

00381

10
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CULTIVO, SELECCIÓN Y MEJORAMIENTO DE *NEOLENTINUS
SUFFRUTESCENS (=LENTINUS LEPIDEUS)* Y FACTIBILIDAD DE
LA REUTILIZACIÓN DE LA MADERA DEGRADADA POR ESTE
HONGO PARA EL CULTIVO DE OTRAS
ESPECIES COMESTIBLES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

RIGOBERTO GAITÁN HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

1999

DIRECTOR DE TESIS: DR. GASTÓN GUZMÁN HUERTA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

272132



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposa Isabel
con todo mi amor, por su cariño siempre brindado y por su constante
colaboración en las tareas técnicas de esta tesis

A mi hijo Rodrigo Iván
por formar parte de mi vida y por ser motivo de mi superación

A mis padres, hermanos y demás familiares
por su constante estímulo

"La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos"

Ruy Perez Tamayo

"Nunca consideres el estudio como un deber, si no como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber"

Albert Einstein

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Gastón Guzmán, en el Laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles, del Departamento Hongos del Instituto de Ecología en Xalapa, Ver.

A G R A D E C I M I E N T O S

El autor desea expresar su reconocimiento al Dr. Gastón Guzmán por su orientación, constante crítica, dedicación y valiosa ayuda en la realización de esta tesis. A la M. en C. Dulce Salmones, Jefa del Departamento Hongos, por su apoyo siempre brindado durante el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Gerardo Mata se le reconoce por las sugerencias hechas al escrito y el costante apoyo moral y académico.

Se agradece a la M. en C. Bianca Delfosse, Jefa de la Coordinación de Apoyo a la Investigación del Instituto de Ecología, por su ayuda en la impresión de la tesis.

A las Biólogas Rosalía Pérez Merlo y Verónica Álvarez, miembros del Laboratorio de Cultivo de Hongos, se les dan las gracias por su desinteresada colaboración. Además, un agradecimiento al Técnico Juan Lara Carmona quien ayudó en forma constante en diversas tareas. También se reconoce el apoyo otorgado por María Eugenia Ramírez, secretaria del Departamento Hongos.

Se hace patente un reconocimiento al CONACyT, por otorgar una beca para llevar a cabo los estudios de Doctorado y la realización de la tesis.

A los miembros del jurado revisor se les reconoce por las valiosas observaciones y sugerencias:

Dr. Gastón Guzmán Huerta

Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa

Dr. Teófilo Herrera Suárez

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Felipe Eduardo San Martín González

A los doctores Guzmán, Ulloa y Herrera miembros del comité tutorial, se les agradece por la colaboración y evaluación constante de este trabajo durante su realización.

CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
1. El cultivo de los hongos comestibles	5
2. Características generales de la especie, hábitat, distribución e importancia	7
3. Importancia de las especies de los géneros <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i> evaluadas en este estudio	12
4. La reproducción de los hongos	14
5. Degradación de la madera y tipo de pudrición que causan los hongos sobre la misma	16
6. Uso potencial de la madera de pino para el cultivo de hongos	20
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Especies de hongos y cepas	24
2. Metodología general	25
3. Experimentos realizados	28
I. Comparación del crecimiento micelial de <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i> con <i>Neolentinus suffrutescens</i> en madera de pino	28
II. Selección y evaluación de cepas de <i>Neolentinus suffrutescens</i>	28
III. Factibilidad de reutilizar el substrato biodegradado por <i>Neolentinus suffrutescens</i> para el cultivo de <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i>	34
4. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos obtenidos	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
I. Medición del crecimiento y comportamiento morfológico de los micelios de <i>Lentinula</i> , <i>Pleurotus</i> y <i>Neolentinus</i> en madera de pino	40
II. Selección y evaluación de cepas de <i>Neolentinus suffrutescens</i>	43
III. Evaluación de las especies de <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i> en el substrato biodegradado por <i>Neolentinus suffrutescens</i>	57

CONCLUSIONES	74
LITERATURA CITADA	76

RESUMEN

Se estudió la factibilidad de cultivar *Lentinula boryana*, *L. edodes* y *Pleurotus pulmonarius* en los sustratos utilizados para el desarrollo de *Neolentinus suffrutescens*. Para ello, primero se estimó el crecimiento micelial a nivel caja de Petri de *Lentinula* y *Pleurotus*, además de *N. suffrutescens*, en aserrín nuevo (I) y viejo (II), en ambos casos de diversas especies de *Pinus*, principalmente de *P. patula*, en madera de *P. pseudostrabus* (III), *P. ayacahuite* (IV) y de *P. montezumae* (V). De estos sustratos, el II y el V fueron los mejores para todas las cepas. *N. suffrutescens* fue el más rápido en todos los sustratos y *L. boryana*, el más lento. Se obtuvieron 15 cepas de *N. suffrutescens*, del entrecruzamiento de 12 aislamientos monospóricos. Los monospóricos y las cruzas se evaluaron en agar con dextrosa y papa con infusión de *P. montezumae* y se determinó el crecimiento micelial a los 12 días de incubación. Se seleccionaron 8 de las 15 cruzas y evaluaron en los sustratos II y V. En agar, ninguna de las cruzas superó al parental, no así en la madera II, en donde tres lo superaron. El parental y las cruzas seleccionadas se cultivaron a nivel de planta piloto sobre los dos sustratos mencionados. La eficiencia biológica (EB) fluctuó de 4.85 a 14.60 % y la tasa de producción (TP) de 0.07 a 0.19 % en el sustrato II, y en el V de 4.41 a 14.92 % y de 0.06 a 0.23 %, respectivamente. Fue estimado el crecimiento micelial de las especies de *Lentinula* y de *Pleurotus* en el sustrato biodegradado por *N. suffrutescens*. Para ello, se realizaron tres ensayos: a) sustratos pasteurizados, b) sustratos esterilizados y c) sustratos mezclados con bagazo de caña de azúcar esterilizados. La mezcla de la madera con bagazo (1:1, 2:1,

3:1) fue el mejor sustrato. En las mezclas II y V con bagazo (A y B, respectivamente), para todas las cepas, la mejor proporción fue la 1:1 tanto en A como en B, y la mejor cepa la de *P. pulmonarius*. También se estimó el crecimiento en bagazo de caña de azúcar (C). Se compararon los resultados de los sustratos A y B en la proporción 1:1, con los de C, II y V, estos dos últimos sin degradar. El mejor fue el C, pero estadísticamente no fue diferente al II y V, y la cepa de *P. pulmonarius* fue la de más rápido desarrollo. A nivel planta piloto, de acuerdo a la EB y TP de *L. boryana*, *L. edodes* y *P. pulmonarius*, en los sustratos A, B y C, el mejor fue el B y la cepa de *Pleurotus* la más productiva.

SUMMARY

The factibility of cultivating *Lentinula boryana*, *L. edodes* and *Pleurotus pulmonarius* on the substrate used for the development of *Neolentinus suffrutescens* was studied. Growth rates in Petri dishes of *Lentinula*, *Pleurotus* and *N. suffrutescens*, on new sawdusts (I) and old sawdusts (II), in both cases of diverse species of *Pinus*, mainly of *P. patula*, on *P. psedostrobus* (III), *P. ayacahuite* (IV) and *P. montezumae* (V) wood-shaving were considered. The best performance observed was in the substrates II and V. *N. suffrutescens* was the quickest in all the substrates and *L. boryana*, the slowest. Fifteen dicaryotic strains of *N. suffrutescens* were obtained for crossing of monosporous isolates. The monosporous and the dicaryotic strains obtained were evaluated on potato dextrose agar with a wood infusion of *P. montezumae* and growth rates at 12 days of incubation were determined. Eight crosses were selected and subsequently evaluated on the substrates II and V. Crosses were not equal in performance to the original parental strain; however, on the wood II, three of the crosses exceded performance of the original parental strain. The parental strain and the selected crosses were cultivated in pilot plant on the mentioned substrates. Production was evaluated by biological efficiency (EB) and production rate (TP). EB fluctuated between 4.85 to 14.60%, and the TP between 0.07 to 0.19% on the substrate II and on the substrate V of 4.41 to 14.92% and of 0.06 to 0.23%, respectively. Growth rates of the species of *Lentinula* and *Pleurotus* on the substrate degraded by *N. suffrutescens* were estimated. For this, three trials were carried out: a) pasteurized substrates, b) sterilized substrates and c) sterilized substrates mixed with

sugar cane bagasse. The mixture of the wood with bagasse (1:1, 2:1, 3:1) was the best. In the mixtures II and V with bagasse (A and B, respectively), for all the strains, on A and B the best proportion was the 1:1, and *P. pulmonarius* the best strain. Growth rate on sugar cane bagasse (C) also was considered. The results of A and B substrates were compared in the proportion 1:1, with those of C, II and V; the last two not degraded. Substrate C was the best, but statistically was not different to the II and V, and *P. pulmonarius* strain was the one with the fastest development. In pilot plant, according to the EB and TP of *L. boryana*, *L. edodes* and *P. pulmonarius*, on the substrates A, B and C, the B was the best, and the *Pleurotus* strain was the most productive.

