

## Caracterización *in vitro* y producción de inóculo de cepas guatemaltecas de *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke

Maria del Carmen Bran\*, Roberto Cáceres, Natalia Gurriarán, Osberth Morales, Roberto Flores

Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [mdcbran@yahoo.com](mailto:mdcbran@yahoo.com)

Recibido: 02 de julio 2015 / Revisión: 01 de septiembre 2015 / Aceptado: 04 de noviembre 2015 / Disponible en línea: 16 de noviembre 2015

### Resumen

*Lepista nuda* es un hongo comestible muy apreciado por su delicado sabor, especialmente en varios países de Europa. En Guatemala, lo consumen personas de las etnias kaqchikel y mam, por lo que constituye un alimento ancestral que puede aprovecharse como una alternativa alimenticia y económica. Por tal razón, en este estudio se investigaron cinco cepas nativas de *L. nuda* y se evaluó su crecimiento *in vitro* en tres medios de cultivo (agar extracto de malta -AEM-, agar papa dextrosa -APD- y agar Sabouraud -SAB-) a dos temperaturas (18 y 26°C), así como la producción de inóculo en granos de trigo, cebada y sorgo. Se determinó que el medio más adecuado para el crecimiento micelial de las cepas fue AEM incubado a 26°C. Todas las cepas presentaron colonias de color blanco a lila, textura algodonosa, bordes irregulares, con hifas de 1 a 4 µm y fibulas en regular cantidad a abundantes en todos los medios evaluados. En la producción de inóculo, las cepas presentaron mayor velocidad de colonización en los granos de trigo. Se recomienda utilizar AEM para la producción de biomasa y granos de trigo para la producción de inóculo de las cepas evaluadas.

Palabras claves: Hongos comestibles, cultivo de hongos comestibles

### Abstract

*Lepista nuda* is an edible mushroom highly appreciated for its delicate flavor particularly in several European countries. In Guatemala is used by people of kaqchikel and mam ethnic groups and constituting an ancient food that can be used for economic and nutritional alternatives for the country. For this reason, five native strains of *L. nuda* were studied *in vitro* in three culture media (malt extract agar -AEM-, potato dextrose agar -APD- and Sabouraud agar -SAB-) at two different temperatures (18 and 26°C). The spawn production where evaluated in wheat, barley and sorghum grains. The most appropriate medium for the mycelial growth of the strains was AEM incubated at 26°C. All strains showed colonies white to lilac, cottony texture, irregular edges, with hyphae of 1 to 4 µm, and moderate to abundant quantity of clamp connections in all media tested. In the spawn production, the strains showed faster colonization in wheat grains. It is recommend the medium AEM for the production of biomass and wheat grain for spawn production for the strains tested.

Keywords: Edible mushrooms, edible mushrooms culture



## Introducción

*Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke es un hongo comestible que presenta importantes cualidades organolépticas que incluyen un delicado sabor, lo cual lo hace una especie muy apreciada en Europa (Pinto, Barros, Sousa, & Ferreira, 2013). En Guatemala es una especie comestible utilizada por personas de la etnia kaqchikel que habitan los municipios de Comalapa, San Martín Jilotepeque y Tecpán, Chimaltenango, donde se le conoce como *Panq'oq'* (Bran, Morales, Cáceres, & Flores, 2003; Bran et al., 2003; Morales, Bran, & Cáceres, 2010). También se le conoce en el municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, donde los habitantes de la etnia mam se refieren a ella como *Xew* (Flores et al., 2002).

El origen del cultivo de este hongo proviene de Francia y Holanda y aunque se ha realizado una gran labor para cultivarla, se han presentado algunas complicaciones debido a su largo y lento ciclo de vida (Castro, Moreno, García, & Ortiz, 2014). Se han realizado diversos estudios para conocer las características de su cultivo. En México se evaluó el crecimiento micelial de cuatro cepas de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo y suplementos orgánicos (Gaitán-Hernández & Baéz, 2008).

