

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**“AISLAMIENTO DE CEPAS DE *VOLVARIELLA VOLVACEA*
RECOLECTADA SOBRE BAGAZO DE MAGUEY TEQUILERO”**

**TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD:
TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:
JUAN JESÚS RUELAS MEDINA.**

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. CONRADO SOTO VELAZCO.**

**ASESOR:
DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA**

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, MARZO DE 2009



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1378/ C. C. BIOLOGÍA

C. Juan Jesús Ruelas Medina

PRESENTE

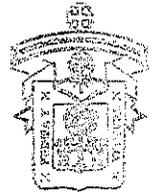
Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “Aislamiento de cepas de *Volvariella volvacea* recolectada sobre bagazo de maguey tequilero” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el **M.C. Conrado Soto Velasco** y como asesor la **Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 19 de septiembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**Aislamiento de cepas de *Volvariella volvacea* recolectada sobre bagazo de maguey tequilero**" que realizó el pasante **Juan Jesús Ruelas Medina** con número de código **39551643** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA".
 Las Agujas, Zapopan., 29 de enero de 2009

Firma 
M.C. Conrado Soto Velazco
 Director/a del trabajo,

Firma 
Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula
 Asesora



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Sergio Fausto Guerra		11/02/09.
Isela Leticia Alvarez Brisas		13/02/09
Luis Villalobos I		13/02/09
Supl. Josefina Casas Solís		13/02/09

Agradecimientos.

A mis padres y hermanos que son el pilar más fuerte en el cual me sostengo...

A mis amigos que siempre me estuvieron apoyando en especial la Karina y su esposo Ernesto.

Al Biólogo Jorge García López compañero y amigo por sus consejos y respaldo que me sirvieron para comprender que con trabajo y dedicación todo sale adelante.

A la Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula por su amistad y valiosos conocimientos, asesoría y apoyo que contribuyeron a la realización del trabajo de tesis.

Al M. C. Comrado Soto Velasco por haberme dado la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de titulación aprendí mucho de usted.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones al proyecto.

A todos mis maestros que me otorgaron apoyo en toda mi formación académica en especial a la maestra Rossi y Enrique.

***“Haz aquello que sea lo mejor
que haya que hacer.”***

Marco Tulio Cicerón.

Índice general.

Contenido

Página

Resumen.	
1. Introducción	1
2. Generalidades	4
2.1 Morfología y Ciclo Biológico de <i>V. volvacea</i>	4
2.2 Distribución y Ecología de <i>V. volvacea</i>	5
2.3 Preservación	6
3. Antecedentes	6
3.1 Aislamiento de cepas	7
3.2 Medios de Cultivos para la Producción de Biomasa	8
3.3 Cultivo de <i>V. volvacea</i> en residuos agroindustriales	9
4. Planteamiento del problema	11
5. Hipótesis	12
6. Objetivos	13
6.1 General	13
6.2 Específicos	13
7. Material y métodos	14
7.1 Recolección de la muestra	15
7.2 Determinación morfológica de la especie	15
7.3 Características microscópicas de los ejemplares recolectados	15
7.4 Aislamiento y mantenimiento de las cepas	15
7.5 Características macroscópicas de las cepas aisladas	16
7.6 Características microscópicas de las cepas aisladas	16
7.7 Evaluación de Micelio	17
7.8 Cuantificación de Biomasa	17
7.9 Cambios de pH durante el crecimiento de las en los medios de cultivo líquido	18

Índice de figuras.

Contenido	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Volvariella volvacea</i> -----	5
Figura 2. Diagrama de flujo para el aislamiento y cuantificación del micelio de <i>Volvariella volvacea</i> -----	14
Figura 3. Condiciones del sitio de recolección-----	19
Figura 4. <i>V. volvacea</i> creciendo en sustrato de coloración oscura-----	20
Figura 5. Basidiocarpos recolectados de <i>V. volvacea</i> en bagazo de maguey tequilero-----	22
Figura 6. Esporas observadas en el microscopio-----	23
Figura 7. Basidios observados en el microscopio-----	24
Figura 8. Aislamiento de las cepas-----	25
Figura 9. Tipos de células precursoras de clamidosporas-----	27
Figura 10. Fotomicrografía 40x mostrando hifas semirrectas-----	28
Figura 11. Clamidosporas aisladas en las cepas de <i>V. volvacea</i> -----	29
Figura 12. Velocidad de crecimiento de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio PFA-----	30
Figura 13. Velocidad de crecimiento de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio EMA-----	31
Figura 14. Velocidad de crecimiento de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio JRA-----	31
Figura 15. Velocidad de crecimiento de la cepa Vv1 en los tres medios de cultivo inoculados-----	32
Figura 16. Velocidad de crecimiento de la cepa Vv2 en los tres medios de cultivo inoculados-----	33
Figura 17. Producción de biomasa de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio PF-----	34
Figura 18. Producción de biomasa de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio EM-----	35
Figura 19. Producción de biomasa de las cepas de <i>V. volvacea</i> en el medio JR-----	36
Figura 20. Producción de biomasa para la cepa Vv1 en los tres medios de cultivo inoculados-----	37
Figura 21. Producción de biomasa para la cepa Vv2 en los tres medios de cultivo inoculados-----	38
Figura 22. Variación del pH de los medios líquidos de cultivo en la cepa Vv1-----	39
Figura 23. Variación del pH de los medios líquidos de cultivo en la cepa Vv2-----	39

Índice de cuadros

Contenido	Página
Cuadro 1. Ubicación taxonómica de <i>V. volvacea</i> -----	2
Cuadro 2. Registro de localidades encontrados en el herbario de micología (IBUG)-----	21
Cuadro 3. Aislamientos de píleo y estípite-----	25
Cuadro 4. Aspecto morfológico del micelio de las cepas Vv1 y Vv2-----	26

RESUMEN.

Entre las especies de *Volvariella* (Fungi, Basidiomycota, Agaricales) con mayor importancia económica destaca *V. volvacea* al ser un hongo comestible apreciado principalmente en el continente asiático. En México, aún no es una especie cultivada y producida a escala industrial, aunque crece silvestre sobre diversos desechos agroindustriales parcialmente degradados. En el presente estudio se recolectaron y determinaron ejemplares desarrollados en bagazo de maguey tequilero parcialmente fermentado de la región de Tequila, Jalisco. Como primer paso se aislaron cepas a partir del plecténquima de estípites y píleos de hongos silvestres. Se obtuvieron cinco cepas, de las cuales se eligieron solamente dos de ellas para el estudio. Las cepas Vv1 y Vv2 demostraron tener similitudes en cuanto al crecimiento micelial en medio sólido y en los tres tratamientos empleados para el cultivo de micelio en medio líquido, demostraron ser igualmente efectivos, con ello, se demuestra que es posible llevar a cabo un aislamiento y propagación masiva de biomasa a partir de ejemplares silvestres desarrollándose en bagazo de maguey en fermentación y con esto lograr establecer cepas puras que permitan en un futuro, la explotación industrial de la especie.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos y bacterias contribuyen a la degradación de residuos orgánicos con lo que ayudan a un desarrollo sustentable permanente favoreciendo la renovación de ecosistemas con la reducción de biocontaminantes, por ejemplo, desechos agroindustriales transformándolos en alimento para animales y humanos; o en abonos para las plantas (Baena, 2005).

Se calcula que existen unas 200 especies de hongos comestibles de las cuales destacan las especies saprobias tales como *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* y *Volvariella*. Al género *Volvariella* se adscriben diversas especies de hongos comestibles que se caracterizan por poseer la esporada y láminas de color rosa y el estípite o pie con volva en su base (Vázquez y Guzmán-Dávalos, 1991). Entre las especies de *Volvariella* con mayor importancia económica destaca *V. volvacea* (Bull.) Singer., conocido comercialmente como "paddy Straw mushroom", "chinese mushroom" u "hongo de la paja", ya que ocupa el cuarto lugar en producción mundial. Tales cultivos aportan cerca del 6% de la producción mundial de hongos comestibles.

En México crece silvestre sobre diversos desechos agroindustriales parcialmente degradados, como bagazos de caña de azúcar, de henequén, de maguey tequilero, pulpa de café, aserrines y sobre troncos en descomposición de diferentes especies (Agridino y Salmones, 2006). *V. volvacea* pertenece al grupo Basidiomicotina, por lo que se caracteriza por estar conformados por largas ramificaciones de hifas que se reúnen en cordones rizoidales que poseen la capacidad de desdoblarse la materia orgánica como lignina y celulosa de los residuos donde crecen (Carrillo, 2003).

Característicamente desarrollan micelio en suelo o madera por mucho tiempo y en diversas condiciones ambientales como temperatura y humedad. Poseen la capacidad de absorber materia orgánica como lignina y celulosa de los residuos donde crecen (Carrillo, 2003). En tales condiciones se suelen formar cuerpos de reproducción visibles llamados setas,

carporos, cuerpos fructíferos o basidiomas. El nombre científico de este hongo a variado con el tiempo y a sido *Agaricus volvaceus* descrito por Bull., Herb. Fr., pl. 262. en el año de 1978, *Volvariopsis volvacea* (Bull. :Fr.) Murr., N. Amer. Flora **10**: 144. En 1917, nombre *Volvariella volvacea* (Bull.: Fr.) Sing., Lilloa **22**: 401. en 1951, que aparece en la clasificación taxonómica actual (Shaffer, 1957) (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Ubicación taxonómica de *V. volvacea*.

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Eumycota</i>
Clase	<i>Basidiomycetes</i>
Subclase	<i>Holobasidiomycetes</i>
Serie	<i>Hymenobasidiomycetes</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Pluteaceae</i>
Genero	<i>Volvariella</i>
Especie	<i>volvacea</i>

El género ha sido poco estudiado en el Estado de Jalisco desde el punto de vista taxonómico y mucho menos el aislamiento de cepas para realizar cultivos de este hongo como fuente de alimentos no convencionales (Vázquez y Guzmán-Dávalos, 1991); Anteriormente se realizaron estudios comparativos de la cepa aislada mexicana *V. bakeri* (Murrill.) Shafferr y la cepa asiática *V. volvacea* (bull.) Singer., Los resultados demostraron que las características morfológicas macroscópicas y microscópicas confirmaron que

ambas especies son sinónimos y concluyen que el nombre correcto de *V. bakeri* es *V. volvacea* (Martínez-Carrera, *et al.*, 1986; Vela y Martínez-Carrera, 1989).

Es un hongo comestible, recolectado para consumo por campesinos que los reconocen en época de lluvias, con sus nombres comunes: pecho de gavilán, hongo del bagazo, hongo del rastrojo, hongo de la pulpa de café y hongo rosado (Agripino y Salmones, 2006).