INTRODUCCIÓN

1. El cultivo de los hongos comestibles

El cultivo de los hongos comestibles es una actividad que se desarrolla ampliamente en diversas partes del mundo, como Estados Unidos, Europa y el Sureste de Asia. En la actualidad, esta biotecnología se ha manifestado como una alternativa en la obtención de alimentos para el consumo humano y satisfacer, en gran medida, las necesidades proteínicas y nutricionales de la población que habita en los países subdesarrollados, en función de la obtención de grandes cantidades en pequeñas áreas mediante técnicas sencillas, de bajo costo, en cortos períodos de tiempo y empleando residuos agroindustriales como substrato para su cultivo (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990).

A nivel mundial, de las aproximadamente 10,000 especies de macromicetes (Miles, 1997), cerca de 2000, de más de 30 géneros, son consideradas como hongos comestibles, pero sólo unas 80 de ellas se estudian experimentalmente, 40 son cultivadas a pequeña escala, aproximadamente 20 son cultivadas comercialmente y sólo de 5 a 6 se producen a escala industrial (Chang y Miles, 1993). Las especies cultivadas en orden de importancia son *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Flammulina velutipes* (Curt. : Fr.) Sing. y *Volvariella volvacea* (Bull. : Fr.) Sing. (Chang, 1996).

En México existen aproximadamente 200,000 especies de hongos; de éstas, 300 son consideradas comestibles, las cuales se desarrollan sobre diversos tipos de

vegetación y son objeto de consumo (Guzmán, 1998).

En los últimos años, en América Latina y específicamente en México, las investigaciones sobre el cultivo de los hongos comestibles han tenido un gran avance debido al desarrollo de tecnologías apropiadas. A pesar de la potencialidad que existe en la región para cultivar hongos que se desarrollan en forma silvestre y de la tradición por su consumo (Martínez *et al.*, 1984; Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990), el cultivo se ha restringido principalmente a dos especies, *Agaricus bisporus*, conocido como champiñón, y *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm., identificado como oreja blanca o seta. El cultivo del champiñón y de otros hongos comestibles recientemente se ha implementado, a pesar de que los primeros cultivos datan de hace 40 años, en contraste con la tradición que hay en el país sobre los hongos (Guzmán, 1984). El interés por el cultivo de especies del género *Pleurotus* en México comenzó hace aproximadamente 10 años. Dicho interés se ha debido principalmente al desarrollo tecnológico de estos cultivos en Asia y Europa (Guzmán *et al.*, 1994). Sin embargo, existen otras especies de hongos que son susceptibles de ser cultivadas en México, entre ellas *Neolentinus suffrutescens* (Brot. : Fr.) May & Wood.

El presente trabajo surgió de la inquietud de continuar con las investigaciones de Gaitán-Hernández *et al.* (1993, 1995), dada la potencialidad que tiene el hongo de ser cultivado en residuos de la madera de pino y a su aceptación en el consumo popular (Guzmán, 1977, 1997; Guzmán *et al.*, 1993; Martínez-Carrera, 1989; Villarreal y Pérez-Moreno, 1989). Se obtuvieron cepas de *N. suffrutescens* por entrecruzamiento y se seleccionaron las de alta productividad. También se discute la posibilidad de reutilizar

los substratos degradados por *N. suffrutescens* para el cultivo de los hongos comestibles *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler, *L. edodes* y *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.

2. Características generales de la especie, hábitat, distribución e importancia

El hongo en estudio es un basidiomicete que clásicamente se ha adscrito al género *Lentinus*, identificado entre los Agaricales, familia Tricholomataceae (Singer, 1949; Guzmán, 1977); modernamente se le adscribe a los Aphylophorales del grupo de los Poriales, en la familia Lentinaceae (Singer, 1986; Pegler, 1983; Hawksworth *et al.*, 1995). Con base en características de los basidiomas y el tipo de pudrición que produce, Redhead y Ginns (1985) transfirieron a *Lentinus lepideus* al género *Neolentinus*, lo cual fue justificado y corroborado genéticamente por Hibbett y Vilgalys (1991,1993) y Molina *et al.* (1992). *Neolentinus* se distingue de *Lentinus* por el patrón de sexualidad heterotálico bipolar, por tener una trama himenoforal regular y esporas binucleadas, por la capacidad de causar un tipo de prudrición cúbica oscura (Kühner, 1980; Redhead y Ginns,1985; Rune, 1994) y por tener un comportamiento nuclear tipo D (Hibbett *et al.*, 1994), es decir, la tercera división nuclear (mitosis postmeiótica) tiene lugar dentro de las basidiosporas, en las que el núcleo hijo permanece dentro de las mismas, las cuales son binucleadas al ser liberadas (Duncan y Galbraith, 1972). La especie tiene un gran número de sinónimos y según May y Wood (1995) el nombre válido es *Neolentinus suffrutescens*, a pesar de que no hace mucho a este hongo se le denominaba *Panus lepideus* (Fr. : Fr.) Corner (Corner, 1981), *Lentinus lepideus* (Guzmán, 1977) o *Neolentinus lepideus* (Redhead y Ginns,1985).

El hongo en discusión presenta las siguientes características morfológicas según Pegler (1983) y Pegler y Young (1983).

Píleo de 3-15 (-30) cm de diámetro, carnoso, convexo, después aplanado a ligeramente cóncavo con superficie lisa a escuarrosa, con escamas de color café pálido sobre un fondo blanquecino y más abundantes en el centro. **Láminas** decurrentes, con aguda prolongación hacia el estípite, aserradas, blancas a amarillentas pálidas, que se manchan irregularmente de amarillo, a veces transversalmente estriadas, subdistantes. **Estípite** de 2-11 x 1-3 cm, central o excéntrico, cilíndrico, algunas veces con la base bulbosa, sólido, concoloro con el píleo, pero de color café oscuro en la base, escamoso igual que el píleo (ver Fig. 1). **Velo** aracnoide, blanco, efímero. **Contexto** blanco, subcarnoso, con olor fúngico ligero y sabor fúngico. **Primordios** de forma de clava o espatuliformes, de color café achocolatado oscuro a café tenue a medida que maduran. **Basidiosporas** de 8.5-12.25 x 3-4.7 μm , subcilíndricas, con una depresión supra-apendicular, hialinas, lisas, inamiloides, con pared delgada. **Basidios** de 35-46 x 5-7 μm , tetraspóricos, claviformes. **Pleurocistidios** de 40-60 x 3-5 μm , cilíndricos, hialinos, con pared delgada, abundantes. **Queilocistidios** de 35-150 x 2-6 μm , cilíndrico-sinuosos o subclaviformes, frecuentemente constreñidos o nodulosos, hialinos y con pared delgada. **Sistema hifal** dimítico. **Trama himenoforal** regular a subregular, con hifas generativas y esqueléticas orientadas irregularmente. **Hifas generativas** de 2.5-7 μm de diámetro, en ocasiones ligeramente más gruesas, a veces con pared gruesa, frecuentemente ramificadas con prominentes fíbulas. **Hifas esqueléticas** de 3-6 μm de diámetro, cilíndricas, hialinas, no ramificadas, con ápice obtuso, intercalares o principalmente

terminales, escasas. **Capa subhimenial** pseudoparenquimatosa.

La especie es común en zonas templadas con bosques o plantaciones de pinos, tanto en Europa como en Asia y América del Norte (Smith, 1949; Pegler, 1983). Es común en México (Guzmán, 1977), en donde se le encuentra sobre madera de pino, en troncos o tocones, pocas veces en árboles vivos. Se le ha encontrado sobre durmientes de ferrocarril de *Pinus* (Suominen, 1973; Clark y Setliff, 1985) y a veces sobre madera de *Betula*, *Abies*, *Picea*, *Larix*, *Arbutus*, en troncos caídos de *Sequoia*, *Ulmus*, *Calocedrus*, *Liquidambar*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Tsuga* y en postes de *Quercus* (Weir, 1918; Zeller, 1929; Smith, 1949; Duncan y Lombard, 1965; Pegler, 1983; Farr *et al.*, 1989). En México, Guzmán (com. pers.) lo encontró en los durmientes del ferrocarril infantil de Chapultepec, en la Ciudad de México, en la década de los 70's.

El hongo en discusión produce pudrición oscura de tipo cúbica, que destruye la celulosa del duramen, dejando intacta la lignina (Jennison *et al.*, 1955; Gómez-Nava *et al.*, 1969). Con relativa frecuencia se le encuentra sobre madera de construcción mal tratada y que está en permanente contacto con el suelo. Ocasionalmente produce pudriciones en el duramen de los pinos vivos (Zeller, 1929; Cooke, 1955), sin embargo, no se le ha citado como especie parásita. Su tolerancia a concentraciones relativamente altas a la creosota y la circunstancia de que el hongo se localiza principalmente en el duramen, dan a *Neolentinus suffrutescens* una importancia especial como agente de pudrición en madera de uso económico (Kollmann, 1959; Duncan y Lombard, 1965; Nobles, 1965; Gómez-Nava *et al.*, 1969; Suominen, 1973; Dickinson, 1982). La pudrición de *N. suffrutescens* en un principio no causa alteraciones visibles en la madera; se inicia con la producción de un

pigmento amarillento o de color café pálido, que en etapas más avanzadas llega a tornarse más oscuro, hasta adquirir tintes rojizos y una consistencia pastosa (Buller, 1909; Gómez-Nava *et al.*, 1969).

