1996.66        | 1456.96 ± 130.63       | 7673.59 ± 688.01        |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).



## E. Capacidad antioxidante total

La CAO total de una especie es el resultado de la suma de la CAO de su extracto lipofílico y su extracto hidrofílico. Estos valores, tanto para el ensayo con el método DPPH como con FRAP, en base seca y base húmeda, se muestran en las Tablas 8 y 9; expresados en  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/100g de hongo, y mg equivalente de Trolox/100g de hongo, respectivamente.

En base seca, *Daldinia* sp. fue la especie que, para ambos métodos, presentó la mayor AAO; sin embargo, al ser una especie utilizada con fines medicinales, y no ser consumida, limita que pueda ser considerada como tal. En lo que a las especies comestibles se refiere, *C. sulcipes*, *C. tricholoma* y *Polyporus* sp. fueron las especies en cuyos extractos lipofílico e hidrofílico, hubo mayor AAO detectada tanto con el método DPPH, como con el método FRAP. Las 10 especies evaluadas en este trabajo, en base seca, presentaron valores inferiores a los de otras especies de HSC referidas en las tablas (excepto por *Favolus brasiliensis*), y que se encuentran y consumen en la misma región.

En base húmeda, para ambos ensayos, las tres especies con mayor CAO total fueron *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* (Tablas 10 y 11); éstas, en promedio, tienen una CAO comparable a la de *Pleurotus djamor*, e inferior a la de *Auricularia delicata* y *Schizophyllum commune*, especies ampliamente consumidas en el área de estudio (Jiménez-Zárate, 2017).

Las diferencias entre los valores de todas estas muestras son más evidentes, debido a que el contenido de humedad varió mucho entre las especies. Como ya se ha mencionado anteriormente, hay una correspondencia entre aquellas especies con los valores de AAO más altos, y su bajo contenido de agua en comparación con las demás especies, pues sus compuestos antioxidantes (aquellos en base seca) se encuentran disueltos en menor proporción, respecto a las especies con altos porcentajes de humedad. De esta manera, se puede conocer la cantidad de

antioxidantes que se encuentran disponibles, por especie, en una cierta cantidad de sus ejemplares frescos.

*Cookeina sulcipes* y *C. tricholoma*, las especies con mayor CAO, son de tamaño pequeño, comparadas con ejemplares de especies como *V. bombycina* y *L. sulphureus*, los cuales, aunque tienen menos capacidad antioxidante, sus basidiomas son grandes, por lo que no es necesario consumir grandes cantidades de estos ejemplares, y obtener sus beneficios como antioxidantes. Sin embargo, es necesario hacer estudios sobre los tipos de antioxidantes que tienen.

Tabla 10. Comparación de actividad antioxidante total con método DPPH y método FRAP.

**Actividad antioxidante total en  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100g en base húmeda**

| No.          | Especie                            | DPPH                                    | No. | Especie                            | FRAP                                   |
|--------------|------------------------------------|---|-----|------------------------------------|--|
| 1            | <i>Cookeina tricholoma</i>         | <b>10066.61 <math>\pm</math> 404.23</b> | 1   | <i>Cookeina tricholoma</i>         | <b>4279.98 <math>\pm</math> 166.46</b> |
| 2            | <i>Cookeina sulcipes</i>           | 8832.54 $\pm$ 872.40                    | 2   | <i>Cookeina sulcipes</i>           | 3547.97 $\pm$ 22.72                    |
| 3            | <i>Panus lecomtei</i>              | 8207.16 $\pm$ 1177.55                   | 3   | <i>Panus lecomtei</i>              | 3138.26 $\pm$ 146.64                   |
| 4            | <i>Daldinia</i> sp.                | 1672.38 $\pm$ 228.65                    | 4   | <i>Volvariella bombycina</i>       | 1027.80 $\pm$ 34.72                    |
| 5            | <i>Polyporus</i> sp.               | 1539.75 $\pm$ 160.86                    | 5   | <i>Daldinia</i> sp.                | 835.88 $\pm$ 21.71                     |
| 6            | <i>Laetiporus sulphureus</i>       | 1381.82 $\pm$ 68.88                     | 6   | <i>Polyporus</i> sp.               | 660.89 $\pm$ 20.57                     |
| 7            | <i>Volvariella bombycina</i>       | 1440.02 $\pm$ 117.14                    | 7   | <i>Laetiporus sulphureus</i>       | 566.65 $\pm$ 18.48                     |
| 8            | <i>Auricularia nigricans</i>       | 1051.56 $\pm$ 96.17                     | 8   | <i>Pycnoporus sanguineus</i>       | 306.42 $\pm$ 29.42                     |
| 9            | <i>Lentinus crinitus</i>           | 577.93 $\pm$ 66.35                      | 9   | <i>Auricularia nigricans</i>       | 271.08 $\pm$ 15.47                     |
| 10           | <i>Pycnoporus sanguineus</i>       | <b>509.81 <math>\pm</math> 59.61</b>    | 10  | <i>Lentinus crinitus</i>           | <b>217.55 <math>\pm</math> 4.11</b>    |
| Otros hongos |                                    |   |     |                                    |  |
| 1            | <i>Schizophyllum commune</i> *     | 15685.35 $\pm$ 1514.64                  | 1   | <i>Auricularia delicata</i> *      | 6776.41 $\pm$ 47.23                    |
| 2            | <i>Auricularia delicata</i> *      | 11432.40 $\pm$ 704.15                   | 2   | <i>Cantharellus lateritius</i> *   | 6452.67 $\pm$ 401.20                   |
| 3            | <i>Pleurotus djamor</i> *          | 9324.82 $\pm$ 591.82                    | 3   | <i>Schizophyllum commune</i> *     | 5821.08 $\pm$ 521.92                   |
| 4            | <i>Cantharellus lateritius</i> *   | 7629.92 $\pm$ 276.30                    | 4   | <i>Pleurotus djamor</i> *          | 4556.87 $\pm$ 579.16                   |
| 5            | <i>Auricularia fuscisuccinea</i> * | 6611.20 $\pm$ 195.90                    | 5   | <i>Auricularia fuscisuccinea</i> * | 4407.70 $\pm$ 161.90                   |
| 6            | <i>Favolus brasiliensis</i> *      | 5031.64 $\pm$ 1403.17                   | 6   | <i>Favolus brasiliensis</i> *      | 3629.06 $\pm$ 913.84                   |
| 7            | <i>Phillipsia domingensis</i> *    | 4604.22 $\pm$ 158.24                    | 7   | <i>Phillipsia domingensis</i> *    | 2844.30 $\pm$ 160.62                   |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

Tabla 11. Comparación de actividad antioxidante total con otras siete especies de la misma región.

**Actividad antioxidante total en mg equivalentes de Trolox/100g en base húmeda**

| No.          | Especie                            | DPPH                    | No. | Especie                            | FRAP                   |
|--------------|------------------------------------|-------------------------|-----|------------------------------------|------------------------|
| 1            | <i>Cookeina tricholoma</i>         | <b>2519.57 ± 101.17</b> | 1   | <i>Cookeina tricholoma</i>         | <b>1071.24 ± 41.66</b> |
| 2            | <i>Cookeina sulcipes</i>           | 2210.70 ± 218.35        | 2   | <i>Cookeina sulcipes</i>           | 888.02 ± 5.69          |
| 3            | <i>Panus lecomtei</i>              | 2054.17 ± 294.73        | 3   | <i>Panus lecomtei</i>              | 785.47 ± 36.70         |
| 4            | <i>Daldinia</i> sp.                | 418.58 ± 57.23          | 4   | <i>Volvariella bombycina</i>       | 257.25 ± 8.69          |
| 5            | <i>Polyporus</i> sp.               | 385.38 ± 40.26          | 5   | <i>Daldinia</i> sp.                | 209.21 ± 5.43          |
| 6            | <i>Volvariella bombycina</i>       | 360.42 ± 29.32          | 6   | <i>Polyporus</i> sp.               | 165.41 ± 5.15          |
| 7            | <i>Laetiporus sulphureus</i>       | 345.86 ± 17.24          | 7   | <i>Laetiporus sulphureus</i>       | 141.83 ± 4.62          |
| 8            | <i>Auricularia nigricans</i>       | 263.17 ± 24.07          | 8   | <i>Pycnoporus sanguineus</i>       | 76.69 ± 7.36           |
| 9            | <i>Lentinus crinitus</i>           | 144.65 ± 16.61          | 9   | <i>Auricularia nigricans</i>       | 67.85 ± 3.87           |
| 10           | <i>Pycnoporus sanguineus</i>       | <b>127.60 ± 14.92</b>   | 10  | <i>Lentinus crinitus</i>           | <b>54.45 ± 1.03</b>    |
| Otros hongos |                                    |                         |     |                                    |                        |
| 1            | <i>Schizophyllum commune</i> *     | 3925.89 ± 379.10        | 1   | <i>Auricularia delicata</i> *      | 1696.07 ± 11.82        |
| 2            | <i>Auricularia delicata</i> *      | 2861.41 ± 176.24        | 2   | <i>Cantharellus lateritius</i> *   | 1615.04 ± 100.42       |
| 3            | <i>Pleurotus djamor</i> *          | 2333.91 ± 148.13        | 3   | <i>Schizophyllum commune</i> *     | 1456.96 ± 130.63       |
| 4            | <i>Cantharellus lateritius</i> *   | 1909.69 ± 69.16         | 4   | <i>Pleurotus djamor</i> *          | 1140.54 ± 144.96       |
| 5            | <i>Auricularia fuscisuccinea</i> * | 1654.72 ± 49.03         | 5   | <i>Auricularia fuscisuccinea</i> * | 1103.20 ± 40.52        |
| 6            | <i>Favolus brasiliensis</i> *      | 1259.37 ± 351.20        | 6   | <i>Favolus brasiliensis</i> *      | 908.32 ± 228.73        |
| 7            | <i>Phillipsia domingensis</i> *    | 1152.39 ± 39.61         | 7   | <i>Phillipsia domingensis</i> *    | 711.90 ± 40.20         |

En rojo: valor más alto; en azul: valor más bajo para ambos métodos. Datos obtenidos de: \* Jiménez-Zárate (2017).

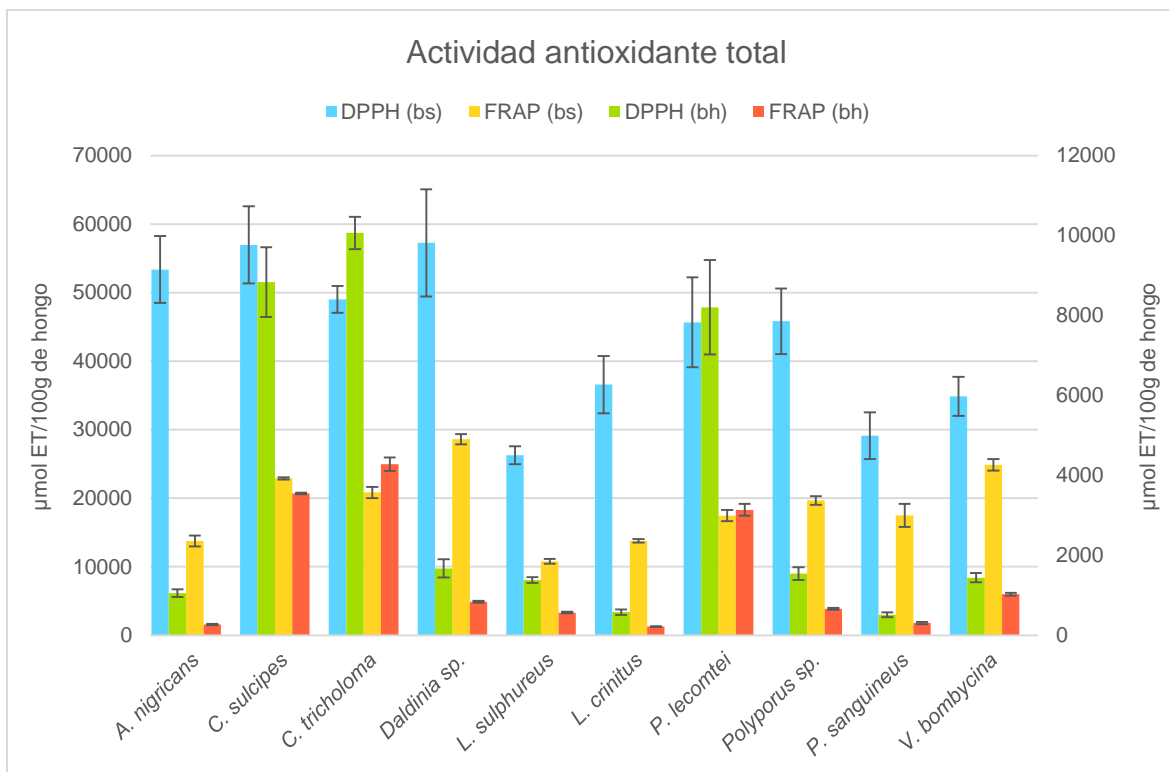


Figura 8. Actividad antioxidante total, en base seca y base húmeda, con el método DPPH y el método FRAP.

En comparación con algunos alimentos, *C. sulcipes*, *C. tricholoma* y *P. lecomtei* presentaron una AAO superior al de todas las frutas y verduras referidas (Tabla 12), donde se incluyen los valores de moras, uvas, frambuesas, arándanos y aceitunas, cuyas propiedades antioxidantes son ampliamente reconocidas, por lo que son consumidas con frecuencia, ya sea de manera directa, o como base o complemento de otros productos.

De acuerdo a estos resultados, considerando ambos métodos, *Polyporus sp.* tiene una CAO inferior a la de moras y frambuesas, pero similar, o superior, a la de los arándanos; la AAO de *V. bombycina* es comparable a la de las aceitunas negras, y superior a la de fresas y aceitunas verdes; *A. nigricans* se asemeja a las calabacitas, los higos y los aguacates; *P. sanguineus* tienen una CAO semejante, o superior, a la del brócoli; y la AAO de *L. crinitus* es comparable, o mayor, a la de peras, aguacates e higos.