En Guatemala se han aislado varias cepas de *L. nuda*, sin embargo es necesario conocer los parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas recolectadas en diversas localidades donde tradicionalmente se utiliza como alimento. Por tal motivo, en esta investigación se estudiaron cinco cepas nativas de *L. nuda* para evaluar su crecimiento *in vitro* en diferentes medios de cultivo a dos temperaturas, así como la producción de inóculo sobre tres granos de cereales, con el fin de iniciar el estudio del cultivo de este hongo utilizando residuos generados por las actividades madereras y agrícolas del país (Bran et al., 2004).

## Materiales y métodos

### Cepas de *L. nuda*

Las cepas utilizadas fueron aisladas de especímenes silvestres recolectados entre los años 2001 a 2010 y se encuentran depositadas en el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrícicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Los códigos y procedencia de las cepas son: 17.01, 54.02 y 21.10 (Tecpán,

Chimaltenango), 50.09 (Comalapa, Chimaltenango) y 4.10 (San Jorge Muxbal, Santa Catarina Pinula, Guatemala)

### Revitalización y producción de biomasa de las cepas

Las cepas se sembraron en el medio APD y se incubaron a 26°C por 30 días. Posteriormente se resembraron en agar AEM y se incubaron a 26°C por dos semanas.

### Crecimiento micelial de las colonias en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier, Toriello y Ulloa (2002) y Stamets (1993). Se prepararon los medios de cultivo AEM, APD y SAB en cajas de Petri de poliestireno desechables estériles de 9 cm de diámetro. Después cada medio se inoculó con un círculo de aproximadamente 0.5 cm de diámetro que contenía medio AEM con el micelio de la cepa respectiva. Se inocularon 40 cajas de cada medio y cepa, para un total de 600 unidades experimentales (300 para cada temperatura de incubación). Posteriormente se incubaron a 18 y 26°C, durante 17 días. Se midió el diámetro (cm) de las colonias, cada 3 días.

Al finalizar el tiempo de incubación, las colonias se caracterizaron macro y microscópicamente de acuerdo con lo recomendado por Nobles (1965). Se observó el color del anverso y reverso de las colonias, la textura, la forma y la producción de exudado. También se describió microscópicamente el micelio y se realizaron preparaciones con azul de lactofenol, para observar las características hifales y fíbulas, así como para medir el diámetro de las hifas ( $\mu\text{m}$ ).

### Inóculo

El inóculo se preparó utilizando granos de trigo, sorgo y cebada según lo recomendado por Quimio, Chang y Royse (1990). Los granos se hidrataron por 18 h hasta alcanzar aproximadamente el 80% de humedad. Luego se colocaron 20 g de cada uno de los granos en bolsas de polipapel y se añadió carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (1 % p/p) como regulador de pH. Se realizaron 20 repeticiones por cada grano y cepa y se obtuvieron un total de 300 unidades experimentales. Las bolsas con los granos se esterilizaron durante 0.5 h a 121°C y 1.0 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Posteriormente a este tratamiento se

dejaron enfriar. Después en condiciones de esterilidad, los granos contenidos en las bolsas de polipapel se colocaron en cajas de Petri estériles y se inocularon en el centro de cada caja con un fragmento de 0.5 cm<sup>2</sup> que contenía medio AEM y micelio de la cepa respectiva. Posteriormente se incubaron a 26°C.

El diámetro de las colonias se midió cada 3 días, de acuerdo con lo recomendado por Coello-Castillo, Sánchez y Royse (2009), hasta que el micelio creció en toda el área de la caja. Posteriormente se estimó la Tasa de Extensión Radial (RER) expresada en mm/día, con la siguiente fórmula:  $RER = \frac{X2 - X1}{T2 - T1}$ , donde X1 es el diámetro inicial (mm) de la colonia, X2 el diámetro final (mm), T1 el tiempo inicial (0) y T2 el tiempo final de incubación (días).

### Diseño del estudio y análisis de la información

Para el estudio del crecimiento micelial de las colonias se utilizó un diseño factorial 5 x 3 x 2 (cinco cepas, tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación). En la producción de inóculo se utilizó un diseño factorial 5 x 3 (cinco cepas y tres granos de cereales). Al final de cada período de incubación se calcularon la media aritmética del diámetro de las colonias y RER y su respectiva desviación estándar.

