

Auricularia fuscosuccinea: una cepa nativa ecuatoriana para hacer frente a la crisis alimentaria

Auricularia fuscosuccinea: a native Ecuadorian strain to face the food crisis

Edwin Jesús Ortiz Rodríguez¹, Julio Amilcar Pineda Insuasti², Astrid Stefanía Duarte Trujillo³, Claudia Patricia Soto Arroyave⁴, Camilo Alejandro Pineda Soto⁵

¹ Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Antonio Ante, Antonio Ante, Ecuador.

² Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

³ Organización Micológica Internacional (OMI), Florencia, Colombia.

⁴ Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Colombia.

⁵ Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: edwinortizrod@gmail.com

Recibido: octubre 27 de 2017

Aceptado: diciembre 16 de 2017

RESUMEN

Auricularia spp. es un hongo que presenta amplio potencial en la industria alimentaria debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. Aunque, las inadecuadas técnicas de identificación y propagación in vitro han limitado su aprovechamiento. Por ello, el objetivo de este trabajo es obtener cepas puras de *Auricularia* spp. con potencial industrial. Se aislaron e identificaron y caracterizaron químicamente cepas nativas del hongo, y se seleccionó el medio de cultivo que permitiera la mayor velocidad de crecimiento. Las cepas aisladas mostraron identidad genética del 99% con *A. fuscosuccinea* y una velocidad de crecimiento óptima de 7,2 mm/día en medio Agar Extracto de Malta (MEA), que presentó diferencias estadísticamente significativas con PDA.

PALABRAS CLAVE: aislamiento, caracterización seguridad alimentaria, tasa de crecimiento.

ABSTRACT

Auricularia spp. is a fungus that has wide potential in the food industry due to its nutritional and medicinal properties. Although, the inadequate techniques of identification and in vitro propagation have limited its use. Therefore, the objective of this work is to obtain pure strains of *Auricularia* spp. with industrial potential. Native strains of the fungus were isolated and identified and chemically characterized, and the culture medium that allowed the highest growth rate was selected. The isolated strains showed 99% genetic identity with *A. fuscosuccinea* and an optimal growth rate of 7.2 mm / day in the Malt Agar Extract Medium (MEA), which presented statistically significant differences with PDA.

KEYWORDS: isolation, characterization, food security, growth rate.

INTRODUCCIÓN

El Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) n° 2 de la Organización de las Naciones Unidas

(ONU, 2015) pretende disminuir el hambre a cero, por lo que una serie de políticas alimentarias y sociales, e invenciones científicas han sido implementadas por todos

los países miembros (Viñas, 2011, 2012). Sin embargo, el objetivo de “hambre cero” está muy ligado al nº 3, “salud y bienestar”, ya que no se trata sólo de saciar de comida a los individuos, sino también de suministrarles los nutrientes necesarios para gozar de un buen estado de salud.

El suministro de proteína es uno de los retos mundiales para suplir los requerimientos dietéticos de la población (Godfray *et al.*, 2010), no obstante, su producción cada vez es más insostenible ambiental y económicamente; por tanto la modificación de hábitos de consumo hacia fuentes de proteína alternativa es una opción viable (Capone, El Bilali, Debs, Cardone, y Driouech, 2014; Hoogland, de Boer, y Boersema, 2005). En este contexto, la producción de proteína microbiana es una buena alternativa (Pineda, Ramos y Soto, 2014), ya que presenta altos rendimientos; no obstante, el consumo de proteína de algas, bacterias y levaduras ha sido limitado por sus efectos nocivos en la salud del consumidor (García-Garibay, Gómez-Ruiz, Cruz-Guerrero, y Bárzana, 2014; Zepka, Jacob-Lopes, Goldbeck, Souza-Soares, y Queiroz, 2010). La proteína fúngica, pese a presentar menor rendimiento, no provoca efectos adversos en el consumidor, contiene todos los aminoácidos esenciales y presenta alta digestibilidad (Nigam y Singh, 2014; Román Corrochano, 2013).