Por otra parte, *N. suffrutescens* es aceptado en México como hongo comestible. Se le conoce con los nombres populares de cuaresmeño, pechuga de pollo, hongo de pino u hongo de ocote (Herrera y Guzmán, 1961; Guzmán, 1977; Gispert *et al.*, 1984; Guzmán, 1997) y de iarín (Mapes *et al.*, 1981), y es comercializado en algunos mercados populares de México (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989).



Fig. 1. Cuerpos fructíferos silvestres de *Neolentinus suffrutescens*, con diámetro del píleo de aproximadamente 9 a 12 cm.

3. Importancia de las especies de los géneros *Lentinula* y *Pleurotus* evaluadas en este estudio

Lentinula edodes [*Lentinus edodes* (Berk.) Singer], el llamado shiitake japonés o también shiang-gu y oak's mushroom u hongo de encino, es uno de los hongos mejor conocidos y más estudiados (Tokimoto y Komatsu, 1978; Chang y Miles, 1987). Actualmente ocupa el segundo lugar en producción de hongos cultivados a nivel mundial, siendo China, Japón, Taiwan y Korea los principales países productores (Chang, 1996). Tradicionalmente el shiitake es cultivado en troncos de maderas duras, principalmente de encino (San Antonio, 1981; Leatham, 1982; Chang y Miles, 1989; Kozak y Krawczyk, 1993; Sobata y Nall, 1994), aunque los esfuerzos por desarrollar un sistema más eficiente, rápido y confiable para la producción, se han enfocado a utilizar un substrato con aserrín enriquecido (Han *et al.*, 1981; Royse, 1985; Przybylowicz y Donoghue, 1990; Fox *et al.*, 1994). Se han probado substratos sintéticos, aunque las cepas de hongos empleadas han sido el mayor factor limitante (Diehle y Royse, 1985). En México su cultivo se ha desarrollado empleando otras virutas como las de *Carpinus*, *Bursera*, *Alnus* y *Eliocarpus* (Mata *et al.*, 1990; Morales y Martínez-Carrera, 1991; Morales *et al.*, 1991), inclusive pulpa de café y bagazo de caña (Mata y Gaitán-Hernández, 1992, 1994; Salmones *et al.*, 1997a).

Por otra parte, *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler [*Lentinus boryanus* (Berk. & Mont.) Sing.] es un hongo comestible común en los subtrópicos de América (Hibbett, 1992; Guzmán, 1996; Guzmán *et al.*, 1997). En México se le encuentra creciendo en los bosques húmedos tropicales y subtropicales (Guzmán, 1977; Bandala *et al.*, 1988; Mata

y Guzmán, 1991) y debido a la posibilidad de su cultivo comercial y a su similitud morfológica con el shiitake japonés ha sido objeto de estudio por varios autores (Mata y Gaitán-Hernández, 1992; Mata y Guzmán, 1993; Soto-Velazco *et al.*, 1995). Se le conoce con los nombres comunes de hongo de encino, hongo de palo, guaje, oak's mushroom y log's mushroom (Guzmán, 1997); crece principalmente en madera de *Quercus* y en México se ha probado su cultivo en virutas de especies de este género, además de *Carpinus* y *Alnus*, así como en bagazo de caña de azúcar (Mata, 1990, 1992; Mata y Guzmán, 1991, 1993; Gutiérrez-Lecuona y Salmones, 1996).

Las especies del llamado hongo seta, oreja blanca u oreja de izote (*Pleurotus* spp.) (Guzmán, 1977), son populares como hongos comestibles cultivados. Estos hongos son de fácil cultivo y pueden desarrollarse en una gran variedad de sustratos lignocelulósicos (Zadrazil, 1978; Mueller *et al.*, 1985; Bisara *et al.*, 1987; Ragunathan *et al.*, 1996); actualmente el género ocupa el tercer lugar de los hongos cultivados a nivel mundial, después de *Agaricus* y *Lentinula*, siendo China, Japón, Korea y Tailandia los principales productores (Chang, 1996). De los géneros de hongos cultivados, *Pleurotus* tiene varias especies de una importancia económica significativa, entre ellas *Pleurotus pulmonarius* (*P. florida* Eger s. auct.) (*P. ostreatus* var. *florida* Eger). Ésta es una especie que se distribuye en Europa, Asia y Norte América en donde se le conoce como grey oyster mushroom, phoenix-tail mushroom y Florida pleurotus (Buchanan, 1993; Guzmán *et al.*, 1993); crece en forma gregaria sobre una gran variedad de maderas de angiospermas, principalmente en verano, aunque de las especies de *Pleurotus* es la que se encuentra más comúnmente creciendo en madera en descomposición de coníferas, como *Abies*,

Picea y *Pinus* (Kalberer, 1974; Eger *et al.*, 1979; Cailleux y Joly, 1993; Vilgalys *et al.*, 1993; Zervakis y Balis, 1996; Vilgalys, 1997). De las más de 20 especies reconocidas y variedades cultivadas a través del mundo (Buchanan, 1993), *P. pulmonarius* se cultiva comúnmente en países tropicales (Bresinsky *et al.*, 1987; Petersen y Hughes, 1993; Iracabal *et al.*, 1995), y aunque las formas silvestres se desconocen en México (Guzmán, 1996) su cultivo sobre diversos residuos lignocelulósicos, empleando cepas extranjeras, ha tenido un gran desarrollo en los últimos años (González *et al.*, 1993; De León-Chocooj *et al.*, 1993; Guzmán-Dávalos *et al.*, 1987a,b; Martínez-Carrera, 1987; Mata y Gaitán-Hernández, 1995; Salmones *et al.*, 1997b).

4. La reproducción en los hongos

La reproducción en los hongos se efectúa asexual y sexualmente en fases por separado o simultáneamente. La gran mayoría de los hongos, excepto Deuteromycotina o Fungi Imperfecti que carecen de reproducción sexual, muestran estos dos tipos de reproducción (Herrera y Ulloa, 1990).

Para mejorar y/o seleccionar cepas con características deseables, además de una correcta identificación taxonómica de la especie y de un dominio de los sinónimos en juego, es necesario conocer bien el ciclo de vida del organismo, ya que para establecer un protocolo de entrecruzamiento se requiere de manipulación genética, la cual es dependiente del conocimiento del ciclo de vida.

Cualquiera que sea la modalidad sexual que presenten los hongos se pueden dividir en dos grupos respecto a su compatibilidad sexual: **homotálicos** y **heterotálicos**.

En los primeros el micelio que surge de una espóra puede completar el ciclo de vida con la formación de estructuras reproductoras sexuales, es decir son autocompatibles, y en las especies heterotálicas se necesitan dos micelios compatibles para desarrollar la fase sexual (Miles y Chang, 1986; Herrera y Ulloa, 1990; Ulloa, 1991).

El **homotalismo** puede dividirse en **primario** y en **secundario**. En el primero, una basidiospora, poniendo como ejemplo un basidiomicete, germina para formar un micelio, el cual rápidamente se organiza en segmentos binucleados. No hay distinción genética entre los dos núcleos en cada célula y el micelio es capaz de formar un cuerpo fructífero con basidios. El término **homotalismo secundario** se aplica a los hongos que producen basidiosporas con dos núcleos postmeióticos, cuyos factores de apareamiento son compatibles, y el micelio dicariótico es capaz de fructificar. Las especies con homotalismo secundario se dividen a su vez en dos grupos basados en la manera en que se originan las basidiosporas binucleadas. En las especies con dos esporas, dos de los cuatro núcleos meióticos migran a cada basidiospora; en las especies de cuatro esporas, cada una de ellas recibe dos núcleos haploides de los ocho que por división mitótica postmeiótica surgieron en el basidio (Ginns, 1974).

Los basidiomicetes considerados heterotálicos pueden distinguirse bajo dos condiciones, los **heterotálicos bipolares** (=heterotalismo unifactorial) y los **heterotálicos tetrapolares** (=heterotalismo bifactorial). Los primeros se caracterizan por presentar un solo gen (o factor) (A) con dos alelos (A1, A2). La segregación de los dos alelos en la meiosis asegura que una espóra lleve sólo un alelo.

En las especies heterotálicas tetrapolares la compatibilidad (o incompatibilidad) es

controlada por dos genes o factores (A y B) situados en cromosomas homólogos y con dos alelos en cada locus (A1, A2 y B1, B2) (Kühner, 1977; Miles, 1993; Webster, 1991). Sólo es fértil la unión sexual en que se reúnen los cuatro alelos diferentes para formar un micelio heterocigótico con los alelos A1A2B1B2. Un talo con este juego de alelos puede producir esporas (en particular las basidiosporas de los basidiomicetes) de cuatro genotipos diferentes: A1B1, A2B2, A1B2, A2B1. También es posible que se produzcan esporas solamente de dos tipos si la combinación de los caracteres se efectúa de las siguientes maneras: A1B1, A1B1,A2B2 y A2B2., o bien: A1B2,A1B2, A2B1 y A2B1. Esto depende del arreglo de los cromosomas homólogos durante la meiosis y del entrecruzamiento o falta de entrecruzamiento de un par o de ambos pares de dichos cromosomas (Herrera y Ulloa, 1990).