Posteriormente se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para evidenciar las diferencias significativas de la interacción de los factores: cepas, medios de cultivo y temperaturas de incubación. De igual forma, se evaluó la interacción del valor RER obtenido por las cepas en función de los granos evaluados para la producción del inóculo. Además se elaboraron gráficas del tipo barras de error.

### Resultados

Los resultados indicaron que la cepa 4.10 obtuvo los mayores crecimientos en el medio AEM en las dos temperaturas evaluadas, los cuales a su vez fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a las demás cepas, medios y temperaturas ensayadas. Por otra parte, la cepa 54.02 obtuvo los menores diámetros a ambas temperaturas (Tabla 1).

Al observar el efecto de la temperatura y medios de cultivo sobre cada una de las cepas evaluadas, se determinó que el diámetro de crecimiento micelial obtenido por la cepa 4.10 a 26°C fue estadísticamente significativo comparado con las demás ( $p < 0.05$ ). Asimismo, la cepa 54.02 a 26°C obtuvo el crecimiento micelial más bajo (Figura 1).

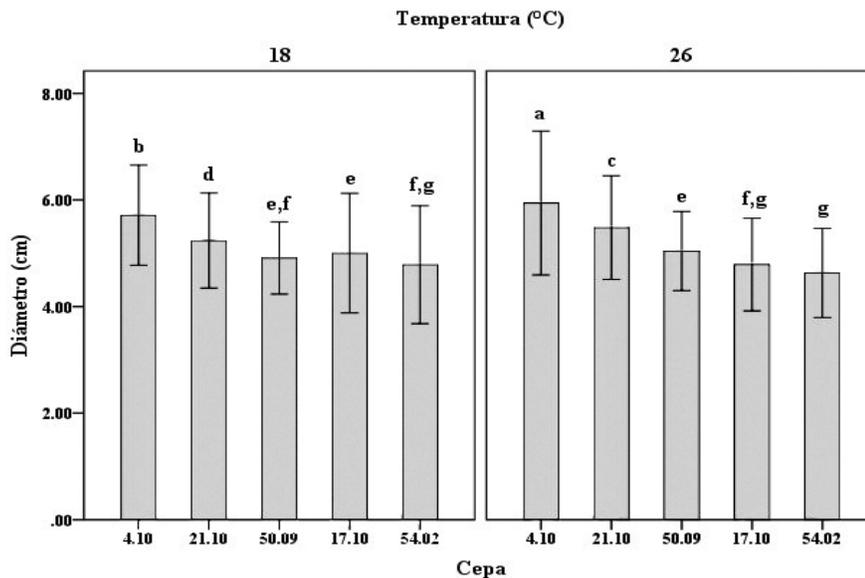


Figura 1. Efecto de las cepas y temperaturas de incubación sobre el diámetro del crecimiento micelial de todos los medios evaluados. Las barras de error indican la media ± la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Tabla 1  
Crecimiento miceliar de cepas de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo y temperaturas

Temperatura (°C)	Cepa	Medio	Diámetro de las colonias (cm)	
18	4.10	AEM	6.81 ± 0.43	b <sup>1</sup>
		APD	5.50 ± 0.44	f,g
		SAB	4.83 ± 0.45	i,j,k,l
	17.01	AEM	4.91 ± 0.29	i,j
		APD	6.38 ± 0.23	c,d
		SAB	3.72 ± 0.18	o
	21.10	AEM	6.11 ± 0.42	d,e
		APD	5.39 ± 0.58	g,h
		SAB	4.22 ± 0.18	n
	50.09	AEM	5.77 ± 0.38	e,f
		APD	4.46 ± 0.30	l,m,n
		SAB	4.50 ± 0.20	k,l,m,n
	54.02	AEM	5.11 ± 0.33	h,i
		APD	5.90 ± 0.24	e
		SAB	3.34 ± 0.08	p
26	4.10	AEM	7.78 ± 0.37	a
		APD	5.20 ± 0.23	g,h,i
		SAB	4.85 ± 0.23	i,j,k
	17.01	AEM	5.33 ± 0.34	g,h
		APD	5.42 ± 0.11	f,g,h
		SAB	3.61 ± 0.20	o,p
	21.10	AEM	6.61 ± 0.43	b,c
		APD	5.40 ± 0.44	f,g,h
		SAB	4.43 ± 0.15	m,n
	50.09	AEM	5.97 ± 0.42	e
		APD	4.46 ± 0.18	l,m,n
		SAB	4.70 ± 0.33	j,k,l,m
	54.02	AEM	4.94 ± 0.30	i,j
		APD	5.41 ± 0.28	f,g,h
		SAB	3.54 ± 0.10	o,p