Auricularia spp. es una de las diez setas producidas a escala industrial, que crece de forma natural en los tallos y las raíces de algunos árboles, así como en materiales lignocelulósicos en descomposición (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016; Ortiz *et al.*, 2016), por lo que su producción constituiría una forma de reciclaje de residuos agroindustriales viable, teniendo en cuenta que Ecuador es un país con vocación agrícola (Monteros Guerrero, Sumba Lusero, y Salvador Sarauz, 2013).

Por ello, el objetivo de este trabajo es obtener cepas puras de *Auricularia* spp. con potencial industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Se empleó los medios de cultivo Agar antibiótico, Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA) de la marca FUNGI PERFECTI®, los cuales se prepararon siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

Material biológico

Los carpóforos de *Auricularia* sp. fueron recolectados en la provincia de Carchi, cantón Mira, parroquia Jacinto Jijón y Camaño, comunidad La Joya, en un bosque tropical húmedo con las siguientes coordenadas UTM WGS84 (GPS MAGELLAN 550): 17N 806475 Este 10088020 Norte. Los hongos habían crecido sobre troncos caídos y restos de madera aserrada de pendo en descomposición; por lo que para su recolección se transportaron adheridos al sustrato, como indica la fig. 1.



Fig. 1. Carpóforos de *Auricularia* sp. adheridos al sustrato natural.

Aislamiento

Se realizó por escisión de los carpóforos, extracción de tejidos internos de 2mm de longitud y posterior incubación en agar antibiótico durante 6 días a 22 °C. Se consideraron como aislamientos positivos, todos aquellos con crecimientos y características miceliares uniformes, sin

contaminaciones ni estados conidiales. Las cepas se purificaron mediante el método de repiques sucesivos (Ortiz *et al.*, 2016) y se rotularon con la nomenclatura ceba AP1-1810, ceba AP2-1810 y ceba AP3-1810. Luego, se liofilizaron por congelación a 200 atm descendiendo desde 10 °C hasta -50 °C, y secado a 300 atm de presión, ascendiendo hasta 30 °C. Las cepas se almacenaron a 4 °C en el Banco de Recursos Genéticos (BRG) del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

Identificación

Se emplearon las claves taxonómicas reportadas por Montoya-Alvarez y colaboradores (2011), luego se enviaron los carpóforos al laboratorio especializado IDGEN. La identificación molecular tuvo el siguiente protocolo: extracción de ADN mediante el método de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989) modificado con la adición de ARNasa (X. Z. Fan, Zhou, Xiao, Xu, y Bian, 2014); amplificación de barcode con ITS4 e ITS5 como cebadores (primers); secuenciación estándar por el Método de Sanger, Nicklen y Coulson (1977); ensamblaje de productos de PCR empleando el programa bioinformático GENEIOUS; y contraste de resultados con las secuencias registradas en la base de datos GenBank.

Cálculo de velocidad de crecimiento

Cajas de Petri que contenían los medios de cultivo en estudio (PDA y MEA) fueron inoculadas con las cepas liofilizadas del CEBA e incubadas a 22 °C durante 7 días. Las medidas fueron tomadas con cinta métrica, como muestra la fig 2.

La ecuación (1) permitió calcular la velocidad de crecimiento (V) como el cociente entre el diámetro de la colonia (x) y el tiempo de incubación (t) (Pineda, Soto, Santiago, Pónce, y Reyes, 2015).

$$V \left(\frac{\text{mm}}{\text{d}} \right) = x (\text{mm}) / t (\text{d}) \quad (1)$$



Fig. 2. Técnica de medición de crecimiento.

Diseño experimental

Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco réplicas por tratamiento para un total de 10 corridas. Como factor de estudio se seleccionó el medio de cultivo (MEA y PDA), como variable de respuesta la velocidad de crecimiento de la cepa nativa y como factor de ruido el nivel de luz. Los parámetros de operación fueron: la temperatura a 22°C, el tiempo de incubación de 7 días y el tipo de cepa, que se mantuvieron constantes durante el desarrollo del experimento.

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico se realizó empleando el software estadístico STATGRAPHIS®, Centurion XV, versión 15.2.05. Se realizó un Análisis De Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) para evaluar el efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento radial de *A. fuscosuccinea*; la prueba se efectuó con un nivel de confianza del 95%, un bloque de estudio y 9 grados de libertad para el error, tomando como Hipótesis nula (H_0) que la velocidad media de crecimiento de los distintos medios de cultivo son iguales y como Hipótesis alternativa (H_a) que al menos una es diferente.

