

Ecología

Hongos saprótrofos neotropicales de bosque de *Juniperus deppeana* (Cupressaceae): aislamiento, identificación, cultivo *in vitro* y preservación

Saprotrophic fungi from Juniperus deppeana (Cupressaceae) forest: isolation, identification, in vitro culture, and preservation

Rut Ortega-Ávila ^a, Jaime Marcial-Quino ^b, José Luis Martínez-y Pérez ^b,
Laura V. Hernández-Cuevas ^b, Araceli Tomasini ^c,
Elvia Ortiz-Ortiz ^d y Alba Mónica Montiel-González ^{b, *}

^a Universidad Autónoma de Tlaxcala, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Carr. Tlaxcala-Puebla Km 1.5, 90062 Tlaxcala, Tlaxcala, México

^b Universidad Autónoma de Tlaxcala, Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Laboratorio de Biología Molecular, Autopista San Martín Texmelucan-Tlaxcala Km 10.5, 90120 San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, México

^c Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Biotecnología, Ciencias y Tecnología Ambiental, Av. San Rafael Atlixco #186, Colonia Vicentina, 09340 Ciudad de México, México

^d Universidad Autónoma de Tlaxcala, Facultad de Odontología, Av. Ribereña s/n, Colonia Centro, 90000 Tlaxcala, Tlaxcala, México

*Autor para correspondencia: albamonica.montiel.g@uatx.mx (A.M. Montiel González)

Recibido: 4 febrero 2023; aceptado: 17 octubre 2023

Resumen

La alteración de los bosques por actividades antropogénicas y fenómenos naturales ha llevado al desarrollo de características adaptativas para que los organismos puedan tolerarlos o usarlos en su beneficio. En este trabajo se aislaron e identificaron hongos saprótrofos de un bosque de *Juniperus deppeana* perturbado para su propagación *in vitro*. Se recolectaron 31 especímenes; se propagaron en extracto de malta agar (EMA), papa dextrosa agar (PDA), agar lignina Kraft (A-L) y medio mineral (MM). La identificación taxonómica se realizó a partir de caracteres macro y micromorfológicos de los basidiomas, y fue complementada con un análisis filogenético de secuencias ITS. Solo 7 de las cepas crecieron en condiciones *in vitro*; los medios EMA y PDA fueron donde mejor se desarrollaron. La temperatura ambiente (~22 °C) y la preservación a 4 °C fueron las mejores condiciones para mantener la viabilidad de las cepas. Después de 6 meses, las cepas preservadas en glicerol (15%) a 4° y -20 °C no fueron viables. Los hongos aislados pertenecen a los géneros *Agrocybe*, *Byssomerulius*, *Coniophora* y *Gymnopus*. Dada las condiciones ambientales donde las cepas fueron aisladas, éstas representan nuevos prospectos de investigación para la obtención de biomoléculas de interés biotecnológico.

Palabras clave: Basidiomicetos; Caracterización; Bosque perturbado; Identificación taxonómica; Filogenia molecular

Abstract

The alteration of forests due to anthropogenic activities and natural phenomena has led to the development of adaptive features so that organisms can tolerate it or use it to their benefit. In this study, saprotrophic fungi from a disturbed *Juniperus deppeana* forest were isolated and identified for *in vitro* propagation. Thirty-one specimens were collected and propagated on malt extract agar (EMA), potato dextrose agar (PDA), Kraft lignin agar (A-L) and mineral medium (MM). Taxonomic identification was performed on the basis of macro- and micromorphological characters of the basidiomata, and was complemented by phylogenetic analysis of ITS sequences. Only 7 strains grew under *in vitro* conditions; they grew best in EMA and PDA media. Room temperature (~22 °C) and preservation at 4 °C were the best conditions to maintain the viability of the strains. After 6 months, strains preserved in glycerol (15%) at 4° and -20 °C were not viable. The isolated fungi belong to the genera *Agrocybe*, *Byssomerulius*, *Coniophora* and *Gymnopus*. Given the environmental conditions where the strains were isolated, they represent new research prospects for obtaining biomolecules of biotechnological interest.

Keywords: Basidiomycetes; Characterization; Disturbed forest; Taxonomical identification; Molecular phylogeny

Introducción

Los avances científicos y tecnológicos han conducido a la mejora y a la ampliación de los criterios para usar a los microorganismos y a las biomoléculas que producen. El interés biotecnológico en algunos de éstos radica en el hecho de que, al ser el resultado de su adaptación ante diferentes circunstancias bióticas y abióticas, los ha llevado a desarrollar capacidades para responder a situaciones particulares (Feckler et al., 2018). Las condiciones que son adversas para muchos microorganismos han mostrado ser inductores de características adaptativas que contribuyen a la resistencia y a la resiliencia (Philippot et al., 2021; Shade et al., 2012). La tolerancia y, en algunos casos, el uso exitoso de variados agentes causantes de estrés como los pesticidas y fungicidas, por distintos microorganismos, han llamado la atención para explorar su potencial uso biotecnológico (Feckler et al., 2018). De ahí la necesidad de conocer la diversidad microbiana presente en regiones sometidas a diferentes condiciones de perturbación o estrés, mediante distintas herramientas y análisis morfológicos y moleculares. El aislamiento de los microorganismos que presentan crecimiento *in vitro* y la caracterización de las condiciones de conservación de las cepas son imprescindibles para su manipulación; a partir de tal información se construyen bases de datos, que constituyen acervos fundamentales para determinar el potencial metabólico de los microorganismos (Arora et al., 2005; Çaktu y Türkoğlu, 2011; De Vero et al., 2019).

En ambientes terrestres los hongos saprótrofos son un grupo abundante y diverso. Ellos participan en los procesos de descomposición y de mineralización de la materia orgánica para el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas (Peay et al., 2008). También reciclan nutrientes a través de los ciclos del carbono, del nitrógeno

y de otros minerales del suelo (Pawloska et al., 2019; Reverchon et al., 2010). Incluso, estos hongos contribuyen a la diversidad y mantenimiento de las comunidades, al descomponer compuestos complejos en otros de fácil asimilación que son aprovechados por las plantas y por otros organismos (Marin y Kohout, 2021). Dicha habilidad de descomponer diferentes compuestos de origen natural (Crowther et al., 2012; Kab-Yeul et al., 2009; Tortella et al., 2008) y xenobióticos (Magnin et al., 2018; Merlin et al., 2014) se debe a los sistemas enzimáticos de oxidoreducción que presentan (fenoloxidasas, peroxidasas, entre otros). Además, son productores de moléculas antioxidantes (Gi-Hong et al., 2019, 2020; Kalyoncu et al., 2010; Nelson et al., 2019) y de una amplia variedad de metabolitos secundarios aplicados en la medicina (Mygind et al., 2005), razones que han despertado el interés por usar hongos de este gremio y las biomoléculas que producen para diferentes procesos biotecnológicos (Minkyong et al., 2020; Marin y Kohout, 2021).

En México, se estima que podrían existir más de 2,000 especies de hongos saprótrofos, bajo condiciones ambientales variadas y contrastantes (Aguirre-Acosta et al., 2014); por lo que el potencial biotecnológico que representan es enorme. Éste podría acrecentarse de forma significativa al explorar comunidades vegetales secundarias, originadas por cambios de uso del suelo y por otros fenómenos de perturbación antrópica (Rzedowski, 2006). Los bosques de *Juniperus* L., pertenecen a esta categoría. En extensas superficies del centro de México, estos bosques están integrados por comunidades mono- o multiespecíficas (Rzedowski, 2006) de *J. flaccida* Schltdl., *J. monosperma* (Engelm.) Sarg. y *J. deppeana* Steud (INEGI, 2017). Estas comunidades tienden a establecerse con una alta frecuencia en sitios perturbados y ocupan una gran extensión de áreas abiertas. Tales situaciones se

traducen en incrementos de insolación, de temperatura, de salinidad del suelo y de una cada vez mayor incidencia de xenobióticos, debido a la cercanía o a la vecindad de estos bosques con áreas agropecuarias y zonas urbanas e industriales (Feckler et al., 2018). Las comunidades fúngicas —y de otros organismos— que habitan en sitios con tales características, han desarrollado estrategias biológicas para adaptarse y sobrevivir en ellas, con mecanismos interesantes para explorar, en la búsqueda de productos bioactivos novedosos o alternativos a los existentes (Anteneh et al., 2019; Thorn et al., 1996; Toledo et al., 2014; Ványolós et al., 2019). Para ello, es necesario aumentar e incentivar los estudios sobre diferentes gremios de hongos, como los saprótrofos, en diferentes tipos de bosques y de ambientes perturbados en México.

Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio es contribuir al conocimiento de la diversidad de hongos saprótrofos nativos de un bosque de *J. deppeana* perturbado susceptibles de ser aislados, de sus características de crecimiento *in vitro* y de su respuesta a la preservación a corto plazo. Estos conocimientos ayudarán a sentar las bases para crear una colección de cepas fúngicas como modelos de estudio encaminados a la obtención de metabolitos factibles para usos biotecnológicos.

Materiales y métodos

En la búsqueda de hongos saprótrofos sometidos a estrés constante, se decidió explorar un bosque sujeto a actividades de disturbio de manera frecuente, como cambio de uso del suelo para actividades agrícolas, pecuarias y/o por incendios provocados. Bajo estos criterios, se seleccionó un bosque de *Juniperus deppeana*, de ~10 ha de superficie, localizado en el centro de México. Ahí, los hongos se recolectaron a partir de recorridos de campo efectuados durante las temporadas de lluvias de los años 2015 y 2016. El bosque se ubica en el municipio Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala, México, a 2,300 m de altitud; el clima es templado subhúmedo con un promedio anual de lluvia de 800 a 1,000 mm. Los meses de junio y julio son los más lluviosos; la precipitación invernal es menor a 5%. La temperatura promedio anual varía de 14 a 16 °C; las heladas se presentan entre 40 y 60 veces por año, y con una frecuencia promedio de 2 granizadas al año (INEGI, 2017). *Rhus standleyi* F.A. Barkley predomina en el estrato arbustivo, mientras que el herbáceo está dominado por pastizales de *Muhlenbergia implicata* (Kunth) Trin., *Stipa ichu* (Ruiz y Pav.) Kunth y *Aristida schiedeana* Trin. et Rupr. (Hudson et al., 2005; INEGI, 2017). Además, el bosque está rodeado por áreas urbanas y agrícolas en crecimiento y por un bosque inducido y fragmentado de *Eucalyptus globulus* Labill.