V. volvacea contribuye a la economía y la salud de los seres humanos en el sureste de Asia y Madagascar desde hace décadas (Martínez-Carrera *et al.*, 1986). Investigaciones muestran que a partir de un extracto alcaloide frío obtenido del cuerpo fructífero de *V. volvacea*, se logra la extracción de un glucano con una potente actividad inhibitoria del crecimiento de tumores inducidos en ratones (Kishida *et al.*, 2001). También existen indicios de que los extractos de este hongo pueden funcionar como potentes antioxidantes debido a la cantidad de fenoles que se encuentran en la fase líquida del extracto (Cheung *et al.*, 2003).

En México, son escasos los estudios efectuados del cultivo *in vitro* de *V. volvacea* por lo que surge la necesidad de desarrollar técnicas eficientes para el aislamiento y purificación de cepas logradas a partir de especímenes silvestres recolectados en el Estado de Jalisco. Con este estudio se proporcionará la información necesaria para conservar el germoplasma de esta especie de hongo de importancia alimenticia y que en el futuro pueda funcionar para la producción a nivel industrial.

2. GENERALIDADES

2.1 Morfología y Ciclo Biológico de *V. volvacea*.

Este hongo cuando es inmaduro, se asoma como un huevecillo blanquecino cubierto por una membrana o volva, que al crecer se rompe y sale el píleo o sombrero y el resto de la funda queda en la base del pie o estípite. El sombrero mide de 5 a 14 cm de diámetro primero es campanulado, liso y algo mamelonado en el centro de color gris-ocre o parduzco con finas fibrillas oscuras radiales; el himenio presenta láminas libres, blancas que se tornan de color rosa al madurar. Las esporas son de forma ovoide 7-9 x 4-6 μm . En ambiente adverso presentan otro tipo de esporas llamadas clamidosporas de color parduzco de 40-60 μm . Su estípite es fibroso de mas de 2 cm. de diámetro habitualmente encorvado blanquecino y con la base ensanchada y rodeada por el resto de la volva (García, 2003).

El ciclo biológico empieza cuando las basidiosporas germinan, nacen hifas tabicadas con numerosos núcleos haploides en cada compartimento; tales hifas constituyen el gametófito, y son capaces de producir clamidosporas cenocíticas, que forman nuevos individuos de la misma generación; pero, por otra parte pueden fusionarse por plasmogamia, con otras hifas de distinta polaridad, para iniciar un micelio también tabicado, con numerosos núcleos en cada compartimento (pero, en este caso, con una mezcla de núcleos "plus" y "minus"). Este micelio que representa a la generación esporofítica puede, por un lado multiplicarse vegetativamente mediante clamidosporas, de estructura también cenocítica, con núcleos de ambas polaridades. Pero, además, puede reproducirse por vía sexual, diferenciando basidiocarpos, cuyas células basidiógenas contiene curiosamente solo dos núcleos de distinta polaridad. Estos núcleos experimentan cariogamia e inmediatamente meiosis, resultando un basidio normal, con sus cuatro basidiosporas haploides y uninucleadas (Figura 1) (Cocucci y Hunzinker, 1994).

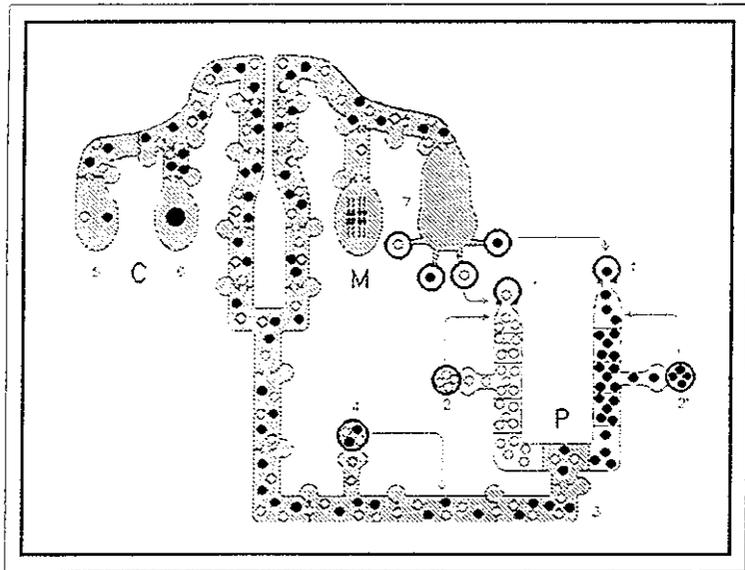


Figura 1. Ciclo biológico de *V. volucae*. Se observa la reproducción asexual formando clamidosporas de la misma polaridad o por medio de hifas mediante plasmogamia (P) de distinta polaridad que dará origen otras clamidosporas con ambas polaridades. Además la reproducción sexual mediante cariogamia (C) de las células basidiógenas y la posterior fase de meiosis (M) resultando un basidio normal.

2.2 Distribución y Ecología de *V. volucae*

Especie de amplia distribución a nivel mundial especialmente al sureste de Asia (China) y parte de África (Madagascar) donde se cultiva con éxito. En Jalisco se ha recolectado en los Municipios de Zapopan, Tlaquepaque, Tala, Tequila y Mazamitla (Vázquez y Guzmán-Dávalos, 1991).

V. volucae prefiere sustratos de azúcares y compuestos de fácil asimilación previamente digeridos por microorganismos descomponedores. Se desarrolla en condiciones de baja intensidad lumínica, así como en ambientes con una humedad relativa de cerca del 80% y temperaturas aproximadas a los 30° C. Por ello es común encontrarlos en zonas tropicales

y subtropicales sobre restos lignocelulósicos como ramas y troncos muertos, así como bagazo de caña de azúcar o de agave (Ahlawat *et al.*, 2004).

2.3 Preservación.

Como primer paso para la preservación de germoplasma, es importante efectuar tanto estudios de recolección clasificatoria de especies como de aislamiento de cepas. Así como esfuerzos para resguardar una amplia colección de cepas de hongos comestibles, con descripción de sus características biológicas, lo que permite la selección, mejoramiento y viabilidad de germoplasma criogenizado, para garantizar la calidad y rendimiento de cepas como se lleva a cabo en la Unidad de Micología del Instituto de Ecología, A. C. (Sobal *et al.*, 2007).

3. ANTECEDENTES

En la actualidad las cepas utilizadas para el cultivo de hongos comestibles provienen de Norte América, Asia y Europa; por lo que desde 1961 se iniciaron investigaciones en Argentina, Brasil, México y Perú para conservar el germoplasma de especies nativas. Estas colecciones incluyen 907 cepas de los géneros *Agaricus*, *Agrocybe*, *Armillariella*, *Auricularia*, *Calvatia*, *Coriolus*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Hohenbuehelia*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Stropharia* y *Volvariella* constituyendo así un número pequeño de cepas aisladas, teniendo en cuenta el tamaño de Latinoamérica (Martínez-Carrera *et al.*, 1999).

Se han desarrollado técnicas para la adaptación de hongos comestibles silvestres a cultivos industrializados utilizan materia prima en este caso desechos agroindustriales; un ejemplo es en Guatemala donde han contribuido a la biotecnología alimenticia y desarrollo sustentable con obtención de datos de temperatura y medios sólidos óptimos para su cultivo *in vitro* y en desechos orgánicos y características macro y microscópicas en laboratorio de una cepa guatemalteca de *V. bakeri* creciendo silvestre en bagazo de citronela (De León, 1985). Un estudio de morfología colonial comparativa de cepas obtenidas de cultivo monosporico de *V. bakeri*

mexicana y *V. volvacea* extranjera mantenidas en agar extracto de malta y posteriormente cultivadas en popotillo de cebada mostraron la misma morfología de la colonia micelial no habiendo diferencias significativas en diámetros hifales y clamidosporas y con esta evidencias presentadas en este estudio se concluye que *V. volvacea* y *V. bakeri* son la misma especie siendo el primero el correcto (Vela y Martínez-Carrera, 1989). En México se ha hecho un estudio de obtención de dos cepas de *V. bakeri* de origen multiesporico estas cepas se estudiaron en seis medios de cultivo sintético analizando el comportamiento y morfología a nivel macro y microscópico donde los mejores resultados fueron en el medio agar extracto de malta y el completo especial para el genero *Volvariella* (Salmones, 1975). Posteriormente se valoraron cepas de *V. volvacea* en restos de hojas de plátano y paja de cebada donde se contrasto el crecimiento micelial in vitro de las cepas IE-653 e IE-106 que alcanzaron promedios de 60.11 cm² y 62.94 cm² al los seis días de incubación (Agripino y Salmones, 2006).

3.1 Aislamiento de cepas.

El micelio de la cepa de hongo de interés se obtiene del aislamiento de cuerpos fructíferos silvestres recolectados por micólogos expertos. El aislamiento vegetativo consiste en tomar fragmentos de tejido vivo de contexto de cualquier parte de un hongo joven o maduro, sano y colocarlo en un medio de cultivo sintético nutritivo adecuado. La cepa pura se obtiene a partir de fragmentos del micelio en crecimiento colocados en un cultivo in vitro, después la cepa pura puede clonarse y mantenerse (Soto y Arias, 2004).

Se ha observado que el medio Agar extracto de Malta es adecuado para el cultivo de cepas de *V. bakeri*, debido a que las colonias cultivadas en este medio presentan micelio denso y clamidosporas; en relación a otros como el medio Sabouraud que si bien presenta buen crecimiento micelial, se observa poco desarrollo del diámetro hifal y de las células precursoras de clamidosporas. Además existen datos de temperatura óptima (32 a 35°C) de crecimiento de micelio de cepas de *V. bakeri*, determinada por el tiempo

necesario para que la caja de Petri se cubra completamente de micelio (Salmones, 1985; De León, 1985).

3.2 Medios de Cultivos para la Producción de Biomasa.

Los sustratos contienen elementos primordiales para el crecimiento y conservación de cepas, tales componentes se pueden agrupar en cuatro categorías:

- a) **Fuentes de nitrógeno:** peptona, caseína, urea, aminoácidos, sulfatos, nitratos de amonio, etc.
- b) **Fuentes de carbono:** glucosa, fructuosa, maltosa, sacarosa, almidón, celulosa, galactosa etc.
- c) **Minerales:** sales de hierro, cobre, magnesio, sodio, potasio y calcio.
- d) **Promotores de crecimiento:** vitaminas, como la tiamina y hormonas como el ácido giberélico.

Entre los productos comerciales disponibles con algunos de estos elementos y específicos para hongos se encuentra el extracto agar malta (EMA) y el papa dextrosa agar (PDA). Sin embargo, se pueden preparar medios de cultivo sencillos tomando atención los elementos indispensables antes mencionados y adicionando agar a la mezcla. Una variable en la elaboración de medios de cultivo consiste en no agregar agar para obtener un medio líquido (Soto y Arias, 2004).