Previamente, se verificaron los supuestos de la estadística paramétrica más importantes: normalidad y homocedasticidad. La distribución normal de los residuales se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk, con un nivel de confianza del 95%, tomando como H_0 que la muestra proviene de una población con distribución normal y como H_a lo contrario.

Para apoyar la afirmación anterior se realizó la prueba de Jarque-Bera, con un nivel de confianza del 95%, empleando como H_0 que la muestra tiene la asimetría y la curtosis de una distribución normal y como H_a lo contrario. La homocedasticidad de los datos se verificó con la prueba de Levene, con un nivel de confianza del 95%, empleando como H_0 que la muestra proviene de una población con igualdad de varianzas entre los grupos y como H_a lo contrario.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento

El aislamiento de *Auricularia* sp. se hace a partir del tejido del hongo y no de esporas debido a que los cultivos de tejidos son esencialmente clones del hongo, en contraste con los cultivos de esporas, que presentan variabilidad genética (Ardón López, 2007).

El medio de cultivo empleado, agar PDA, coincide con el empleado por varios investigadores para el aislamiento de especies del género, tales como *A. auricula* (Fan *et al.*, 2014; Tao, Liu, y Xu, 2011).

Las colonias fúngicas presentaron micelio blanco de aspecto sedoso a plumoso y mediana densidad, como muestra la fig. 3.

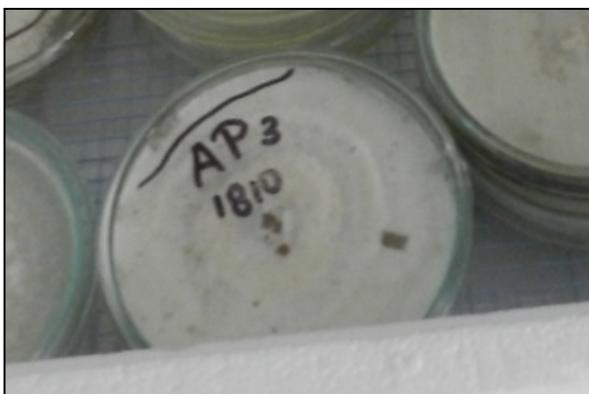


Fig. 3. Cepa de *Auricularia* sp. purificada.

Identificación morfológica

Los cuerpos fructíferos recolectados presentaron crecimiento en solitario, unión lateral al sustrato, forma de oreja, estípites

corto o ausente, color rosa amarronado, apariencia glabra, consistencia cerosa y gelatinosa cuando frescos mientras que coriácea cuando secos, himenio suave con pliegues leves, tamaño de 2 a 10 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, y una zona pilosa inferior a 100 μm con capa medular inferior a 150 μm , coincidiendo con Lowy (1951) y Bolaños y Soto (2011).

Taxonómicamente se puede decir que las cepas corresponden a *A. Fuscosuccinea*, aunque, es necesario un estudio filogenético para mayor exactitud (Montoya-Alvarez *et al.*, 2011).

Identificación molecular

Los enfoques moleculares se consideran herramientas poderosas para investigar la relación inter e intragenética de especies de basidiomicetos, apoyando los resultados obtenidos a partir de métodos convencionales tales como los morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Tao *et al.*, 2011).

En este trabajo se emplearon los cuerpos fructíferos del *Auricularia* sp. (*Auri1*) como muestra para la extracción de ADN, a diferencia de otros trabajos donde se emplea el micelio seco luego de Fermentación en Estado Líquido (FEL) (Fan *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2011).

La extracción de ADN se realizó en este trabajo por el método de Sambrook y colaboradores (1989), a diferencia de Tao y Colaboradores (2011), que emplearon el método de Doyle y Doyle (1987) modificado, y de Yan y colaboradores (2004), que emplearon el método de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés). Para la extracción se requirió de un tratamiento enzimático adicional, que permitiera la obtención de ADN de alta calidad, debido a que el cuerpo fructífero de *Auri1* posee una elevada concentración de proteínas y polisacáridos.