La recolección de basidiomas se realizó de forma dirigida en sitios visitados con anterioridad y durante la cual se tomaron las coordenadas geográficas para cada basidioma recolectado. Los hongos se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), Tlaxcala, México. La caracterización morfológica incluyó la toma de datos de tamaño, color, textura, ornamentación de los basidiomas completos y de sus estructuras (píleo, estípite e himenóforo). Estos datos se complementaron con las características de forma, color y de ornamentaciones de las esporas y de estructuras microscópicas como basidios, cistidios e hifas. Los hongos frescos fueron fotografiados, a la vez que se registraron los sustratos de donde se recolectaron.

La identificación de los basidiomas se llevó a cabo con claves taxonómicas y descripciones especializadas (Petersen y Hughes, 2014, 2019; Contreras-Pacheco et al., 2014). Como base, se usaron las descripciones contenidas en la obra “Agaricales in Modern Taxonomy classification” (Singer, 1986). Los caracteres considerados fueron: tamaño, color y textura del píleo, estípite e himenio, tipo de este último (laminado, poroso, entre otros), reacciones con KOH (10%) y Melzer (Munsell, 1975). Para observar las estructuras microscópicas como esporas, basidios, cistidios, hifas y fibulas, se realizaron cortes del himenio o a partir de secciones de micelio en crecimiento de las cepas, que se colocaron en preparaciones temporales con KOH (2%, p/v).

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico con contraste de interferencia de Nomarski (Zeiss AxioScope 2 Plus). La longitud de las esporas se consideró a partir del ápice hilar, mientras que el ancho se tomó hacia la parte ecuatorial. Los valores de Q y de Qm se determinaron de acuerdo con lo reportado por Petersen y Hughes (2019). Los valores del largo y ancho de las esporas se obtuvieron a partir de la medición de 25 esporas por espécimen. Las imágenes de las estructuras fueron tomadas con una cámara digital acoplada al microscopio (Infinity 1). Cada imagen se procesó con el programa Image Pro®Plus v. 4.5., el cual permite realizar mediciones, previa calibración, con un índice micrométrico de acuerdo con el objetivo de observación (Media Cybernetics, EUA). Los registros de las cepas aisladas se asignaron consecutivamente como CIGYA-n. Todas las cepas se registraron y sus duplicados se depositaron en la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Jalisco, México.

La identificación de las cepas se confirmó por medio de la secuenciación del DNAr de la región ITS. El DNA

se extrajo a partir de basidiomas y micelio. El micelio se produjo en medio líquido simple suficiente para generar biomasa. Las cepas se crecieron en matraces Erlenmeyer (125 ml) conteniendo 50 ml de medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): glucosa (40), NaNO₃ (3.0), extracto de levadura 2.0, KCl (0.5), MgSO₄·7H₂O (0.5) y FeSO₄·7H₂O (0.01). Cada matraz se inoculó con un cilindro de agar (10 mm de diámetro) con micelio y la incubación de los matraces fue a 25 °C durante 15 días en oscuridad. Se utilizaron 0.25 g de biomasa de cada cepa para la extracción de DNA total usando el kit Power soil DNA Isolation Kit (Mo-Bio, Qiagen, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región ITS fue amplificada con los cebadores ITS1 Fw (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y con ITS4 Rv (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Para la PCR, se realizó una mezcla de reacción con volumen final de 50 µl, la cual contenía: DNA total (10 ng), amortiguador Taq (10X), MgCl₂ (25 mM), dNTP's (10 mM), cebadores Fw y Rv (20 mM), H₂O y Taq polimerasa (2.5 U) (Thermo Scientific™ Inc., EUA). La amplificación se realizó en un termociclador T100™ (BioRad, EUA) de acuerdo con las condiciones establecidas para la enzima. El equipo se programó como a continuación se menciona: un ciclo inicial de 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos que incluyeron, 40 s a 94 °C, 1 min a 50 °C, 1 min a 72 °C; y un último ciclo a 72 °C por 4 min. Las amplificaciones se confirmaron y analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%, p/v) y teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/L). Los geles se visualizaron y se foto-documentaron en el equipo Gel Doc 1000 (BioRad, EUA). Todos los productos de PCR obtenidos se purificaron con los kits Wizard Sv Gel y PCR Clean Up System (Promega Corporation, EUA), conforme a las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los amplicones se efectuó en ambos sentidos, usando un secuenciador automático ABI-Prism 3100 (Applied Biosystems®) del Laboratorio Divisional de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Las secuencias se ensamblaron con el programa Geneious R10.2.2. Las secuencias consenso se alinearon y se realizó un análisis de similitud en GenBank y UNITE (<https://unite.ut.ee/>) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias obtenidas de las cepas aisladas se depositaron en GenBank (MG817374, MG817375, MG817376, MG817377, MG817378, MG817379, MG817380).

Las secuencias correspondientes a la región ITS de los basidiomas (o micelio) fueron utilizadas para complementar la identificación morfológica con análisis filogenéticos. Con este propósito se tomaron en cuenta los

análisis filogenéticos de los géneros obtenidos y realizados previamente por otros autores. Se consideraron los números de acceso, las especies y el grupo externo propuesto por ellos. Las matrices de datos obtenidas fueron alineadas con el programa Clustal W (Thompson et al., 1994) incluido en BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999) bajo los criterios de alineamiento múltiple y 1,000 réplicas de bootstrap. El archivo resultante (alineamiento de secuencias) se editó en el programa Mesquite v.3.04 (Madison y Madison, 1997). Mientras que para la inferencia filogenética se utilizó el programa MrBayes v3.2 con el modelo general reversible con una proporción de sitios invariable y una distribución gamma en las tasas de variación entre sitios (GTR+I+Γ), con 4 cadenas de Markov, 2 corridas y 3,000,000 de generaciones. Por último, el árbol filogenético obtenido se editó con el programa FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2006).

Los medios de cultivo para el aislamiento fueron agar extracto de malta agar (EMA) (Sigma-Aldrich, Canadá), papa dextrosa y agar (PDA) (MCD-LAB, México), agar lignina Kraft (A-L) (0.1% de lignina -Sigma-Aldrich, EUA-), y medio mineral (MM). El MM contenía (g/L): glucosa (10.0), extracto de levadura (1.0), KH₂PO₄ (2.0), MgSO₄·7H₂O (0.5), KCl (0.5), agar (2%, p/v). Los medios de cultivo EMA y PDA fueron seleccionados por ser medios nutritivos convencionales para el cultivo *in vitro* de una amplia variedad de hongos. El medio lignina Kraft fue utilizado como un medio selectivo, con el propósito de aislar cepas con potencial de biodegradación de polímeros complejos de la pared celular (lignina) a través de complejos enzimáticos; se consideró importante para aislar hongos procedentes de madera. Se incluyó el MM debido a que es un medio de cultivo sencillo, que cuenta con los elementos básicos requeridos para el crecimiento de las cepas y una fuente de carbono de fácil asimilación.

Para el aislamiento se eligieron basidiomas jóvenes, carnosos, sin daño aparente, limpios, libres de insectos, relativamente grandes. De cada uno de ellos se tomaron 5 fragmentos (0.25 cm² cada uno) cortados con un bisturí estéril y bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Los fragmentos se colocaron en el centro de las cajas de Petri que contenían cada medio de cultivo preparado. La segunda forma de aislamiento consistió en la obtención de esporas y de micelio producido por germinación. Pequeños fragmentos de los púleos de especímenes maduros fueron adheridos, con glicerina estéril, al interior de las tapas de cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo. Posteriormente, las placas se colocaron a 45° de inclinación durante 24 h para favorecer la liberación de las esporas hacia los medios de cultivo.

Las cajas Petri inoculadas con fragmentos de basidioma (o esporas) se incubaron a temperatura ambiente (22

°C) en oscuridad. Las placas se monitorearon cada 24 h para visualizar germinación, crecimiento hifal o posible contaminación. Para la caracterización de las cepas se seleccionaron las que mostraron crecimiento constante y regeneración por al menos 2 generaciones.

Velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo

Para este ensayo se usó el mismo medio de cultivo empleado para realizar el aislamiento de las cepas y medio agar-agua como control negativo. Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad. El diseño experimental fue factorial completamente aleatorizado, con 3 réplicas; los factores fueron los 4 medios de cultivo: EMA, PDA, A-L y MM. La velocidad media de crecimiento (VMC) se obtuvo con las mediciones del diámetro del crecimiento miceliar cada 24 h hasta que éste cubrió completamente la superficie del medio. El medio de cultivo con la mayor VMC se seleccionó para las pruebas de preservación. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (Anova) para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias, seguida de una prueba “post hoc” de Tukey para saber la diferencia entre tratamientos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics (versión 25).

El método de preservación probado fue glicerol-agua, en concentraciones de 10 y 15% (v/v), e incubadas a temperatura ambiente (22 °C), 4 °C y -20 °C. Como indicadores de respuesta al método de preservación, se evaluaron el porcentaje de sobrevivencia, la producción de biomasa y la VMC, durante 1, 3 y 6 meses. Los datos de las cepas crecidas sin glicerol se usaron como referencia. Al final de cada tiempo se removió el glicerol de los cilindros con medio de cultivo, con agua fisiológica estéril. Los cilindros fueron colocados en cajas de Petri con el medio de cultivo correspondiente. El porcentaje de viabilidad estuvo representado por el número de placas de cultivo con crecimiento miceliar. La VMC se determinó como se describió anteriormente. La biomasa se determinó mediante el método de estimación del peso seco, para lo cual se colocó la biomasa producida a 45 °C durante 48 h. Los datos se analizaron por Anova seguida de una prueba “post hoc” de Dunnett para definir entre qué tratamientos hubo diferencias. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics (ver. 25).