Nota. <sup>1</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

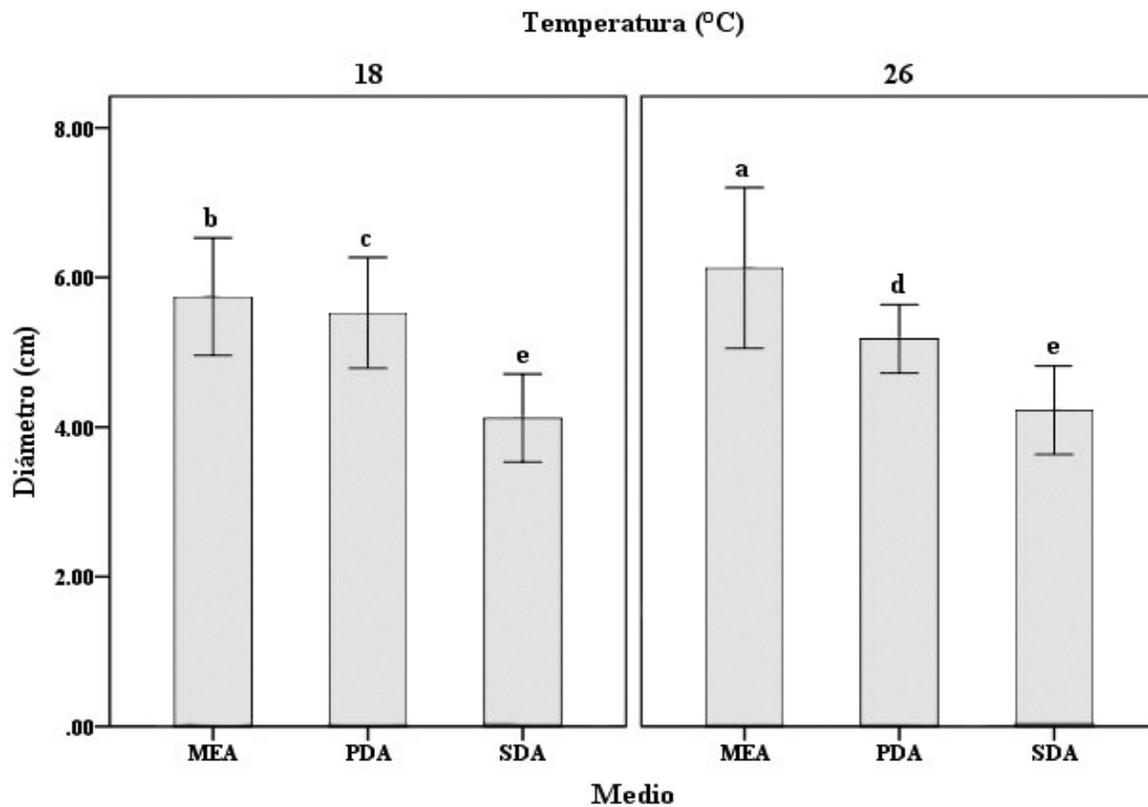


Figura 2. Efecto de los medios de cultivo y temperaturas de incubación sobre el diámetro del crecimiento micelial de todas las cepas evaluadas. Las barras de error indican la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Al comparar el efecto de la temperatura y cepas en los medios de cultivo evaluados, se determinó que el crecimiento micelial fue mayor en el medio AEM a 26°C, el cual evidenció diferencia significativa con respecto a los demás ( $p < 0.05$ ). Además, el crecimiento en el medio SAB a ambas temperaturas fue menor y estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los otros medios de cultivo evaluados (Figura 2).