5. Degradación de la madera y tipo de pudrición que causan los hongos sobre la misma

Anualmente a nivel mundial se producen entre 1.6×10^{11} toneladas en peso seco de desechos lignocelulósicos, siendo de los más abundantes en el planeta. Estos desechos son principalmente esquilmos agrícolas (pajas y rastrojos de diversos cereales), subproductos agroindustriales (bagazo de caña de azúcar, bagazo de henequén, pulpa de café) y subproductos de la industria forestal (virutas y aserrín), muchos de ellos siendo subutilizados (Lu *et al.*, 1988; Mata y Martínez-Carrera, 1988). Los materiales lignocelulósicos son difíciles de digerir, debido a las fuertes uniones físicas y químicas entre los carbohidratos y la lignina. La lignina actúa como una barrera que protege a la

celulosa del ataque microbiano. La utilización de la lignocelulosa, dependen del grado de rompimiento del complejo lignina-polisacárido; de esta manera se provoca que los polisacáridos sean accesibles a la digestión microbiana (Zelenak, 1990). De los desechos lignocelulósicos los de la industria forestal son los de mayor importancia (Zelenak, 1990).

La madera es un material con gran complejidad anatómica y química, que puede soportar una comunidad rica de especies microbianas (Dix y Webster, 1995). Los principales constituyentes de la madera son celulosa, hemicelulosas, lignina, extractivos (gomas, resinas, alcaloides, taninos), minerales y agua, siendo los tres primeros las fuentes principales de carbono y los componentes estructurales. La **celulosa**, que representa poco más del 50 % de la madera, es un polímero lineal compuesto de unidades de glucosa; está organizada en filamentos microfibrilares y es la responsable principal de la fuerza de tensión y estructural. Las **hemicelulosas** están compuestas por heteropolímeros relativamente cortos de glucosa, manosa, xilosa, arabinosa y ciertos ácidos urónicos; no tiene una organización fibrilar y es responsable de la rigidez de las paredes celulares antes de la lignificación. El contenido de hemicelulosa en la madera varía de 20 a 35 % y la cantidad en la madera de árboles de hoja ancha es superior que en la de coníferas. La **lignina** es un complejo de polímeros aromáticos y está asociada con la hemicelulosa pero no con la celulosa y representa del 15 al 35 % de la madera; protege los polisacáridos de las paredes celulares de la hidrólisis microbiana, excepto en el caso de los microorganismos que pueden modificar o degradar la lignina, como los basidiomicetes y ascomicetes, que pueden iniciar una degradación significativa de la madera (Scheffer y Cowling, 1966; Montgomery, 1982; Cook y Rayner, 1984; Higuchi,

1990; Zelenak, 1990). La distribución de estos tres elementos en las maderas duras, como *Betula*, *Populus*, *Quercus* y *Alnus*, y en las maderas suaves como las coníferas, se observa en la tabla 1.

La degradación de la celulosa y de la lignina por hongos, es uno de los procesos más importantes en el ciclo del carbono y es mayor que el de algunos otros grupos de organismos vivos (Jakucs y Vetter, 1992). A nivel microscópico existen varias diferencias entre los tipos de pudrición que causan los hongos, debidas principalmente a la acción enzimática y a la variación que existe en la composición química de la madera (Dix y Webster, 1995).

Tabla 1. Porcentaje aproximado de celulosa, hemicelulosa y lignina por tipo de madera

Compuesto	Maderas duras	Maderas suaves
celulosa	40-50	40-50
hemicelulosa	25-40	25-30
lignina	18-25	25-35

Cook y Rayner (1984).

Una pared celular de una planta madura está constituida por tres partes principales: la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria. La pared primaria está formada por un pequeño número de microfibrillas de celulosa, lignina y partículas no celulósicas como pectinas. La pared secundaria es la más gruesa y está dividida en tres capas, S1, S2 y S3. La capa S3 es usualmente muy delgada y difícil de distinguir de las otras. En las células lignificadas, la lignina está presente en todas las capas de la pared celular. En las

maderas duras, cerca del 90 % de la lignina se encuentra en la lámina media y en la pared primaria, y el 60 % en las maderas suaves, en las que la capa S3 se encuentra más lignificada. En las células lignificadas, tanto en maderas duras como en suaves, la celulosa es el principal constituyente de todas las capas de la pared celular (Cook y Rayner, 1984; Zelenak, 1990; Dix y Webster, 1995).

Los hongos difieren en su capacidad para usar las moléculas orgánicas de las paredes celulares de la madera, por lo que producen tres tipos principales de pudrición en la misma. La **pudrición blanca** es causada principalmente por basidiomicetes y ciertos ascomicetes. Degradan todos los componentes de la madera, aunque la lignina es removida con mayor rapidez. La descomposición por este tipo de hongos se inicia en la capa S3 y pasa a la lámina media. La acción de las enzimas de estos hongos se limita principalmente a las capas expuestas de la pared celular. La madera adquiere apariencia blanquecina y consistencia fibrosa y esponjosa. Los hongos que producen este tipo de pudrición se dividen en hongos que degradan selectivamente la lignina, los que simultáneamente degradan lignina y polisacáridos y los que combinan la degradación selectiva y simultánea en el mismo substrato (Blanchette, 1991). La **pudrición morena o cúbica oscura** parece ser exclusiva de basidiomicetes. Atacan la celulosa y la hemicelulosa y modifican ligeramente la lignina. Los hongos deterioran la madera por penetración de las hifas en la capa S2 y después atacan las capas S1 y S3 de la pared secundaria; sin embargo, a veces las capas S2 y S3 se descomponen en forma simultánea. La madera degradada se caracteriza por agrietamiento cúbico de color café oscuro. Causa una pérdida de peso y fuerza de tensión en la madera más rápida que los

de pudrición blanca, debido a la degradación más acelerada de la celulosa. Los residuos de la madera con pudrición morena son extremadamente estables y pueden persistir sobre las capas del suelo por muchos años, lo que es de gran importancia ecológica (Gilbertson, 1981). La **pudrición suave** es causada por una gran cantidad de ascomicetes y hongos imperfectos. Es característica de madera con alto contenido de humedad y preservadores que evitan un ataque por hongos de pudrición blanca y morena, y es frecuentemente superficial. En las etapas iniciales de este tipo de pudrición, las hifas dentro de la madera no son muy numerosas y no forman perforaciones en las paredes celulares. Aparentemente estos hongos producen en la madera dos tipos de deterioro morfológicamente distintos. El primero se caracteriza por la penetración de las hifas dentro de la capa S2 y la formación de cavidades. En el segundo, la pared celular es erosionada por el contacto directo de hifas del hongo en el lumen de la célula. La celulosa y la hemicelulosa son degradadas, pero más ligeramente que la que causan los hongos de pudrición morena, presumiblemente por la ausencia de producción de peróxido y una dependencia de enzimas con difusión limitada (Cook y Rayner, 1984; Dix y Webster, 1995).

6. Uso potencial de la madera de pino para el cultivo de hongos

Los pinos mexicanos se encuentran distribuidos principalmente en las regiones montañosas, entre los 1500 y 3000 metros de altitud, desde la frontera con Estados Unidos de América hasta la de Guatemala. Los bosques de coníferas cubren alrededor de 17 millones de hectáreas del territorio nacional, es decir 34 % de la superficie arbolada

del país. La explotación de los pinares produce grandes beneficios económicos; más del 60 % de las especies de pino tiene importancia comercial y 80 % de los productos forestales del país se obtienen de los bosques de pino-encino. Más del 50 % de las 90 a 120 especies de pinos que existen en el mundo habitan en México (Eguiluz, 1977; Romeu, 1995).

La explotación forestal inadecuada, sobre todo la clandestina, así como los desmontes para fines de aplicación de zonas agrícolas, ganaderas y habitacionales constituyen factores que restan superficie a los bosques y modifican la composición de los que quedan. Dentro de la riqueza forestal de México los pinares constituyen un recurso de primera importancia por la demanda de su madera, por la factibilidad de su explotación, por la relativa rapidez del crecimiento de muchas de sus especies y sobre todo por la extensa área de distribución y buen desarrollo que presentan los bosques en el país. Las especies maderables más explotadas son: *Pinus arizonica* Engelm., *P. engelmannii* Carr., *P. montezumae* Lamb., *P. pseudostrobus* Lindl., *P. ayacahuite* Ehrenb., *P. cooperi* Blanco y *P. durangensis* Martínez (Rzedowski, 1978). En 1995 la producción maderable en México fue de 6,302,417 m³, en la que las especies de pino representaron el 88 %, las maderas de encino y latifoliadas el 8 %, y las maderas preciosas el 4 %. La producción se generó principalmente en los estados de Durango, Chihuahua, Michoacán, Oaxaca y Jalisco. La industria de aserrío absorbió el 75 % de la producción, la de celulosa 19 % y se destinó 6 % a la producción de postes, combustibles (leña y carbón) y durmientes; generandose con esto, aproximadamente 3.5 millones de m³ de residuos, que en la actualidad son subutilizados (SEMARNAP, 1998). Dada la cantidad de desechos

forestales que se generan, el cultivo de los hongos comestibles se ha manifestado como una alternativa viable, para darle un aprovechamiento más eficiente a estos subproductos y para la producción de alimentos de consumo humano.