Resultados

La exploración del bosque secundario de *J. deppeana* llevó a la recolección de 31 especímenes de basidiomicetos saprótrofos. De éstos, solo algunos fueron susceptibles de aislamiento y crecimiento *in vitro* (figs. 1, 2). Se obtuvieron 7 cepas de 4 géneros, cada uno con una especie. Una cepa de *Coniophora* aff. *arida* denominada CIGYA-001

(fig. 1A-D), 2 cepas de *Agrocybe* aff. *pediades* (Fr.) Fayod CIGYA-002 (fig. 1E-H) y CIGYA-003 (fig. 1I-L), 2 cepas de *Byssomerulius* aff. *corium* (Pers.: Fr.) Parmasto CIGYA-004 (fig. 2A-D) y CIGYA-005 (fig. 2E-H) y 2 cepas de *Gymnopus* sp. CIGYA-007 (fig. 2I-L) y CIGYA-008 (fig. 2M-P). En la tabla 1, se presenta información detallada de las características morfológicas, macro- y microscópicas, de los basidiomas y de crecimiento miceliar de estos hongos.

La identificación molecular se realizó mediante la amplificación de la región ITS del DNAr y los subsecuentes análisis en BLAST y de árboles filogenéticos con las respectivas secuencias. Se realizaron amplificaciones de ITS tanto de basidiomas como del micelio, las cuales no mostraron diferencias. La tabla 2 muestra los resultados del análisis de BLAST.

El análisis filogenético que incluía las secuencias de las cepas CIGYA-002 y CIGYA-003 (MG817375 y MG817376 respectivamente), indica que éstas se resuelven en un clado con la secuencia MZ725547 depositada en GenBank como *Agrocybe imaii* con valor de probabilidad posterior de 1 en el soporte de rama, con *Agrocybe ochracea* como grupo hermano y con otro clado formado por 2 secuencias identificadas como *Agrocybe pediades*. El soporte de las ramas de estos 3 grupos presentó un valor bajo menor de 0.7 (fig. 3). En lo que se refiere a la cepa de *Gymnopus* sp., se incluyeron las secuencias reportadas por Oliveira et al. (2019). De acuerdo con el análisis filogenético, la posición de las secuencias de las cepas CIGYA-007 y CIGYA-008 (MG817379 y MG817380, respectivamente) se resolvió en un clado con soporte de rama igual a 1 y como grupo hermano del clado formado por las secuencias depositadas en GenBank de *Gymnopus barbipes*, incluyendo la del espécimen tipo (fig. 4). Aunque, la posición resultante en el cladograma lleva a determinar que no corresponde con esa especie.

Es importante mencionar que no se realizaron análisis filogenéticos para el género *Coniophora* debido a que no existen registros de secuencias ITS; ni del género *Byssomerulius* porque los registros en las bases de datos corresponden solo a una especie.

Los resultados del análisis de velocidad media de crecimiento (VMC) muestran que las velocidades de crecimiento de las cepas dependen del medio de cultivo donde se propaguen (fig. 5A-G). La mayor VMC (11.4 mm/d) para *C. aff. arida*, cepa CIGYA-001 se presentó en el medio mineral (MM) (fig. 5A). Respecto a *A. aff. pediades*, una de las cepas (CIGYA-002) no creció en medio MM, pero sí presentó desarrolló en medio EMA (6.39 mm/d); mientras que la cepa CIGYA-003 registró la misma velocidad de crecimiento en todos los medios (fig. 5B, C). El medio de cultivo EMA fue el mejor

Tabla 1

Características morfológicas de hongos saprótrofos provenientes de un bosque perturbado de *Juniperus deppeana* ubicado en el centro de México.

Especie	Cepa CIGYA	Número de figura	Sustrato	Georreferencias/ sustrato de origen	Morfología del esporoma	Morfología de la cepa
<i>Coniophora</i> aff. <i>arida</i> (Fr.) Karst	001	1A-D	Madera	19°20'0.08" N, 98°21'52.3" O, 2,160 m de altitud	Basidiomas costrosos, resupinados, lignícolas, de color café amarillento en el centro (10 YR 5/4), café muy pálido a blanquecino en el margen (10 YR 8/4). Esporas ovoides, hialinas, 10.9 -13.2 µm de largo × 6.0-7.9 µm de ancho (Q = 1.81-1.67; Qm = 1.74).	Crecimiento denso de forma bien definida, con anillos de crecimiento concéntricos. Micelio aéreo y sumergido denso. El primero con apariencia algodonosa, blanco a blanquecino donde se diferencian las zonas de crecimiento.
<i>Agrocybe</i> aff. <i>pediades</i> Fr. (Fayod)	002	1E-H	suelo	19°20'0.03" N, 98°21'52.8" O, 2,166 m de altitud	Basidiomas con un estípote corto, 2.5-6 cm de altura total, de color café amarillento (10 YR 8/6), cilíndrico, coriáceo, café amarillento (10 YR 7/6 a 10 YR 8/6), oscureciéndose al acercarse al píleo.	Crecimiento compacto, formando pliegues radiales y un anillo de crecimiento en la zona de crecimiento activo bien definidos. Micelio denso, con crecimiento aéreo postrado, blanco.
	003	1I-L	suelo	19°19'58.4" N, 98°21'56.9" O, 2,166 m de altitud	Píleo convexo a aplanado-convexo, 0.6-2.3 cm de diámetro, amarillo pardusco (10 YR 6/6). Láminas adnadas, café oscuro (7.5 YR 5/6 a 5/8). Sin anillo. Esporas de color café a café amarillento, lisas, ovoides, 15.1-17.8 µm de largo × 9.2-10.7 µm de ancho (Q = 1.81-1.67; Qm = 1.74). Basidios bispóricos, cistidios hialinos, presencia de fibulas.	
<i>Byssomerulius</i> aff. <i>corium</i> (Pers.: Fr.) Parmasto	004	2A-D	madera	19°19'59.7" N, 98°21'52.2" O, 2,261 m de altitud	Basidiomas resupinados en el centro, con margen tendiente a levantarse, de aproximadamente 7 cm de largo. Coloración heterogénea, con partes blanquecinas (10 YR 8/4), de color café amarillento en el centro (5Y 7/6), con áreas de tonos amarillento (10YR 7/6) y amarillo pálido (2.5 Y 7/6) y la periferia con el margen blanquecino.	Crecimiento laxo, sumergido y aéreo, formando un anillo en la zona de crecimiento activo, definido por abundante micelio aéreo. Micelio escaso, esparcido, resupinado en el área de crecimiento activo, blanco grisáceo a ligeramente amarillento.
	005	2E-H	madera	19°20'00.1" N, 98°21'55.8" O, 2,277 m de altitud	Basidiomas suaves y flexibles al toque cuando frescos, quebradizos al deshidratarse. Himenio constituido por pseudoporos (pliegues porosos), con contexto blanco. Presencia de basidiolos (basidios inmaduros). No se observaron esporas.	
<i>Gymnopus</i> sp. (fig. 2I-P)	007	2I-L	hojarasca	19°19'58.8" N, 98°21'58.4" O, 2,166 m de altitud	Basidiomas estipitados, 3-7.7 cm de altura total. Estípote cilíndrico a ligeramente cónico, 1.4-6.2 cm de alto, tomentoso y blanco en la base (10 YR 8/1), de color café rojizo a café oscuro hacia el ápice (5YR 5/3 a 7.5 YR 5/4). Píleo aplanado, 0.7-5.5 cm de diámetro, ligeramente resupinado hacia el margen, los especímenes maduros presentan un umbo pequeño en el centro, rojo oscuro (10R 3/2, 10R 2.5 / 2) en especímenes jóvenes a rojo débil (10R 5/4) hacia el margen; de color café rojizo oscuro a café oscuro (5YR 3/4-7.5 YR 4/6) en el centro a café rojizo (5YR 4/4-7.5 YR 6/6) en los bordes. Láminas libres a adnadas, gruesas y separadas, de color rosa (7.5 YR 7/4). Olor intenso y desagradable. Esporas hialinas, lisas, elipsoides, 6.2-8.9 µm de largo × 3.1-4.8 µm de ancho (Q = 2.0-1.8; Qm = 1.92). Basidios tetraspóricos, 4.6-7.2 × 18.1-26.3 µm, 6.10 µm de ancho promedio, 22.34 µm de largo promedio. Con fibulas.	Crecimiento compacto, sumergido y aéreo, formando un anillo de crecimiento activo definido por un cambio de color. Micelio abundante, compacto, postrado en su mayoría, con apariencia algodonosa solo al ocupar la placa entera, con apariencia resupinada en el centro. El micelio viejo se diferencia del joven por el cambio de color de la periferia hacia el centro, de blanco a café a café rojizo.
	008	2M-P	hojarasca	19°19'57.9" N, 98°21'57.0" O, 2,166 m de altitud		

Tabla 2

Similitud entre cepas de hongos saprófitos aislados y otros hongos reportados. Análisis obtenido de BLAST.

Especie	Cepa	Número de acceso en GenBank	Resultados del BLAST Especie (número de acceso)	Similitud (%)
<i>Coniophora</i> aff. <i>arida</i> (Fr.) P. Karts	CIGYA-001	MG817374	<i>Coniophora arida</i> (Fr.) P. Karts (GU187510.1)	99
<i>Agrocybe</i> aff. <i>pediades</i> (Fr.) Fayod	CIGYA-002	MG817375	<i>Agrocybe pediades</i> (OL687128.1)	99
			<i>Agrocybe pediades</i> (FJ810131.1)	98
			<i>Agrocybe vervacti</i> (Fr.) Singer	97
			<i>Agrocybe ochracea</i> Nauta	97
			<i>Agrocybe imaii</i> Beker et U. Eberh.	96
			<i>Agrocybe flexuosipes</i> (Peck) Beker et U. Eberh.	95
			<i>Agrocybe praecox</i> (Pers.) Fayod	94
			<i>Agrocybe smithii</i> Watling et H.E. Bigelow	94
			<i>Agrocybe acericola</i> (Peck) Singer	93
			<i>Byssomerulius</i> aff. <i>corium</i> (Pers.:Fr.) Parmasto	CIGYA-003
<i>Agrocybe pediades</i> (FJ810133.1)	98			
<i>Byssomerulius corium</i> (KX449489.1)	98			
<i>Byssomerulius corium</i> (MT177290)	98			
<i>Gymnopus</i> sp.	CIGYA-006	MG817379	<i>Byssomerulius corium</i> (KX449489.1)	98
			<i>Byssomerulius corium</i> (MT177290)	98
			<i>Gymnopus foetidus</i> (Sowerby) P.M. Kirk (KY026739.1)	98
			<i>Gymnopus impudicus</i> (Fr.) Antonín, Halling et Noordel (MN992405)	98
<i>Gymnopus</i> sp.	CIGYA-007	MG817379	<i>Gymnopus barbipes</i> R.H. Petersen et K.W. Hughes (MK532859)	94
			<i>Gymnopus foetidus</i> (Sowerby) P.M. Kirk (KY026739.1)	98
			<i>Gymnopus impudicus</i> (Fr.) Antonín, Halling et Noordel (MN992405)	98
			<i>Gymnopus barbipes</i> R.H. Petersen et K.W. Hughes (MK532859)	94

crecimiento para las cepas de *Byssomerulius* aff. *corium* (CIGYA-004 y CIGYA-005) con una VMC de 10.09 mm/d (fig. 5D, E). Mientras, que las cepas de *Gymnopus* sp. (CIGYA-007 y CIGYA-008) se desarrollaron mejor en los medios PDA y EMA, obteniéndose valores de 4.34 y 5.32 mm/d, respectivamente (fig. 5F, G). Estos resultados permitieron seleccionar los medios de cultivo que se emplearían para los ensayos de preservación de las cepas. El medio MM para *C. aff. arida*, medio EMA

para *A. aff. pediades* y *Byssomerulius* aff. *corium*, y PDA para *Gymnopus* sp.