Tabla 12. Comparación de actividad antioxidante total con frutas y verduras, y diferentes métodos.

| Actividad antioxidante total en mg equivalentes de Trolox/100g en base húmeda |                              |           |        |
|---|------------------------------|-----------|--------|
| No.   | Muestra                      | mg /100 g | Método |
| 1   | <i>Cookeina tricholoma</i>   | 2519.57   | DPPH   |
| 2   | <i>Cookeina sulcipes</i>     | 2210.70   | DPPH   |
| 3   | <i>Panus lecomtei</i>        | 2054.17   | DPPH   |
| 4   | <i>Cookeina tricholoma</i>   | 1071.24   | FRAP   |
| 5   | <i>Cookeina sulcipes</i>     | 888.02    | FRAP   |
| 6   | <i>Panus lecomtei</i>        | 785.47    | FRAP   |
| 7   | Mora *                       | 506.59'   | TEAC   |
| 8   | Frambuesa *                  | 420.24'   | TEAC   |
| 9   | <i>Daldinia sp.</i>          | 418.58    | DPPH   |
| 10  | <i>Polyporus sp.</i>         | 385.38    | DPPH   |
| 11  | Aceituna negra *             | 368.68'   | TEAC   |
| 12  | <i>Volvariella bombycina</i> | 360.42    | DPPH   |
| 13  | Grosella*                    | 351.66'   | TEAC   |
| 14  | <i>Laetiporus sulphureus</i> | 345.86    | DPPH   |
| 15  | Fresa (silvestre) *          | 283.83'   | TEAC   |
| 16  | Aceituna verde *             | 261.05'   | TEAC   |
| 17  | <i>Auricularia nigricans</i> | 263.17    | DPPH   |
| 18  | <i>Volvariella bombycina</i> | 257.25    | FRAP   |
| 19  | Piña *                       | 248.04'   | TEAC   |
| 20  | Naranja *                    | 218.75'   | TEAC   |
| 21  | Espinaca *                   | 212.50'   | TEAC   |
| 22  | <i>Daldinia sp.</i>          | 209.21    | FRAP   |
| 23  | Pimentón rojo *              | 210.24'   | TEAC   |
| 24  | Arándano *                   | 185.97'   | TEAC   |
| 25  | <i>Polyporus sp.</i>         | 165.41    | FRAP   |
| 26  | <i>Lentinus crinitus</i>     | 144.65    | DPPH   |
| 27  | <i>Laetiporus sulphureus</i> | 141.83    | FRAP   |
| 28  | Betabel *                    | 130.40'   | TEAC   |
| 29  | Ciruela *                    | 127.90'   | TEAC   |
| 30  | <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 127.60    | DPPH   |
| 31  | Mandarina *                  | 104.12'   | TEAC   |
| 32  | Uva (morada) *               | 96.36'    | TEAC   |
| 33  | Acelga *                     | 88.35'    | TEAC   |
| 34  | <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 76.69     | FRAP   |
| 35  | Brócoli *                    | 76.09'    | TEAC   |
| 36  | Calabacita                   | 71.58'    | TEAC   |
| 37  | <i>Auricularia nigricans</i> | 67.85     | FRAP   |

|    |                          |              |             |
|----|--------------------------|--------------|-------------|
| 38 | Higo *                   | 61.82'       | TEAC        |
| 39 | Aguacate *               | 55.56'       | TEAC        |
| 40 | Pera *                   | 54.81'       | TEAC        |
| 41 | <b>Lentinus crinitus</b> | <b>54.45</b> | <b>FRAP</b> |
| 42 | Durazno *                | 41.80'       | TEAC        |
| 43 | Jitomate *               | 41.30'       | TEAC        |
| 44 | Tuna *                   | 36.54'       | TEAC        |
| 45 | Berenjena *              | 27.53'       | TEAC        |
| 46 | Coliflor *               | 27.53'       | TEAC        |
| 47 | Níspero *                | 18.77'       | TEAC        |
| 48 | Zanahoria *              | 11.01'       | TEAC        |
| 49 | Pepino *                 | 10.76'       | TEAC        |

En rojo: valores obtenidos con el método DPPH; en azul: valores obtenidos con el método FRAP. Datos obtenidos de: \* Pellegrini *et al.*, 2003. † Datos calculados a partir de los datos referidos en la literatura.

Un factor que representa un reto en el ensayo de CAO, es que dentro de los sistemas biológicos hay varias fuentes de antioxidantes, como son las enzimas, moléculas grandes (p. ej. proteínas), moléculas pequeñas (p. ej. ácido ascórbico, ácido úrico, carotenoides y (poli)fenoles), y algunas hormonas, por lo que un sólo método no tiene la capacidad de reflejar de manera precisa todas las fuentes de antioxidantes, motivo por el cual se llevan a cabo diferentes ensayos para determinar la AAO de una muestra. Al final, el resultado es el mismo independientemente del mecanismo de los compuestos antioxidantes, pues las reacciones de transferencia de electrones y transferencia de un átomo de hidrógeno, pueden ocurrir en paralelo (Prior *et al.*, 2005).

Con el método DPPH, los valores de la AAO fueron más altos (tanto en base húmeda, como en base seca) respecto a aquellos obtenidos con el método FRAP (Figura 8); esto podría ocurrir debido a que con este último sólo se detectan aquellos agentes antioxidantes que transfieren una molécula de hidrógeno, mientras que el método DPPH es capaz de detectar compuestos con ambos mecanismos de acción (transferencia de electrones y transferencia de un átomo de hidrógeno), por lo que su espectro de detección es más amplio.

Si bien en el presente trabajo no se determinó la composición específica de compuestos con actividad antioxidante en las especies analizadas, con los ensayos llevados a cabo se pudo determinar que, algunas de éstas, son ricas en algunos de estos compuestos, por lo que tienen un gran potencial como alimentos que pudieran representar un beneficio a la salud de quien los consume, como un medio para controlar los radicales libres y disminuir sus efectos negativos.

## F. ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES

Con la finalidad de comparar los valores obtenidos en cada categoría, para cada una de las 10 especies (*Auricularia nigricans*, *Cookeina sulcipes*, *Cookeina tricholoma*, *Daldinia* sp., *Laetiporus sulphureus*, *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Polyporus* sp., *Pycnoporus sanguineus* y *Volvariella bombycina*), se incluyeron en la tabla 13 porcentajes referidos en la literatura para otras especies de hongos silvestres comestibles (HSC) y algunos alimentos pertenecientes a diferentes grupos, tales como: 1) alimentos de origen animal, por ser una fuente de proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas; 2) frutas, por su aporte de fibra, minerales y vitaminas; 3) cereales, por ser una fuente de fibra, proteínas y minerales; y 4) semillas, por su aporte de fibra, lípidos y proteínas.

### Base seca

**Cenizas (minerales o material inorgánico).** *Volvariella bombycina*, *C. sulcipes* y *C. tricholoma*, fueron las tres especies con los porcentajes más altos, los cuales son comparables a los de otras especies de HSC, como *Volvariella speciosa* y *Termitomyces microcarpus* (Nakelembe *et al.*, 2015). Los valores de las otras siete especies analizadas, fueron similares a aquellos reportados por Jiménez-Zárate (2017) para otras especies de hongos de esta misma región, y mayores a los de los alimentos presentados en la tabla.

**Extracto etéreo.** El aporte de lípidos fue significativo para *V. bombycina*, del mismo modo que *V. speciosa* y *T. microcarpus*; no así para *Daldinia* sp., pues a pesar de tener el mayor porcentaje en esta categoría, no es una especie consumida por las personas en la región, pues su importancia radica en que se utiliza con fines medicinales, en tratamientos de la piel. El resto de las especies, obtuvieron valores similares a los de otros HSC, y que también son comparables con aquellos de las carnes magras (sin grasa) y la carne de pollo, así como con cereales como la avena y el trigo.

**Fibra cruda.** *Auricularia nigricans* fue la especies con mayor porcentaje, seguida por *Daldinia* sp. y *P. sanguineus*; esta última especie tampoco es consumida, sino que también es utilizada con fines medicianles (Jiménez-Zárate, 2017), por lo que en cuanto aporte nutricional se refiere, *L. crinitus* y *Polyporus* sp., junto con *A. nigricans*, fueron las tres especies comestibles que, en base seca, tuvieron los valores más altos de contenido de fibra, siendo comparables con los porcentajes de semillas como la chía y la linaza, y superiores a aquellos de las otras especies de HSC referidas en la tabla. Para las demás especies (*C. sulcipes*, *C. tricholoma*, *P. lecomtei* y *V. bomycina*), sus porcentajes de fibra cruda fueron comparables con los de *Schizophyllum commune* y *Phillipsia domingensis* (HSC de la región), y superiores al del resto de los hongos, frutos y cereales.

**Proteína cruda.** *Volvariella bombycina* fue la especie con el mayor porcentaje, cuyo valor fue similar al reportado para *Cantharellus cibarius*, y menor que el de *Lycoperdon perlatum* (Colak et al., 2009). Sin embargo, *V. bombycina*, *Polyporus* sp., *C. sulcipes* y *P. lecomtei* presentaron, en base seca, porcentajes más altos que la chía y la linaza, e incluso, que los alimentos de origen animal.

**Extracto libre de nitrógeno.** En él se encuentran carbohidratos, vitaminas, compuestos orgánicos no nitrogenados, entre otros; *L. sulphureus*, *P. lecomtei* y *L. crinitus* fueron las especies con los valor más alto, mismos que son comparables con los de algunas especies de HSC de esta misma región (*A. fuscusuccinea*, *A.*



*delicata*, *C. lateritius*, *P. domingensis* y *S. commune*); *L. sulphureus* contiene un porcentaje similar a aquel de algunos cereales (trigo, arroz y avena), sin embargo, la mayoría de los frutos referenciados en la tabla (chayote, mango, naranja y papaya) contienen porcentajes considerablemente más elevados que los de las especies evaluadas.

En base seca no hubo una especie en particular cuyos valores porcentuales, mínimos o máximos, fueran constantes para todas las categorías. *A. nigricans* presentó los valores más bajos de porcentaje de ceniza, extracto etéreo y proteína cruda, y por el contrario, el valor más alto en cuanto a contenido de fibra cruda libre de humedad. Estos datos contrastan con los de *A. delicata* y *A. fuscosuccinea*, dos especies del mismo género y que se encuentran en la misma región, cuyos valores de extracto etéreo, fibra cruda y proteína cruda son similares entre sí, pero difieren considerablemente de los de *A. nigricans*.

De las 10 especies evaluadas, *V. bombycina*, *Polyporus* sp., *C. sulcipes*, *C. tricholoma* y *L. crinitus*, fueron las especies que, de manera general, contienen más nutrientes en base seca. El consumo de estos hongos, cuando no contienen humedad, puede aportar a la dieta tantos minerales, o más, que algunos alimentos de origen animal, frutos y cereales; menos lípidos que ciertos tipos de carne, pero igual que algunos cereales; igual o mayor porcentaje de fibra que algunos frutos, cereales y semillas; y tanta cantidad proteína como la carne, los cereales y las semillas; sin embargo, menos extractos libres de nitrógeno que cereales, semillas y frutas.

Tabla 13. Porcentajes en base húmeda y base seca de AQP de las especies analizadas, comparadas con otros alimentos.

| Especie                             | % Humedad | % materia seca | Ceniza |       | Extracto etéreo |       | Fibra cruda |       | Proteína cruda |       | Extracto libre de nitrógeno |        |
|-------------------------------------|-----------|----------------|--------|-------|-----------------|-------|-------------|-------|----------------|-------|-----------------------------|--------|
|                                     |           |                | BH     | BS    | BH              | BS    | BH          | BS    | BH             | BS    | BH                          | BS     |
| <i>Auricularia nigricans</i>        | 98.03     | 1.97           | 0.04   | 2.01  | 0.01            | 0.45  | 0.79        | 39.98 | 0.13           | 6.67  | 1.00                        | 50.89  |
| <i>Cookeina sulcipes</i>            | 84.50     | 15.50          | 1.65   | 10.63 | 0.21            | 1.35  | 2.96        | 19.12 | 3.80           | 24.50 | 6.88                        | 44.40  |
| <i>Cookeina tricholoma</i>          | 79.48     | 20.52          | 2.31   | 11.27 | 0.31            | 1.53  | 3.23        | 15.73 | 4.43           | 21.60 | 10.23                       | 49.85  |
| <i>Daldinia</i> sp.                 | 97.08     | 2.92           | 0.19   | 6.48  | 0.16            | 5.61  | 1.14        | 38.91 | 0.40           | 13.54 | 1.04                        | 35.47  |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>        | 94.74     | 5.26           | 0.22   | 4.16  | 0.13            | 2.46  | 0.40        | 7.59  | 0.56           | 10.57 | 3.96                        | 75.22  |
| <i>Lentinus crinitus</i>            | 98.42     | 1.58           | 0.05   | 3.30  | 0.01            | 0.94  | 0.38        | 24.07 | 0.24           | 15.13 | 0.89                        | 56.55  |
| <i>Panus lecomtei</i>               | 82.03     | 17.97          | 0.97   | 5.39  | 0.10            | 0.56  | 2.32        | 12.91 | 4.22           | 23.51 | 10.36                       | 57.63  |
| <i>Polyporus</i> sp.                | 96.64     | 3.36           | 0.27   | 8.12  | 0.06            | 1.65  | 0.79        | 23.41 | 0.90           | 26.86 | 1.34                        | 39.95  |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i>        | 98.25     | 1.75           | 0.06   | 3.37  | 0.01            | 0.65  | 0.48        | 27.27 | 0.25           | 14.50 | 0.95                        | 54.20  |
| <i>Volvariella bombycina</i>        | 95.87     | 4.13           | 0.79   | 19.19 | 0.13            | 3.19  | 0.64        | 15.48 | 1.30           | 31.51 | 1.26                        | 30.63  |
| Otros hongos                        |           |                |        |       |                 |       |             |       |                |       |                             |        |
| <i>Auricularia delicata</i> *       | 86.27     | 13.73          | 0.63   | 4.62  | 0.21            | 1.51  | 1.03        | 7.49  | 2.21           | 16.08 | 9.65                        | 70.30  |
| <i>Auricularia fuscossuccinea</i> * | 90.08     | 9.92           | 0.38   | 3.81  | 0.13            | 1.31  | 0.55        | 5.52  | 1.16           | 11.64 | 7.71                        | 77.72  |
| <i>Cantharellus lateritius</i> *    | 88.43     | 11.57          | 1.15   | 9.94  | 0.24            | 2.11  | 1.24        | 10.74 | 2.61           | 22.52 | 6.33                        | 54.70  |
| <i>Phillipsia domingensis</i> *     | 92.96     | 7.04           | 0.70   | 9.89  | 0.08            | 1.15  | 0.89        | 12.59 | 1.46           | 20.80 | 3.91                        | 55.56  |
| <i>Schizophyllum commune</i> *      | 81.01     | 18.99          | 0.63   | 3.31  | 0.13            | 0.66  | 3.73        | 19.64 | 3.56           | 18.77 | 10.94                       | 57.61  |
| <i>Volvariella speciosa</i> **      | 86.02     | 13.98          | 1.98'  | 14.13 | 0.50'           | 3.56  | 0.59'       | 4.19  | 2.79'          | 19.95 | 10.92'                      | 78.12' |
| <i>Termitomyces microcarpus</i> **  | 83.01     | 16.99          | 2.57'  | 15.13 | 0.57'           | 3.34  | 0.67'       | 3.95  | 4.66'          | 27.42 | 13.18'                      | 77.58' |
| <i>Cantharellus cibarius</i> ***    | 87.92     | 12.08'         | 0.94'  | 7.78  | 0.17'           | 1.40  | ---         | ---   | 4.13'          | 34.17 | ---                         | ---    |
| <i>Lycoperdon perlatum</i> ***      | 70.00     | 30.00'         | 0.60'  | 2.00  | 3.17'           | 10.58 | ---         | ---   | 13.48'         | 44.93 | ---                         | ---    |
| Alimentos de origen animal          |           |                |        |       |                 |       |             |       |                |       |                             |        |
| Carne de vacuno (magra) ****        | 75.0      | 25.0'          | 0.30'  | 1.2   | 0.45'           | 1.8   | ---         | ---   | 5.58'          | 22.3  | ---                         | ---    |
| Canal de vaca ****                  | 54.7      | 45.3'          | 0.36'  | 0.8   | 12.68'          | 28.0  | ---         | ---   | 7.47'          | 16.5  | ---                         | ---    |
| Carne de cerdo (magra) ****         | 75.1      | 24.9'          | 0.25'  | 1.0   | 0.30'           | 1.2   | ---         | ---   | 5.68'          | 22.8  | ---                         | ---    |
| Canal de cerdo ****                 | 41.1      | 58.9'          | 0.35'  | 0.6   | 27.68'          | 47.0  | ---         | ---   | 6.60'          | 11.2  | ---                         | ---    |
| Carne de pollo ****                 | 75.0      | 25.0'          | 0.30'  | 1.2   | 0.23'           | 0.9   | ---         | ---   | 5.70'          | 22.8  | ---                         | ---    |