La morfología macroscópica de las cepas mostró colonias, algodonosas, con micelio aéreo de escaso a abundante y bordes irregulares, color blanco a liliáceo sin coloración en el reverso y microscópicamente presentaron hifas hialinas, no ramificadas, con diámetro entre 1.0-4.0  $\mu\text{m}$ , así como fibulas abundantes, en los medios y temperaturas evaluados.

En la producción de inóculo, se determinó que las cepas 4.10, 17.01, 50.09 y 54.02 colonizaron con mayor velocidad los granos de trigo, con excepción de la cepa 21.10 que lo hizo en cebada, sin embargo, no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Se resalta que el menor tiempo de colonización en trigo lo mostró la cepa 4.10 (Tabla 2).

Al comparar el efecto de los granos evaluados sobre las cepas, se encontró que la cepa 54.02 mostró la mayor RER; sin embargo, no presentó diferencia estadísticamente significativa con la cepa 17.01 ( $p > 0.05$ ). La menor RER se observó en la cepa 21.10, la cual no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a la cepa 4.10 (Figura 3).

Tabla 2  
Producción de inóculo de cepas de *L. nuda* en diferentes sustratos

Cepa	Sustrato	RER (mm/día)	
4.10	Cebada	3.32 ± 1.03	e
	Sorgo	4.89 ± 0.64	b,c
	Trigo	5.54 ± 0.16	a
17.01	Cebada	5.25 ± 0.61	a,b
	Sorgo	4.23 ± 0.43	d
	Trigo	5.58 ± 0.15	a
21.10	Cebada	5.27 ± 0.33	a,b
	Sorgo	2.63 ± 0.41	f
	Trigo	5.04 ± 0.55	a,b
50.09	Cebada	3.85 ± 0.44	d,e
	Sorgo	4.40 ± 0.49	c,d
	Trigo	5.55 ± 0.11	a
54.02	Cebada	4.03 ± 0.53	d
	Sorgo	5.41 ± 0.89	a,b
	Trigo	5.58 ± 0.15	a

Nota. Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

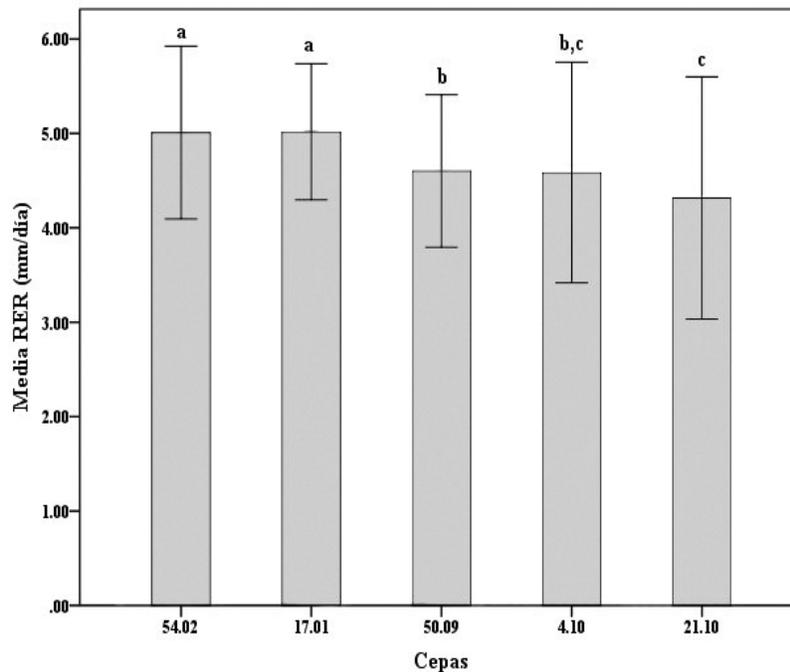


Figura 3. Efecto de las cepas sobre el RER obtenido en diferentes sustratos. Las barras de error indican la media ± la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Al contrastar el efecto de las cepas sobre los granos evaluados, se comprobó que la mayor RER fue observada en granos de trigo y mostró diferencia sig-

nificativa con respecto a cebada y sorgo ( $p < 0.05$ ), sin embargo, no existió diferencia ( $p > 0.05$ ) entre éstos dos últimos (Figura 4).