En cuanto a los estudios disponibles de medios de cultivo en hongos al evaluar el potencial osmótico del agua en el crecimiento vegetativo de tres genotipos de *Lentinula edodes* en MYPA (agar malta levadura peptona) se determinó que el micelio creció apropiadamente con un potencial de $-0,5$ MPa, 55% de humedad; mientras que la cepa se mantuvo a temperatura ambiente aproximadamente 27° C en un medio agar extracto de malta (EMA) con un pH de 5,5. Posteriormente, se evaluaron varios medios: agar levadura, extracto de malta y avena (OMYA); agar levadura extracto de malta (MYA) y agar levadura papa dextrosa (PDYA) que mostraron mayor

crecimiento en tiempo por su alto contenido de nitrógeno, proteínas, vitaminas y minerales (Villegas *et al.*, 2007).

Con respecto a la búsqueda de alternativas para la producción de biomasa y bioactivos de forma rápida, económica y confiable se encontró que el cultivo líquido posee ventaja ante los convencionales; donde la clave es desarrollar y reformular nuevos medios de cultivo buscando alternativas viables a la necesidad y poder adquisitivo de cada persona; y donde se evalúa, además, la incidencia de diferentes fuentes de carbono en medio de sales (MS) y medio básico (MB) ambos medios suplementados con 30 g/l de una de las fuentes de carbono. La cepa de *Grifola frondosa* se conservó en medio agar dextrosa papa (PDA) con pH 5,5 a 4° C. Se determinó que MB produce mayor biomasa (Zapata *et al.*, 2007).

Y más aún, el aislamiento y cultivo de tejidos fúngicos en medio Melin Norkrans, mostró que los extractos acuosos de cultivos líquidos de micelio de *Lentinula lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma aplanatum* no son citotóxicos y contienen sustancias con actividad antioxidante; y el primero además contiene actividad inmuno moduladora (Garza *et al.*, 2006).

3.3 Cultivo de *V. volvacea* en residuos agroindustriales.

El cultivo de hongos comestibles en la actualidad es una iniciativa para el desarrollo del sector alimenticio ya que a nivel mundial alcanza una producción de 7 millones de toneladas por año. El volumen de producción anual de hongos comestibles en Latinoamérica mostró un incremento del 32% durante 1995-2001, lo que representó una ganancia económica de 167 millones de dólares al año (García, 2002).

Para el cultivo comercial de *V. volvacea* a diferencia de otras de interés comercial como *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach, se pueden desarrollar a temperaturas cálidas y al aire libre, lo que representa una alternativa productiva para las regiones tropicales y un cultivo idóneo para las zonas rurales, ya que requieren bajos costos de inversión. Se han utilizado materiales lignocelulósicos tan diversos como los desechos de algodón la paja de arroz, lirio acuático y bagazo de caña de azúcar; mezclas

de desperdicios de la cosecha de banano y paja de cebada son también adecuadas para la producción de esta especie, debido quizás a la características del sustrato previamente degradado, en contraste con las mezclas de pseudotallos y paja de cebada frescos, en las que el crecimiento fue lento (Agridino y Salmones, 2006).

Estudios en Nigeria, en residuos agrícolas como medios de cultivo, muestran que esta especie presenta un buen nivel de crecimiento en un amplio rango de desechos celulósicos. Así, mezclas de algodón y cáscara de arroz producen un desarrollo abundante de micelio; mezclas de pericarpio de palma de aceite y cáscaras de nuez, de rastrojo de maíz y cáscaras de nuez presentan un micelio con crecimiento moderado (Akinyele y Adetuyi, 2005).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, son escasos los estudios efectuados en el desarrollo de técnicas para el aislamiento de cepas de hongos comestibles a partir de ejemplares silvestres de *V. volvacea*. Este hongo es de importancia comercial en el continente asiático, de ahí que en estos lugares sea un alimento muy valorado. En el Estado de Jalisco se desconoce el cultivo de esta especie de hongo a pesar que este crece copiosamente en el bagazo de maguey. Por lo que es importante desarrollar trabajos para el cultivo in vitro, proveer datos e información necesaria para la obtención, mejoramiento, y conservación del germoplasma de cepas de importancia alimenticia; que en el futuro pueda funcionar para la producción a nivel industrial.

5. HIPÓTESIS.

El micelio de *V. voluacea* crece de forma natural sobre diversos materiales lignocelulósicos, sin embargo, es de poco vigor y muy fácilmente se fragmenta, por lo que su viabilidad es muy baja si se expone al ambiente. Por lo que se plantea la obtención de micelio de *V. voluacea* por medio del aislamiento de plecténquima a partir de especímenes silvestres que crecen en bagazo de maguey tequilero, para su propagación masiva en medios de cultivo que le ayuden a mantener un periodo de vida mas largo.

6. OBJETIVOS.

6.1 General:

Aislar cepas a partir de ejemplares silvestres de *Volvariella volvacea*, recolectadas sobre bagazo de maguey tequilero y medir la biomasa micelial formada en medios de cultivos.

6.2 Especificos:

- a) Reconocer sitios de recolecta de la especie *V. volvacea* encontrados en bagazo de maguey tequilero.
- b) Obtener in vitro el micelio vegetativo a partir del plecténquima de los ejemplares recolectados.
- c) Determinar la velocidad de crecimiento de los micelios de las cepas aisladas en tres medios de cultivo sólido.
- d) Cuantificar la biomasa micelial obtenida en tres medios de cultivo líquido.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se llevara a cabo para lograr el aislamiento de *V. volvacea* se describe en la (Figura 2).

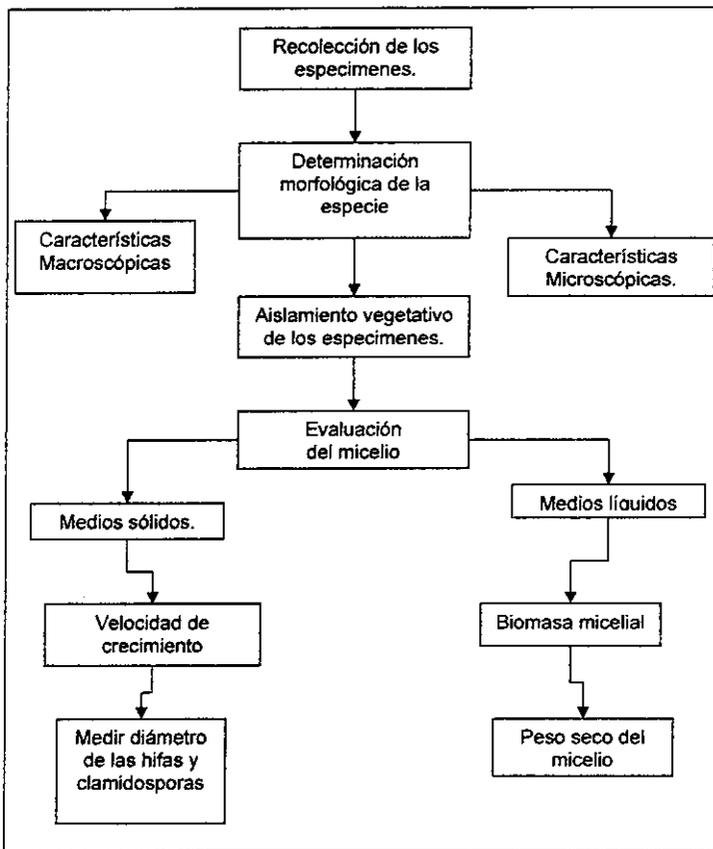


Figura 2. Diagrama de flujo para el aislamiento y cuantificación del micelio de *V. volvacea*.

7.1 Recolección de la muestra.

La extracción de cuerpos fructíferos fue diversas etapas en desarrollo del carpóforo: jóvenes y maduros en buen estado. La recolecta fue en tiraderos de bagazo de maguey sobre la carretera hacia el poblado de Tequila, Jalisco. Se tomaron fotos de los ejemplares y ha todas las localidades. Las muestras se colocaron en una caja de madera y se cubrieron con un costal para evitar maltrato y excesiva deshidratación. Se transportaron a la sala de cultivo de hongos comestibles en el CUCBA.

7.2 Determinación morfológica de la especie.

Para la determinación morfológica de la especie se anotaron las características macroscópicas en fresco de las muestras recolectadas tales como: Tamaño, forma, estructura, color y olor del píleo, margen, láminas, estípites, base, contexto (Deschamps, 2002). Para determinar la especie se emplearon las claves dicotómicas descritas por Gastón-Guzmán 1986; Vázquez y Guzmán-Dávalos, 1991.

7.3 Características microscópicas de los ejemplares recolectados

A partir de ejemplares maduros deshidratados se hicieron cortes en "cepillo" de las láminas, con la ayuda de una navaja. Un fragmento de las láminas se colocó en un portaobjetos al cual se le agregó una gota de KOH (hidróxido de potasio) al 3%; para apreciar mejor las estructuras encontradas se utilizó el reactivo Rojo Congo. Posteriormente se cubrió con un cubreobjeto y se procedió a observar y medir estructuras tales como, basidios y esporas con ayuda de un microscopio Marca Karl Zeiss Modelo k8 a los objetivos 10X, 40X y 100X (Guzmán, 2004).

7.4 Aislamiento y mantenimiento de las cepas

Para el aislamiento de las cepas se desinfectó el material (aguja y pinzas de disección) y la campana de flujo laminar con alcohol etílico 90%. Se encendió la campana 5 minutos antes de empezar y un mechero justo antes de iniciar el aislamiento con el fin de tener un ambiente aséptico y evitar contaminación.

Para el aislamiento se seleccionaron cuerpos fructíferos que mostraron las mejores condiciones. Se limpiaron superficialmente para eliminar el sustrato donde estaban creciendo y se colocaron en una toalla de papel extendida dentro de la campana de flujo laminar. Con las manos limpias y desinfectadas con alcohol, se partió verticalmente cada espécimen desde el pileo hasta la base de la volva. Con la ayuda de una pinza metálica se tomaron fragmentos tanto del contexto hifal (Plecténquima) del centro pileo y estípite, sin tocar el margen para evitar contaminación. En general se tomaron 6 fragmentos de cada porción del cuerpo fructífero los cuales depositaron en cajas de Petri con medio de cultivo a base de harina de papa. Se rotularon con fecha y nombre para cada fragmento de hongo. Posteriormente se incubaron en una estufa a 27° C por tres días o hasta ver la formación de micelio.