Para *Coniophora* aff. *arida* los valores de VMC y de generación de biomasa fueron mayores durante los primeros 3 meses, cuando la preservación se realizó a temperatura ambiente y 4 °C. Incluso, cuando se utilizó glicerol (10 y 15%) y se conservaron a 4 °C, se logró recuperar 100% de los aislados después de 1, 3 y 6 meses de preservación. La sobrevivencia de las cepas conservadas

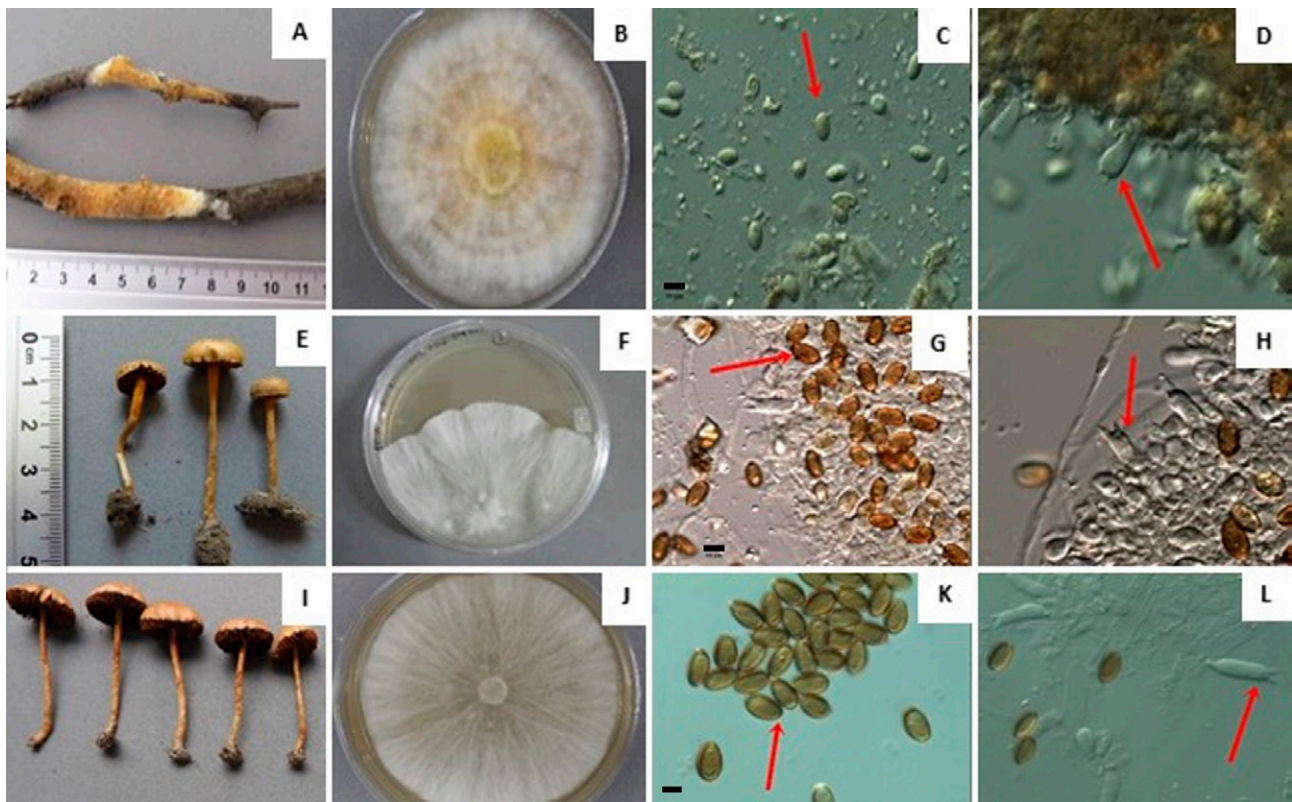


Figura 1. *Coniophora* y *Agrocybe*, hongos saprófitos aislados de un bosque de *Juniperus deppeana* perturbado, en el centro de México. A-D, *Conidiophora* aff. *arida* (CIGYA-001), basidioma (A), crecimiento micelial en medio mineral (B), esporas (C), basidio (D). E-H, *Agrocybe* aff. *pediades* (CIGYA-002), basidiomas (E), crecimiento micelial en medio EMA (F), esporas (G), basidio (H). I-L, *Agrocybe* aff. *pediades* (CIGYA-003), basidiomas (I), crecimiento micelial en medio EMA (J), esporas (K), basidios (L). Barra en C, G, K = 10 μ m.

en glicerol a 15% y mantenidas a temperatura ambiente, disminuyó hasta 60% después de 6 meses de conservación (tabla 3). No hubo respuesta de las cepas a la preservación con ambas concentraciones de glicerol a -20°C .

Por otro lado, para *A. aff. pediades* todas las condiciones de preservación realizadas en este trabajo fueron favorables para su sobrevivencia. Los tratamientos a 4°C mostraron los mayores valores de VMC y de biomasa (tabla 4). Para esta cepa, su resguardo a temperatura ambiente y -20°C en glicerol (10%), fueron las condiciones adecuadas para obtener 100% de sobrevivencia del micelio. Aunque disminuyó a 80% al usar glicerol al 15% y conservadas a temperatura ambiente, 4°C y -20°C (tabla 4).

Respecto de las cepas de *Byssomerulius* aff. *corium*, solo respondieron a los tratamientos de preservación a temperatura ambiente y a 4°C al usar glicerol al 10 o 15%, obteniendo sobrevivencia de 100% del micelio. Las VMC y generación de biomasa fueron comparables con las del control a los 3 tiempos probados (tabla 5). Las cepas de

esta especie no respondieron a la preservación en glicerol, independientemente de la concentración, a -20°C .

En tanto que las cepas de *Gymnopus* sp., respondieron favorablemente en glicerol al 10 y 15%, conservadas a temperatura ambiente, con sobrevivencia de 100%. La conservación de esta cepa a 4°C disminuye su propagación a 20%, mientras que a -20°C en ambas concentraciones de glicerol no se obtuvo respuesta de sobrevivencia de las cepas (tabla 6). Los porcentajes de sobrevivencia, de VMC y de biomasa fueron mejores a los 3 y 6 meses de preservación.

Discusión

Identificación de las cepas

Coniophora aff. *arida*. El tamaño de las esporas en los especímenes recolectados, $10.9\text{-}13.2\ \mu\text{m}$ de largo \times $6.0\text{-}7.9\ \mu\text{m}$ de ancho ($Q = 1.67\text{-}1.81$; $Q_m = 1.74$), es mayor de lo que se ha reportado para esta especie ($8\text{-}10 \times 5\ \mu\text{m}$),