|                           |       |        |       |      |        |       |        |       |        |       |        |        |
|---------------------------|-------|--------|-------|------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Leche (pasteurizada) **** | 87.6  | 12.4'  | ---   | ---  | 0.43'  | 3.5   | ---    | ---   | 0.40'  | 3.2   | ---    | ---    |
| Huevos (cocidos) ****     | 74.6  | 25.4'  | ---   | ---  | 2.84'  | 11.2  | ---    | ---   | 3.07'  | 12.1  | ---    | ---    |
| Frutas                    |       |        |       |      |        |       |        |       |        |       |        |        |
| Aguacate *****            | 72.07 | 27.98' | 0.11' | 0.39 | 7.23'  | 25.88 | 2.54'  | 9.11  | 0.44'  | 1.58  | 18.05' | 64.62' |
| Chayote *****             | 94.73 | 5.27'  | 0.06' | 1.07 | 0.09'  | 1.78  | 0.35'  | 6.70  | 0.07'  | 1.30  | 4.77'  | 90.45' |
| Mango *****               | 81.60 | 18.40' | 0.20' | 1.06 | 0.00'  | 0.02  | 0.91'  | 4.96  | 0.28'  | 1.50  | 17.29' | 93.96' |
| Naranja *****             | 83.60 | 16.40' | 0.17' | 1.05 | 0.05'  | 0.33  | 0.54'  | 3.30  | 0.23'  | 1.40  | 15.63' | 95.32' |
| Papaya *****              | 87.14 | 12.86' | 0.13' | 1.04 | 0.02'  | 0.16  | 0.68'  | 5.31  | 0.18'  | 1.40  | 12.02' | 93.49' |
| Otros                     |       |        |       |      |        |       |        |       |        |       |        |        |
| Chía *****                | 6.2   | 93.8'  | 4.22' | 4.5  | 26.17' | 27.9  | 30.95' | 33.00 | 18.67' | 19.90 | 34.60' | 32.45' |
| Linaza *****              | 7.2   | 92.8'  | 2.88' | 3.1  | 34.71' | 37.4  | 23.39' | 25.20 | 18.47' | 19.90 | 34.30' | 31.83' |
| Trigo *****               | 12.5  | 87.5'  | 1.49' | 1.7  | 1.58'  | 1.8   | 1.93'  | 2.2   | 10.50' | 12.0  | 94.30' | 82.51' |
| Arroz *****               | 11.4  | 88.6'  | 4.43' | 5.0  | 1.59'  | 1.8   | 7.80'  | 8.8   | 10.10' | 11.4  | 84.40' | 74.78' |
| Avena *****               | 13.5  | 86.5'  | 2.68' | 3.1  | 4.15'  | 4.8   | 8.91'  | 10.3  | 11.68' | 13.5  | 81.80' | 70.76' |
| Papas (cocidas) ****      | 78.00 | 22.00' | ---   | ---  | 0.02'  | 0.1   | ---    | ---   | 0.42'  | 1.90  | ---    | ---    |
| Flor de cempasúchil ***** | 89.39 | 10.61' | 0.08' | 0.80 | 0.03'  | 0.32  | 0.98'  | 9.20  | 0.14'  | 1.32  | 89.68' | 9.52'  |

## Base húmeda

Debido a que los nutrientes se encuentran disueltos en el agua que contienen los ejemplares, la determinación de sus porcentajes en condiciones de humedad es importante, ya que así se puede conocer el aporte nutricional de las especies, al ser consumidas en estado fresco.

**Ceniza.** El contenido de *C. tricholoma* fue mayor al del resto de las especies evaluadas en este trabajo, así como las reportadas por Jiménez-Zárate (2017) para esta misma región; asimismo, este valor es comparable al de *Termitomyces microcarpus*, una especie de HSC ampliamente consumida en Uganda, África (Nabubuya *et al.*, 2010), así como al de la linaza y la avena; superior al de los productos de origen animal y frutos referidos en la tabla, e inferior al de la chía y el arroz. *C. sulcipes*, y *P. lecomtei*, son otras especies con un porcentaje de ceniza significativo, y cuyos valores se asemejan más a los reportados para otras especies de HSC.

**Extracto etéreo.** *Cookeina tricholoma*, *C. sulcipes*, *Daldinia* sp. y *V. bombycina*, tuvieron los porcentajes más altos; estos valores, y los de las demás especies analizadas en este trabajo, no difieren mucho de los reportados para otras especies de la región. Comparados con otros alimentos, su contenido de lípidos es semejante al de las carnes magras, a diferencia de los canales de vaca y cerdo, cuyo porcentaje es significativamente más alto, así como también el de la chía y la linaza.

**Fibra cruda.** Ambas especies del género *Cookeina* presentaron los valores más altos en cuanto a porcentaje, seguidos de *P. lecomtei*; estos tres porcentajes son superiores al de todas especies de HSC referidas, excepto por *S. commune*, especie de la región. Su contenido de fibra es comparable al aguacate, y significativamente inferior que en las semillas. El resto de las especies analizadas, contienen porcentajes de fibra similares a los de frutos como el mango, la naranja y la papaya.

**Proteína cruda.** Los porcentajes más altos fueron aquellos de *C. tricholoma*, *P. lecomtei* y *C. sulcipes*, los cuales, aunque similares a *S. commune*, son superiores a las especies reportadas por Jiménez-Zárate (2017), e inferiores al resto de las especies de HSC en la tabla. Si bien la carne de vaca, cerdo y pollo, contiene porcentajes más altos de proteína cruda, ésta diferencia no es significativa, en comparación con las semillas y los cereales, cuyos valores son del doble, o más.

**Extracto libre de nitrógeno.** Los valores fueron muy variados entre las especies analizadas, lo mismo que para los hongos presentados como referencia. Una vez más, *P. lecomtei*, *C. tricholoma* y *C. sulcipes*, fueron las tres especies con los porcentajes más altos, y que pueden ser comparados con aquellos de frutos como la naranja y la papaya, pero superados por otros como el aguacate y el mango; y aún más, por semillas y cereales.

En base húmeda, *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* fueron las tres especies con mayor porcentaje de nutrientes, entre las especies evaluadas; esto es atribuido a que sus porcentajes de humedad fueron los más bajos, por lo que sus nutrientes están menos disueltos en los ejemplares frescos de estas especies. *Cookeina tricholoma* destacó por presentar los valores más altos en todas las categorías (excepto en extracto libre de nitrógeno, cuyo porcentaje fue muy cercano al más alto).

Cuando frescos, los hongos contienen porcentajes considerablemente menores de nutrientes, comparado con su base seca; sin embargo, aportan mayores cantidades de cenizas que algunos frutos; contienen cantidades de lípidos similares a las de las carnes magras, e inferiores a los de otros tipos de carnes; el porcentaje de fibra cruda es similar al de cereales como la avena; su aporte de proteína es apenas inferior al de las carnes magras y algunos alimentos de origen animal, y su porcentaje de extracto libre de nitrógeno es muy bajo, lo que corrobora que los hongos aportan pocos carbohidratos.

La diferencia entre el aporte nutricional de las especies de hongos comestibles en base seca y en base húmeda se debe principalmente a su contenido de humedad, el cual es muy alto en comparación con otros alimentos; por lo que para igualar las porciones de nutrientes aportadas por frutas, verduras, cereales, semillas y productos animales, habría que consumir cantidades relativamente altas de hongos, considerando que pierden agua durante su preparación. Sin embargo, si bien los hongos no pueden sustituir otro tipo de alimentos, sí tienen un gran potencial como parte de una dieta saludable.

## **G. AISLAMIENTO DE CEPAS**

A partir de los esporomas obtenidos en las salidas al campo, se obtuvieron cepas de cuatro especies: *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* y *Pycnoporus sanguineus*. Todas estas aisladas en medio de cultivo PDA. Tres de las cuatro especies presentaron fíbulas, excepto por *Phillipsia domingensis*, pues pertenece al grupo de los Ascomicetos, y a diferencia de muchas de las especies de Basidiomicetos, este grupo no presenta dichas estructuras.

## **H. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS**

### ***Lentinus crinitus***

#### Macroscopía

EMA 23°C: colonia circular a ligeramente irregular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio ausente, color blanco, reverso transparente (sin cambio de color), tasa de crecimiento:  $0.96 \pm 0.30$  mm/día.

EMA 25°C: colonia circular a ligeramente irregular, zona de avance adpresa a ligeramente alzada con hifas fimbradas, micelio ausente a ligeramente pelicular,

color blanco a ligeramente amarillento (1 A2), reverso transparente, tasa de crecimiento:  $1.01 \pm 0.23$  mm/día.

EMA 27°C: colonia irregular, zona de avance adpresa a ligeramente alzada con hifas fimbradas, micelio pelicular, color blanco a ligeramente amarillento (2 A2), reverso transparente a ligeramente amarillento (1 A2), tasa de crecimiento:  $1.19 \pm 0.32$  mm/día.

PDA 23°C: colonia circular a ligeramente irregular, zona de avance adpresa a ligeramente alzada con hifas fimbradas, micelio veloso a pelicular, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $0.56 \pm 0.11$  mm/día.

PDA 25°C: colonia circular, zona de avance adpresa a ligeramente alzada con hifas fimbradas, micelio veloso a pelicular, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $0.93 \pm 0.22$  mm/día.

PDA 27°C: colonia circular a ligeramente irregular, zona de avance adpresa a ligeramente alzada con hifas fimbradas, micelio veloso a pelicular, color blanco a amarillento (4 A2, 4 A3), reverso transparente, tasa de crecimiento:  $0.70 \pm 0.22$  mm/día.

### Microscopía

Hifas transparentes, diámetro de 1.5 y 5  $\mu\text{m}$ , agregadas y con algunas protuberancias intercalares, hifa terminal redondeada, fíbulas simples, presentes en todos los septos, estructuras de propagación ausentes (Anexo 5).

### Análisis estadístico

Para *L. crinitus*, el medio de cultivo fue el factor que tuvo mayor influencia en su crecimiento. Se identificó al medio EMA y la temperatura de 27°C, como la combinación de factores que favorecieron su desarrollo, con una tasa de

crecimiento promedio de 1.19 mm/día, estadísticamente diferente del resto de las condiciones probadas para esta cepa.

### ***Panus lecomtei***

#### Macroscopía

EMA 23°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (1 A2), tasa de crecimiento:  $1.00 \pm 0.31$  mm/día.

EMA 25°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $1.54 \pm 0.09$  mm/día.

EMA 27°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $1.78 \pm 0.27$  mm/día.

PDA 23°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (2 A2), tasa de crecimiento:  $0.74 \pm 0.16$  mm/día.

PDA 25°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (2 A2, 3 A2), tasa de crecimiento:  $1.43 \pm 0.09$  mm/día.

PDA 27°C: colonia circular, zona de avance alzada con hifas fimbradas, micelio plumoso, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (3 A2), tasa de crecimiento:  $1.65 \pm 0.29$  mm/día.

#### Microscopía



Hifas transparentes, diámetro de 1.5 y 3  $\mu\text{m}$ , agregadas a manera de “cuerdas funiculosas”, hifa terminal redondeada o en punta, fíbulas simples, presentes en todos los septos, estructuras de propagación ausentes (Anexo 5).

#### Análisis estadístico

Para *P. lecomtei*, la temperatura fue el factor que tuvo mayor influencia en su crecimiento. Se identificó al medio EMA y la temperatura de 27°C, como la combinación de factores que favorecieron su desarrollo, con una tasa de crecimiento promedio de 1.78 mm/día, estadísticamente diferente del resto de las condiciones probadas para esta cepa.

### ***Phillipsia domingensis***

#### Macroscopía

EMA 23°C: No creció

EMA 25°C: No creció

EMA 27°C: No creció

PDA 23°C: No creció

PDA 25°C: colonia irregular, zona de avance sumergida de margen uniforme, micelio aterciopelado, color amarillento (4 A2, 4 A3), reverso amarillento (4 A2) a anaranjado (5 A3), tasa de crecimiento:  $0.69 \pm 0.22$  mm/día.

PDA 27°C: colonia irregular, zona de avance sumergida de margen uniforme, micelio aterciopelado, color amarillento (4 A2) a anaranjado (5 B3), reverso amarillento (4 A3) a anaranjado (5 A2) y marrón (5 B4, 5 C5, 5D6, 5 E7), tasa de crecimiento:  $0.06 \pm 0.01$  mm/día.

## Microscopía

Hifas transparentes, diámetro de 1.5 a 5  $\mu\text{m}$ , agregadas a manera de “cuerdas funiculosas”, hifa terminal redondeada, fíbulas ausentes, septos ausentes, estructuras de propagación ausentes (Anexo 5).

## Análisis estadístico

Para *P. domingensis*, debido a la falta de datos, no fue posible hacer un análisis cuyos resultados fueran estadísticamente confiables.

### ***Pycnoporus sanguineus***

## Macroscopía

EMA 23°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio farináceo, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $1.02 \pm 0.14$  mm/día.

EMA 25°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio farináceo, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (4 A4) y anaranjado (4 A8, 5 A7), tasa de crecimiento:  $1.38 \pm 0.16$  mm/día.