Una vez que hubo formación de micelio se procedió a purificar este, ya que algunos fragmentos presentaban signos de contaminación por bacterias. Con la ayuda de una sacabocados de 0.5 cm de diámetro y aguja de disección se tomó un círculo de agar con micelio en progreso (preinoculo), lo más alejado del fragmento de Plecténquima inicial. Este micelio se colocó en un medio de cultivo en el centro la caja de Petri con medio de cultivo de agar con extracto de malta (EMA). Se continuó con la incubación a 27° C por tres días y se repitió el procedimiento hasta obtención de las cepas libres de contaminantes. Para la preservación de las cepas puras se efectuaron transferencias cada 15 días en medio de cultivo EMA (Soto y Arias 2004)

7.5 Características macroscópicas del micelio de las cepas aisladas

En las cepas aisladas y mantenidas en medio EMA se anotaron algunos aspectos de la morfología del micelio, tales como: densidad, micelio aéreo, color y presencia de clamidosporas (Martínez-Carrera, *et al.*, 1986).

7.6 Características microscópicas de las cepas aisladas

Para determinar las características de las hifas de los aislamientos, se tomó una pequeña porción del micelio y se colocó en un portaobjeto. Con la ayuda de una aguja de disección éste se extendió junto con una gota de KOH al 8%. Posteriormente se cubrió con un cubreobjeto y se procedió a medir

clamidosporas e hifas en un microscopio óptico con los objetivos 10X, 40X y 100X, (Vela y Martínez-Carrera, 1989).

7.7 Evaluación del crecimiento Micelio

Con la finalidad de evaluar el crecimiento del micelio sobre tres medios de cultivo: extracto de malta con agar (EMA: Difco), puré de papa fructuosa y agar (PFA) y Fosfatos (JRA) las cepas se sembraron por triplicado en cada uno de ellos. Se tomó un círculo de inóculo de 0.5 cm de diámetro con micelio desarrollado de cada cepa, y se colocó en el centro del medio de cultivo. Se dejaron crecer en incubación a 27° C y con la ayuda de una regla se midió el diámetro del micelio desarrollado cada 24 horas. Para esto se trazaron 2 ejes cartesianos sobre la tapa de la caja, Petri y la medición se realizó hasta obtener cubierto el diámetro de 90 mm de la caja (Vázquez, *et al.*, 2002).

7.8 Cuantificación de Biomasa.

Para cuantificar la biomasa del micelio que se formó en los medios de cultivo anteriores, se realizó el experimento en medios de cultivo sin agar (medios de cultivo líquidos): Fructosa papa (PF), Extracto de malta (EM) y medio completo (JR). El experimento se realizó por triplicado para cada una de las cepas en los tres medios de cultivo.

Para este experimento se utilizaron botellas con capacidad de 250 ml, las cuales se llenaron con 100 ml de medio de cultivo. Se esterilizaron a 121 ° C durante 15 minutos y se dejaron enfriar toda la noche. La inoculación consistió en introducir un fragmento de micelio de 0.5 cm de diámetro, de cada una de las cepas dentro de las botellas. Los recipientes fueron rotulados con fecha y nombre que le corresponda a cada tratamiento y fueron colocadas en un agitador oscilatorio a 120 rpm. El micelio se dejó crecer en un cuarto oscuro y una temperatura ambiente de 27° C. La biomasa se evaluó en tres tiempos: 10, 20 y 30 días. La determinación se hizo por medio de medir el peso seco del micelio expresado en mg/ml. El medio de cultivo líquido fue separado del micelio por medio de filtración con un papel filtro. Se lavó con agua destilada y se colocó en un horno de secado a 50° C durante toda la noche o hasta la obtención de un peso constante (Zapata, *et al.*, 2007). En todos los experimentos fue empleado un diseño estadístico completamente al azar y una

comparación de medias con el análisis de regresión lineal (Agrisino y Salmones, 2006).

7.9 Cambios de pH durante el crecimiento de las cepas en los medios de cultivo líquido.

Para medir el efecto de pH de los medios líquidos en cada tratamiento se toma el pH inicial antes de la esterilización; después de haber pasado el periodo de tiempo para registrar biomasa, el medio de cultivo líquido fue separado del micelio por medio de filtración y el sobrenadante se coloca en vaso de precipitado y a este se le midió el pH final con un potenciómetro JENWAY modelo 3510 provisto con un electrodo para líquidos (Akinyele y Adetuyi, 2005).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Recolección de especímenes.

En cuanto al sitio de recolección de las muestras, es importante señalar que los tiraderos de bagazo de maguey se encontraban totalmente expuestos al sol y sin vegetación asociada (Figura 3). La primera localidad se ubicó a 500 metros después de las vías camino a las antenas de microondas del Volcán de Tequila, La segunda localidad se encontró en la zona de fermentación de bagazo de maguey de la empresa Tequila Sauza ubicada en el poblado La Magdalena. Un tercer sitio de recolecta se ubico a tres kilómetros antes de la ciudad de Tequila. Este tiradero es utilizado para la limpieza y empaquetamiento del bagazo seco para su venta a empresas de asientos para automóviles.

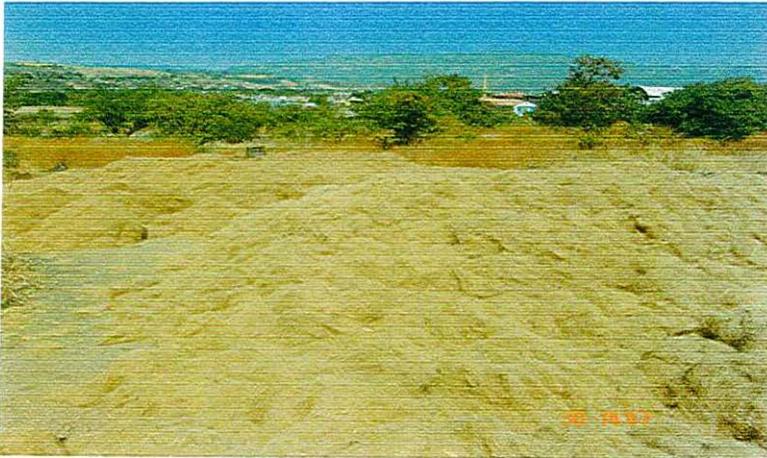


Figura 3. Características de los sitios de recolección: zona semidesértica de bagazo acumulado en pilas; expuesto totalmente al sol, sin vegetación asociada y aledaña a la población de Tequila.

En todos los casos los cuerpos fructíferos se encontraron a diferentes profundidades de las pilas de bagazo, desde 10 cm hasta 50 cm; prosperaban en un sustrato de color café negruzco y un olor ligeramente parecido al cloro. El ambiente era de poca luz bajo la protección dentro de los montones de bagazo. La humedad del sustrato era entre 65 y 70 % aproximadamente. La temperatura ambiente al momento de la recolecta oscilaba entre 32-36° C; el hongo es consumido por los lugareños y su nombre vulgar es hongo rosado (Figura 4).



Figura 4. *V. volvacea* creciendo en sustrato bagazo de maguey de coloración oscura (humus) en agregados de más de cinco hongos muchos de ellos en desarrollo.

En estudios posteriores de laboratorio se confirma que este hongo tiende a desarrollarse en sustratos parcialmente digeridos y con alto contenido de celulosa en los que los azúcares solubles y otros compuestos hayan sido previamente utilizados por microorganismos descomponedores (Agridino y Salmones 2006).

Con la finalidad de comparar los sitios de recolección de esta especie con anterioridad, se recurrió al herbario de micología del Instituto de Botánica Universidad de Guadalajara (IBUG). Se encontró que *V. volvacea* (bull.) Singer registrada como *V. bakeri* (Murrill.) Shaffer., a sido recolectada en diversas localidades de Jalisco (Cuadro 2).

Cuadro 2. Registro de localidades de *V. volvacea* encontrados en el herbario de micología (IBUG).

RECOLECTADO POR:	DETERMINADO POR:	AÑO DE RECOLECCIÓN:	Nº DE REGISTRO:	LUGAR DE RECOLECCIÓN:
L. Guzmán-Dávalos I. Álvarez	L. Guzmán-Dávalos I. Álvarez	1985 1988	# 2459 # 330	Tiraderos de bagazo de agave hacia el cerro de Tequila a 1 km del Municipio de Tequila.
E. Saucedo L. Guzmán-Dávalos	L. Guzmán-Dávalos L. Guzmán-Dávalos	1985 1986	# 4 # 3507	Tiraderos de bagazo de caña de azúcar Ingenio azucarero de Tala.
S. Miramontés	L. Guzmán-Dávalos	1993	S/N	Toluquilla, Municipio de Tlaquepaque.
L. Vázquez	L. Vázquez, L. Guzmán-Dávalos	1989	# 789	Mazamitla, Municipio Mazamitla.
L. Guzmán-Dávalos	L. Guzmán-Dávalos	1989	# 5013	Cerro de Techachaca-Perote, Municipio de Tezihuatlan (Puebla).
C. Soto	L. Guzmán-Dávalos	1994	S/N	Jardín Botánico IBUG, Las Agujas Nextipac, Municipio de Zapopan.
J. Velázquez	L. Guzmán-Dávalos	1999	# 20	Bosque la Primavera, Municipio de Zapopan.

8.2 Descripción morfológica de los especímenes recolectados.

Pileo (-5) 8 -10 cm de diámetro, convexo-campanulado a extendido, embonado, liso, cubierto finas escamas, margen entero, levemente estriado, de color blanco matizado en café-grisáceo. Láminas libres, de color rosa; estípíte (-4) 8 - 12 cm x 0.2 - 0.5 cm blanco subcurvado, glabro fibriloso, compacto, blanquecino. Volva membranosa característico del genero *Volvariella*, delgada, poco algodonosa o glabra, con el borde libre, blanquecina. Carne blanca con olor semejante a cloro. En todos los casos el hábitat fue saprobio obligado, cespitosos, en terrenos de composteo y zonas semidesérticas (Figura 5).



Figura 5. Basidiocarpos recolectados de *V. volvacea* en bagazo de maguey tequilero foto en campo.

8.3 Características microscópicas de los ejemplares recolectados.

Esporas (-5.5) 7.2 -8 x 4.8 - 6.4 μm , ovoides, con pared subgruesa de (0.5 μm), lisas, hialinas, algunas con apículo prominente (Figura 6). El material coincide con lo descrito por Shaffer (1957), Vásquez y Guzmán-Dávalos (1991); García (2003) difiere un poco con las esporas de 7-9 x 4-6.

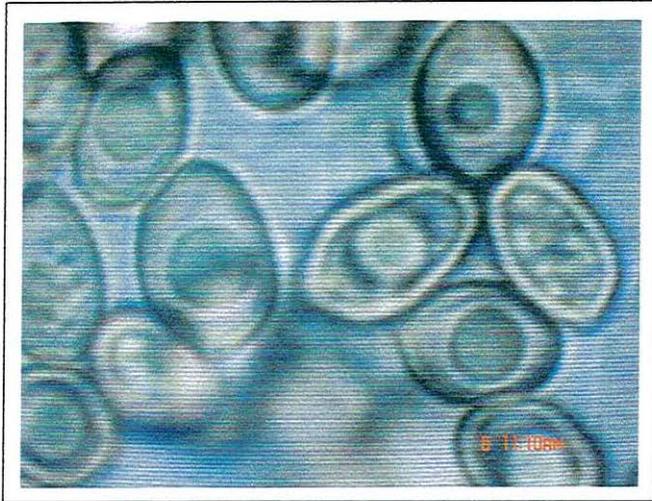


Figura 6. Micrografía de esporas de *V. volvacea* en objetivo 100 x.