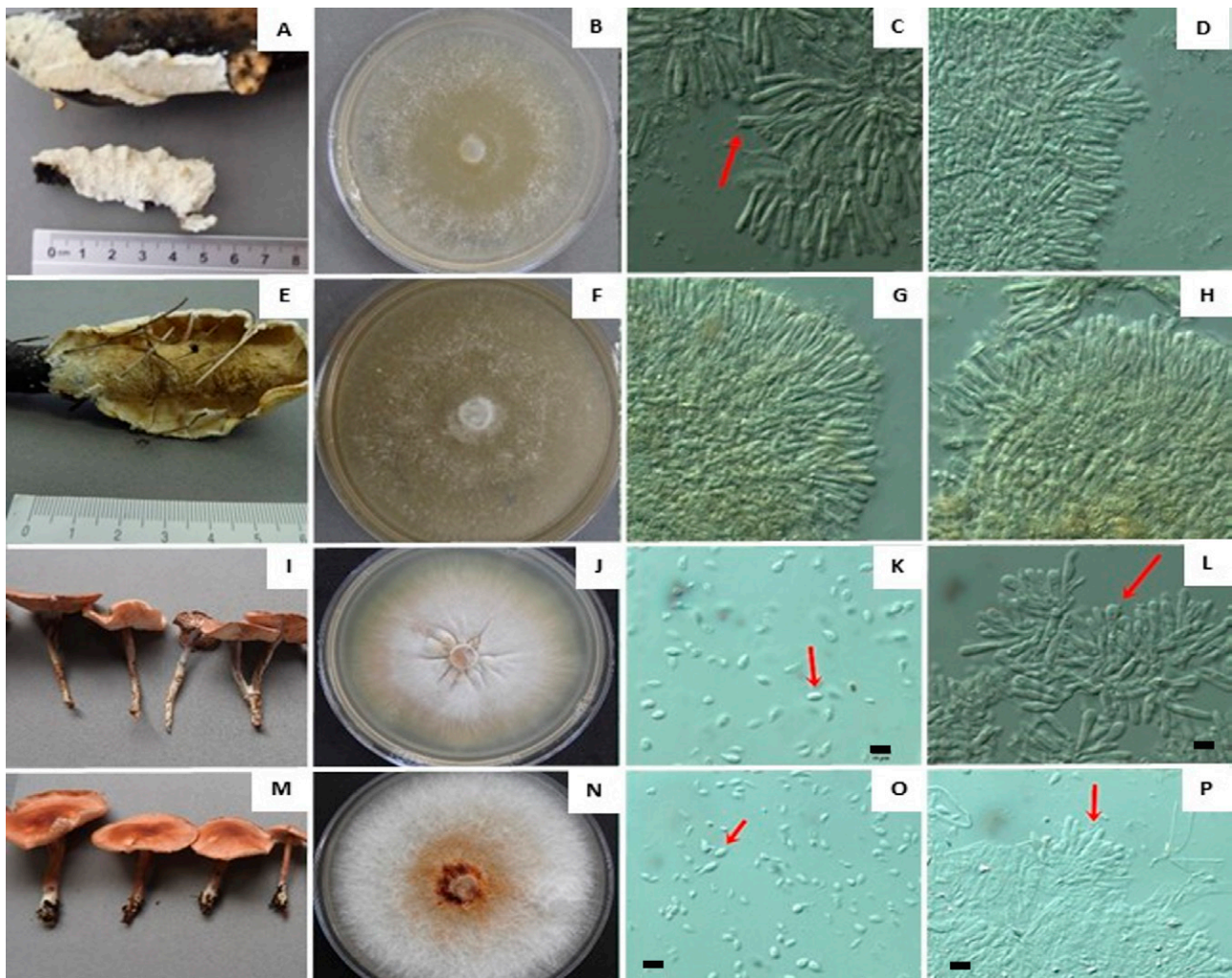


Figura 2. *Byssomerulius* y *Gymnopus*, hongos saprófitos aislados de un bosque de *Juniperus deppeana* perturbado, en el centro de México. A-D, *Byssomerulius* aff. *corium* (CIGYA-004), basidiomas (A), crecimiento miceliar en medio EMA (B), basidios inmaduros (C), basidiospores (D). E-H, *Byssomerulius* aff. *corium* (CIGYA-005), basidiomas (E), crecimiento miceliar en medio MEA (F), basidiospores (G, H). I-L, *Gymnopus* sp. (CIGYA-007), basidiomas (I), crecimiento miceliar en medio PDA (J), esporas (K), basidios (L). M-P, *Gymnopus* sp. (CIGYA-008), basidiomas (M), crecimiento miceliar en medio PDA (N), esporas (O), basidios (P). Barra en K, L, O, P = 10 μ m.

de otros especímenes recolectados en el estado Durango (Contreras-Pacheco et al., 2014) y del Estado de México 8-12 μ m de largo \times 5.5-8 μ m de ancho ($Q = 1.4-1.5$; $Q_m = 1.45$) (Contreras-Pacheco et al., 2018). Kausrud et al. (2007) y Skrede et al. (2012) señalaron que existen conflictos taxonómicos con la identidad de *C. arida* debido a la variabilidad de características como el tamaño de las esporas, que podrían llevar a considerar la posibilidad de que en realidad se trate de varias especies crípticas. Si bien se observó este tipo de variación en el ejemplar estudiado,

se decidió designarlo como *C. aff. arida* con base en las características morfológicas analizadas.

Agrocybe aff. *pediades*. De acuerdo con el tamaño de las esporas, mientras que la cepa CIGYA-0002 coincidió con *A. pediades*, la cepa CIGYA-0003 se relacionó con *A. semiorbicularis* (Bull.) Favod. De acuerdo con Agretious (2000), los caracteres macromorfológicos para separar ambas especies son prácticamente indistinguibles, por lo que en la actualidad se considera a *A. semiorbicularis* como sinónimo de *A. pediades* (www.indexfungorum).

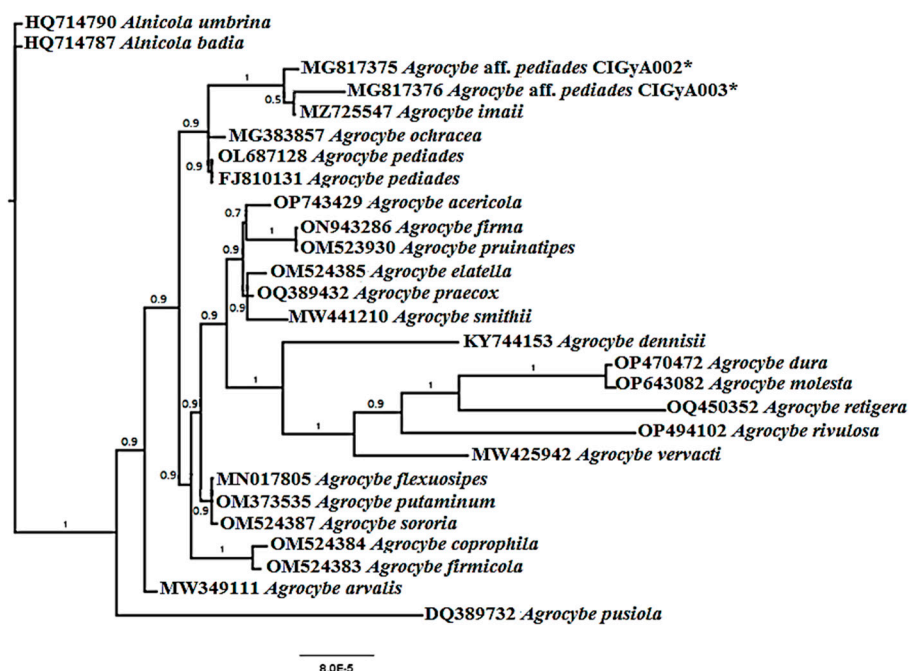


Figura 3. Cladograma resultante del análisis filogenético de las secuencias ITS de *Agrocybe* aff. *pediades* aislado del bosque de *Juniperus deppeana*. Los números en las ramas corresponden a los valores de soporte expresados en probabilidades.

Tabla 3

Efecto de las condiciones y tiempos de preservación en la velocidad media de crecimiento, en la biomasa seca y sobrevivencia de *Coniophora* aff. *arida*, cepa CIGYA-001.

Categoría	T-1	T-2	T-3	T-1	T-2	T-3	Sobrevivencia %
	VMC (mm/d)			Biomasa (g/L)			
Control	4.87 ± 0.09	-	-	5.83 ± 0.55	-	-	100
10% T.A.	5.74 ± 0.09	5.00 ^a ± 0.28	2.77 ± 0.93	5.21 ^a ± 1.66	5.34 ^a ± 0.83	5.49 ^a ± 0.59	100
15% T.A.	5.44 ± 0.17	5.83 ± 0.24	3.37 ± 0.57	6.13 ^a ± 0.25	5.52 ^a ± 0.57	4.47 ± 0.57	60 - 100
10% 4 °C	5.01 ^a ± 0.46	5.03 ^a ± 0.18	5.47 ^a ± 0.42	6.18 ^a ± 1.75	5.74 ^a ± 0.39	3.28 ± 0.41	100
15% 4 °C	5.44 ± 0.35	5.73 ± 0.13	5.44 ^a ± 0.39	5.62 ^a ± 0.41	5.17 ^a ± 0.63	3.43 ± 0.46	100

Media ± desviación estándar. VMC: Velocidad media de crecimiento. T-1: 1 mes, T-2: 3 meses, T-3: 6 meses. T.A.: Temperatura ambiente. ^a = Indica diferencias significativas ($p = 0.0001$).

org). Herrera et al. (2006) reportaron, a partir de cepas aisladas, esporas de tamaño de 9-13 μm de largo \times 6.6-7.5 μm de ancho ($Q = 1.36-1.73$; $Q_m = 1.54$); sin embargo, las esporas reportadas en este trabajo son de mayor tamaño con valores de 15.1-17.8 μm de largo \times 9.2-10.7 μm de ancho ($Q = 1.64-1.66$; $Q_m = 1.65$). En contraste, los resultados del análisis filogenético muestran la inclusión de las cepas de nuestro estudio en el mismo clado de

Agrocybe imaii, especie descrita en Japón (Eberhard et al., 2022), con un tamaño de esporas de $Q = 1.44$. Dicho clado se resuelve con un soporte de rama igual a 1, pero alejado de *A. pediades*. En vista de esto, hasta no contar con nueva información y realizar estudios más detallados, se decidió designar a las cepas aisladas como *Agrocybe* aff. *pediades*, especie con la que fueron morfológicamente más parecidas.

Tabla 4

Efecto de las condiciones y tiempos de preservación en la velocidad media de crecimiento —de acuerdo con la biomasa (peso seco)— y en la sobrevivencia de *Agrocybe* aff. *pediades*, cepas CIGYA-002 y CIGYA-003.

Categoría	T-1		T-2		T-3		T-1		T-2		T-3		
Cepa CIGYA	002	003	002	003	002	003	002	003	002	003	002	003	
	VMC (mm/d)						Biomasa (g/L)						Sobrevivencia %
Control	6.52 ± 0.60	6.77 ± 0.37	-	-	-	-	0.25 ± 0.04	0.16 ± 0.02	-	-	-	-	100
10% T.A.	5.26 ± 0.13	4.88 ± 0.06	5.84 ^a ± 0.34	7.47 ± 0.26	5.83 ± 0.12	5.72 ± 0.17	0.18 ^a ± 0.05	0.18 ^a ± 0.01	0.13 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.20 ^a ± 0.03	0.13 ^a ± 0.04	100
15% T.A.	6.16 ^a ± 0.07	6.34 ± 0.13	7.20 ± 0.15	7.41 ± 0.05	5.73 ± 0.09	4.61 ± 0.09	0.14 ± 0.04	0.18 ^a ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.19 ^a ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.02	80 - 100
10% 4 °C	6.44 ^a ± 0.27	6.38 ± 0.05	7.04 ^a ± 0.44	7.66 ± 0.28	6.55 ^a ± 0.04	6.24 ± 0.21	0.22 ^a ± 0.07	0.17 ^a ± 0.02	0.11 ± 0.07	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.16 ^a ± 0.01	80 - 100
15% 4 °C	6.35 ^a ± 0.58	6.18 ± 0.16	6.49 ^a ± 0.63	7.87 ± 0.10	6.24 ^a ± 0.19	6.04 ± 0.26	0.28 ^a ± 0.08	0.19 ^a ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.17 ^a ± 0.04	100
10% -20 °C	4.47 ± 0.78	5.83 ± 0.26	-	-	-	-	0.19 ^a ± 0.06	0.16 ^a ± 0.03	-	-	-	-	100
15% -20 °C	4.11 ± 1.07	6.16 ± 0.22	-	-	-	-	0.23 ^a ± 0.03	0.26 ^a ± 0.15	-	-	-	-	80 - 100

Media ± desviación estándar. VMC: Velocidad media de crecimiento. T-1: 1 mes, T-2: 3 meses, T-3: 6 meses. T.A.: Temperatura ambiente. ^a = Indica diferencias significativas ($p = 0.0001$).