EMA 27°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio farináceo, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (3 A2), tasa de crecimiento:  $1.42 \pm 0.09$  mm/día.

PDA 23°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio farináceo, color blanco, reverso amarillento (3 A2), tasa de crecimiento:  $0.67 \pm 0.12$  mm/día.

PDA 25°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbradas, micelio farináceo, color blanco, reverso transparente, tasa de crecimiento:  $0.99 \pm 0.11$  mm/día.

PDA 27°C: colonia circular, zona de avance adpresa con hifas fimbriadas, micelio farináceo, color blanco, reverso transparente a ligeramente amarillento (3 A2), tasa de crecimiento:  $1.08 \pm 0.12$  mm/día.

#### Microscopía

Hifas transparentes, diámetro de 1.5 a 5  $\mu\text{m}$ , oleíferas, hifa terminal redondeada, fíbulas simples, presentes en todos los septos o de ocurrencia errática, conidios abundantes (Anexo 5).

#### Análisis estadístico

Para esta especie, la interacción del medio de cultivo y la temperatura influyó en el crecimiento de la cepa. Se identificó al medio EMA y las temperatura de 25 y 27 °C, como factores que favorecieron significativamente su desarrollo, con una tasa de crecimiento promedio de 1.38 y 1.42 mm/día, respectivamente, y que fueron estadísticamente diferente del resto de las condiciones probadas.

## I. CRIOCONSERVACIÓN

Con este ensayo se determinó la capacidad y el tiempo de recuperación del micelio de *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* y *Pycnoporus sanguineus*, inoculado en semillas de sorgo, después de haber mantenido éstas en ultracongelación (-80 °C) y en nitrógeno líquido (-196 °C) durante un mes.

Un día después de haber descongelado las semillas, aquellas que permanecieron en ultracongelación tuvieron un porcentaje de recuperación del 100% para las cuatro especies, es decir, en todas las semillas se pudo observar crecimiento micelial (Figura 9).

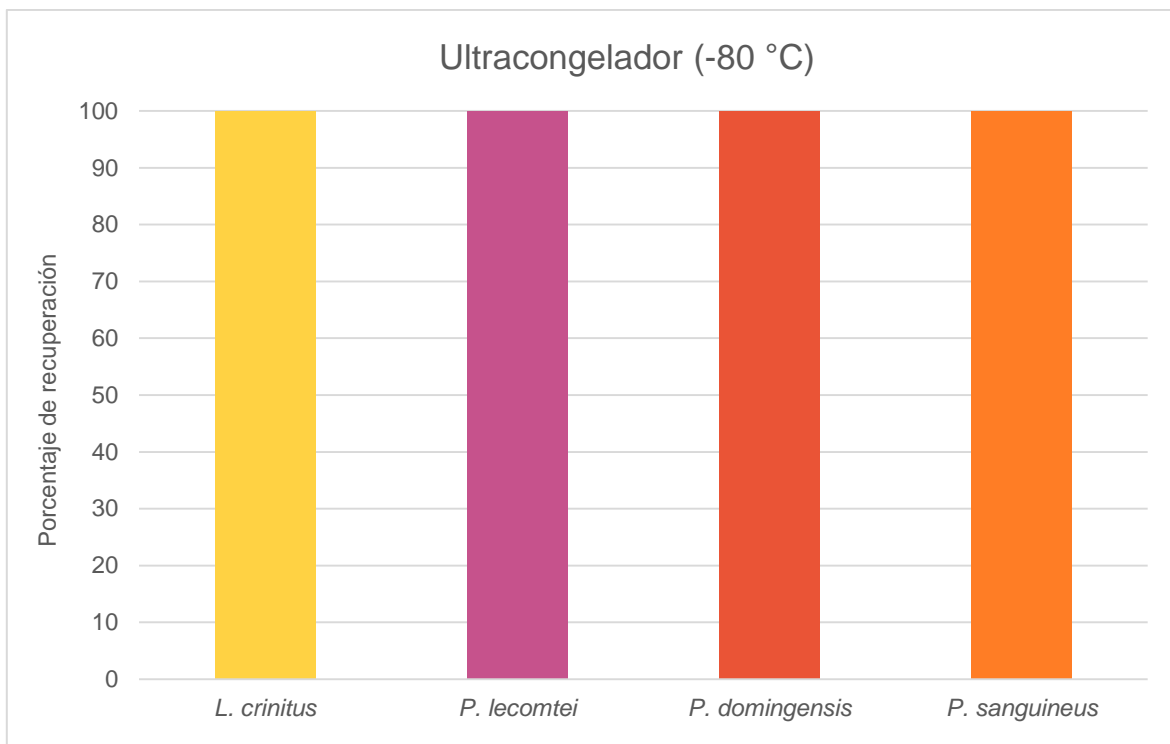


Figura 9. Porcentaje de recuperación del crecimiento micelial de cuatro especies de hongos silvestres, en inóculo, después de haber permanecido en criogenización durante un mes a -80°C.

Por otro lado, el porcentaje de recuperación total de las semillas en nitrógeno líquido se dio durante las siguientes 48 horas, a partir de que fueron descongeladas (Figura 10). En el primer día, casi todas las semillas de *P. sanguineus* se recuperaron (98%). Para *L. crinitus*, *P. lecomtei* y *P. domingensis*, sus porcentajes de recuperación fueron de 80, 84 y 88%, respectivamente. En el segundo día, el 100% de las semillas, de las cuatro especies, presentó crecimiento micelial.

Estos resultados corresponden a lo reportado en trabajos anteriores, donde se ha visto que el porcentaje de recuperación del micelio, varía entre el 60 y 100%, además de que no existe una relación entre el grupo taxonómico de un hongo y su respuesta al proceso de congelación y descongelación (Homolka, 2013).

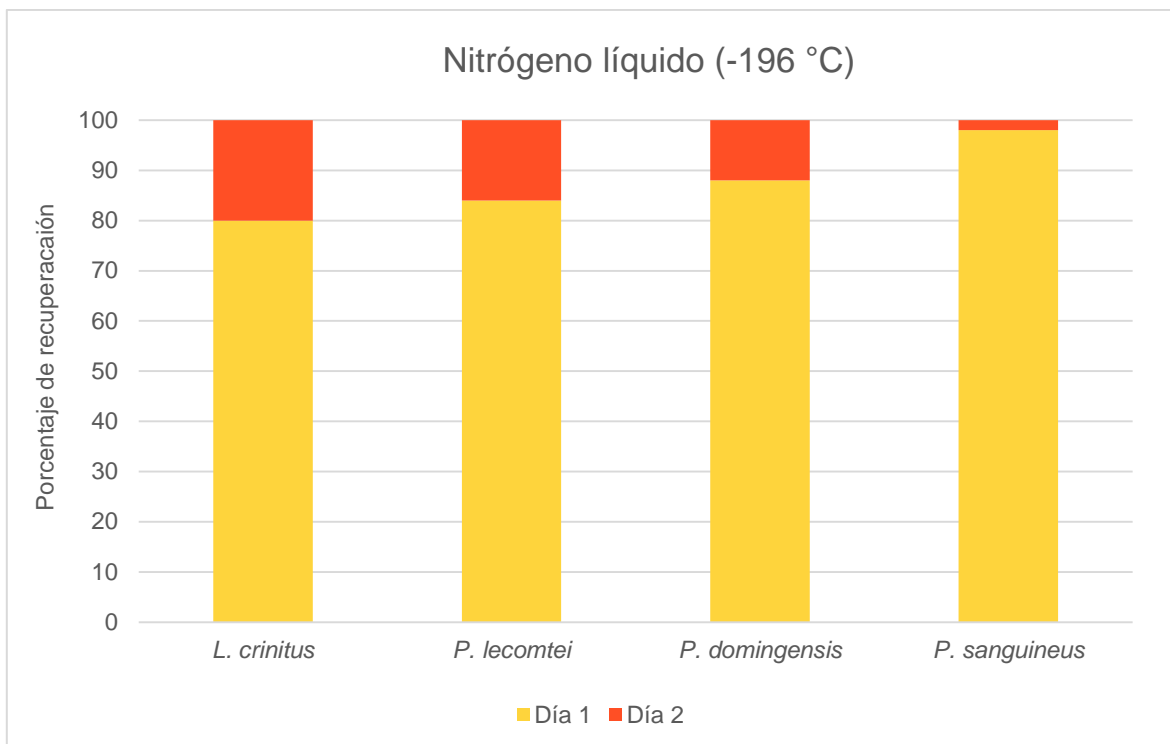


Figura 10. Porcentaje de recuperación del crecimiento micelial de cuatro especies de hongos silvestres, en inóculo, después de haber permanecido en criogenización durante un mes a -196°C.

### Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de los cultivos de *P. domingensis* y *P. sanguineus*, sometidos a congelación, no pudo ser determinada debido a problemas de contaminaciones posteriores a la descongelación de las semillas.

En la tabla 14 se muestra la tasa de crecimiento de los cultivos de *L. crinitus* y *P. lecomtei*, después de haber sido atemperados y resembrados. Para *P. lecomtei*, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control, por lo que la congelación no tuvo ningún efecto en el crecimiento micelial de esta cepa.

Por otro lado, para *L. crinitus* no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos temperaturas de congelación, pero sí respecto a la tasa de crecimiento del control, siendo ésta última menor; por lo que aparentemente la criogenización tuvo un efecto positivo en el desarrollo de esta cepa.

| Tasa de crecimiento (mm/día) |             |             |             |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Especie                      | 24°C        | -80 °C      | -196 °C     |
| <i>L. crinutus</i>           | 0.58 ± 0.07 | 0.85 ± 0.10 | 0.87 ± 0.06 |
| <i>P. lecomtei</i>           | 1.44 ± 0.15 | 1.41 ± 0.21 | 1.43 ± 0.11 |

Tabla 14. Tasa de crecimiento de dos especies de hongos silvestres, después de haber sido sometidas a tres diferentes temperaturas.

Estos resultados no sólo demuestran que la criogenización es un método eficaz para la preservación de estas cepas, sino que además sugieren que el estrés ambiental, debido a la exposición a bajas temperaturas, puede promover una mayor tasa de crecimiento micelial en algunas especies.

## J. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO

Dados los beneficios que tiene el cultivo en medio líquido sobre la producción de inóculo en semilla, con este ensayo se determinó la producción de micelio en un medio líquido con sacarosa y extracto de levadura, de las cepas obtenidas en este trabajo; sin embargo, no fue posible evaluar la especie *Lentinus crinitus*, ya que todos los matraces inoculados con esta cepa presentaron contaminación por bacterias, lo que evitó el desarrollo de su micelio. Los resultados para *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* y *Pycnoporus sanguineus* se muestran en la Tabla 15. En ésta, se reportan los miligramos de micelio, en peso seco, producidos en 100 mililitros de medio líquido, después de dos semanas, y un mes, a partir de la inoculación.

La morfología de los *pellets* formados por *P. lecomtei* y *P. domingensis* fue redonda, y de aproximadamente 1.5 y 0.5 cm de diámetro, respectivamente; a diferencia de aquellos formados por *P. sanguineus*, cuyos *pellets* fueron redondos (aproximadamente 1.0 cm de diámetro), y en algunas ocasiones planos. Estas diferencias en la morfología y el tamaño de los *pellets* se deben a la fragmentación de las hifas, pues, de acuerdo a Márquez-Rocha *et al.* (1999), el tamaño y la

estabilidad de éstos se ven afectados por la composición del medio y las condiciones hidrodinámicas del cultivo, como la velocidad de agitación; asimismo, Tucker & Thomas (1994) determinaron que diferentes composiciones del medio, confieren diferente resistencia a los *pellets*.

De las tres especies, *P. lecomtei* fue aquella que menos micelio produjo al cabo de ambos tiempos; *P. domingensis* tuvo la mayor producción de biomasa a las dos semanas; no obstante, transcurrido un mes, *P. sanguineus* fue la especie con la mayor cantidad de micelio producido (Figura 11).

Tabla 15. Miligramos de biomasa (peso seco) producidos en 100 ml de medio de sacarosa y extracto de levadura (mg/100 ml).

| Especie               | Tiempo         |                |
|-----------------------|----------------|----------------|
|                       | Dos semanas    | Un mes         |
| <i>P. lecomtei</i>    | 137.90 ± 6.93  | 170.30 ± 16.26 |
| <i>P. domingensis</i> | 197.15 ± 33.87 | 219.15 ± 7.00  |
| <i>P. sanguineus</i>  | 175.90 ± 23.48 | 266.50 ± 1.98  |

Abdullha *et al.* (2013), reportaron que al cabo de tres días, la especie *Pleurotus pulmonarius* produjo 11.72 gramos de micelio, en peso seco, en un litro de medio líquido compuesto por azúcar morena, salvado de arroz, extracto de malta y extracto de levadura. En otro estudio, Kim *et al.* (2002), al cabo de cinco días, obtuvieron 1.08 gL<sup>-1</sup> (peso seco) de *Pleurotus sajor-caju*, en un medio de extracto de levadura de malta, y 2.84 gL<sup>-1</sup> en un medio de peptona de malta de papa. Otro ejemplo, es el de *Agaricus blazei* (Lin & Yang, 2006), en el que esta especie, en ocho días, produjo 10.83 gL<sup>-1</sup> de micelio, en un medio de extracto de malta, extracto de levadura y peptona.

En comparación con esos resultados, la producción de biomasa de *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus* resultó ser muy baja, ya que de acuerdo los datos (Tabla 15), la cantidad de micelio contenido en un litro del medio líquido con sacarosa y extracto de levadura, sería de 1.70, 2.19 y 2.66 gL<sup>-1</sup>, respectivamente, al cabo de un mes.