Basidios (-20) 28 -36 x 6.4 -9.6 μm (Figura 7) comparado con la observación del ejemplar recolectado por Guzmán-Dávalos 2459 (IBUG) en tequila Jalisco donde los basidios median 22.4 -31.2 x 8 -11.4 μm que son muy similar a las estudiados.

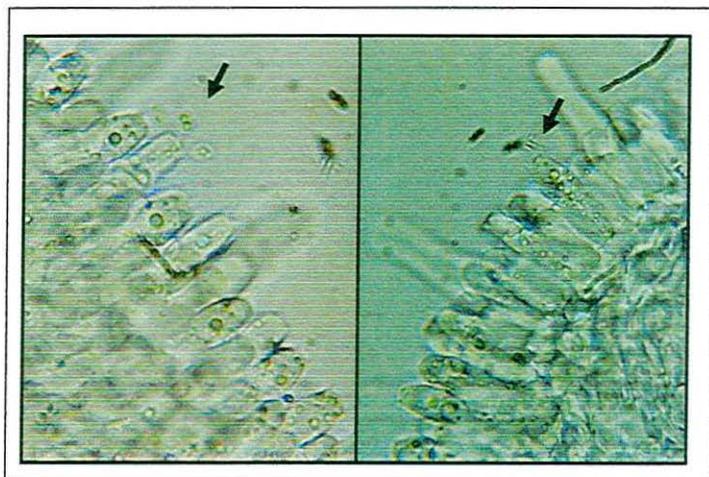


Figura 7. Basidios *V. volucae* observados con objetivo 40 x. Se Muestran tres basidiósporas (flecha izquierda) y esterigmas largos (flecha derecha).

8.4 Aislamiento de las cepas.

Se obtuvieron *in vitro* cinco cepas de *V. volvacea* de un total de siete especímenes silvestres seleccionados de la recolección de tiraderos de bagazo de maguey tequilero; de estos resultaron aislamientos de siete cajas de petri por duplicado de estípites y pileo, (Cuadro 3) eliminándose cinco: una de pie y el resto de sombrero por contaminación principalmente por bacterias y mohos (Figura 8).

Cuadro 3. Cuadro de aislamientos de *V. volvacea* en pileo y estípites

ESPECIMEN	ESTRUCTURA	REPLICA 1	REPLICA 2
1	Estípites	+	+
2	Estípites	+	+
3	Estípites	+	+
4	Estípites	+	-
5	Pileo	+	-
6	Pileo	+	-
7	Pileo	-	-

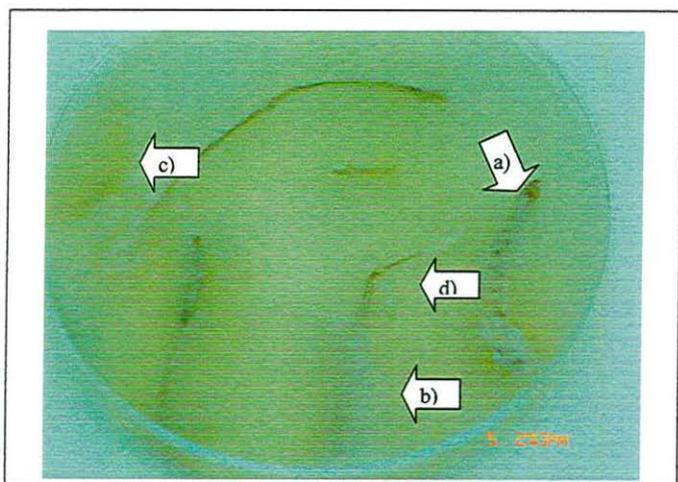


Figura 8. Aislamiento de *V. volvacea*. a) Fragmento de plecténquima (estípites). b) desarrollo de micelio c) Contaminante por moho d) contaminación por bacterias.

8.5 Características macroscópicas de las cepas aisladas (Vv1 y Vv2)

Durante el estudio las cepas analizadas presentaron en el medio de cultivo EMA las mismas características macroscópicas (Cuadro 4), las colonias fueron poco densas con abundante micelio aéreo, textura lanosa; como lo reportado por Martínez-Carrera *et al.*, (1986). En la cepa Vv1 solo en una caja aparecen clamidosporas al sexto día mientras en la mayoría al octavo día.

CUADRO 4. Aspecto del micelio y clamidosporas de las cepas Vv1 y Vv2.

DÍA	ASPECTO DEL MICELIO	PRESENCIA DE CLAMIDOSPORAS.	
		Vv1	Vv2
2	hialinas como telaraña muy poco densa	No	No
4	Blanquecina, poco densa poco micelio aéreo en el centro	No	No
6	Blanquecina, poco lanosa micelio aéreo en el centro	Si	No
8	Blanquecino, rojizo en el centro debido a las clamidosporas, lanoso abundante micelio aéreo	Si	Si

Las cepas de *V. voluacea* presentaron células precursoras de clamidosporas entre los 5 y 7 días después de la inoculación de forma: ovalada y las oblongo elípticas fueron abundantes en donde se presentaron diversas variaciones: formas ovoides, globosas, oblonga, lacrimal, subglobosas, subfusiforme, esfera pedunculada (Figura 9). Por lo general se observaron clamidosporas terminales. Martínez-Carrera *et al.*, (1986) menciona las mismas formas y además cita que aparecen a los seis días después de la inoculación.

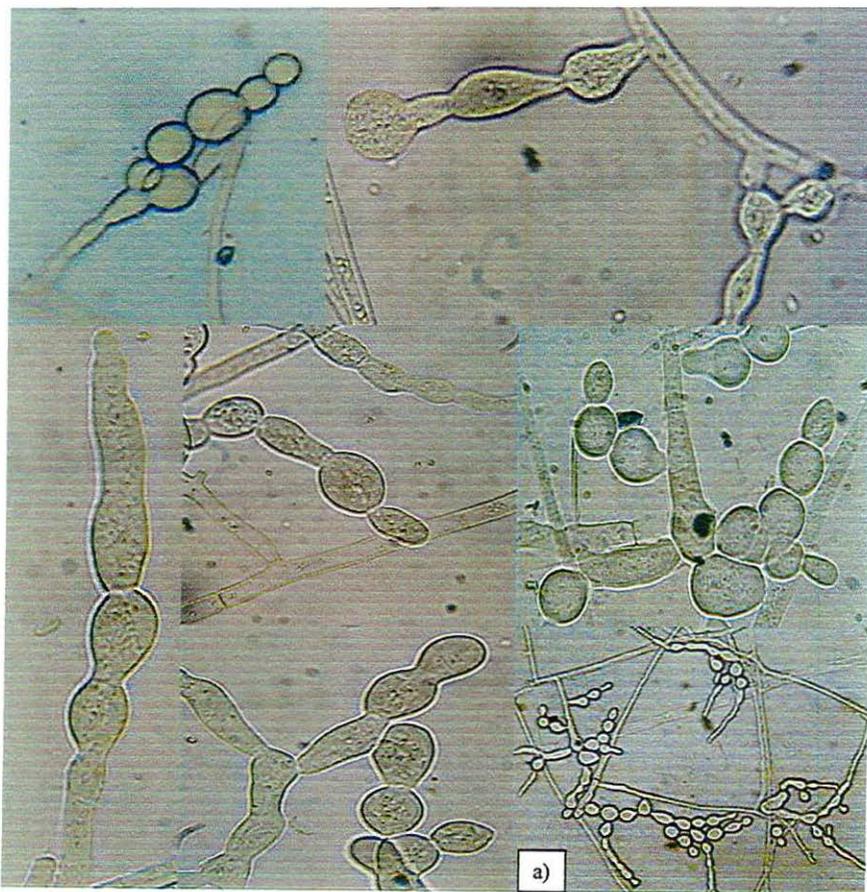


Figura 9. Tipos de células precursoras de clamidosporas de dos o más células, observadas en el micelio de *V. voluacea* 40x cepas Vv1 y Vv2 a) Micrografía 10x.

Características microscópicas de las cepas aisladas.

Diámetro de Hifas (2.5-) 5.6 -7 μm de diámetro; hifas hialinas septadas semirectas, sin fibulas (Figura 10). Martínez Carrera *et al.*, (1986) reporta hifas de (-4) 6 -20 μm de diámetro.



Figura 10. Fotomicrografía 40x mostrando hifas de *V. volvacea* semirectas. Septos indicados por flechas.

Las clamidosporas de las cepas son esféricas, con doble pared; verdoso amarillento oscuro, se encontraron a nivel terminal como intercalar (Figura 11). Diámetro de las clamidosporas fue (20.8-) 41 -49.6 μm . Martínez-Carrera *et al* (1986) reporta diámetro de clamidosporas de (12.1-) 35 -58. Mientras que Vela y Martínez-Carrera en la cepa INIREB -33 (1986) describe un diámetro de (30.6-) 32.6 -45.9 (48.9).

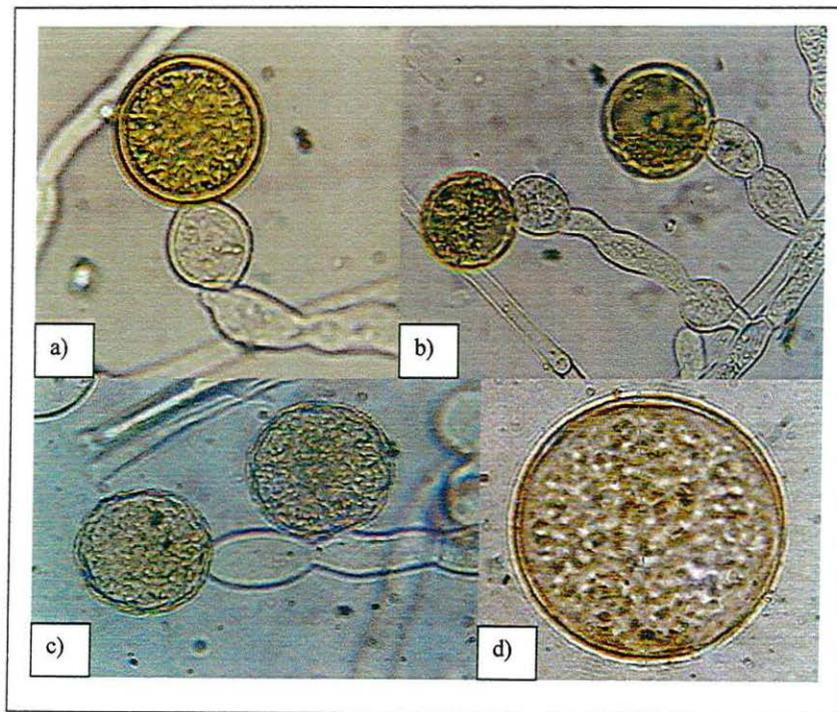


Figura 11. *V. volucae* a) clamidospora terminal madura. b) clamidosporas terminales en desarrollo. c) clamidospora terminal e intercalar 40x. d) clamidospora madura donde se aprecia la doble pared 100x.