OBJETIVOS

Generales:

- 1) Obtener y seleccionar cepas de *Neolentinus suffrutescens*.
- 2) Desarrollar fructificaciones de *N. suffrutescens* en madera de pino y evaluar su producción.
- 3) Evaluar el crecimiento de *Lentinula boryana*, *L. edodes* y *Pleurotus pulmonarius* sobre madera degradada por *Neolentinus suffrutescens*.

Particulares:

- 1) Determinar el crecimiento micelial de *Lentinula*, *Pleurotus* y *Neolentinus* en las maderas de pino.
- 2) Seleccionar las mejores maderas de acuerdo con los resultados del punto anterior, para las posteriores evaluaciones.
- 3) Obtener cepas por entrecruzamiento intraespecimen de *N. suffrutescens*.
- 4) Determinar el crecimiento micelial y caracterizar las cruzas y su parental en medio de cultivo y en madera de pino.
- 5) Evaluar a nivel de planta piloto la producción de las cruzas seleccionadas del punto anterior y comparar con el parental.
- 6) Determinar el crecimiento micelial de *Lentinula* y *Pleurotus* en las maderas degradadas por *Neolentinus* y comparar los resultados con los del objetivo particular 1.
- 7) Seleccionar las mejores cepas y substratos del punto anterior para su evaluación a nivel de planta piloto.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se mencionan las especies de hongos utilizadas en este estudio, la metodología general y la descripción de los experimentos realizados.

1. Especies de hongos y cepas

Cepas de *Neolentinus suffrutescens*

La cepa estudiada (IE-133) fue obtenida del Cepario de Hongos del Instituto de Ecología de Xalapa, Ver. Dicha cepa se encuentra también depositada en la American Type Culture Collection de Rockville, Maryland, E.U.A. (Tabla 2) y fue aislada de un cuerpo fructífero recolectado en la región de Xalapa, el cual se encontraba creciendo en un madero de pino previamente tratado con creosota. El ejemplar está depositado en el Herbario XAL con el registro *Álvarez 41*. De la cepa aludida se obtuvieron 15 cepas por entrecruzamiento intraespecimen, designadas como NS y numeradas progresivamente (Tabla 2).

Cepas de *Lentinula boryana*, *L. edodes* y *Pleurotus pulmonarius*

Las cepas lignocelulolíticas estudiadas se obtuvieron del Cepario de Hongos mencionado y fueron *Lentinula boryana*, *L. edodes* y *Pleurotus pulmonarius*. La primera fue aislada de un cuerpo fructífero silvestre recolectado en la región de Xalapa, el cual se encontraba creciendo en madera en descomposición de *Quercus* sp. El ejemplar está depositado en el Herbario XAL con el registro *Mata 285*. Las cepas de *L. edodes* y *P.*

pulmonarius son comerciales adquiridas a la compañía Fungi Perfecti de los Estados Unidos. El registro original y actual de todas las cepas se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas en el presente estudio

cepas	procedencia
<i>Neolentinus suffrutescens</i>	
IE-133*	México
NS1** NS9	
NS2 NS10	
NS3 NS11	
NS4 NS12	
NS5 NS13	
NS6 NS14	
NS7 NS15	
NS8	
<i>Lentinula boryana</i>	
IE-93	México
<i>Lentinula edodes</i>	
IE-105 (K-200***)	Estados Unidos
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	
IE-115 (CS.2***)	Estados Unidos

* cepa parental depositada también en la American Type Culture Collection, con el número 96535.

** cepas obtenidas por entrecruzamiento intraespecimen del parental (IE-133).

*** registro original en Fungi Perfecti.

2. Metodología general

Preparación de medios de cultivo

Las cepas de *Lentinula* y *Pleurotus* se mantuvieron en un medio de cultivo comercial (BIOXON) de agar con extracto de malta (AEM). Los micelios monospóricos obtenidos de la cepa parental de *N. suffrutescens*, y sus cruas, se mantuvieron y

evaluaron en un medio de cultivo comercial (BIOXON) de agar con dextrosa y papa (ADP), pero enriquecido con infusión de viruta de madera de *Pinus montezumae* (1000 ml de infusión de madera/39 g de medio de cultivo) (ADP-IM). La infusión se obtuvo hirviendo 45 g de viruta en 1500 ml de agua destilada.

Substratos estudiados y tratamiento de los mismos

Se utilizaron los siguientes substratos: aserrín nuevo (I), aserrín viejo después de un año de almacenado (II), en ambos casos de *Pinus* spp., madera de *P. pseudostrobus* (III), de *P. ayacahuite* (IV) y de *P. montezumae* (V). Los substratos I y II se obtuvieron del aserradero Ingenio El Rosario, de la región del Cofre de Perote, Ver. En estos aserrines, con tamaño de partícula de 2-3 mm, la especie predominante fue *Pinus patula* Schiede & Deppe. Las maderas III, IV y V se recolectaron en forma de ramas y tocones en la misma región y se transformaron en viruta por medio de una canteadora eléctrica, y posteriormente en un molino eléctrico, a un tamaño de partícula de 7-8 mm. Todas las maderas se colocaron en charolas de aluminio, y se secaron en horno a 75 ± 1 °C por 72 h y se almacenaron en bolsas de plástico selladas para su utilización posterior. Las especies fueron identificadas y corroboradas por especialistas del Herbario XAL del Instituto de Ecología. También se utilizó bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), el cual fue proporcionado por el Ingenio "La Concha", localizado en el ejido La Concepción, municipio de Xilotepec, Ver. y fue secado de la misma manera que las maderas.

Se determinó el pH de los substratos, colocando el electrodo en una suspensión de

10 g de sustrato triturado en 20 ml de agua destilada estéril.

Medición del crecimiento micelial en medio de cultivo y parámetros considerados

Los experimentos se realizaron en cajas de Petri de 90 mm (\emptyset) y 15 mm de profundidad, en las cuales se colocaron 25 ml de medio de cultivo, esterilizado por 15 min a 121 °C. Las cajas se inocularon en condiciones de esterilidad, colocando en el centro de las mismas un fragmento de agar de 8 mm (\emptyset) con micelio de cada una de las cepas a evaluar. Se consideró el diámetro micelial promedio registrado a los 12 días de incubación. También se tomaron en cuenta, excepto para los micelios monospóricos, la formación de agregaciones hifales y de primordios. Adicionalmente se consideró el color y la textura de los micelios, según Stalpers (1978), y la densidad usando una modificación del sistema descrito por Mata (1990), en la que se cambia la terminología de las cuatro categorías citadas por Mata (densidad escasa a densidad muy abundante) a cinco empleadas en este estudio (muy baja densidad a muy alta densidad).

Medición del crecimiento micelial en los sustratos evaluados

Los experimentos igualmente se realizaron en cajas de Petri, en las cuales se colocó el equivalente a 7 g en peso seco de cada uno de los sustratos, hidratados al 80 %, siguiendo el método de Mata y Gaitán-Hernández (1992). Una vez esterilizadas por 90 min a 121 °C, las cajas se inocularon de la misma manera especificada en el punto anterior. Los parámetros considerados fueron los mismos observados en la evaluación en medio de cultivo, excepto la formación de primordios.

3. Experimentos realizados

Siguiendo la metodología antes mencionada, excepto para las evaluaciones en planta piloto, se realizaron tres experimentos, los cuales se describen a continuación:

I. Comparación del crecimiento micelial de *Lentinula* y *Pleurotus* con *Neolentinus suffrutescens* en madera de pino

En cajas de Petri , se colocaron cada uno de los substratos I-V. Una vez esterilizadas las cajas, se inocularon e incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de cada una de las cepas; a 22 ± 1 °C las sembradas con *L. boryana*, a 25 ± 1 °C con *L. edodes* y a 27 ± 1 °C con *P. pulmonarius* y *N. suffrutescens*, todas en obscuridad. Se estimó el crecimiento de los micelios y se consideraron las características morfológicas de los mismos.