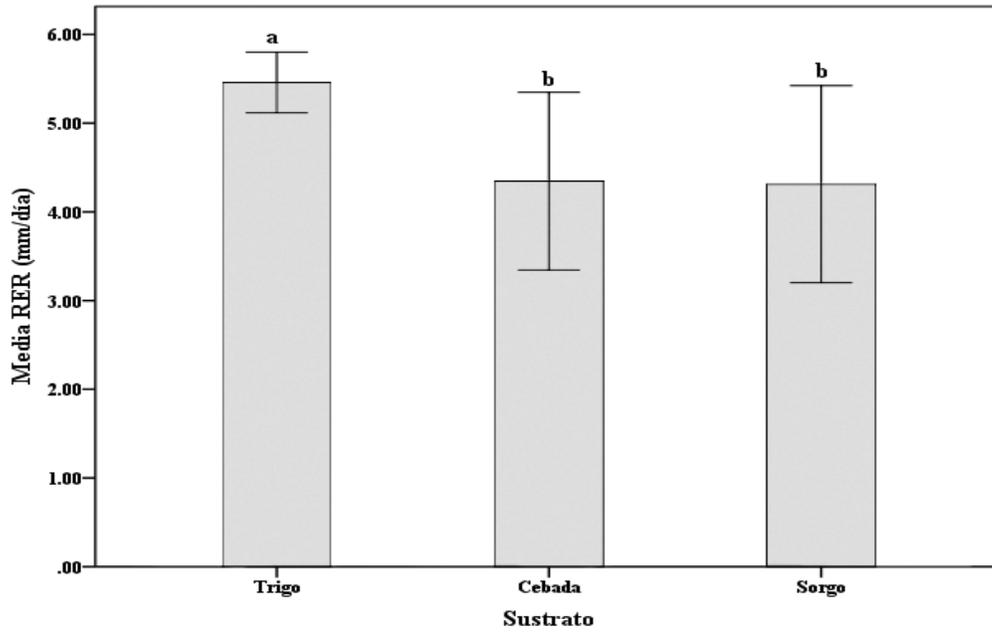


Figura 4. Efecto general observado en los sustratos, con respecto al RER obtenido por las cepas evaluadas. Las barras de error indican la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

En este estudio se comprobó que las cepas de *L. nuda* presentaron en general mayor velocidad de crecimiento a 26°C en AEM, de manera que este medio y temperatura favorecieron el desarrollo del micelio. Este comportamiento puede deberse a que éstas necesitan un medio enriquecido para su desarrollo. El medio de cultivo que reúne esta característica es el AEM, ya que entre sus ingredientes se encuentran el extracto de malta y peptona de harina de soja que proveen de nutrientes de calidad (Bridson, 2002).

En otros trabajos se ha recomendado el uso del medio AEM sin suplementos o adicionado con 2% de lavadura (Stott, Broderick, & Nair, 1996), con polvo de encino, caseína hidrolizada o con peptonas (Gaitán-Hernández & Báez, 2008). En particular, puede ser que las cepas silves-

tres de *Lepista* necesiten sustratos degradados previamente, lo que apoyaría la necesidad de las cepas de crecer en un medio enriquecido y con fácil disponibilidad de nutrientes como los contenidos en el medio AEM (Boddy, Frankland, & van West, 2007).

El hecho que la cepa 4.10 presentara el mayor crecimiento micelial a ambas temperaturas en el medio de AEM, indica su estabilidad y adaptabilidad a diferentes condiciones de crecimiento. Además, dado que la mayoría de las cepas obtuvieron el mayor diámetro de crecimiento micelial en ese medio de cultivo a ambas temperaturas, se recomienda su uso.

Se considera que las cepas 17.01 y 54.02 podrían poseer enzimas capaces de degradar el almidón de forma más eficiente que las demás cepas evaluadas, debido a que crecieron mejor en el medio APD a ambas temperaturas. Sin embargo es necesario realizar estudios

adicionales sobre la producción de amilasas en cada una de las cepas.