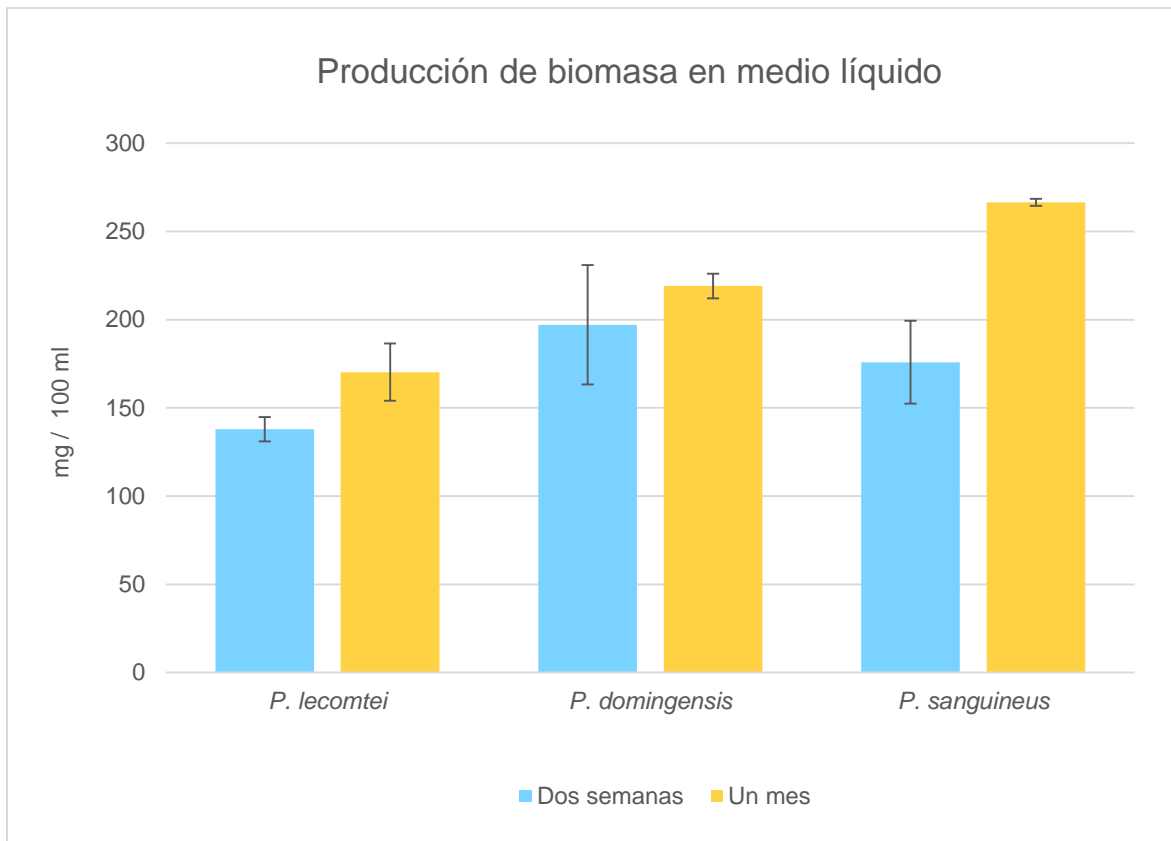


Figura 11. Producción de micelio en medio líquido de tres especies de hongos silvestres.

Debido a la poca atención que se le ha dado a *P. lecomtei* y *P. domingensis*, como especies comestibles cultivables, no se encontraron reportes sobre su cultivo en medio de líquido, por lo que se puede considerar que estos son los primeros resultados obtenidos, aplicando esta técnica, para dichas especies. *P. sanguineus*, en cambio, es una especie que ya ha sido ampliamente estudiada, por lo que la producción de biomasa en este tipo de medios ya se utiliza, principalmente para la obtención de enzimas, como las lacasas (Pointing *et al.*, 2000).

Se sabe que el inóculo en medio líquido tiene un mayor rendimiento y produce una biomasa micelial más uniforme en periodos de tiempo más cortos, en comparación al inóculo en granos de cereales, el cual, además, tiene un mayor riesgo de contaminación (Stamets, 2000; Confortin *et al.*, 2008).



Si bien el medio utilizado en este trabajo no fue el óptimo para una buena producción de biomasa de estas tres especies, el hecho de que sí haya habido cierto crecimiento de micelio, y que éste haya sido compacto, indica que un medio de cultivo líquido puede ser una alternativa eficaz para la producción de inóculo y la posterior fructificación de estos hongos; por lo que valdría la pena determinar qué condiciones fisicoquímicas y nutricionales (fuentes de carbono, composición del medio, pH, temperatura, velocidad de agitación, entre otras), son las idóneas para la obtención de mejores resultados.

## **K. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA EN SUSTRATO MEDIANTE LA HIDRÓLISIS DEL DIACETATO DE FLUORESCEÍNA**

La cantidad de biomasa suele ser asociada con la actividad metabólica del micelio, la cual va cambiando con el tiempo. A su vez, la capacidad de los hongos para crecer en un sustrato lignocelulósico, está relacionada con la actividad del micelio, así como su capacidad para activar mecanismos fisiológicos necesarios para aprovechar su medio adecuadamente (Buswell *et al.*, 1993). Con este ensayo se determinó la actividad metabólica en muestras de inóculo de *Lentinus crinitus*, *Panus lecomtei*, *Phillipsia domingensis* y *Pycnoporus sanguineus*, por medio de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína, por acción de esterasas (com. per. Mata, 2017).

Para la gama utilizada como referencia en los ensayos ( $\mu\text{g}$  de FDA hidrolizados/ml), el valor del coeficiente de relación ( $R^2$ ) fue de 0.9989 (Figura 12).

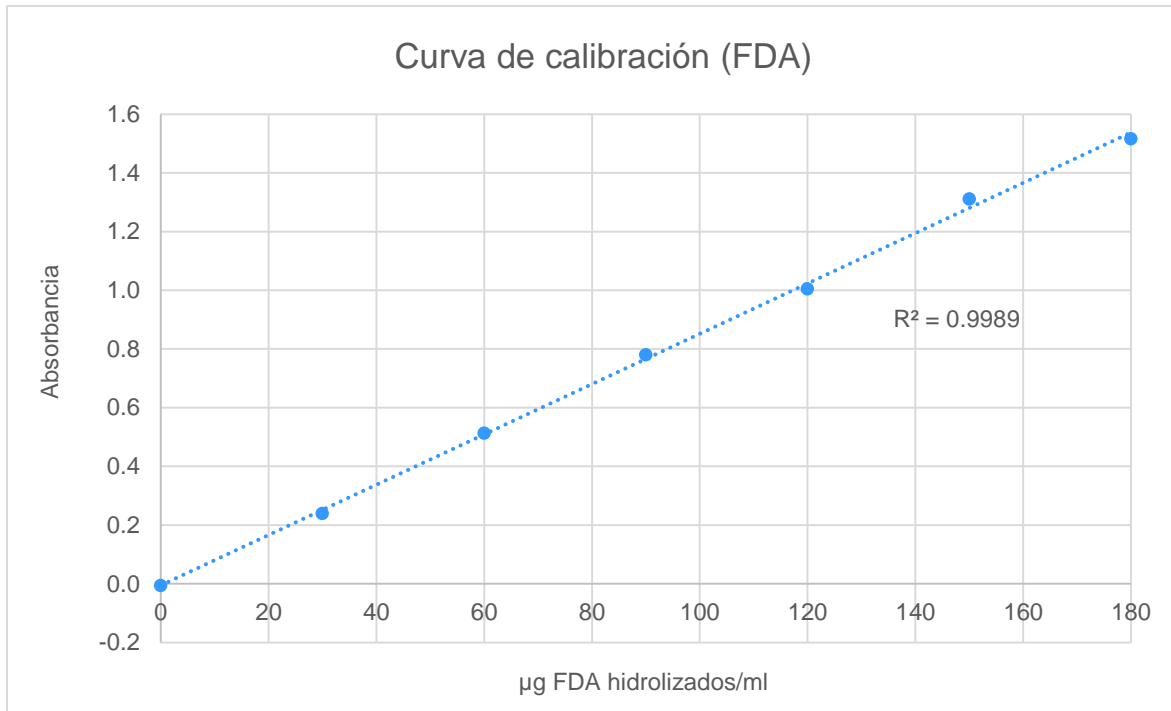


Figura 12. Curva de calibración (gama) utilizada como referencia en los ensayos de estimación del potencial biológico, mediante la hidrólisis de FDA.

En las cuatro cepas, el tiempo en el que se detectó la mayor actividad metabólica fue a los 28 días (semana 4), a partir de que se inocularon las semillas (Tabla 16). La actividad de *P. domingensis* y *P. sanguineus* fue aumentando gradualmente en el transcurso de las primeras cuatro semanas (al mismo tiempo que incrementaba su biomasa), con un evidente descenso en la semana 5. Por otro lado, la actividad metabólica de *P. lecomtei* y *L. crinitus* tuvo un aumento considerable en la segunda semana, respecto a la primera, y ésta se mantuvo hasta la cuarta semana con poca variación, aun cuando la cantidad de micelio iba en aumento (Figura 13).

Tabla 16. Actividad metabólica en inóculo de cuatro cepas de hongos silvestres. En rojo: valores de actividad más altos para cada especie.

| Potencial biológico en sustrato ( $\mu\text{g}$ FDA hidrolizados / g sustrato seco) |                  |                   |                   |                                     |                  |
|---|------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|------------------|
| Especie   | Semana 1         | Semana 2          | Semana 3          | Semana 4                            | Semana 5         |
| <i>L. crinitus</i>  | 40.28 $\pm$ 8.53 | 81.96 $\pm$ 18.33 | 74.02 $\pm$ 1.57  | <b>85.37 <math>\pm</math> 4.18</b>  | 71.45 $\pm$ 2.02 |
| <i>P. lecomtei</i>  | 62.07 $\pm$ 4.40 | 92.78 $\pm$ 14.58 | 92.41 $\pm$ 10.74 | <b>95.19 <math>\pm</math> 14.48</b> | 60.83 $\pm$ 9.56 |
| <i>P. domingensis</i>   | 8.11 $\pm$ 4.02  | 26.77 $\pm$ 1.99  | 71.00 $\pm$ 10.61 | <b>86.05 <math>\pm</math> 4.27</b>  | 9.41 $\pm$ 9.24  |
| <i>P. sanguineus</i>  | 18.48 $\pm$ 9.79 | 22.81 $\pm$ 2.26  | 73.34 $\pm$ 6.01  | <b>80.20 <math>\pm</math> 5.50</b>  | 5.64 $\pm$ 2.44  |

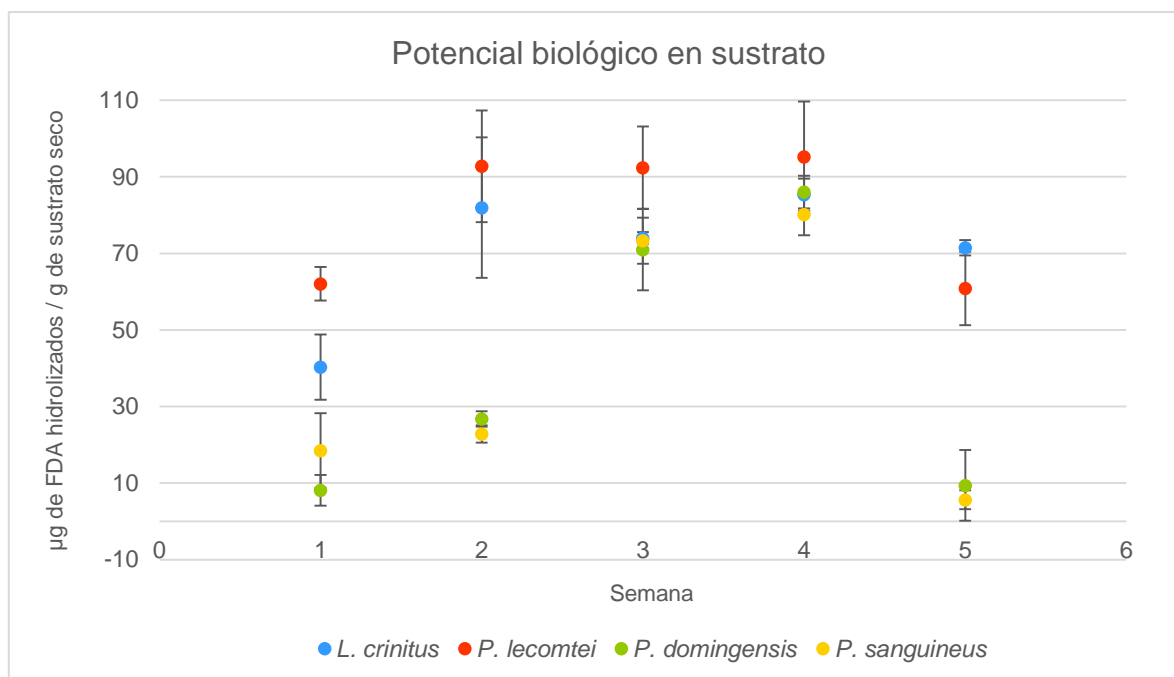


Figura 13. Actividad metabólica semanal de cuatro especies de hongos silvestres, expresada como microgramos de FDA por cada gramo de sustrato seco.

Si bien se pudo observar que en *P. domingensis* y *P. sanguineus* hubo una aparente relación entre la cantidad de biomasa y la actividad metabólica, los resultados obtenidos con *L. crinitus* y *P. lecomtei* no reflejaron tal correspondencia entre estas dos variables. Schnürer y Rosswall (1982), mencionan que este método probablemente sea más útil para la determinación de la actividad de microorganismos descomponedores, que para determinar su biomasa, y que no necesariamente hay una relación directa entre estos dos factores; pues, además,

algunas limitaciones del sustrato podrían explicar tal disminución en la tasa hidrolítica del inóculo.

La reducción de las unidades de FDA hidrolizado a partir de la quinta semana, podría indicar un cambio en la actividad metabólica del inóculo, lo que permitiría que el micelio pudiera invadir el sustrato de manera más eficiente por la acción de enzimas (p. ej. esterasas, lacasas y peroxidasas), para posteriormente fructificar. Si bien un adecuado crecimiento micelial no garantiza una buena eficiencia biológica, éste sí es fundamental para asegurar una rápida invasión del sustrato, y el tiempo y la temperatura de incubación del inóculo son factores críticos (Mata *et al.*, 2002; Terashita *et al.*, 1997).

Los resultados de este trabajo sugieren que la incubación de estas cepas durante 28 días, podría resultar en un inóculo con una alta actividad metabólica, y por lo tanto, una buena capacidad de iniciación de crecimiento micelial en el sustrato. Sin embargo, es necesario llevar a cabo otros experimentos para determinar la capacidad de producción de estas cepas.

## **L. DISCUSIÓN GENERAL**

En este trabajo se determinó que las 10 especies de hongos silvestres evaluadas, son una excelente fuente de nutrientes, en cuanto a su contenido de minerales, lípidos, fibra y proteína. Algunas de estas especies, por su aporte nutrimental, pueden ser comparadas con otros alimentos incluidos ampliamente en la dieta humana (productos de origen animal, frutas, semillas y cereales), e incluso, de mejor calidad. Además, por su capacidad antioxidante, estas especies de macromicetos pueden considerarse alimentos funcionales, pues al ser consumidos, tienen la capacidad de eliminar radicales libres o suprimir sus efectos. Del mismo modo, por su actividad antihelmíntica, pueden proveer protección contra infecciones parasitarias ocasionadas por nematodos (*C. elegans*); por lo que la ingesta de estas

especies de hongos no sólo representa un beneficio nutricional, sino también para la salud de quien los consume.