II. Selección y evaluación de cepas de *Neolentinus suffrutescens*

Obtención de micelios monospóricos

En la planta piloto del Instituto de Ecología, en viruta de *P. montezumae* se obtuvieron fructificaciones de la cepa parental de *N. suffrutescens*, de acuerdo con la técnica descrita por Gaitán-Hernández *et al.* (1993). Para ello, se usó una cámara de vidrio utilizada para la producción de *Volvariella volvacea* (Salmones y Guzmán, 1994), la cual es una modificación del diseño propuesto por Li (1984). En ésta se controlaron los factores temperatura (27 ± 1 °C) y humedad (75-85 %), para favorecer la fructificación. De los basidiomas logrados, se obtuvieron esporadas colocando éstos sobre papel filtro estéril

durante 12 horas, posteriormente se tomó un fragmento del papel de aproximadamente 1 cm² y se suspendió en 100 ml de agua destilada estéril. Se depositaron 0.5 ml de la dilución en cajas de Petri con medio de cultivo de ADP-IM, esterilizado previamente por 15 min a 121 °C; posteriormente se incubaron a 27 ± 1 °C en oscuridad, siguiendo a Guzmán *et al.* (1993).

Los micelios monospóricos se aislaron en condiciones de esterilidad, con ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de disección, para transferir los micelios a nuevas placas de agar (ADP-IM), en donde se les determinó el de crecimiento micelial. Los aislamientos se corroboraron microscópicamente por la ausencia de fíbulas. Las observaciones se realizaron con preparaciones de micelio montadas en KOH al 5 % (Fig. 2).

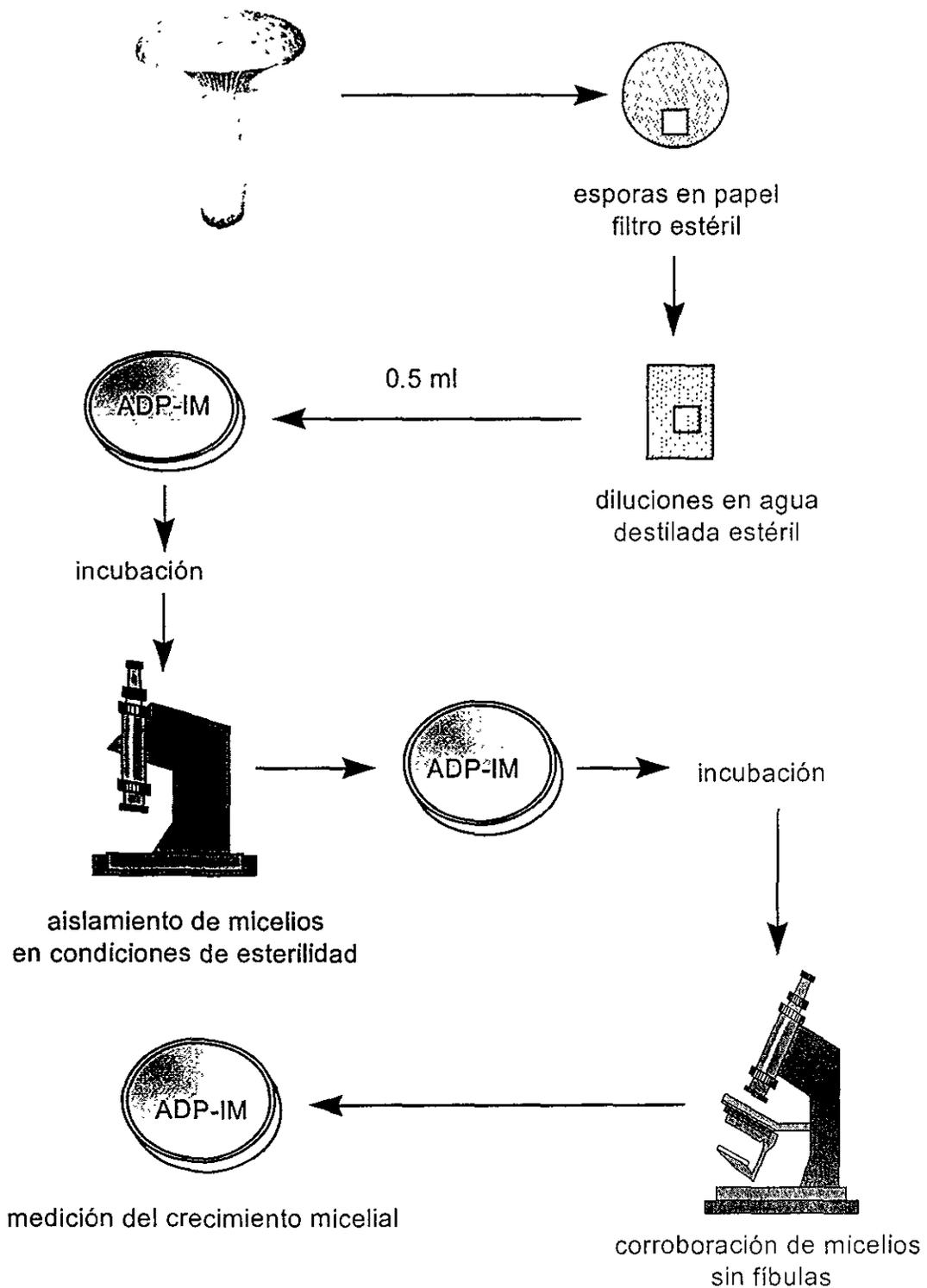


Fig. 2. Obtención de micelios monospóricos de la cepa parental de *Neolentinus suffrutescens*.

Obtención de cepas dicarióticas por entrecruzamiento y su evaluación en medio de cultivo

Se siguió el método utilizado por Eger (1978), para la determinación del patrón de sexualidad de *Pleurotus*. Doce micelios monospóricos se aparearon entre sí en todas las combinaciones posibles, evitando las cruzas recíprocas. Se obtuvieron en total 66 combinaciones y la dicariorización fue determinada por la presencia de fíbulas en los micelios observados microscópicamente. Las cruzas obtenidas y el parental se evaluaron en medio de cultivo de ADP-IM. Se inocularon en condiciones de esterilidad e incubaron a 27 ± 1 °C en obscuridad, se midió el crecimiento y se consideraron las características morfológicas de los micelios.

Medición del crecimiento micelial de las cruzas en madera de pino

La evaluación se realizó en cajas de Petri, en las cuales se colocó el substrato de *Pinus* spp. (II) o *P. montezumae* (V) , seleccionadas del **experimento I**. Una vez esterilizadas, las cajas se inocularon con las cruzas y el parental, e incubaron a 27 ± 1 °C. Se midió el crecimiento de los micelios y se tomaron en cuenta también las características morfológicas de los mismos.

En la figura 3 se aprecia la secuencia de la metodología para obtener las cepas dicarióticas y la medición del crecimiento.

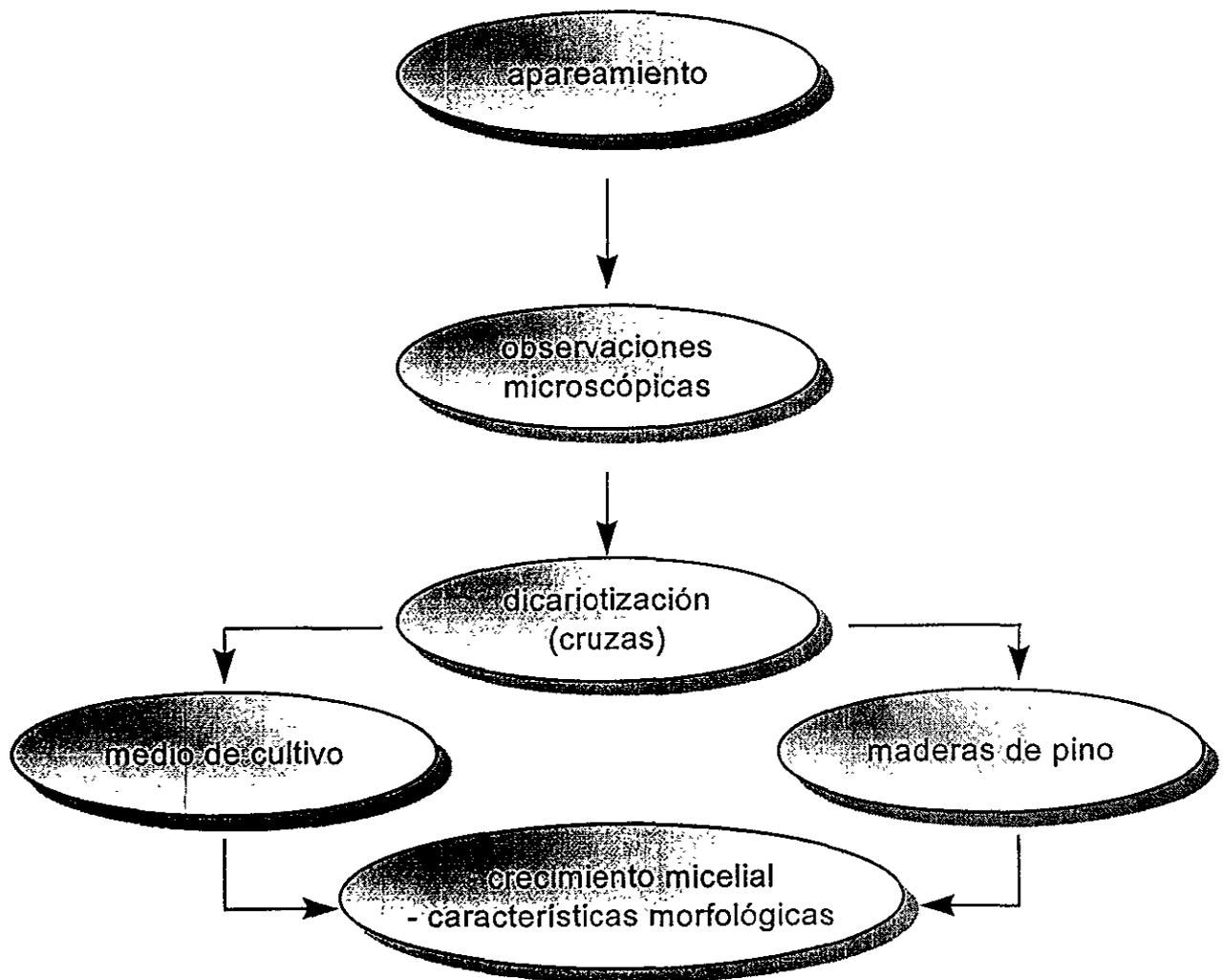


Fig. 3. Obtención de las cruzas de *Neolentinus suffrutescens*, su evaluación a nivel laboratorio y comparación con el parental.