En este estudio, la temperatura de incubación 26°C permitió la mejor selección de la cepas de más rápido crecimiento, no así a 18°C, debido a que la temperatura es un factor que influye en la velocidad del crecimiento micelial ya que las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular (Sánchez, 2004). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en otros trabajos realizados con hongos nativos en el país, debido a que cepas de *Schizophyllum commune* y *Neolentinus ponderosus* crecieron mejor a 26°C. En contraste, cepas de *Agrocybe cylindracea* crecieron mejor a una temperatura de 18°C (Bran, Morales, Flores, & Cáceres, 2008; Bran, Morales, Flores, Cáceres, & Blanco, 2007; Bran, Morales, Flores, Cáceres, & Gurriarán, 2009).

En un estudio del crecimiento micelial de cepas silvestres de *L. nuda* procedentes de México y Francia, cultivadas en medios con diferentes suplementos orgánicos, se encontró que las cepas crecieron a una temperatura de 20 y 25°C con resultados muy variables (Gaitán-Hernández & Báez, 2008). Stott (1998) informó de una temperatura de 25°C como la óptima para el crecimiento de *L. nuda* en diferentes medios de cultivo, resultados muy cercanos a los encontrados en esta investigación.

En conclusión debido a su rápido crecimiento, adaptabilidad y estabilidad, la cepa 4.10 es promisoría para la producción de micelio en AEM y la producción de inóculo en granos de trigo a 26°C. La selección de cepas que se deben usar en el cultivo de hongos es importante debido a que una cepa con alta habilidad de colonización, puede disminuir los tiempos de producción de micelio en caja de Petri y en granos de cereales e incluso incrementar la productividad (Sánchez, 2004).

En cuanto a las características macro y microscópicas de las colonias, el color blanco a lila y textura algodonosa así como hifas hialinas con fibulas abundantes, fueron similares a lo reportado para *L. nuda* en otros estudios (Arias, 1977; Sánchez, Honrubia, & Torres, 2000). La presencia de fibulas en todas las cepas es una garantía del estado dicariótico del micelio y aseguran el mantenimiento de éste estado, como un paso previo a la fructificación en los basidiomicetes (Chang & Miles, 2004).

La producción de inóculo en granos de trigo, también ha sido utilizada con buenos resultados para *A. cylindracea* (Philippoussis, Zevarkis, & Diamantopoulou, 2001; Stamets, 1993), *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *N. ponderosus* y *N. lepideus* (Martínez-Ca-

rrera, Morales, & Sobal, 1988; Martínez-Carrera, Soto, & Guzmán, 1985; Palacios, 2000). En Guatemala se ha reportado para la producción de inóculo de cepas nativas de *A. cylindracea* (Bran et al., 2009) y de *S. commune* (Bran et al., 2008)

Es importante señalar que el mejor sustrato o vehículo es aquel que es colonizado en menor tiempo (con mayor RER) por una cepa determinada, ya que una prolongación en el tiempo de incubación promueve la contaminación y alarga los ciclos del cultivo (Stamets, 1993).

A pesar que en esta investigación solamente se estudiaron las características de cultivo *in vitro* y producción de inóculo, pasos previos e importantes para la producción de cuerpos fructíferos se provee de información para el cultivo en Guatemala de *L. nuda*, un hongo nativo muy apreciado por su agradable sabor y textura y que a nivel mundial es considerado un “hongo exótico” de potencial comercial e industrial (Stott et al., 1996).

## Agradecimientos

A la Dirección General de Investigación (DIGI) y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el financiamiento otorgado (proyecto 4.8.63.6.53). A la Inga. Liuba Cabrera, Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición, por la asistencia técnica y administrativa, así como a todas las personas que colaboraron con la ejecución de la presente investigación.