Del mismo modo, por su capacidad antihelmíntica, estas especies tienen potencial biotecnológico, al poder ser utilizados sus extractos metanólicos para el control de nematodos parásitos de plantas de importancia económica. El uso de estos extractos para el control de hongos patógenos ha sido comprobado para otras especies de macromicetos; sin embargo, en el ensayo aquí llevado a cabo, no se observó un efecto antifúngico significativo.

Dado que las especies saprobias pueden ser cultivadas en condiciones de invernadero, se obtuvieron cepas de *L. crinitus*, *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus*, las cuales, con fines para su conservación, pueden ser criogenizadas sin que la recuperación de su micelio se vea afectada. La producción de biomasa en un medio líquido tiene ciertos beneficios sobre la producción de inóculo en semilla; para *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus*, un medio con sacarosa y extracto de levadura permite el crecimiento de micelio, aunque en pequeñas cantidades, por lo que habría que determinar las condiciones para obtener mejores resultados, principalmente con *P. lecomtei* y *P. domingensis*, especies comestibles con valor cultural y nutricional, y que no son cultivadas.

Por último, se determinó que la incubación durante cuatro semanas, de las cuatro cepas aisladas, podría resultar en un inóculo con una actividad metabólica idónea para una rápida invasión del sustrato, factor importante para la posterior fructificación. Estos resultados son similares a aquellos de especies comerciales como las setas y el shiitke, lo que sugiere el potencial que tienen estas especies silvestres para ser cultivadas en gran escala, pero que no han sido aprovechadas como un recurso económico y/o alimenticio.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Con el ensayo antifúngico llevado a cabo, ninguno de los extractos metanólicos de las especies evaluadas inhibió el crecimiento radial de las especies blanco.

En el ensayo de actividad antihelmíntica, *Daldinia* sp., *Laetiporus sulphureus*, *Panus lecomtei*, *Polyporus* sp. y *Volvariella bombycina* tuvieron un efecto significativo en el control de nematodos (*C. elegans*). Siendo *Daldinia* sp. el más eficaz.

*Daldinia* sp., *Cookeina sulcipes*, *Cookeina tricholoma* y *Polyporus* sp., en base seca, fueron las especies en cuyos extractos (lipofílico e hidrofílico) se detectó mayor actividad antioxidante total. En base húmeda, los extractos de *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* fueron los que presentaron la mayor capacidad antioxidante.

En base seca, no hubo una especie cuyos porcentajes máximos fueran constates en todas las fracciones (cenizas, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda y extracto libre de nitrógeno); sin embargo, *V. bombycina* fue la especie que más destacó con los valores más altos para tres de estas fracciones. En base húmeda, *C. tricholoma*, *C. sulcipes* y *P. lecomtei* fueron las especies con los porcentajes más altos, y por lo tanto, aquellas con mayor aporte nutricional.

Se aislaron cepas de *L. crinitus*, *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus*, mismas que se caracterizaron. Se determinó que el medio EMA y la temperatura de 27 °C, favorecen el crecimiento de *L. crinitus*; el medio EMA y la temperatura de 27 °C, favorecen el crecimiento de *P. lecomtei*; y el medio EMA y las temperaturas de 25 y 27 °C, favorecen el crecimiento de *P. sanguineus*. La criogenización del inóculo de estas especies durante un mes, en ultracongelación (-80°C) y nitrógeno líquido (-196°C), no tiene un efecto negativo en la recuperación del crecimiento micelial, ni

en su tasa de crecimiento posterior a la descongelación del inóculo; por lo que éste es un método viable para la conservación de algunas de estas cepas.

La inmersión de una pequeña cantidad de micelio de las cepas de *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus*, en un medio líquido de sacarosa y extracto de levadura, dio como resultado la producción de conglomerados de biomasa de diferentes tamaños, y con una morfología predominantemente redonda. Al cabo de un mes, las cantidades de micelio producidas fueron muy bajas, comparadas con las reportadas para otras especies y en distintos medios líquidos; aun así, estos resultados fueron positivos, pues indican que, bajo condiciones fisicoquímicas y nutricionales idóneas, se pueden producir mayores cantidades de biomasa para su posterior fructificación en sustrato.

Finalmente, por medio de un ensayo de hidrólisis de diacetato de fluoresceína, se determinó que el pico de la actividad metabólica del inóculo de las cepas de *L. crinitus*, *P. lecomtei*, *P. domingensis* y *P. sanguineus* es a los 28 días, a partir de la inoculación de las semillas, con un descenso de esta actividad a los 35 días. Además, se pudo observar que, contrario a lo que algunos autores mencionan, no hubo una relación directa entre la cantidad de biomasa y la actividad metabólica, sino que puede haber otros factores que influyan en ésta última. Estos resultados sugieren que el inóculo de estas especies, con una incubación de cuatro semanas, podría garantizar una rápida iniciación de invasión del sustrato en el que se llevará a cabo la fructificación.

## **Perspectivas**

Todas las especies evaluadas en este trabajo, al ser saprobias, podrían ser cultivadas en condiciones de invernadero, y dadas sus propiedades nutricionales y bioquímicas, tienen una gran potencial para ser utilizadas con fines alimenticios, medicinales y/o biotecnológicos; sin embargo, y a pesar del trabajo que se ha hecho con otras especies de hongos silvestres, esto aún no es suficiente como para que

estas especies tengan una mayor escala de producción, más allá del laboratorio. Este tipo de trabajos son importantes, pues no sólo demuestran el gran valor que tienen nuestros recursos naturales, sino que además proponen y ayudan a sentar algunas bases para llevar a cabo un aprovechamiento sustentable de éstos.



## CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA

- Abdullah, N., Ismail, R., Johari, N. M. K., Anuar, M. S. M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué! by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae* 161: 65-60.
- Agrios, G. N. 2004. Losses caused by plant diseases. Plant pathology. Quinta Edición. Editorial Elsevier, Oxford, UK. 903 pp.
- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa, México, D. F. 838 pp.
- Albertó, E. 2014. Present and Future: Searching for natural occurring strains for mushroom production. *World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products Bulletin* 10: 7-12.
- Anke, T. 1997. Strobilurins. In: *Fungal biotechnology*, Anke, T. (ed). Chapman & Hall, Londres, pp 206-212.
- Anke, T., Stadler, M., Mayer, A., Sterner, O. 1995. Secondary metabolites with nematicidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany* 73: 932-939.
- Anke, H., Sterner, O. 1997. Nematicidal metabolites from higher fungi. *Current Organic Chemistry* 1: 361-374.
- Anwar, S. A., McKenry, M. V. 2010. Incidence and reproduction of *Meloidogyne incognita* on vegetable crop genotypes. *Pakistan Journal of Zoology* 42: 135-141.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists. USA.
- Asian and Pacific Centre of Agricultural Engineering and Machinery (APCAEM). 2012. Training Manual on Mushroom Cultivation Technology.

- Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., Franco-Maass, S. 2014. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20: 213-225.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70-76.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Gotz, M., Costa, R., Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere associated fungi antagonistic to *Verticillium dahlia* Kleb. *Applied environmental Microbiology* 71: 4203-4213.
- Bird, J., Herd, R. P. 1995. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Veterinary Parasitology* 56: 181-187.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany* 98: 426-438.
- Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población. *Productos forestales no madereros* 17. Food And Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* 13: 265-301.
- Boucher, G., Lamshead, P. J. D. 1994. Ecological biodiversity of marine nematodes in samples from temperate, tropical, and deep-sea regions. *Conservation Biology* 9: 1594-1604.
- Bruijn, J., Loyola, C., Aqueveque, P., Cañumir, J., Cortéz, M., France, A. 2010. Extraction of secondary metabolites from edible Chilean mushrooms.

- Burns, A. R., Luciani, G. M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin, J., Hunter, R., Redman, E., Stasiuk, S., Schertzberg, M., Angus-McQuibban, G., Caffrey, C. R., Cutler, S. R., Tyers, M., Giaever, G., Nislow, C., Fraser, A. G., MacRae, C. A., Gilleard, J., Roy, P. J. 2015. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications* 6: 7485.
- Buswell, J. A., Cai, Y. J., Chang, S. T. 1993. Fungal and substrate-associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates. In: *Mushroom biology and mushroom products*. Chang, S. T., Buswell, J. A. and Chiu, S. W. (eds). The Chinese University Press, Hong Kong. 141-150 pp.
- Cañete-Villafranca, R., Marcel-Sounouve, K., Prior-García, A., Noda-Albelo, A., Rodríguez-Pérez, M. 2013. Infecciones helmínticas del aparato digestivo: consideraciones actuales. *Revista Médica Electrónica* 35: 25-37.
- Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushroom on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *International Journal of Medicinal Mushroom* 1: 1-7.
- Chang, S. T., Miles, P. M. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, Environmental Impact*. Segunda Edición. Editorial CRC Press. EUA, Boca Raton. 451 pp.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. C. E. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81: 249-255.
- Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). 2016. Atlas de los pueblos indígenas de México. Disponible en: [http://www.cdi.gob.mx/atlas2015/?page\\_id=7237](http://www.cdi.gob.mx/atlas2015/?page_id=7237)
- Confortin, F. G., Marchetto, R., Bettin, F., Camassola, M., Salvador, M., Dillon, A. J. P. 2008. Production of *Pleurotus sajor-caju* strains PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1149-1155.

- Corral-Aguayo, R., Yahia, E. M., Carrillo-López, A., González-Aguilar, G. 2008. Correlation between some nutritional components and total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 10498-10504.
- Correa, S., Mello, M., Ávila-Zila, R., Minaré-Braúna, L., Pádua, R. R., Gómez, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Fitosanidad* 11: 3-9.
- Costa, J. C., Lilley, C. J., Urwin, P. E. 2007. *Caenorhabditis elegans* as a model for plant-parasitic nematodes. In: *Nematology*, pp: 3-16.
- Decker, H. 1989. Plant nematodes and their control (Phytonematology). Sveshnikova, N. M. (ed). BRILL. Nueva York.
- Degenkolb, T., Vilcinskis, A. 2016. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 100: 3813-3824.
- Demain, A. L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69: 1-39.
- Díaz -Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Dalla-Rizza, M. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean journal of agricultural research* 71: 231-239.
- Djonovié, S., Pozo, M.M., Kenerley, C. M. 2006. Tvbn3, a beta- 1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7661-7670.
- Dowe, A. 1987. Räuberische Pilze und andere plizliche Nematodenfeinde. 2. neubearbeitete Auflage, Die Neue Brehm-Bücherei 449. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg.

- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Sid-Ahmed, A., Requena, M. E., Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Fernández-Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Costa Rica. Manejo integrado de plagas* 62: 96-100.
- Garibay-Orijel, R. Cifuentes, J., Estrada-Torres, A., Caballero, J., 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-67. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. México, Puebla. 648 pp.*
- Garibay-Oriel, R., Ruan-Soto, F., Estrada-Martínez, E. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el desarrollo del aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. En: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. México, Puebla. 648 pp.*
- Garibay-Orijel, R., Ruan-Soto, F. 2014. Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. Editores: Moreno-Fuentes, A., Garibay-Orijel, R. *La etnomicología en México: estado del arte, Red de Etnoecología y Patrimonio Biocultural-Asociación Etnobiológica Mexicana-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-Universidad Autónoma de México, México: 99-120.*
- Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity & Conservation* 7: 369-384.

- Guzmán, G. 2007. Variabilidad, producción e importancia de los hongos en la naturaleza. En: El maravilloso mundo de los hongos. Primera edición. Editores: Zulueta-Rodríguez, R., Trejo-Aguilar, D., Trigos-Landa, A. R. México, Ver.
- Harris, C. A., Renfrew, M. J., Woolridge, M. W. 2001. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Additives and Contamination* 18: 1124-1129.
- Hernández, F. D., Carvajal, C. R., Guerrero, E., Sánchez, A., Gallegos, G., Lira, R. H., 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo del hongo de *Rhizoctonia solani* Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*: 259-269.
- Hiromoto, B. 2000. Composition having nematicidal activity. US6048714A. Disponible en: <http://www.google.sr/patents/US6048714>
- Hussey, R. S., Janssen, G. J. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Plant resistance to parasitic nematodes. Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. (eds). CAB International, United Kingdom. 43-70 pp.
- Hutchinson, L. J. 1991. Description and Identification of Cultures of Ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.
- Hwang, E. I., Yun, B. S., Kim, Y. K., Kwon, B. M., Kim, H. G., Lee, H. B., Jeong, W., Kim, S. U. 2000. Phellinsin A, a novel chitin synthase inhibitor produced by *Pellinus* sp. PL3. *The Journal of antibiotics* 53: 903-911.
- Inbar, Y., Boen, M. J., Hoitink, H. A. J. 1991. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Phytophthora ultimum*. *Soil biochemistry* 23: 479-483.
- INEGI. 2015. Panorama sociodemográfico de San Luis Potosí 2015.

- Jansson, H. B., López-Llorca, L. V. 2004. Control of nematodes by fungi. In: Arora, D. K. (ed) Fungal Biotechnology in agriculture, food, and environmental applications. Marcel Dekker, New York. 205-215 pp.
- Jiménez-Zárate, J. 2017. Etnomicología en la región náhuatl de San Luis Potosí: Importancia cultural y propiedades bioquímicas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. México.
- Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 38: 423-441.
- Kikot, G. E., Hours, R. A., Alconada, T. M. 2008. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. Journal of Basic Microbiology 49: 231-241.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemical. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 3713-3717.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H., Yun, J. W. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Letters in Applied Microbiology 34: 56-61.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A. 2008. Dictionary of fungi. Décima edición. CABI. Wallingford, UK.
- Kjeldahl, J. 1883. New method for determination of nitrogen in organic substances. Zeitschrift für analytische Chemie, 22: 366-383.
- Ko, W. H., Tsou, Y. J., Lin, M. J., Chern, L. L. 2010. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. New biotechnology 27: 397-402.

- Kornerup, A., Wanscher, J. H. 1967. Methuen Handbook of Colour. 1967. Segunda Edición.
- Kues, U., Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 141-152.
- Li, G. H., Zhang, K. Q. 2014. Nematode-Trapping Fungi. Zhang, K., Q., Hyde, K. D. (eds). Springer Science and Business. Nueva York. 392 pp.
- Li, G., Zhang, K., Xu, J., Dong, J., Liu, Y. 2007. Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology* 1: 1-22.
- Lin, J. H., Yang, S. S. 2006. Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murrill by submerged fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 39: 98-108.
- Lindequist, U., Teuscher, E., Narbe, G. 1990. Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. *Z Phytother* 11: 139-49.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., Jülich, W. D. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2: 285-299.
- Lizcano-González, M. C. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotium*. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá.
- López-Llorca, L. V., Jansson, H. B. 2006. Fungal parasites of invertebrates: multimodal biocontrol agents. In: *Exploitation of fungi*. Robson, G. D., VanWest, P., Gadd, G. M. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 310-335.
- Manzanilla-López, R. H., Kenneth, E., Bridge, J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In: *Nematology- advances and perspectives. Nematode management and utilization Volume II*. Chen, Z. X., Chen, Z. Y., Dickson, D. W. (eds). CABI publishing. Cambridge, MA, pp 637-716.