El ADN de *Auri1* se extrajo por duplicado con el fin de obtener una concentración y calidad de ADN que permitiera la correcta amplificación del Fragmento de Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) mediante PCR. Adicionalmente, las muestras se trataron con ARNasa y se diluyeron hasta una concentración en un rango de 15 a 30 ng/ μ L, para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN, previo a su utilización en el ensamblaje de la PCR. Este rango de concentración de ADN es semejante al rango reportado por Tao y Colaboradores (2011) para la identificación de cepas nativas de *A. auricula*, 20 a 40 ng/ μ L.

El análisis de secuencias de Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en los estudios de filogenia en o por debajo del nivel de género y en la identificación de hongos (Dunham, O'dell, y Molina, 2003).

Los resultados del ensamblaje de ADN se visualizan en la fig. 4, donde "C-" es el control negativo y el marcador de peso molecular tiene una longitud de 1000 pb.

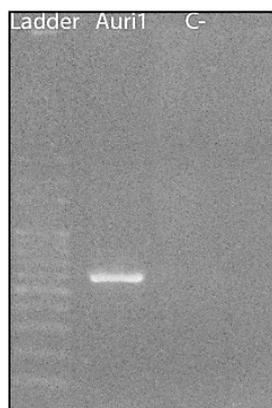


Fig. 4. Amplicón del fragmento ITS de *Auri1*.

El ADN lineal de *Auri1* presenta longitud de 636 pb, calidad del 71,5 % y al contrastarse con la accesión JX065150.1 de la base de datos de nucleótidos de GenBank muestra identidad del 99 % con *A. fuscossuccinea* (GenBank, 2013), conforme con la publicación de Looney, Birkebak y Matheny (2013). Este porcentaje de identidad genética es **favorable**, ya que otros

estudios evidencian que las cepas nativas presentan una alta diversidad genética. Cepas nativas de *A. auricula-judae* presentaron una identidad genética promedio de tan sólo el 41% (Du, Cui, y Dai, 2011), mientras que las cepas de *A. auricular* presentaron el 50-63% (Li *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2004) y las de *A. polytricha* el 58-65 % (Du, Cui, Zhang, y Dai, 2013; Yan *et al.*, 2004).

Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento promedio de *A. fuscossuccinea* fue mayor en MEA que en PDA, cuyos valores correspondieron a 7,20 mm/d y 6,28 mm/d, respectivamente.

Carreño-Ruiz y colaboradores (2014) cultivaron *A. Fuscossuccinea* en diferentes medios de agar para su caracterización morfológica luego del aislamiento y obtuvieron velocidades de crecimiento superiores en PDA que en MEA; aunque las cepas no habían sido sometidas a liofilización, a diferencia de este trabajo, lo que probablemente causó las discrepancias. Aunque, algunos autores sostienen que la influencia de la liofilización en la supervivencia de los hongos no es estadísticamente significativa, siempre y cuando se sigan los protocolos adecuados (Singh, Upadhyay, Yadav, y Tiwari, 2004; Singh, Yadav, y Rai, 2007).

En el trabajo de Carreño-Ruiz y colaboradores (2014), las velocidades de crecimiento en PDA son similares a las de este trabajo, alrededor de 6 mm/ día, caso contrario a las velocidades de crecimiento en MEA que corresponden a aproximadamente 4 mm/ día, casi tres unidades inferiores a las de este trabajo.

Tratamiento estadístico

La velocidad promedio en MEA fue de 7,20 mm/d con un mínimo de 7,0 mm/d, un máximo de 7,3 mm/d, desviación estándar de 0,141421, coeficiente de variación de 0,0196419, sesgo de -0,8838835 y curtosis de -1,750000. La velocidad promedio en PDA fue de 6,28 mm/d, con un mínimo de 6,2 mm/d,

un máximo de 6,4 mm/d, desviación estándar de 0,109545, coeficiente de variación de 0,0174434, sesgo de 0,6085806 y curtosis de -3,333333. Según esto, el mejor medio de cultivo para *A. fuscosuccinea*.