Evaluación de las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* y comparación con su parental a nivel planta piloto

El inóculo se preparó con viruta de *P. montezumae*, hidratada al 80 %, la cual se colocó en bolsas de polipapel, 200 g en peso húmedo por bolsa. Las muestras se esterilizaron durante 90 min a 121 °C y en condiciones asépticas se inocularon con

fragmentos de agar (aprox. 1 cm²) con micelio de cada una de las cepas (Gaitán-Hernández *et al.*, 1993). Las condiciones de incubación fueron en completa oscuridad a 27 ± 1 °C. Una vez obtenido el inóculo, se procedió a preparar las muestras de substrato. Los substratos utilizados fueron el II y el V como único ingrediente. Cada uno de éstos, se hidrató a 80 % y se colocó en bolsas, 200 g en peso seco por bolsa, equivalente a 792 g húmedos para el substrato II y 552 g para el V. Las condiciones de esterilización e incubación fueron las mismas que para el inóculo. A las muestras inoculadas se les colocó un tapón de algodón previamente esterilizado para favorecer la aireación y posteriormente se etiquetaron e incubaron. Una vez que el micelio cubrió el substrato, las muestras se colocaron en el área de producción con iluminación natural difusa y ventilación para favorecer la fructificación. Los parámetros medioambientales se registraron de junio a octubre de 1997. El intervalo mínimo de temperatura osciló entre 11.6 a 13.6 °C, el máximo entre 27.5 a 32.4 °C, y la humedad de 74 a 91.8 % (Fig. 4).

La producción se evaluó con base en los datos de eficiencia biológica (EB), la cual se determinó expresando en porcentaje la relación entre peso fresco de las fructificaciones de los hongos producidos y el peso seco del substrato (Chang y Miles, 1989), y con la tasa de producción (TP), la que se determinó mediante la relación de la eficiencia biológica entre el número total de días de evaluación, a partir del día de inoculación (Royse, 1989). El número y tamaño de las fructificaciones obtenidas fueron evaluados según el diámetro del píleo: grupo 1 (G1) < 5.0 cm y grupo 2 (G2) entre 5.0 y 9.9 cm, modificando el método seguido por Mata y Guzmán (1991) para *Lentinus boryanus*.

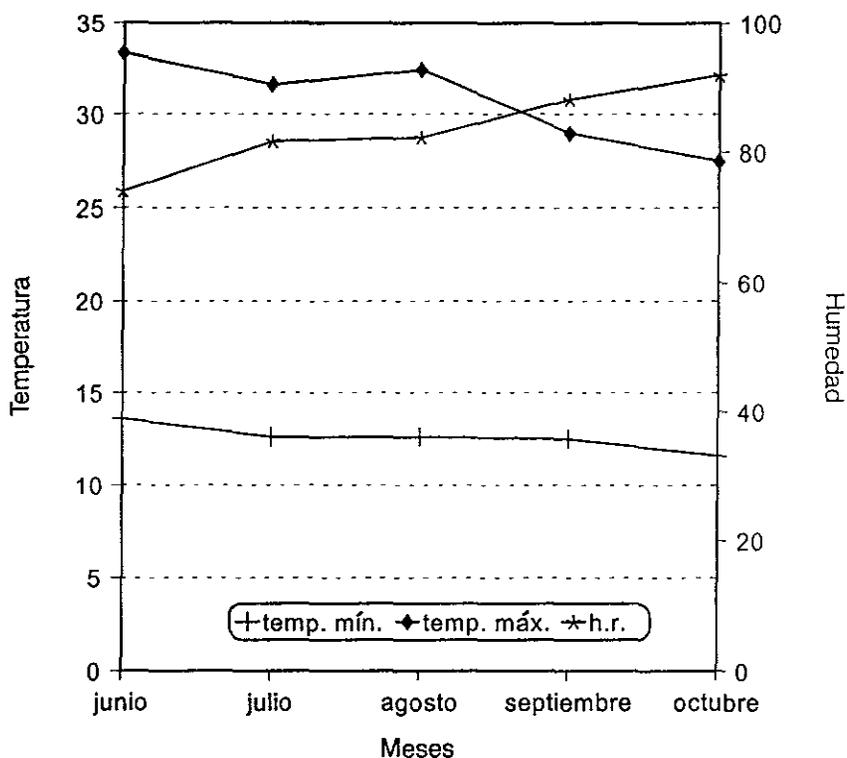


Fig. 4. Temperatura (°C) y humedad (%) registradas durante la fase de fructificación de *Neolentinus suffrutescens*.

III. Factibilidad de reutilizar el substrato biodegradado por *Neolentinus suffrutescens* para el cultivo de *Lentinula* y *Pleurotus*

Se realizaron tres ensayos en los que se midió el crecimiento micelial a nivel caja de Petri de *Lentinula boryana* (IE-93), *L. edodes* (IE-105) y *Pleurotus pulmonarius* (IE-115), en los substratos II y V biodegradados por *N. suffrutescens*, así como en bagazo de caña de azúcar no degradado. Las condiciones de inoculación e incubación, fueron las mismas que en el experimento I.

- a) **Pasteurización:** los substratos II y V, se colocaron en sacos permeables de manta y se sumergieron en agua caliente a 85-90 °C por 50 min. Posteriormente, se les escurrió el exceso de agua y se dejaron enfriar hasta aproximadamente 30 °C.
- b) **Esterilización:** los substratos II y V, previamente hidratados, se colocaron en las cajas y esterilizaron.
- c) **Adición de bagazo de caña de azúcar:** se realizaron mezclas de los substratos II y V con bagazo de caña, en una proporción 1:1, 2:1 y 3:1, además se utilizó el bagazo de caña de azúcar solo (BG), como testigo. Dichos substratos se hidrataron y esterilizaron.

Para la evaluación a nivel planta piloto se preparó inóculo mezclando 87 % de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) y 13 % de bagazo de caña, hidratados al 80 %. Posteriormente se colocó dicha mezcla en bolsas de polipapel, 150 g en peso húmedo por bolsa. Las muestras se esterilizaron durante 90 min a 121 °C y en condiciones asépticas se inocularon con fragmentos de agar con micelio de las cepas a evaluar. Las condiciones de incubación fueron las mencionadas para cada especie en las pruebas de crecimiento (**experimento I**). Una vez obtenido el inóculo, se procedió a preparar las muestras del substrato en las que fueron sembradas cada una de las cepas. Los substratos fueron el II y V degradados por *N. suffrutescens*, mezclados cada uno con bagazo de caña de azúcar en una proporción 1:1 [II+BG (A), V+BG (B)], además de bagazo de caña de azúcar (C). Los substratos se hidrataron a 80 % y se colocaron en bolsas de polipapel, 150 g en peso seco por bolsa, equivalente a 1065 g húmedos para el A, 879 g para el B

y a 740 g para el C. Las muestras se esterilizaron durante 90 min a 121 °C y posteriormente se sembraron con el inóculo previamente preparado (Auetragul, 1984; Chang y Miles, 1989). A las muestras se les colocó un tapón de algodón estéril y se etiquetaron e incubaron en obscuridad a 27 ± 1 °C (Auetragul, 1984; Przybylowicz y Donoghue, 1990). Una vez cubierto el substrato por el micelio de *Lentinula*, las bolsas se transfirieron a un cuarto con iluminación natural difusa, con una temperatura promedio de 25 °C, hasta que el micelio se transformó en una capa oscura, llamada pseudosclerocio (Chang y Miles, 1989; Przybylowicz y Donoghue, 1990; Guzmán *et al.*, 1993), considerado esto como indicativo de que las muestras estaban listas para la fructificación (Donoghue y Denison, 1996). Posteriormente las muestras se colocaron en el área de producción en condiciones de iluminación natural difusa y ventilación para favorecer la fructificación. Los parámetros registrados en el período de febrero a marzo de 1998, que influyeron en el desarrollo de los hongos de *P. pulmonarius*, se observan en la figura 5a. El intervalo mínimo de temperatura osciló entre 9.5 a 10.4 °C, el máximo entre 25.9 a 26.1 °C, y la humedad de 83.2 a 87.1 %. La etapa de fructificación de *L. boryana* y *L. edodes* fue en el periodo de febrero a junio de 1998, en una área de producción diferente a la de *Pleurotus*. Se registró un intervalo mínimo de temperatura de 15.0 a 19.3 °C, un máximo de 24.6 a 27.2 °C y una humedad de 61.8 a 77.8 % (Fig. 5b). Una vez obtenida la primera cosecha, a las muestras de *Lentinula* se les dio un período de reposo de 10 días, posteriormente se sumergieron en agua a aproximadamente 20 °C por 24 h para la inducción de una segunda cosecha y así subsecuentemente, modificando el sistema descrito por Han *et al.* (1981), Mata *et al.* (1990), Przybylowicz y Donoghue (1990) y Ohga

et al. (1992) .