Tabla 5

Efecto de las condiciones y tiempos de preservación en la velocidad media de crecimiento —de acuerdo con la biomasa (peso seco)— y en la sobrevivencia de *Byssomerulius* aff. *corium*, cepas CIGYA-004 y CIGYA-005.

Categoría	T-1		T-2		T-3		T-1		T-2		T-3		
Cepa CIGYA	004	005	004	005	004	005	004	005	004	005	004	005	
	VMC (mm/d)						Biomasa (g/L)						Sobrevivencia %
Control	10.87 ± 0.17	9.65 ± 0.60	-	-	-	-	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.03	-	-	-	-	100
10% T.A.	10.07 ± 0.12	9.08 ± 0.17	10.85 ^a ± 0.27	8.79 ± 0.13	7.78 ± 0.74	9.64 ^a ± 0.33	0.05 ^a ± 0.02	0.17 ^a ± 0.16	0.02 ± 0.01	0.15 ^a ± 0.05	0.05 ^a ± 0.01	0.09 ± 0.03	100
15% T.A.	9.75 ± 0.11	9.12 ± 0.09	10.54 ± 0.25	7.68 ± 0.48	10.12 ± 0.14	8.48 ± 0.35	0.04 ± 0.004	0.15 ^a ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.14 ^a ± 0.06	0.05 ^a ± 0.03	0.12 ^a ± 0.05	100
10% 4 °C	10.17 ± 0.05	8.70 ± 0.20	10.55 ± 0.10	6.88 ± 0.31	10.86 ^a ± 0.14	9.48 ^a ± 0.20	0.08 ^a ± 0.03	0.06 ^a ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.14 ^a ± 0.06	0.04 ± 0.02	0.09 ± 0.03	100
15% 4 °C	10.17 ± 0.03	8.89 ± 0.19	10.55 ± 0.08	5.72 ± 0.27	10.98 ^a ± 0.07	9.26 ^a ± 0.11	0.08 ^a ± 0.02	0.10 ^a ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.08 ^a ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.13 ^a ± 0.02	100

Media ± desviación estándar. VMC: Velocidad media de crecimiento. T-1: 1 mes, T-2: 3 meses, T-3: 6 meses. T.A.: Temperatura ambiente. ^a = Indica diferencias significativas ($p = 0.0001$).

Tabla 6

Efecto de las condiciones y tiempos de preservación en la velocidad media de crecimiento —de acuerdo con la biomasa (peso seco)— y en la sobrevivencia de *Gymnopus* sp., cepas CIGYA-007 y CIGYA-008.

Categoría	T-2		T-3		T-2		T-3		Sobrevivencia %
	007	008	007	008	007	008	007	008	
Cepa CIGYA	VMC (mm/d)				Biomasa (g/L)				
Control	1.90 ± 0.34	3.69 ± 0.35	-	-	2.65 ± 0.83	2.62 ± 0.17	-	-	100
10% R.T.	2.21 ^a ± 0.03	-	2.15 ^a ± 0.09	-	2.11 ^a ± 0.26	-	2.94 ^a ± 0.64	-	100
15% R.T.	2.28 ± 0.12	3.03 ^a ± 1.17	3.97 ^a ± 0.21	-	2.36 ^a ± 0.23	3.47 ± 0.90	1.35 ± 0.29	-	100
10% 4 °C	2.06 ^a ± 0.05	2.72 ^a ± 0.37	2.20 ^a ± 0.02	4.17 ± 0.09	1.77 ± 0.58	1.35 ^a ± 0.14	3.35 ^a ± 0.43	1.81 ^a ± 0.60	80
15% 4 °C	2.01 ^a ± 0.19	2.15 ± 1.19	2.12 ^a ± 0.03	4.23 ± 0.07	2.37 ^a ± 0.33	1.82 ^a ± 1.16	3.98 ± 0.54	2.09 ^a ± 0.74	80 - 100

Media ± desviación estándar. VMC: Velocidad media de crecimiento. T-1: 1 mes, T-2: 3 meses, T-3: 6 meses. T.A.: Temperatura ambiente. ^a = Indica diferencias significativas ($p = 0.0001$).

Byssomerulius aff. *corium*. No existe información acerca de la variación de los caracteres morfológicos de esta especie en México u otras áreas geográficas en el mundo, aun cuando se propuso la variedad *B. merulius* var. *halileensis* para la región mediterránea, recolectada en Israel a partir de madera de *Quercus* (Zmitrovich et al., 2006). Las secuencias ITS de las cepas estudiadas alcanzaron 96 y 97% de similitud con la especie *B. corium* identificada con una especie reportada en España (acceso KX449489.1). Sin embargo, los 7 registros disponibles en GenBank para el género *Byssomerulius* al corresponder únicamente con esta especie, hacen imposible establecer relaciones entre especies del género a través de análisis filogenéticos. Por ello se decidió considerarlo como una especie afín, hasta realizar estudios más detallados sobre dicha especie, que incluyan las características morfológicas de las esporas, estructuras que no se detectaron en los especímenes examinados.

Gymnopus sp. Petersen y Hughes (2014) reportaron a *G. barbipes* R.H. Petersen et K.W. Hughes, *G. disjunctus* R.H. Petersen et K.W. Hughes, *G. micromphaleoides* R.H. Petersen et K.W. Hughes y *G. pseudoluxurians* R.H. Petersen et K.W. Hughes como especies nuevas para Norteamérica, por lo que el espécimen estudiado bien podría corresponder con alguna de ellas. La especie más parecida de acuerdo con los caracteres morfológicos fue *G. barbipes*, aunque también existen diferencias morfológicas

entre algunas de las características de esas especies y las de los ejemplares aquí estudiados. Por ejemplo, el tamaño de las esporas es menor, 6.2-8.9 μm de largo \times 3.1-4.8 μm de ancho ($Q = 1.8\text{-}2.0$; $Q_m = 1.92$) respecto con lo reportado por Petersen y Hughes (2014), con valores de 6-6.5 μm de largo \times 2.5-3 (3.5) μm de ancho ($Q = 1.85\text{-}2.4$; $Q_m = 2.12$). Además, el color y el grosor del estípote son diferentes. Estos resultados y los generados por la posición filogenética de los especímenes que se situaron en un clado diferente de donde se encuentran las del espécimen tipo, señalan la posibilidad de que se trate de una especie nueva o una variedad de las descritas anteriormente. Debido a ésto, se decidió mantener el nombre de las cepas como *Gymnopus* sp. con registro CIGYA-007 y CIGYA-008, hasta que se disponga de más datos taxonómicos, o información de cepas aisladas de bosques templados, primarios y secundarios que puedan integrarse en estudios filogenéticos morfológicos, moleculares o con evidencia total.

Aislamiento y preservación

De los 31 ejemplares de basidiomicetos recolectados, solo se aislaron *in vitro* 4 especies con un total de 7 aislamientos o cepas. Los medios de cultivo probados en este estudio fueron adecuados para aislar a algunos de los hongos saprótrofos del bosque de *Juniperus* explorado. Los medios de cultivo EMA y PDA favorecieron el aislamiento de las cepas de *A. aff. pediades*, *Byssomerulius*

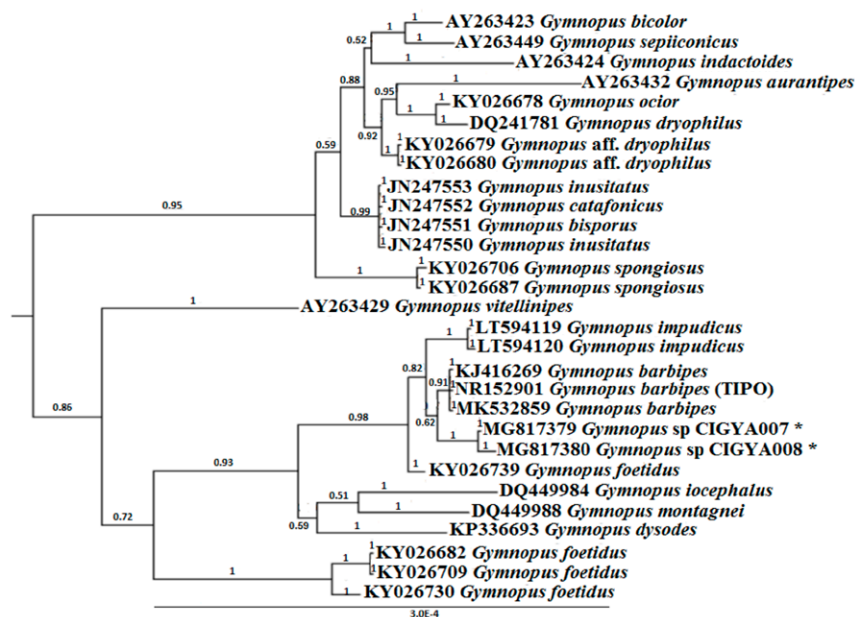


Figura 4. Cladograma resultante del análisis filogenético de las secuencias ITS de *Gymnopus* sp. aislado del bosque de *Juniperus deppeana*. Los números en las ramas corresponden a los valores de soporte expresados en probabilidades.

aff. *corium* y de *Gymnopus* sp., mientras que el MM lo fue para *C. arida*. De acuerdo con Thorn et al. (1996), el medio EMA es conveniente para aislar basidiomicetos saprófitos de muestras de suelo, tal como se mostró con las cepas de *A. aff. pediades*, especie recolectada de suelo. Las cepas de *Gymnopus* sp. y de *Byssomerulius aff. corium*, recolectadas de hojarasca y de madera, respectivamente, también respondieron favorablemente a ese medio. En contraste, la cepa de *Coniophora aff. arida*, aislada de madera, tuvo mejor respuesta al medio de cultivo MM suplementado con glucosa, lo que puede deberse a que esta especie pertenece a los hongos de pudrición parda, que usan preferentemente celulosa y otros hidratos de carbono en lugar de la lignina (Castaño et al., 2022). Ninguna cepa creció de manera aceptable sobre el medio de cultivo lignina Kraft, a pesar de que al menos 2 géneros se aislaron de madera. Esto podría deberse a que la lignina Kraft es un compuesto resultante del proceso de deslignificación de la madera, es decir, es lignina recuperada a partir de la mezcla de celulosa y hemicelulosa con las que se encuentra en dicho material (Chakar et al., 2004), y aunque podría sufrir modificaciones por la acción enzimática de peroxidases o de fenoloxidasas extracelulares, como la lacasa fúngica (Malric-Garaiova et al., 2023), los resultados sugieren que no es aprovechada eficientemente como fuente de carbono.