- Márquez-Rocha, F. J., Guillen, N. G. K., Sanchez, J. E. V., Varquez-Duhalt, R. 1999. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Techniques* 13: 29-32.
- Martínez-Carrera. 2002a. Current Development of Mushroom Biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada International* 14: 61-74.
- Martínez-Carrera. 2002b. Mushroom. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology*. Novena edición. Mc-Graw-Hill, Inc. Nueva York.
- Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P. Mora, M. 2010. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. México, Puebla. 648 pp.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestible. En: *El cultivo de las setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez, J. E., Martínez-Carrera, D., Mata, G., Leal, H. (eds). ECOSUR-CONACYT. México, D. F.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., Mayett, M. 2012. Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. En: *Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo (Agrociencias)*. Academia Mexicana de Ciencias, México, D. F.
- Mata, G., Gaitán-Hernández, R., Pérez-Merlo, R., Ortega, C. 2002. Improvement of shiitake spawn for culturing on pasteurized wheat straw. In: *Mushroom Biology and Mushroom products*. Sánchez, J. E., Huerta, G., Montiel, E. (eds). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 303-309 pp.

- Mata, G., Gaitán-Hernández, R., Salmenes, D. 2007. Hongos comestibles en México, una industria en crecimiento. En: El maravilloso mundo de los hongos. Primera edición. Editores: Zulueta-Rodríguez, R., Trejo-Aguilar, D., Trigos-Landa, A. R. México, Ver.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Song, S. F. 2002. Antioxidant of several specialty mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6072-6077.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J., Caballero, J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche national park, Mexico. *Fungal Diversity* 17: 115-143.
- Moreno-Fuentes, A. 2014. Un recurso alimentario de los grupos originarios y mestizos de México: los hongos silvestres. *Anales de Antropología* 48: 241-272.
- Nabubuya, A., Muyonga, J. H., Kabasa, J. D. 2010. Nutritional and Hypocholesterol Properties of *Termitomyces microcarpus* mushrooms. 2010. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development* 10: 2235-2257.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., den Nijs, L., Hockand, S., Tahna Maafi, Z. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds) *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer, Dordrecht. 21-43 pp.
- O' Brein, B. L., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544-5550.
- Osorio-Hernández, E., Rodríguez-Herrera, R., Hernández-Castillo, F. D. 2009. *Trichoderma* spp., una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. CIENCIACIERTA 17. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC17/cc17trichoderma.html>
- Piña-Vázquez, D. M., Mayoral-Peña, Z., Gómez-Sánchez, M., Salazar-Olivo, L. A., Arellano-Carbajal, F. 2017. Anthelmintic effect of *Psidium guajava* and

- Tagetes erecta* on wild-type and Levamisole-resistant *Caenorhabditis elegans* strains. *Journal of Ethnopharmacology* 202: 92-96.
- Pointing, S. B., Jones, E. B. G., Vrijmoed, L. L. P. 2000. Optimization of Laccase Production by *Pycnoporus sanguineus* in Submerged Liquid Culture. *Mycologia* 92: 139-144.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Radhajeyalakshmi, R., Velazhahan, R., Prakasam, V. 2012. In vitro evaluation of solvent extracted compounds from edible macromycetes against phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45: 293-300.
- Regaieg, H., Ciancio, A., Horrigue, N. H., Brasso, G., Rosso, L. 2010. Effectos of culture filtrates from the nematyophagus fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 2285-2289.
- Reinoso, R., Cajas-Madriaga, D., Martínez, M., San Martín, A., Pérez, C., Fajardo, V., Becerra, J. 2013. Biological activity of macromycetes isolated from chilean subantarctic ecosystems. *Journal of the Chilean Chemical Society* 58: 2016-2019.
- Renčo, M. 2013. Organic amendments of soil as useful tools of plant parasitic nematodes control. *Helminthologia* 50: 3-14.
- Ruan-Soto, F. 2005. Etnomicología en la selva lacandona: percepción, uso y manejo de hongos en Lacanjá-Chansayab y Playón de la Gloria. El Colegio de la Frontera Sur, Tesis de Maestría, San Cristóbal de las Casas.
- Ruan-Soto, F., Garibay-Orijel, R., Cifuentes, J. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2: 3.

- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Primera Edición. Editorial Limusa, México.
- Sánchez, J. E., Mata, G. 2012. Cultivo y aprovechamiento de macromicetos. Una tendencia global en crecimiento. En: Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Primera edición. México.
- Schnürer, J., Rosswall, T. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. Applied and Environmental Microbiology 43: 1256-1261.
- Sempere, F., Santamarina, M. P. 2007. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. Mycopathologia 163:183-90.
- Shimada-Miyazaka, A. 2003. Nutrición animal. Primera edición. Editorial Trillas. México, D. F.
- Sidorava, I. I., Velikaonv, L. L. 2000. Bioactive substances of agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco- and microbiota structure in soils of forest ecosystems. I. Antibiotic activity of water extracts from basidioms of several dominant agaricoid basidiomycetes. Mikol Fitopatol 34: 11-17.
- Stalpers, J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. Studies in Micology 16.
- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Tercera edición. Ten Speed Press. Berkley, California. 574 pp.
- Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Problems, progress and prospects. CAB International, Wallingford, UK.
- Suárez-Medellín, J. M., Guadarrama-Acosta, F. L., Trigos, A. 2007. Los hongos... ¿Alimentos milagrosos?. En: El maravilloso mundo de los hongos. Primera

- edición. Editores: Zulueta-Rodríguez, R., Trejo-Aguilar, D., Trigos-Landa, A. R. México, Ver.
- Swisher, R., Carroll, G. C. 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbiology and Ecology* 6: 217-226.
- Szöllősi, R., Szöllősi-Varga, I. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (adaptation of FRAP method). 2002. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 125-127.
- Terashita, T., Hirata, S., Yoshikawa, K., Shishiyama, J. 1997. Effect of storage spawn on mycelial growth, fruit-body formation and mycelial constituents of the shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Environmental Control in Biology* 35: 283-292.
- Tovar del Río, J. 2013. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Tucker, K. G., Thomas, C. R. 1994. Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentation broth. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* 71: 111-117.
- Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229-235.
- Yumaya, K. T., Pereira, J., Maki, C. S., Ishikawa, N. K. 2013. *Daldinia eschscholtzii* (Ascomycota, Xylariaceae) isolated from the Brazilian Amazon: taxonomic features and micelial growth conditions. *Acta Amazónica* 4: 1-8.5
- Zasada, I., Avendano, F., Li, Y. C., Logan, T., Melakeberhan, H., Koenning, S. R., Tylka, G.L. 2008. Potential of an alkaline-stabilized biosolid to manage nematodes: case studies on soybean cyst and root-knot nematodes. *Plant Disease* 92: 4-13.

Zouhar, M., Douda, O., Nováková, J., Doudová, E., Mazáková, J., Wenzlová, J., Ryšánek, P., Renčo, M. 2013. First report about the trapping activity of *Stropharia rugosoannulata* acanthocytes for Northern root-knot nematode. Helminthologia 2: 127-131.

## CAPÍTULO VII. ANEXOS

### **Anexo 1. Solución FRAP (buffer de acetato de sodio / TPTZ / FeCl<sub>3</sub> (10 : 1 : 1 v/v/v)).**

- Buffer de acetato de sodio 300 mM

Se disolvió 1.7227 g de acetato de sodio (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) en 35 ml de agua destilada, con ayuda de un agitador magnético. Posteriormente se midió el pH de la solución, y ésta se ajustó a un pH de 3.6 añadiendo ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) concentrado. Se aforó a 70 ml con agua destilada.

- TPTZ 10 mM

Se pesó 0.0312 g del reactivo TPTZ (2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina) y se disolvió en 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM. El recipiente que contenía esta solución fue cubierto con papel aluminio.

- Cloruro de hierro (III) 20 mM

Se disolvió 0.324 g de cloruro de hierro (III) (FeCl<sub>3</sub>) en 10 ml de agua destilada. Debido a la fotosensibilidad del reactivo, el frasco se cubrió con papel aluminio.

## Anexo 2. Caracterización de cepas

### CARACTERES

1. Tasa de crecimiento
2. Zona de avance
3. Textura del micelio
4. Color de la colonia
5. Color del reverso / agar
6. Color de las hifas
7. Diámetro de las hifas (ancho)
8. Diferenciación morfológica de las hifas
9. Distribución de las fíbulas
10. Tipo de fíbulas
11. Estructuras de propagación

### DESCRIPCIÓN DE CARACTERES

1. TASA DE CRECIMIENTO (Hutchinson, 1991; Stalpers, 1978)

Crecimiento del diámetro de la colonia, dado en centímetros por día (cm/día)

2. ZONA DE AVANCE (marginal / margen) (Hutchinson, 1991; Stalpers, 1978)

En el mero margen, la colonia puede estar:

- a) **Sumergida:** Creciendo en el agar
- b) **Adpresa:** Postrada sobre la superficie
- c) **Alzada**

Algunas especies poseen colonias con crecimiento:



- a) **Circular**
- b) **Irregular**

Las hifas pueden crecer tan densamente que las “puntas” individuales no se pueden ver a simple vista en la caja a contraluz, o pueden estar tan distantes como para parecer “fimbriadas” (como pelitos). El contorno del margen puede ser uniforme, pero en ocasiones puede ser como “flecós” o “ensamblado”.

El medio de cultivo frecuentemente influye el grado en que las especies exhiben características particulares.

### 3. TEXTURA DEL MICELIO (micelio aéreo) (Stalpers, 1978)

Ésta es descrita por uno, o más, de los siguientes términos:

- a) **Ausente:** Micelio sumergido solamente. La superficie del agar puede ser uniforme / liso o como “gamuza”.
- b) **Velloso:** Con hifas: finas, cortas o erectas. Generalmente toda la colonia es transparente.
- c) **Farináceo:** harinoso / polvoriento.
- d) **Granular:** Cubierto con granos diminutos.
- e) **Sedoso / suave:** Con hifas largas, radialmente paralelas, o en paquetes / manojos, más o menos postrado, a menudo “brillante”.
- f) **Algodonoso:** Hifas bastante largas, simples, dispersas en todas direcciones.
- g) **Lanoso:** Hifas (o grupo de hifas) bastante largas entrelazadas, algo enmarañadas, parecido a la tela de la lana.
- h) **Flocoso:** Pequeños mechones hifales, que sobresalen del agar o del micelio aéreo.
- i) **Plumoso:** Mechones miceliales con hifas largas o cortas, o grupo de hifas radiales desde el eje central, a menudo en un arreglo como de “ventilador”.

- j) **Pelicular:** Cubierto con micelio delgado, escaso, coherente.
- k) **Felty:** Micelio algodonoso o lanoso que se ha enmarañado o empaquetado; hifas ausentes emergentes.
- l) **Aterciopelado:** Micelio denso, de hifas derechas y erectas, usualmente cortas.
- m) **Costroso:** Las hifas forman una costra dura y sólida, usualmente café oscuro, aunque algunas veces es color crema o blanca.
- n) **Lacunoso:** Superficie micelial deprimida o mellada (dañada, disminuida).
- o) **Zonado:** Con bandas concéntricas o segmentos de diferentes texturas.

#### 4. COLOR DE LA COLONIA (Hutchinson, 1991; Stalpers, 1978)

- a) **Incoloro**
- b) **Blanco**
- c) **Crema**
- d) **Amarillento u ocráceo**
- e) **Marrón**
- f) **Anaranjado o rojizo**
- g) **Rosa, lila pálido, azul, vinoso o violáceo**

#### 5. COLOR DEL REVERSO / AGAR (Hutchinson, 1991; Stalpers, 1978)

Se refiere al cambio de color del agar, por debajo del micelio, inducido por el hongo. Éste podría no cambiar (color original del medio), aclararse u oscurecerse.

#### 6. COLOR DE LAS HIFAS (Hutchinson, 1991)

La mayoría de los hongos posee hifas hialinas, pero podría haber excepciones.

## 7. DIÁMETRO DE LAS HIFAS (ANCHO) (Stalpers, 1978)

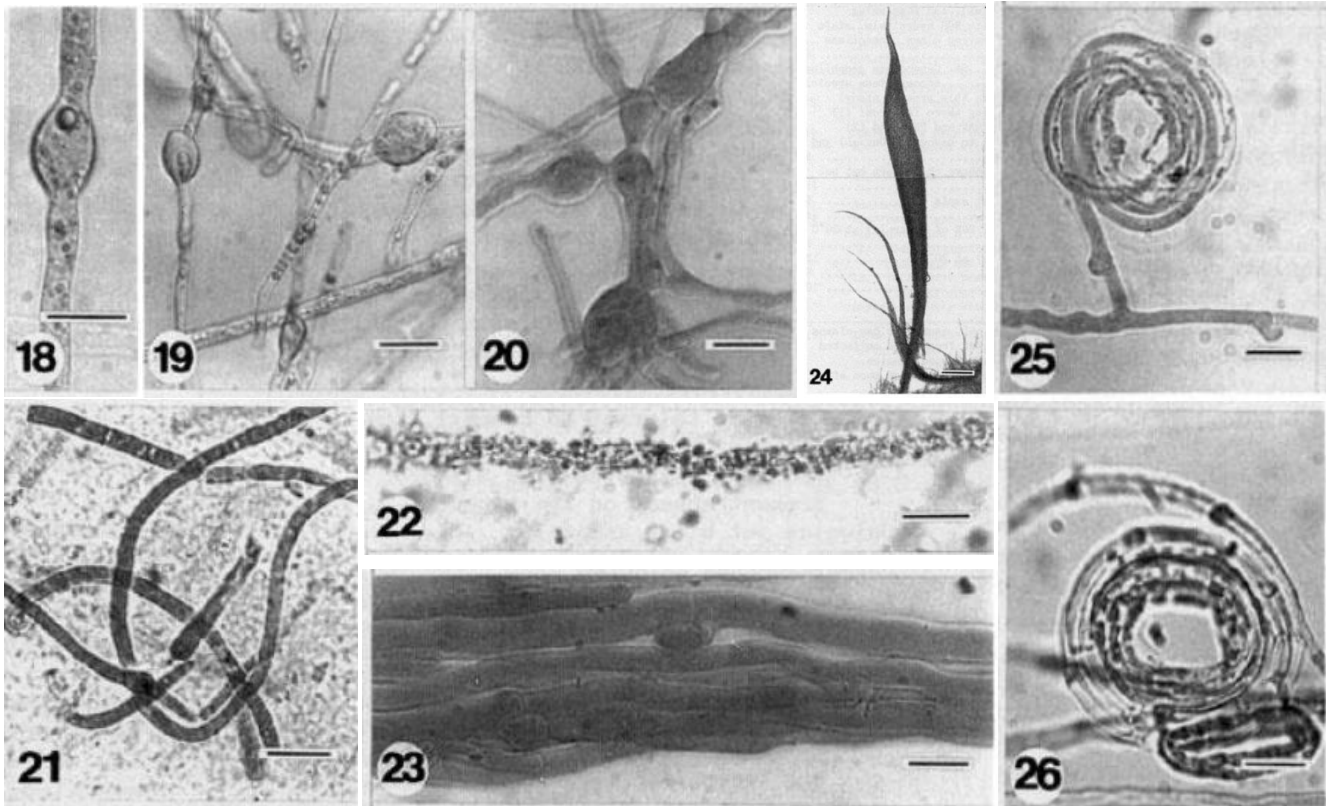
Se han evaluado cinco intervalos:

- a)  $\leq 1.5 \mu\text{m}$
- b)  $1.5 - 3 \mu\text{m}$
- c)  $3 - 5 \mu\text{m}$
- d)  $5 - 7.5 \mu\text{m}$
- e)  $\geq 7.5 \mu\text{m}$

En la mayoría de los casos, el ancho de las hifas corresponde a los grupos a o b.