## Referencias

- Arias, R. (1977). *Interacciones entre cuatro hongos ectomicorrícicos y dos especies de coníferas del cerro del Potosí, Geleana, N.L. México* (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales, México.
- Bran, M. C., Morales, O., Cáceres, R. A., & Flores, R. E. (2003). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en Guatemala. Guatemala.
- Bran, M. C., Morales, O., Flores, R., & Cáceres, R. (2008). *Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam (Schizophyllum commune Fr.) (Inf-2008-084)*. Guatemala: Universidad de San Carlos de

- Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bran, M. C., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R., & Blanco, R. (2007). *Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de Neolentinus ponderosus y N. lepideus* (Inf-2007-019). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bran, M. C., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R., & Gurriarán, N. (2009). *Cultivo de cepas guatemaltecas del hongo comestible Tx'yol B'aqman (Agrocybe cylindracea (DC.: Fr.) Maire): Caracterización y producción de cuerpos fructíferos* (Inf-2009-045). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bran, M. C., Morales, O., Flores, R., Rodríguez, E., Salazar, J., Cáceres, R., ... Arriola, H. (2003). *Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III)* (Inf-2003-30). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bran, M. C., Morales, O., Flores, R., Salazar, J., Alarcón, D., Cáceres, R., ... Carranza, C. (2004). *Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV)* (Inf-2004-14). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bridson, E. (2002). *Oxoid Manual*. England: Wade Road.
- Boddy, L., Frankland, J., & van West, P. (Eds.). (2007). *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Amsterdam: Academic Press.
- Castro, F. J., Moreno, A., García, A., & Ortiz, F. (2014). El cultivo de *Lepista nuda* en sustrato con hojas de olivo para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales en almazaras. *Anales de Biología*, 36, 11-17.
- Chang S., & Miles P. G. (2004). *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2nd. ed). Boca Raton: CRC Press.
- Coello-Castillo, M. M., Sánchez, J. E., & Royse, D. J. (2009). Production of *Agaricus bisporus* on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. *Bioresource Technology*, 100(19), 4488-4492.
- Flores, R., Bran, M., Rodríguez, E., Morales, O., Berdúo, E., & Montes, L. (2002). *Hongos micorrízicos de bosques de pino y pinabete (P-2003-03)*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Gaitán-Hernández, R., & Baéz, I. (2008). Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda* en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Revista Mexicana de Micología*, 26, 41-49.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., & Sobal, M. (1988). Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada. *Revista Mexicana de Micología*, 4, 153-160.
- Martínez-Carrera, D., Soto, C., & Guzmán, G. (1985). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de café como sustrato. *Revista Mexicana de Micología*, 1, 101-108.
- Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales, O., Bran, M. C., & Cáceres, R. (2010). Los hongos comestibles de uso tradicional en Guatemala. En D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI* (pp. 237-464). Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales.
- Nobles, M. K. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 43(9), 1097-1139.
- Palacios, A. (2000). Investigación sobre la potencialidad del cultivo de dos cepas silvestres de *Neolentinus*

- lepideus* y *N. ponderosus*. En *Memorias de VII Congreso Nacional de Micología* (pp. 53-54). Querétaro, México.
- Philippoussis, A., Zevarkis, G. I., & Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*, 191-200.
- Pinto, S., Barros, L., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical characterization and antioxidant properties of *Lepista nuda* fruiting bodies and mycelia obtained by *in vitro* cultures: Effects of collection habitat and culture media. *Food Research International*, *51*(2), 496-502.
- Quimio, T. H., Chang, S. T., & Royse, D. J. (1990). *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushrooms culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*, 756-762.
- Sánchez, F., Honrubia, M., & Torres, P. (2000). Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología*, *17*, 127-134.
- Stamets, P. (1993). *Growing gourmet & medicinal mushrooms*. Berkeley, C.A. : Ten Speed Press & Mycomedea.
- Stott, K. (1998). Characteristics of Australian edible fungi in the genus *Lepista* and investigation into factors affecting cultivation (Tesis de doctorado), University of Western Sydney Hawkesbury, Sydney.
- Stott, K., Broderick, A., & Nair, T. (1996). Investigation to cultivation parameters for Australian species of *Lepista*. En D. Royse (Ed.), *Mushroom Biology and Mushroom Products* (pp. 285-291). Pennsylvania: Penn State University.