8.6 Velocidad de crecimiento del micelio en medios de cultivo sólido.

El desarrollo del micelio de las cepas fue rápido, con un desarrollo de las hifas desde las primeras 24 horas de la inoculación en el medio de cultivo (Anexo 11.1). El primer día posterior a la inoculación del medio, tardaron cinco días para llenar el diámetro completamente de las cajas, siendo esto similar a lo reportado por Martínez-Carrera *et al.* (1986).

Tras aplicar el análisis de varianza (Anexo 11.3), se observó que el valor F de las muestras no es significativo y por lo tanto no existe variación entre las dos cepas (Vv1 y Vv2), igualmente resulta para el caso de los tratamientos, en los cuales también existe poca variación entre los medios empleados para el desarrollo de micelio; el valor de F no significativo para la relación de los tratamientos lo cual indica que no hay un efecto de interacción entre las variables del estudio. Una vez realizado el análisis de varianza, se observó que los tratamientos actúan de manera similar en la velocidad de crecimiento para esta especie.

El análisis estadístico demostró que la velocidad de crecimiento de la cepa Vv2 en el medio de cultivo PFA resultó ligeramente mayor que la cepa Vv1, dado que se desarrolla 1.04 mm por cada hora transcurrida desde que se deposita el inoculo en la caja de petri, por encima de la velocidad de crecimiento de Vv1 que es de 0.94 mm/hora (Figura 12).

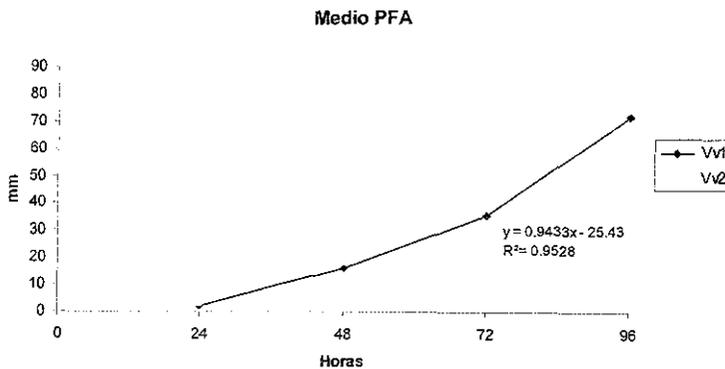


Figura 12. Velocidad de crecimiento de las cepas de *V. voluacea* en el medio PFA.

El caso del medio de cultivo EMA el crecimiento del micelio fue similar al observado en el medio PFA, dado que la cepa Vv2 se desarrollo a razón de 1.01 mm/hr , mientras que la cepa Vv1 creció solamente 0.74 mm por cada hora transcurrida desde su inoculación en el medio de cultivo (Figura 13)

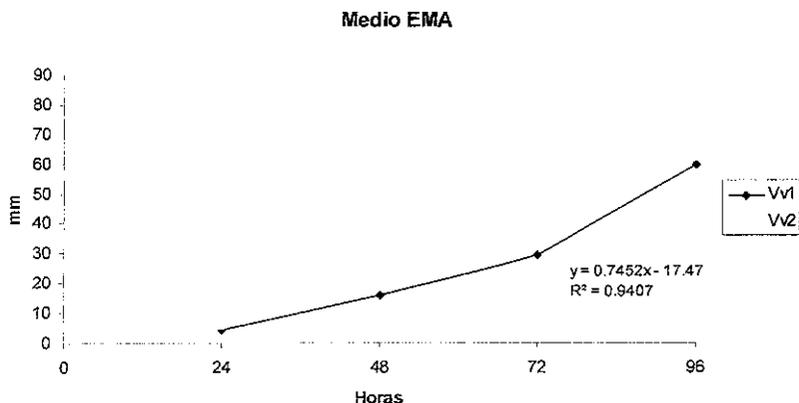


Figura 13. Velocidad de crecimiento de las cepas de *V. volucae* en el medio EMA.

La velocidad de crecimiento de ambas cepas en el medio JRA fue similar dado que en ambos casos se estimo un desarrollo de 1.03 mm/hora (figura 14).

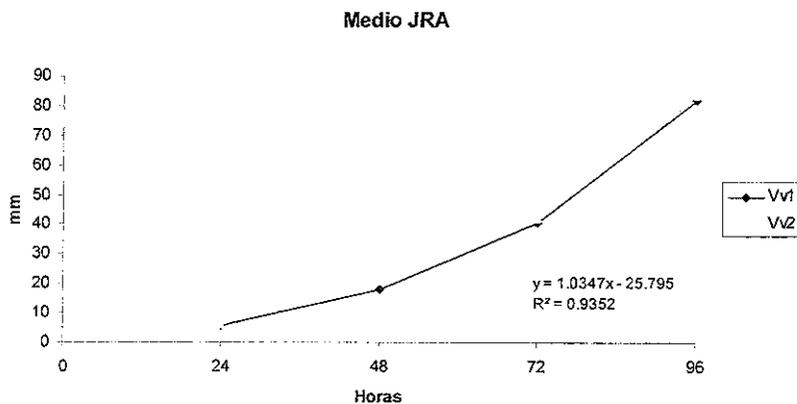


Figura 14. Velocidad de crecimiento de las cepas de *V. volucae* en el medio JRA.

La velocidad de crecimiento de la cepa Vv1, en los tres distintos medios, el análisis demostró que el medio PFA fue el que mas favoreció el desarrollo micelial dado que se obtuvo un desarrollo de 1.03 mm/hr, mientras que en el medio EMA se estimo el menor desarrollo, siendo este de 0.74 mm/hr (Figura 15).

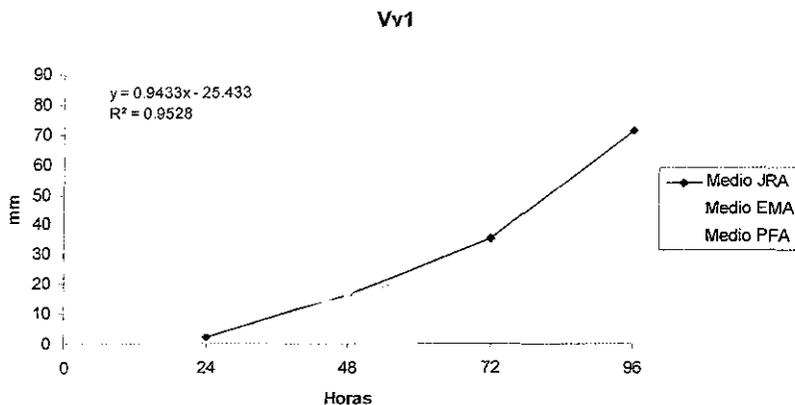


Figura 15. Velocidad de crecimiento de la cepa Vv1 en los tres medios de cultivo inoculados.

La comparación de la velocidad de crecimiento con la cepa Vv2, en los tres distintos medios, el análisis manifestó que fue igualmente efectivo ya que todos se desarrollaron a razón de 1.01-1.04 mm/hr (Figura 16).

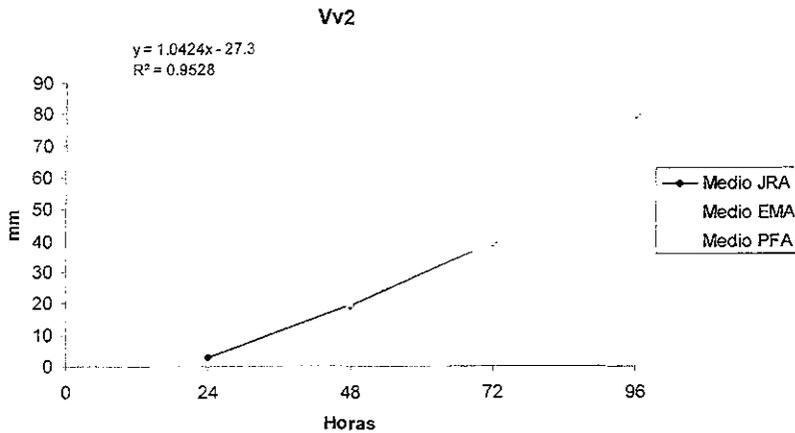


Figura 16. Velocidad de crecimiento de la cepa Vv2 en los tres medios de cultivo inoculados.

8.7 Biomasa obtenida de las cepas de *V. volvacea* en los medios de cultivo liquido.

Tras aplicar el análisis de varianza (Anexo 11.4), se observo que el valor F de las muestras no es significativo y por lo tanto no existe variación entre las dos cepas (Vv1 y Vv2), igualmente resulta para el caso de los tratamientos, en los cuales también existe poca variación entre los medios empleados para cultivar la biomasa; el valor de F no significativo para la relación de los tratamientos lo cual indica que no hay un efecto de interacción entre las variables del estudio. Una vez realizado el análisis de varianza, se observo que los tratamientos actúan de manera similar en la producción de biomasa para esta especie.

La producción de biomasa en el medio PF en la cepa Vv2 funciono mejor al principio ya que dio un rendimiento de 0.0038 mg/ml por hora y la cepa Vv1 0.0074 mg/ml lo cual nos indica mas rendimiento en cuanto a la producción de biomasa como se puede observar en el grafico (Figura17).

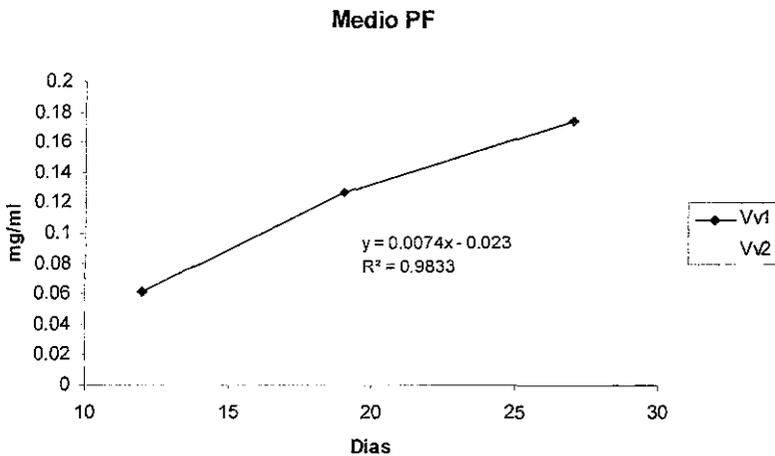


Figura 17. Producción de biomasa de las cepas de *V. volvacea* en el medio PF.