Estos resultados son alentadores al mostrar que existen hongos saprófitos que pueden ser aislados con

los procedimientos y medios de cultivo convencionales desarrollados hasta el momento.

La respuesta de todas las cepas fue diferente de acuerdo con el tiempo y las condiciones de preservación dado que se trató de especies aisladas y estudiadas por primera vez, con capacidades metabólicas distintas (Feckler et al. 2018; Pawlowska et al., 2019). Cabe destacar que la información biológica inherente a cada hongo, a sus adaptaciones ecofisiológicas para hacer uso de los recursos disponibles en sustratos como la madera y la hojarasca, es limitada, aun cuando dichos conocimientos podrían servir para determinar las posibles respuestas de los aislamientos fúngicos hacia diferentes métodos de preservación (Barrasa et al., 2014).

La preservación a una temperatura de -20 °C no fue la más adecuada para las cepas analizadas. Karaduman et al. (2012) indicaron que las bajas temperaturas son poco apropiadas para la preservación; en cambio Voyro et al. (2009), al trabajar con cepas de hongos saprófitos no encontraron pérdida de viabilidad después de 18 meses. Estos autores preservaron dichas cepas con diferentes protocolos de liofilización y de criopreservación resguardadas a -80 °C. Esos reportes y los obtenidos en este trabajo indican la necesidad de continuar buscando protocolos para mejorar la preservación de las cepas o realizar modificaciones de procedimientos existentes. Incrementar el estudio y el desarrollo de métodos de

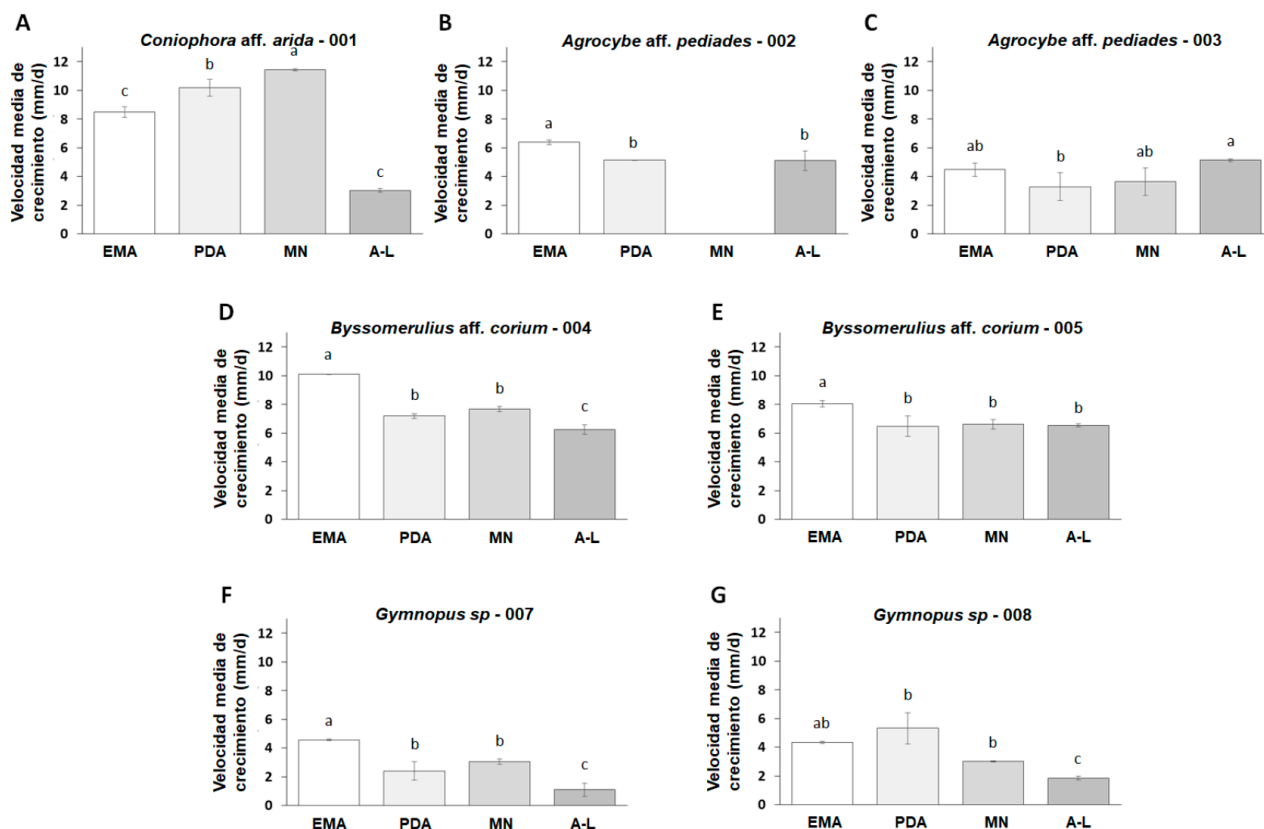


Figura 5. Crecimiento de las cepas en 4 medios de cultivo: MEA, PDA, MM y A-L. A, *Coniophora* aff. *arida* (CIGYA-001); B, *Agrocybe* aff. *pediades* (CIGYA-002); C, *A. aff. pediades* (CIGYA-003); D, *Byssomerulius* aff. *corium* (CIGYA-004); E, *B. aff. corium* (CIGYA-005); F, *Gymnopus* sp. (CIGYA-007); G, *Gymnopus* sp. (CIGYA-008). Las barras representan la desviación estándar de las 3 réplicas trabajadas. Anova ($p < 0.05$). Letras iguales indican que no existen diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey.

preservación de hongos a corto, a mediano y a largo plazo es de suma importancia para que sean considerados como recursos microbianos de alto valor y de fácil acceso (Arora et al., 2005). Las generalizaciones sobre qué procedimientos o métodos de preservación aplicar a los hongos no son válidas para todas las cepas fúngicas (Voyro et al., 2009; Homolka, 2014).

Los cultivos fúngicos, constituyen los materiales biológicos necesarios para proveer de los microorganismos por sí mismos o de los metabolitos que producen, para desarrollar procesos biotecnológicos variados (Çaktu y Türkoğlu, 2011). Ejemplos importantes en hongos saprótrofes al respecto, son las propiedades blanqueadoras provistas por sus enzimas oxido-reductasas (Barrasa et al., 2014) y a las significativas actividades antimicrobianas de importancia para la medicina humana, en cepas nativas (Mariselvi y Earanna, 2018).

En este estudio se aislaron 2 cepas de *A. aff. pediades* y 2 de *Gymnopus* sp., que producen lacasas extracelulares, enzimas cuyo potencial biotecnológico es reconocido ampliamente (Aza et al., 2021; González-González et al., 2023; Sun et al., 2021). La cepa de *A. aff. pediades* (CIGYA-002) ha mostrado la capacidad de tolerar concentraciones altas de compuestos tóxicos como el hexaclorobenceno en cultivo líquido (datos no publicados), probablemente debido a la presencia de enzimas (fenoloxidasas) capaces de procesarlos. Esto ha llevado a considerarla como un modelo de estudio atractivo para la búsqueda de enzimas que puedan usarse en procesos biotecnológicos dirigidos a la biodegradación de compuestos xenobióticos.

Los 4 géneros de hongos saprótrofes aislados del bosque perturbado de *Juniperus* fueron determinados taxonómicamente a través de caracteres morfológicos y

moleculares de los basidiomas y del micelio cultivado *in vitro*. Su aislamiento y preservación con medios de cultivo y métodos de conservación convencionales fue exitoso. Los resultados obtenidos evidencian la necesidad e importancia de aumentar los estudios micológicos en ecosistemas perturbados para identificar especies o nuevas variantes. Las capacidades de sobrevivencia, de tolerancia y uso de recursos que para otros organismos pueden ser desfavorables, hace que estos hongos sirvan como modelos para estudiar la síntesis de metabolitos secundarios o de enzimas que puedan ser empleados en diferentes procesos biotecnológicos.

Agradecimientos

R. Ortega-Ávila fue estudiante de la maestría en Ciencias Biológicas. Este estudio fue apoyado con una beca escolar otorgada a R. Ortega, por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, México, con número de registro 422927.