Se observa que los datos por grupos presentan una dispersión muy semejante, de 1,9% y 1,7% para MEA y PDA, respectivamente, aunque el rango en el nivel MEA es 0,1 unidades mayor. Los valores de curtosis muestran que los datos en MEA presentan apuntamiento bastante platicúrtico, mientras que en PDA presentan apuntamiento casi mesocúrtico, tendiendo a leptocúrtico. Los valores de sesgo muestran que los datos en MEA presentan una leve asimetría negativa mientras los datos en PDA presentan una leve asimetría positiva, que al operarse da 0,03770452, un valor no muy alejado del correspondiente a la distribución normal, que es cero.

La prueba de Shapiro-Wilk arrojó un valor P de 0,07397221 que demuestra que los datos

muestrales provienen de una población con distribución normal. La prueba de Jarque-Bera dio un valor P de 0,5039801 que evidencia que los datos tienen la asimetría y la curtosis de una distribución normal. La prueba de Levene suministró un valor Pr de 0,8088874 que comprueba que las varianzas poblacionales son iguales.

El ANOVA arrojó un valor P de 0,000 y una razón F de 132,25, que evidencian que existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de la velocidad de crecimiento lineal de un medio de cultivo y otro.

CONCLUSIONES

Se aislaron cepas nativas de *Auricularia* spp., las cuales mostraron identidad genética del 99% con *B. bassiana* y una calidad del 75%. El medio de cultivo más apropiado para su crecimiento in vitro es el medio MEA, ya que mostró diferencias estadísticamente significativas con el medio PDA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardón López, C. E. (2007). *La producción de los hongos comestibles*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado a partir de http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2043/07_1932.pdf
- Bolaños, A. C., y Soto, E. (2011). Macrohongos Comestibles Y Medicinales Comunes En La Vegetación De La Universidad Del Valle, Colombia. *Revista De Ciencias*, 15, 31–38. Recuperado a partir de http://revistaciencias.univalle.edu.co/volumenes/vol_15/ABolanos.pdf
- Cano-Estrada, A., y Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico , nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres Economic , nutritional and medicinal value of edible wild mushrooms. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75–80. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011>
- Capone, R., El Bilali, H., Debs, P., Cardone, G., y Driouech, N. (2014). Food System Sustainability and Food Security: Connecting the Dots. *Journal of Food Security*, 2(1), 13–22. <https://doi.org/10.12691/jfs-2-1-2>
- Carreño-Ruiz, S. D., Cappello-García, S., Gaitán-Hernández, R., y Edmundo, J. C.-B. (2014). Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1447–1458. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000800009
- Doyle, J., y Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, 19, 8–15.
- Du, P., Cui, B.-K., y Dai, Y.-C. (2011). High genetic diversity in wild culinary-medicinal wood ear mushroom, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., in tropical China revealed by ISSR analysis. *Int J Med Mushrooms*, 13(3), 289–297. Recuperado a partir de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135881>