La producción de biomasa en el medio EM en la cepa Vv1 funciono mejor con un rendimiento 0.0178 mg/ml que la cepa Vv2 0.0135 mg/ml con como se puede observar en el grafico (Figura18).

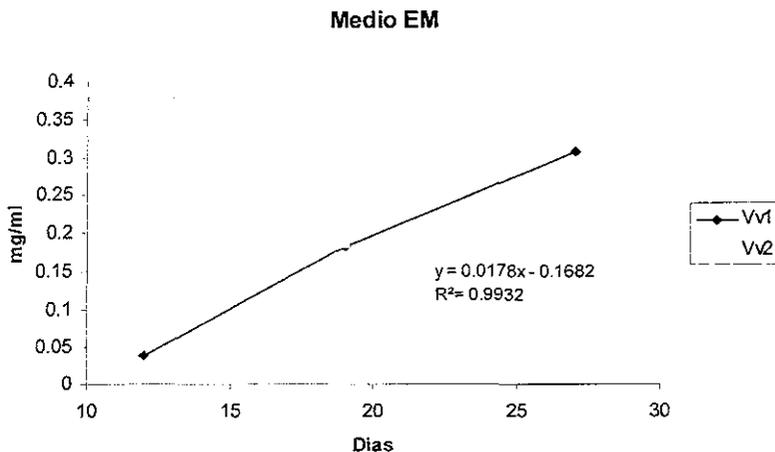


Figura 18. Producción de biomasa de las cepas de *V. voluacea* en el medio EM.

En ambas cepas en el medio JR tiene la misma eficacia ya que producen la misma cantidad de biomasa (Figura19).

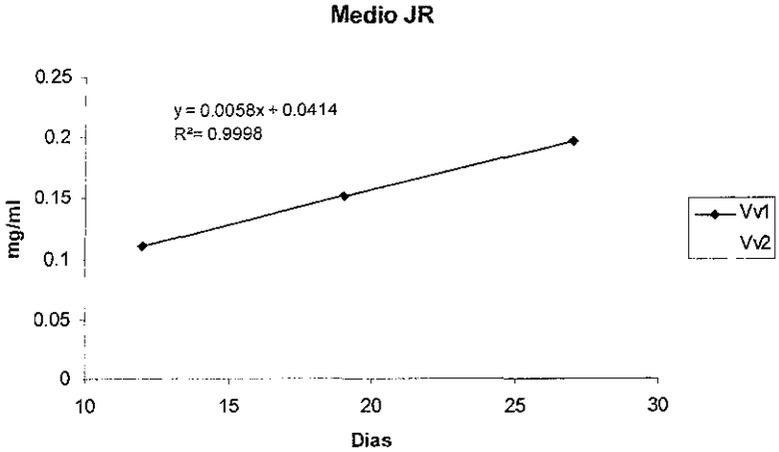


Figura 19. Producción de biomasa de las cepas de *V. voluacea* en el medio JR.

La regresión lineal nos indica que el medio que funciono mejor inicio de su desarrollo en la cepa Vv1 fue PF con un crecimiento de 0.0058 mg/ml en cada hora transcurrida pero el medio EM fue el que rindió mas con 0.0178 mg/ml durante mas tiempo y finalmente fue el de JR con 0.0058 mg/ml (Figura 20).

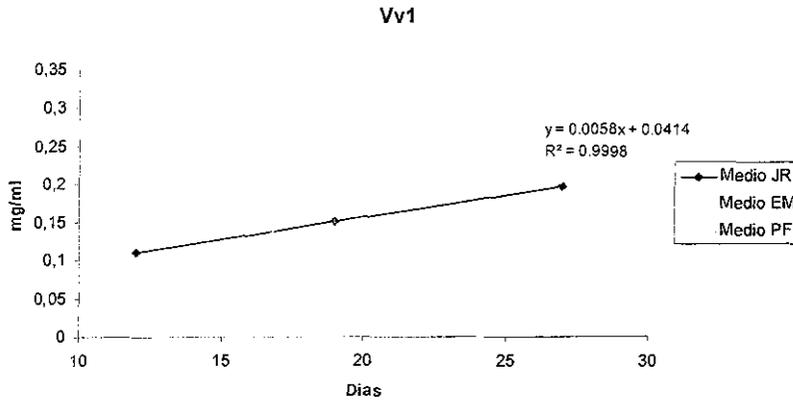


Figura 20. Producción de biomasa para la cepa Vv1 en los tres medios de cultivo inoculados.

La regresión lineal nos indica que el medio que funciono mejor fue en la cepa Vv1 EM con un crecimiento de 0.0135 mg/ml en cada hora transcurrida pero el medio PF y JR fueron muy parecidos el primero con 0.0038 mg/ml y 0.0051 mg/ml respectivamente (Figura 21).

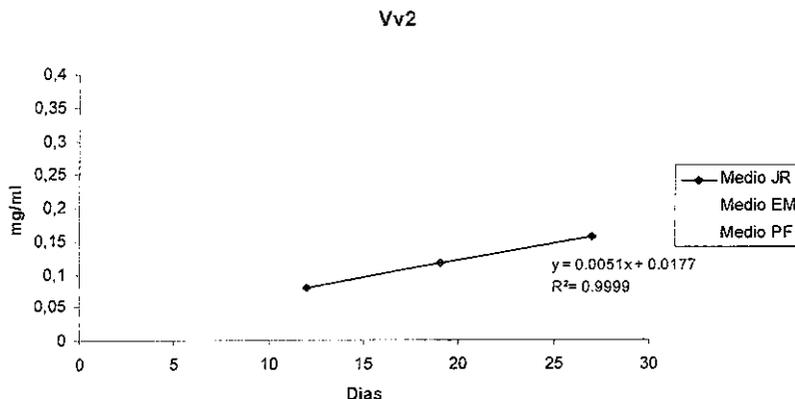


Figura 21. Producción de biomasa para la cepa Vv2 en los tres medios de cultivo inoculados.

8.8 Cambios de pH durante el crecimiento de las en los medios de cultivo líquido.

Simultáneamente a la medición del volumen de biomasa producida, se llevo a cabo el respectivo registro de los cambios de pH durante el crecimiento de los medios de cultivo líquido (Anexo 11.5). Este partió de un pH inicial de PF 6.0, EM 6.6, JR, 6.4. Y gracias a esto se pudo determinar que el mejor volumen registrado de biomasa producida en las cepas Vv1 y Vv2, fue a un pH de 6.4 y 6.9 respectivamente (Figura 22, 23). Lo cual es muy similar con lo reportado con Akinyele (2005) quien logro un óptimo pH de 6.5 para el desarrollo de *V. voluacea*.

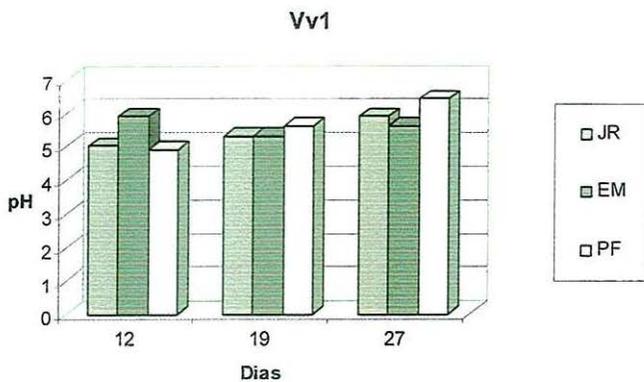


Figura 22. Variación del pH de los medios líquidos de cultivo en la cepa Vv1.

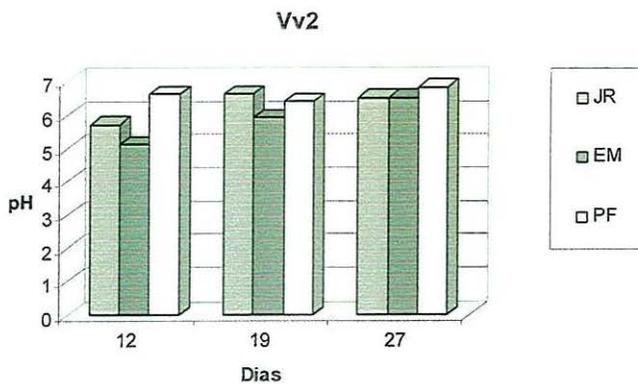


Figura 23. Variación del pH de los medios líquidos de cultivo en la cepa Vv2.

9. Conclusiones.

- ✓ La recolección de las muestras en zonas de tiraderos de bagazo degradado expuestos a las inclemencias del tiempo, nos indica la excelente adaptabilidad del hongo a este medio ambiente; ya que ningún otro hongo silvestre (macromicete), en el lugar, fue capaz de producir carpoforos; ya que estos se producen solamente si las condiciones son idóneas para ello.
- ✓ El hongo colectado coincide con la especie *Volvariella volvacea* de acuerdo a sus características morfológicas y claves dicotómicas.
- ✓ El aislamiento in vitro de *Volvariella volvacea* de plecténquima (estípite y pileo) es adecuado ya que se obtiene micelio en un periodo corto de tiempo y de buena calidad para producir cepas puras.
- ✓ Los tres medios de cultivos sólidos empleados para desarrollar micelio son adecuados, debido a diámetros y velocidades de crecimiento similares.
- ✓ La producción de biomasa fue similar en los tres medios de cultivos, y se observó una clara tendencia a mantener la acidez del pH en el medio líquido.
- ✓ Los medios de cultivos sólidos son adecuados para el aislamiento in vitro y el establecimiento de cepas puras; mientras que para la producción de biomasa los medios de cultivo líquidos resultaron óptimos.
- ✓ El establecimiento de cepas puras viables a partir de ejemplares silvestres de *Volvariella volvacea* creciendo en el bagazo de maguey permitirá la aprovechamiento industrial de la especie.