## 8. DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS HIFAS (Hutchinson, 1991)

- a) **Comúnmente se producen protuberancias.** Frecuentemente han sido confundidas con *clamidosporas*, o en algunos casos, con *conidias*. Éstas pueden ser inducidas por la edad de la hifa y pueden ser más frecuentes en un medio que en otro, para algunas especies. Las protuberancias pueden ser terminales, pero comúnmente son intercalares. Nunca se rompen y siempre son hialinas y de pared delgada (18-20).
- b) **“Cuerdas funiculosas”.** Consiste en hifas aéreas agregadas como en hebras de cuerda. Son características de la sección *Lactarius* (24).
- c) **“Hilos hifales”.** Consiste en largos hilos de hifas aéreas, que generalmente se encuentran adpresas en la superficie de la colonia (23).
- d) **Hifas enroscadas.** Se producen irregularmente (25-26).
- e) **Hifas oleíferas.** En su interior contienen material lipídico, lo que les imparte un índice de refracción diferente, en comparación con las hifas vegetativas adyacentes (21).
- f) **Hifas incrustadas.** Usualmente se encuentran asociadas a hifas *sumergidas* de aquellos hongos que liberan pigmentos fenólicos marrones dentro del agar. Estos cristales generalmente consisten en agregaciones de oxalato de calcio (22).



## 9. DISTRIBUCIÓN DE LAS FÍBULAS (Stalpers, 1978)

La distribución de las hifas generalmente es considerada por tener una mayor importancia taxonómica. Es constante dentro de una especie, y generalmente también dentro de un género, al menos que el hongo regrese a su condición haploide (Nota: los septos secundarios, que pueden ocurrir en todas las especies, nunca tienen fíbulas).

Se pueden reconocer cuatro grupos:

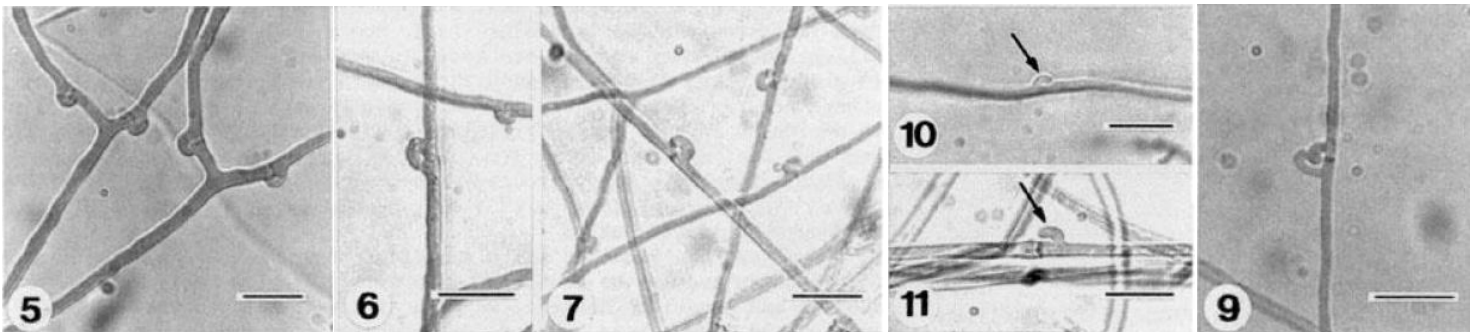
- a) **Fíbulas presentes en todos los septos.**
- b) **Fíbulas ausentes o “raras” en la zona de avance**, pero presentes en casi todos los otros septos (algunas hifas amplias pueden tener septos sin fíbulas).

- c) **Fíbulas de ocurrencia errática o rara**, cuando están presentes, usualmente es en las hifas más anchas. Puede haber más de una fíbula en cada septo (fíbulas múltiples, fíbulas en espirales).
- d) **Fíbulas ausentes**. Las fíbulas pueden brotar tras el cierre; una hifa lateral crece de una fíbula. La forma de la fíbula puede variar. El ángulo entre la fíbula y la hifa puede ser más amplio de 90° (fíbula ligeramente curvada) o alrededor de 90° (fíbula abruptamente curvada). La longitud del ancho del radio puede ser de dos (fíbula corta), o más larga (fíbula larga).

#### 10. TIPO DE FÍBULAS (Hutchinson, 1991)

- a) **Simple** (5)
- b) **Con forma de *dona*** (6,7)
- c) **Pseudo-fíbulas (incompletas)** (10,11)

\*Podrían haber algunas *anormalidades* (9)



#### 11. ESTRUCTURAS DE PROPAGACIÓN (Stalpers, 1978)

- a) **Clamidosporas**: Esporas intercalares o terminales, que típicamente tienen paredes gruesas o engrosadas. Usualmente son solitarias y más abundantes en micelio sumergido, que en micelio aéreo.

- b) **Blastoconidia:** La conidia es una estructura recién formada y la parte inicial de la conidia usualmente se alarga antes de que se forme un septo basal (mohos).
- c) **Artroconidia:** Una hifa se convierte en muchas conidias. Éstas son típicamente cilíndricas - a menudo llamadas después *oidios* - o podría ponerse redonda en los extremos después de la liberación. En algunos casos la artroconidia podría ser elipsoidal, de paredes gruesas y pigmentadas antes de la liberación.
- d) **Conidióforos:** Sólo están presentes en algunas especies con blastoconidias.
- e) **Basidiocarpos:** Generalmente no se forman en cultivos puros, al menos no dentro de las seis semanas. Sin embargo, en algunos géneros aparecen regularmente.

### **Anexo 3. Soluciones para la estimación de la biomasa en sustrato mediante la hidrólisis del FDA**

#### Solución madre

Se disolvieron 2 g de FDA por cada litro de acetona. Una vez preparada la solución, ésta se guardó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Tampón fosfato de potasio

Se disolvieron 8.7 g de fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) en 500 ml de agua destilada; a parte, se disolvió 1.3 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en 500 ml de agua destilada. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones, y la solución final se ajustó a un pH de 7.6. Este tampón se esterilizó durante 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

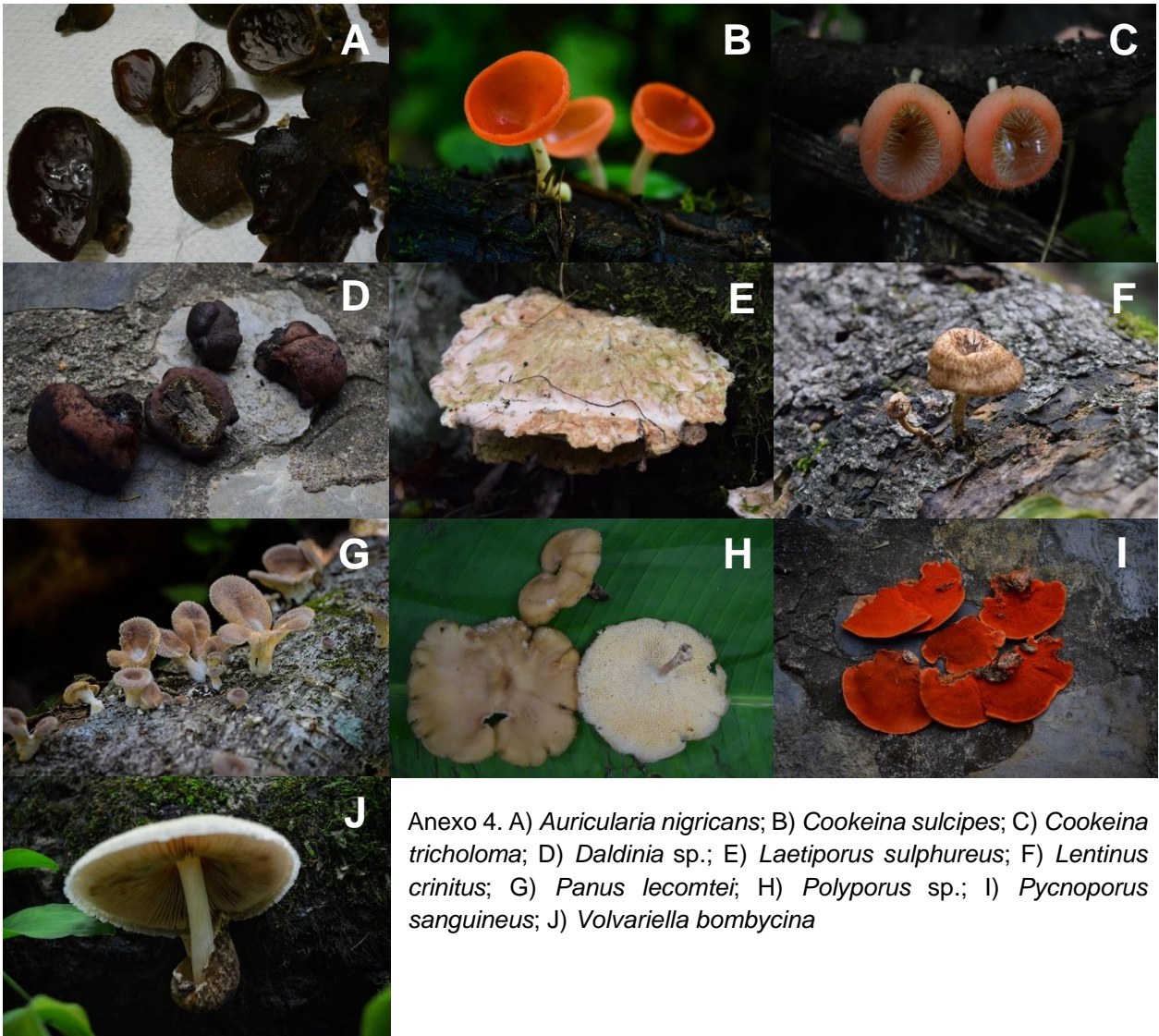
#### Reactivo FDA

Se disolvió 0.5 ml de solución madre en 100 ml de tampón fosfato de potasio estéril. Este reactivo se preparó justo antes de cada ensayo.

#### Reactivo "A"

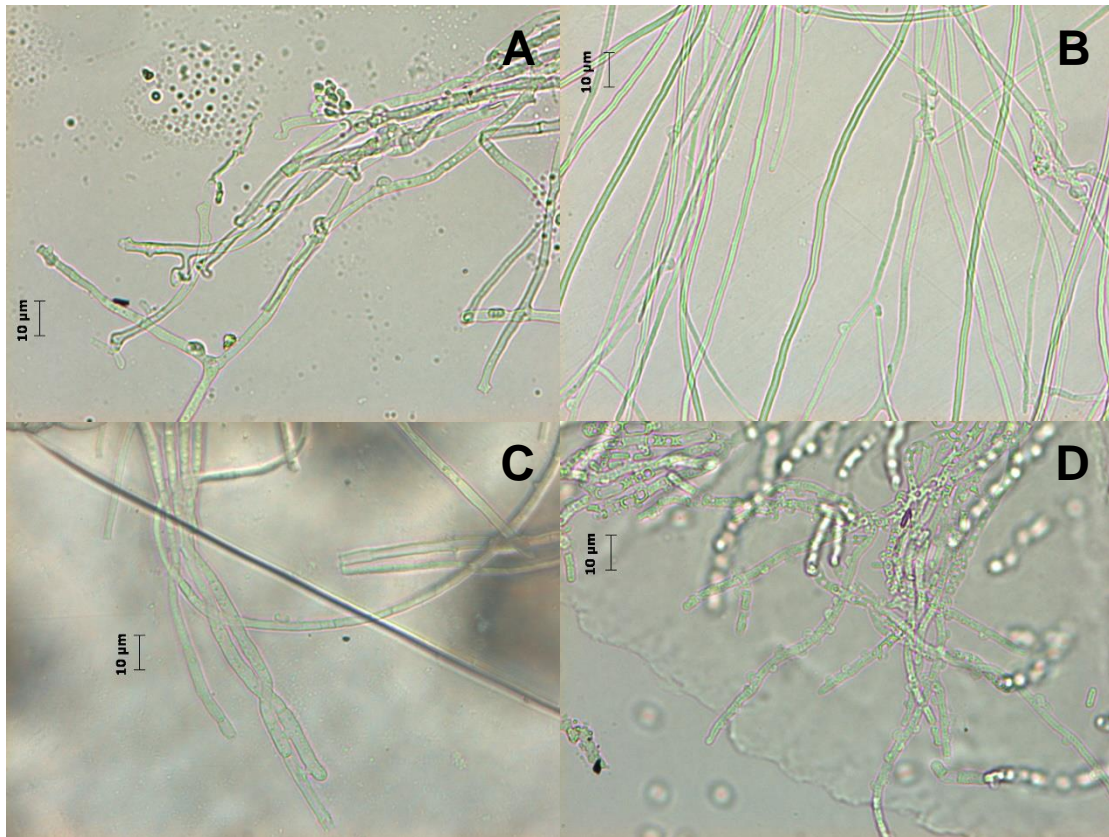
Se tomaron 3 ml de solución madre y se ajustó a 100 ml con tampón fosfato de potasio estéril. Finalmente, el reactivo se hirvió durante 30 minutos. Éste fue almacenado en un frasco oscuro y en refrigeración.

## Anexo 4. Especies colectadas





## Anexo 5. Microscopías



Anexo 5. A) Hifas de *Lentinus crinitus*; B) Hifas de *Panus lecomtei*; C) Hifas de *Phillipsia domingensis*; D) Hifas de *Pycnoporus sanguineus*