- Du, P., Cui, B. K., Zhang, C. F., y Dai, Y. C. (2013). Genetic diversity of wild *Auricularia auricula-judae* revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.11.011>
- Dunham, S. M., O'dell, T. E., y Molina, R. (2003). Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadenis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*, 107(10), 1163–1177. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008475>
- Fan, X. Z., Zhou, Y., Xiao, Y., Xu, Z. Y., y Bian, Y. B. (2014). Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae*. *Microbiological Research*, 169(5–6), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.004>
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., y Bárzana, E. (2014). Single Cell Protein | Yeasts and Bacteria. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 431–438). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00310-4>
- GenBank. (2013). *Auricularia fuscusuccinea* isolate TFB11532 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Acceso JX065. Recuperado a partir de <https://goo.gl/kn5ZQA>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Hoogland, C. T., de Boer, J., y Boersema, J. J. (2005). Transparency of the meat chain in the light of food culture and history. *Appetite*, 45(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.01.010>
- Li, L., Li, J., Zou, L., Bai, S. Y., Niu, L. M., y Ma, Y. K. (2007). RAPD analysis of genetic diversity of nine strains of *Auricularia auricular* cultivated in Heilongjiang Province. *Journal of Forestry Research*, 18(2), 136–138. <https://doi.org/10.1007/s11676-007-0027-7>
- Looney, B. P., Birkebak, J. M., y Matheny, P. B. (2013). Systematics of the genus *Auricularia* with an emphasis on species from the southeastern United States. *North American Fungi*, 8(6), 1–25. <https://doi.org/10.2509/naf2013.008.006>
- Lowy, B. (1951). A morphological basis for classifying the species of *Auricularia*. *Mycologia*, 43(3), 351–8. <https://doi.org/10.2307/3755598>
- Monteros Guerrero, A., Sumba Lusero, E., y Salvador Sarauz, S. (2013). *Productividad Agrícola en el Ecuador*. Quito. Recuperado a partir de http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/indice_productividad.pdf
- Montoya-Alvarez, A., Hayakama, H., Minamya, Y., Fukuda, T., López-Quintero, C., y Franco-Molano, A. (2011). Phylogenetic Relationships and Review of the Species of *Auricularia* (Fungi: Basidiomycetes) in Colombia. *Caldasia*, 33(1), 55–66. Recuperado a partir de <http://www.bdigital.unal.edu.co/35922/1/36375-151681-1-PB.pdf>
- Nigam, P. S., y Singh, A. (2014). Single Cell Protein | Mycelial Fungi. En C. Batt y M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 415–424). Reino Unido: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00311-6>
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Recuperado a partir de <http://www.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals.html>
- Ortiz, E., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., ... Pineda, C. A. (2016). Banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. con fines industriales: Una revisión. *Revista Bionatura*, 3(1), 139–145. Recuperado a partir de <http://revistabionatura.com/files/Banco-de-Recursos-Geneticos.pdf>

- Pineda, J. A., Ramos, L. B., y Soto, C. P. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de azúcar*, 48(2), 13–23. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223131465002>
- Pineda, J. A., Soto, C. P., Santiago, N. F., Pónce, C. A., y Reyes, G. (2015). Selección de cepas nativas ecuatorianas del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) con fines industriales. *Revista Bionatura*, 1(1), 29–32. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/publication/281068003_Seleccion_de_cepas_nativas_ecuatorianas_del_hongo_ostra_Pleurotus_ostreatus_con_fines_industriales
- Román Corrochano, A. (2013). *Facultad de Medicina Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología comestibles, Agaricus bisporus, Pleurotus eryngii y Sarcodon imbricatum*. Universidad de Valladolid. Recuperado a partir de https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/3639/1/TFM_M_40.pdf
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2ª ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90210-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90210-6)
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Singh, S. K., Upadhyay, R. C., Yadav, M. C., y Tiwari, M. (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*, 87(5), 568–570. Recuperado a partir de <http://www.iisc.ernet.in/~currsci/sep102004/568.pdf>
- Singh, S. K., Yadav, M. C., y Rai, R. D. (2007). Molecular characterization and crypreservation of germoplasm of the edible mushrooms. En R. D. Rai, S. K. Singh, M. C. Yadav, y R. P. Tewari (Eds.), *Mushroom Biology and Biotechnology* (pp. 63–78). Chambaghat, Solan: Mushroom Society of India. Recuperado a partir de <https://pdfs.semanticscholar.org/46f1/a2ac56295bd87c8fb330dfa20431578594ef.pdf>
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press (3ª ed., Vol. 2). Berkeley, California: Ten Speed Press. Recuperado a partir de <https://goo.gl/5QzDMb>
- Tao, P., Liu, H., y Xu, X. (2011). ITS sequence analysis of wild *Auricularia auricularia* strains from Heilongjiang Province. *Procedia Environmental Sciences*, 8(18), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.088>
- Viñas, J. M. S. (2011). Volatilidad de los mercados agrarios y crisis alimentaria. *Revista española de estudios agrosociales y pesqueros*, (229), 11–35. Recuperado a partir de http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_REEAP/r229_11_35.pdf
- Viñas, J. M. S. (2012). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de paz*, 106, 37–48. Recuperado a partir de <http://www.iesa.csic.es/eventos/071120110.pdf>
- Yan, P.-S., Luo, X.-C., y Zhou, Q. (2004). RAPD molecular differentiation of the cultivated strains of the jelly mushrooms, *Auricularia auricula* and *A. polytricha*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(8), 795–799. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5840-y>
- Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L. A., y Queiroz, M. I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*, 101(18), 7107–7111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>