10. Bibliografía.

- Agripino J, y Salmones D. 2006. Cultivo de *Volvariella volvacea* en residuos de la cosecha de plátano y paja de cebada. *Revista Mexicana de Micología* **23**: 87-92.
- Ahlawat O, Ahlawat C, Indurani B, Vijay B, Dhar L. 2004. Chemical composition and enzymatic activity of spent paddy straw and oyster mushroom substrate. *Mushroom Science* **16**: 553 - 558.
- Akinyele B, Adetuyi F. 2005. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. *African Journal of Biotechnology*. **4**(12): 1390 - 1395.
- Akinyele B, Adetuyi F. 2005. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. *African Journal of Biotechnology*. **4**(12): 1390-1395).
- Baena, A. 2005. Aprovechamiento del Maguey verde (*Agave salmeana*) de la agroindustria del mezcal en San Luis Potosí para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostretus*). Tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas., Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Carillo L. 2003. *Microbiología agrícola*. (Consultado en abril 2008) en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib>.
- Cheung L, Cheung P, Ooi V. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Science* **81**: 249 - 255.
- Cocucci A. y Hunziker A. 1994. Los ciclos biológicos en el reino vegetal. 2ª. ed. Academia Nacional de Ciencias Córdoba. Córdoba Argentina. 42-43.

- De León R. 1985. Adaptación de una cepa silvestre guatemalteca de *Volvariella bakeri* (Murr.) Shaffer, a cultivos de laboratorio. Tesis de Químico Biólogo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Deschamps, R. 2002. Hongos silvestres comestibles del Mercosur con valor gastronómico. Documento de Trabajo N° 86, Universidad de Belgrano. (Consultado en abril 2008) en: http://www.ub.edu.ar/investigaciones/dt_nuevos/86_deschamps.pdf
- García C. 2002. El cultivo de hongos superiores comestibles, un recurso de desarrollo ineludible en el siglo XXI. Real Academia Nacional de Farmacia **68**: 753-776.
- García. M. 2003. Cultivo de setas y trufas. 4ª ed. Mundi-prensa, Madrid, 239 pag.
- Garza L, Ramírez X, Garza F, Salinas M, Waksman N, Alcaraz Y, Torres O. 2006. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Universidad Autónoma de Nuevo León. **9**(2):164-170.
- Guzmán G. 1986. Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes. 1ª ed. Limusa, México, 236 pag.
- Guzmán G. 2004. Los hongos de la Península de Yucatán (México) V. nuevas observaciones y nuevos registros. Revista Mexicana de Micología. **18**: 7-3.
- Julián A, Salmones D. 2006. Cultivo de *Volvariella volvacea* en residuos de la cosecha de plátano y paja de cebada. Revista Mexicana de Micología **23**: 87-92.

- Kishida E, Sone Y, Misaki A. 2001. Purification of an antitumor-active, branched (1→3)-β-D-glucan from *Volvariella volvacea*, and elucidation of its fine structure. *Science* **193**: 227-239.
- Martínez-Carrera D, Bonilla M, Sobal M, Aguilar A, Martínez W, Larqué Saavedra A. 1999. A culture collection of edible mushrooms and its significance for germplasm preservation, breeding, and the development of mushroom cultivation in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* **12**: 23-40.
- Martínez-Carrera D, Quirarte M, Sobal M, Guzmán G. 1986. Estudio comparativo entre cepas Mexicanas de *Volvariella bakeri* y una extranjera de *Volvariella volvacea*. *Revista Mexicana de Micología* **2**:145-155.
- Martínez-Carrera D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* **14** (2): 61 - 74.
- Reyes G, Franco M. 2006. Producción biotecnológica de sabores, pigmento y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Pontificia Universidad Javeriana Bogota, Colombia. *Universitas Scientiarum*. **11**(2): 23-30.
- Salmones D. 1985. Obtención de cepas de *Volvariella bakeri* y su estudio comparativo con una cepa extranjera de *Volvariella bombycina* en diferentes desechos agroindustriales. (Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana).
- Shaffer R. 1957. *Volvariella* in Norteamérica. *Mycologia* **49**: 545-563.
- Sobal M, Morales P, Bonilla M, Huerta G, Martínez-Carrera D. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 14 pp. In: *El Cultivo de Setas*

Pleurotus spp. en México. Sánchez E, Martínez-Carrera D, Mata G. & Leal H (Eds.) ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7

Soto C, Arias A. 2004. El cultivo de las setas (*Pleurotus spp.*). *Tecnología de producción de alimentos*. Guadalajara: Cuellar. 19-26.

Vázquez A, Santiago G, Estrada A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica* 73(1): 1 - 15.

Vázquez S. y Guzmán-Dávalos. 1991. Los hongos del genero de *Volvariella* (agaricales, Basidiomycetes) conocidos en Jalisco. *Boletín, IBUG* 1: 15-22.

Vela R, Martínez-Carrera D. 1989. Cultivation of *Volvariella bakeri* and *V. volvacea* in México: A comparative study. *Mushroom Journal* 9: 99-108.

Villegas V, Pérez A, Arredondo C. 2007. Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivo sólidos para producción de micelio como inóculo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9(2): 56-63.

Zapata P, Rojas D, Fernández C, Ramírez D. 2007. Producción de biomasa exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia* (7): 137-144.

11. Anexos.

11.1 Diámetro de crecimiento por las cepas Vv1 y Vv2 en tres distintos medios sólidos (mm).

Cepa	Tiempo (horas)	Medios	Promedio
Vv1	24	PFA	2.1
		EMA	4.5
		JRA	5.9
	48	PFA	16.2
		EMA	15.5
		JRA	17.9
	72	PFA	35.2
		EMA	29.4
		JRA	40.2
	96	PFA	71.2
		EMA	59.5
		JRA	81.2
Vv2	24	PFA	2.9
		EMA	5.5
		JRA	5.5
	48	PFA	19.2
		EMA	19.5
		JRA	24.2
	72	PFA	39.4
		EMA	39.5
		JRA	41.1
	96	PFA	79.5
		EMA	79.9
		JRA	82.5

11.2 Biomasa producida por las cepas Vv1 y Vv2 en tres distintos medios líquidos (mg/ml).

Cepa	Tiempo (días)	Medios	Promedio
Vv1	12	JR	0.1103
		PF	0.0642
		EM	0.0389
	19	JR	0.1518
		PF	0.1264
		EM	0.1833
	27	JR	0.1969
		PF	0.1735
		EM	0.3072
Vv2	12	JR	0.0792
		PF	0.1246
		EM	0.1369
	19	JR	0.1157
		PF	0.1436
		EM	0.1837
	27	JR	0.1563
		PF	0.1814
		EM	0.337

11.3 Análisis de varianza de los distintos tratamientos aplicados a las cepas Vv1 y Vv2 en crecimiento micelial.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	VALOR CRÍTICO PARA F
Muestra	149.450504	1	149.450504	0.15515664	0.69828266	4.4138734
Columnas	135.045158	2	67.5225792	0.07010064	0.93255323	3.55455715
interacción	49.4730083	2	24.7365042	0.02568096	0.97468163	3.55455715
Dentro del grupo	17338.0214	18	963.223413			
Total	17671.9901	23				

11.4 Análisis de varianza de los distintos tratamientos aplicados a las cepas Vv1 y Vv2 en biomasa.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F	PROBABILIDAD	VALOR CRÍTICO PARA F
Muestra	0.00062305	1	0.00062305	0.10329126	0.75344404	4.74722534
Columnas	0.01563019	2	0.00781509	1.2956221	0.30940941	3.88529383
Interacción	0.00527134	2	0.00263567	0.43695373	0.65588119	3.88529383
Dentro del grupo	0.07238309	12	0.00603192			
Total	0.09390766	17				

11.5 Modificación del pH en los medios líquidos.

Cepa	Tiempo (días)	Medios	Promedio
Vv1	12	JR	5.0
		EM	5.9
		PF	4.9
	19	JR	5.3
		EM	5.3
		PF	5.6
	27	JR	5.9
		EM	5.6
		PF	6.4
Vv2	12	JR	5.7
		EM	5.1
		PD	4.9
	19	JR	6.6
		EM	5.9
		PF	6.4
	27	JR	6.5
		EM	6.5
		PF	6.9

11.6 Preparación de Medios de Cultivo

Medio de cultivo agar fructuosa papa (PFA) 100 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 300 ml 0.5 gr de puré de papa, 1.5 grs de agar bacteriológico, 0.5 gr de fructuosa y agregar 100 ml de agua destilada. Mezclar hasta homogenizar y llevar a punto de ebullición. Filtrar con una gasa en un vaso de precipitado para eliminar el puré. Vaciar el líquido en un matraz de 300 ml limpio, colocar un tapón de gasa con algodón y cubrirlo con papel aluminio. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar ~ 25 min, vertir ~ 20 ml en las cajas de petri, solidificar y sellar las cajas ya frías. Guardar en una bolsa a 4°C hasta su uso.

Medio de cultivo agar extracto de malta (EMA) 100 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 300 ml 0.5 gr de extracto de malta, 1.5 grs agar bacteriológico; agregar 100 ml de agua destilada, mezclar hasta homogenizar y llevar a punto de ebullición. Colocar un tapón de gasa con algodón y cubrirlo con papel aluminio. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar ~ 25 min, vertir ~ 20 ml en las cajas de petri, solidificar y sellar las cajas ya frías. Guardar en una bolsa a 4°C hasta su uso.

Medio de cultivo agar completo (JRA) 100 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 300 ml 0.1 gr fosfato monosodico, 0.05 grs de sulfato de magnesio, 1.5 agar bacteriológico, 0.05 de levadura, 1 gr de dextrosa; agregar 100 ml de agua destilada, mezclar hasta homogenizar y llevar a punto de ebullición. Colocar un tapón de gasa con algodón y cubrirlo con papel aluminio. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar ~ 25 min, vertir ~ 20 ml en las cajas de petri, solidificar y sellar las cajas ya frías. Guardar en una bolsa a 4°C hasta su uso. (Soto y Arias 2004).

Preparación de medios líquidos

Medio de cultivo fructuosa papa (PF) 1000 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 2000 ml 5 gr de puré de papa, 5 gr de fructuosa; agregar 1000 ml de agua destilada, mezclar hasta homogenizar y llevar a punto de ebullición. Filtrar con una gasa en un vaso de precipitado para

BIBLIOTECA CUCBA

eliminar el puré. Vaciar 100 ml del líquido con la ayuda de una probeta en cada una de las botellas de 250 ml tapar. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente, guardar hasta su uso.

Medio de cultivo extracto de malta (EM) 1000 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 2000 ml 5 gr extracto de malta; agregar 1000 ml de agua destilada, mezclar hasta homogenizar. Vaciar 100 ml del líquido con la ayuda de una probeta en cada una de las botellas de 250 ml tapar. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente, guardar hasta su uso.

Medio de cultivo completo (JR) 1000 ml.

Colocar en un matraz Erlenmeyer 2000 ml 5 gr fosfato monosódico, 0.5 gr de sulfato de magnesio, 0.5 gr de levadura, 10 gr de dextrosa; agregar 1000 ml de agua destilada, mezclar hasta homogenizar. Vaciar 100 ml del líquido con la ayuda de una probeta en cada una de las botellas de 250 ml tapar. Esterilizar en autoclave a 120° C por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente, guardar hasta su uso (Soto y Arias, 2004).