Referencias

- Agretious, T. K. A. (2000). *Floristic studies on some dark spored agarics of Kerala (Tesis doctoral)*. Universidad de Calcuta. Calcuta, India.
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana Biodiversidad*, 85, 76–81. <https://doi.org/10.7550/rmb.33649>
- Anteneh, Y. S., Brown, M. H. y Franco, C. M. M. (2019). Characterization of a halotolerant fungus from a marine sponge. *BioMed Research International*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3456164>
- Arora, D. K., Sikia, R., Dwivedi, R. y Smith, D. (2005). Current status, strategy and future prospects of microbial resource collections. *Current Science*, 89, 488–495.
- Aza, P., Molpeceres, F., Ruiz-Dueñas, F. J. y Camarero, S. (2021). Heterologous expression, engineering and characterization of a novel Laccase of *Agrocybe pediades* with promising properties as biocatalyst. *Journal of Fungi*, 7, 1–24. <https://doi.org/10.3390/jof7050359>
- Barrasa, J. M., Blanco, M. N., Esteve-Raventós, F., Altés, A., Checa, J., Martínez, A. T. et al. (2014). Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.03.007>
- Çaktu, K. y Türkoğlu, E. A. (2011). Microbial culture collections: the essential resources for life. *Gazi University Journal of Science*, 24, 175–180.
- Castaño, J. D., Muñoz-Muñoz, N., Kim, Y. M., Liu, J., Yang, L. y Schilling, J. S. (2022). Metabolomics highlights different life history strategies of white and brown rot wood-degrading fungi. *MSphere*, 7, e0054522. <https://doi.org/10.1128/msphere.00545-22>
- Chakar, F. S. y Ragauskas, A. J. (2004). Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*, 20, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016>
- Contreras-Pacheco, M. M., Raymundo, T., Bautista-Hernández, S., Díaz-Moreno, R. y Valenzuela, R. (2014). Hongos corticioides del bosque Las Bayas, Municipio del Pueblo Nuevo, Durango, México. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 38, 33–40.
- Contreras-Pacheco, M. M., Argüelles-Moyao, A. y Garibay-Orijel, R. (2018). Nuevos registros de hongos corticioides asociados a *Abies religiosa* del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, 1–14. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.1.1605>
- Crowther, T. W., Boddy, L. y Jones, T. H. (2012). Functional and ecological consequences of saprophytic fungus-grazer interactions. *ISME Journal*, 6, 1992–2001. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.53>
- De Vero, L., Boniotti, M. B., Budroni, M., Buzzini, P., Cassanelli, S., Comunian, R. et al. (2019). Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the Italian Network of Culture Collections. *Microorganisms*, 7, 685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>
- Eberhardt, U., Schütz, N., Bartlett, P., Hosaka, K., Kasuya, T. y Beker, H. J. (2022). Revisiting *Hebeloma* (Hymenogastraceae, Agaricales) in Japan: four species recombined into other genera but three new species discovered. *Mycological Progress*, 21, 447–472. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01757-x>
- Feckler, A., Goedkoop, W., Korschak, M., Bundschuh, R., Kenngott, K. G. J., Schulz, R. et al. (2018). History matters: Heterotrophic microbial community structure and function adapt to multiple stressors. *Global Change Biology*, 24, e402–e415. <https://doi.org/10.1111/gcb.13859>
- Gi-Hong, A., Jae-Gu, H. y Jae-Han, C. (2019). Antioxidant activities, β -glucan contents of wild mushrooms Korea. *Journal of Mushrooms*, 17, 144–151. <https://doi.org/10.14480/JM.2019.17.3.144>
- Gi-Hong, A. Jae-Han, C. y Jae-Gu, H. (2020). Examination of the biological activities of wild mushrooms extracts in Korea. *Journal of Mushrooms*, 18, 151–163. <https://doi.org/10.14480/JM.2020.18.2.151>
- González-González, P., Gómez-Manzo, S., Tomasini, A., Martínez y Pérez, J. L., García-Nieto, E., Anaya-Hernández, A. et al. (2023). Laccase production from *Agrocybe pediades*: purification and functional characterization of a consistent laccase isoenzyme in liquid culture. *Microorganisms*, 11, 568. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030568>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 97/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, 95–98.
- Herrera, T., Pérez-Silva, E. y Valenzuela, V. H. (2006). Nueva contribución al conocimiento de los macromicetos de la

- Reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, D.F. México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 51–57. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2006.001.317>
- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of Basidiomycetes-recent methods. *Fungal Biology*, 118, 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Hudson, R., Rodríguez-Martínez, L., Distel, H., Cordero, C., Altbácker, V. y Martínez-Gómez, M. (2005). A comparison between vegetation and diet records from the wet and dry season in the cottontail rabbit *Sylvilagus floridanus* at Ixtacuixtla, central Mexico. *Acta Theriologica*, 50, 377–390. <https://doi.org/10.1007/BF03192633>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2017). *Anuario estadístico y geográfico de Tlaxcala 2017*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Ciudad de México: INEGI.
- Kab-Yeul, J., Soo-Muk, C., Soon-Ja, S., Won-Sik, K., Gyu-Hyun, K. y Jae-Mo, S. (2009). Screening of biodegradable function of indigenous lingo-degrading mushrooms using dyes. *Mycobiology*, 37, 53–61. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.1.053>
- Kalyoncu, F., Oskay, M. y Kayalar, H. (2010). Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*, 1, 195–199. <https://doi.org/10.1080/21501203.2010.511292>
- Karaduman A. B., Atli B. y Yamac M. (2012). An example for comparison of storage methods of macrofungus cultures: *Schizophyllum commune*. *Turkish Journal of Botany*, 36, 205–212. <https://doi.org/10.3906/bot-1102-8>
- Kausserud, H., Shalchian-Tabrizi, K. y Decock, C. (2007). Multilocus sequencing reveals multiple geographically structured lineages of *Coniophora arida* and *C. olivacea* (Boletales) in North America. *Mycologia*, 99, 705–713. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832534>
- Madison, W. P. y Madison, D. R. (1997). Mesquite v. 3.04. Disponible en: <https://mesquitoproject.org/>
- Magnin, A., Hoornaert, L., Pollet, E., Laurichesse, S., Phalip, V. y Avérous, L. (2018). Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial Biotechnology*, 12, 544–555. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13346>
- Malric-Garajova S., Fortuna, F., Pion, F., Martin, E., Thottathil, A. R., Guillemain, A. et al. (2023). Modification of a marine pine Kraft Lignin sample by enzymatic treatment with a *Pycnoporus cinnabarinus* laccase. *Molecules*, 28, 4873. <https://doi:10.3390/molecules28124873>
- Marin, C. y Kohout, P. (2021). Response of soil fungal ecological guilds to global changes. *New Phytologist*, 229, 656–658. <https://doi.org/10.1111/NPH.17054>
- Marisselvi, M. y Earanna, N. (2018). Molecular identification and screening of mushrooms for antibacterial property against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied and Natural Science*, 10, 791–796. <https://doi.org/10.31018/jans.v10i2.1682>
- Merlin, C., Devers, M., Crouzet, O., Heraud, C., Steinberg, C., Mougín, C. et al. (2014). Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 4914–4927. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1971-8>
- Minkyong, K., Chorong, A. y Changmu, K. (2020). Comparisons of mycelial growth characteristics according to culture conditions of Ulleungdo Collection Strains. *The Korean Journal of Mycology*, 48, 75–85. <https://doi.org/10.4489/KJM.20200009>
- Munsell Color Company. (1975). Munsell Soil Color Charts. Munsell Color Company, Baltimore.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S. et al. (2005). Plectasina is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437, 975–980. <https://doi.org/10.1038/nature04051>
- Nelson, D., Moore, J. E., Millar, B. C. y Rao, J. R. (2019). Antimicrobial properties of native Ulster macrofungi (mushrooms and toadstools) to clinical pathogens. *Ulster Medical Journal*, 88, 128–132.
- Oliveira, J. J. S., Vargas-Isla, R., Cabral, T. S., Rodrigues, D. P. e Ishikawa, N. K. (2019). Progress on the phylogeny of the Omphalotaceae: *Gymnopus* s. str., *Marasmiellus* s. str., *Paragymnopus* gen. nov. and *Pusillomyces* gen. nov. *Mycological Progress*, 18, 713–739. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01483-5>
- Pawlowska, J., Okrasinska, A., Kislo, K., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Sztraj, K., Dolatabadi, S. et al. (2019). Carbon assimilation profiles of mucoralean fungi show their metabolic versatility. *Scientific Reports*, 9, 11864. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48296-w>
- Peay, K. G., Kennedy, P. G. y Bruns, T. D. (2008) Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience*, 58, 799–810. <https://doi.org/10.1641/b580907>
- Petersen R. y Hughes K. (2014) New North American species of *Gymnopus*. *North American Fungi*, 9, 1–22. <http://dx.doi.org/10.2509/naf2014.009.003>
- Petersen, R. H. y Hughes, K. W. (2019). Two additional species of *Gymnopus* (Euagarics, Basidiomycotina). *Myckeys*, 45, 1–24. <https://dor.org/10.3897/myckeys.45.29350>
- Rambaut, A. (2006). figTree: Tree figure Drawing Tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Philippot, L., Griffiths, B. S. y Langenheder, S. (2021). Microbial community resilience across ecosystems and multiple disturbances. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85, e00026-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-20>
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P. y Pérez-Moreno, J. (2010). Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico. *Annals of Microbiology*, 60, 217–226. <https://doi.org/10.1007/S13213-010-0030-7>
- Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. Ed. Digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/VegetacionMxPort.pdf>

- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H. et al. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3, 417, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Singer, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*. 4a Ed. Koenigstein, Alemania: Koeltz Scientific Books.
- Skrede, I., Carlsen, T., Stensrud, Ø. y Kausserud, H. (2012). Genome wide AFLP markers support cryptic species in *Coniophora* (Boletales). *Fungal Biology*, 116, 778–784. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.009>
- Sun, Y., Liu, Z. L., Hu, B. Y., Chen, Q. J. y Yang, A. Z., (2021). Purification and characterization of a thermo- and pH-stable laccase from the litter-decomposing fungus *Gymnopus luxurians* and laccase mediator systems for dye decolorization. *Frontiers in Microbiology*, 12, 672620. <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2021.672620>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive sequence alignment through sequence weighting, position specific, gaps penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thorn, R. G., Reddy, C. A., Harris, D. y Paul, E. A. (1996). Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4288–4292. <https://doi.org/10.1128/aem.6211.4288-4292.1996>
- Toledo, C. V., Barroetaveña, C. y Rajchenberg, M. (2014). Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana Biodiversidad*, 85, 1093–1103. <https://doi.org/10.7550/rmb.40010>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Gianfreda, L., Valenzuela, E. y Diez, M.C. (2008). Enzymatic characterization of Chilean native wood-rooting fungi for potential use in the bioremediation of pulled environments with chlorophenols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 285. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9810-7>
- Ványolós, A., Orvos, P., Chuluunbaatar, B., Tálosi, L. y Hohmann, J. (2019). GIRK channel activity of Hungarian mushrooms: From screening to biological active metabolites. *Fitoterapia*, 137, 104272. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104272>
- Voyro, S., Roussel, S., Munaut, F., Varese, G. C., Ginepro, M., Declerck, S. et al. (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research*, 113, 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications*. Cambridge: Academic Press.
- Zmitrovich, I. V., Spirin, W. A. y Wasser, S. P. (2006). Variability of *Byssomerulius corium* in the Mediterranean. *Mycotaxon*, 97, 83–90.