Los parámetros considerados fueron los mismos que los citados para la evaluación de *N. suffrutescens*, excepto que en las fructificaciones producidas, clasificadas por grupos de tamaño, hubo dos grupos más, grupo 3 (G3), con hongos entre 10.0 y 14.9 cm y grupo 4 (G4), con hongos mayores de 15 cm. En la figura 6 se observa un diagrama de flujo de la metodología del **experimento III**.

4. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Los experimentos de crecimiento micelial se realizaron por quintuplicado y los datos registrados a los 12 días de incubación se sometieron a un análisis de varianza unifactorial (micelios monospóricos y cruzas de *N. suffrutescens* en medio de cultivo) y multifactorial (*Lentinula*, *Pleurotus*, parental y cruzas de *N. suffrutescens* en madera de pino).

En los experimentos de planta piloto se realizaron 8 réplicas/cepa/substrato y a los datos de producción se les aplicó un análisis de varianza multifactorial.

A los datos de todos los experimentos también se les aplicó un análisis de comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %). Para lo anterior se utilizó el programa de cómputo Statgraphics Ver. 6.1.

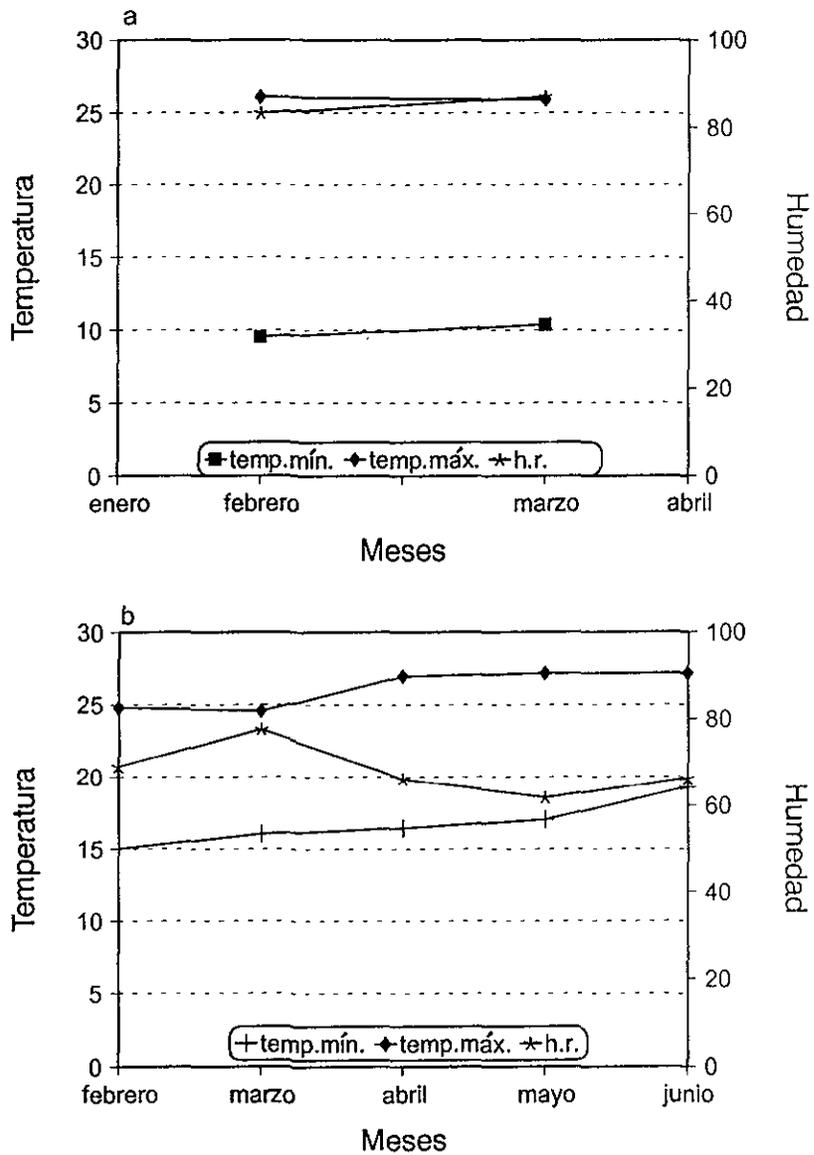


Fig. 5. Temperatura (°C) y humedad (%) registradas durante la fase de fructificación de *Pleurotus pulmonarius* (a), *Lentinula boryana* y *L. edodes* (b).

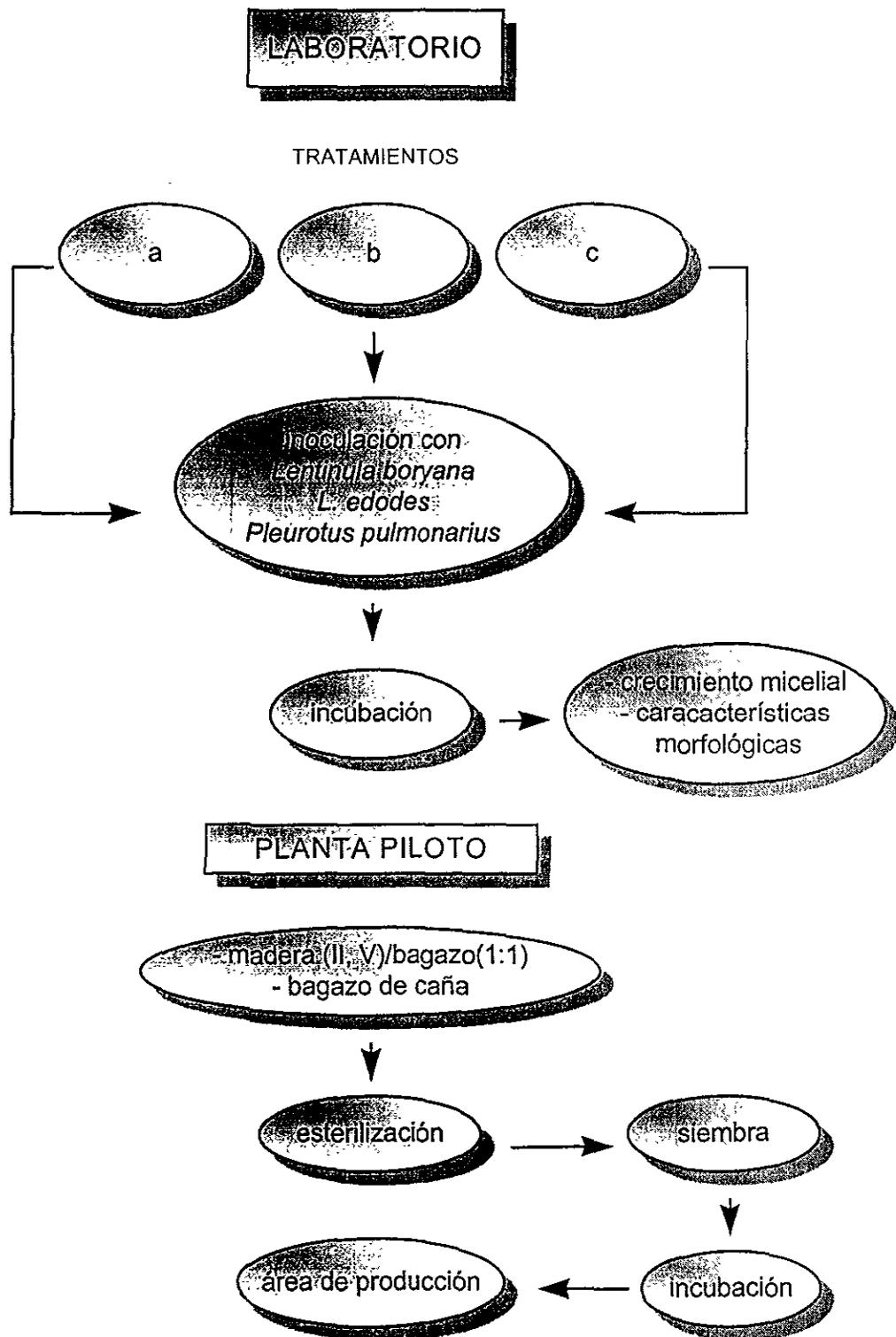


Fig. 6. Evaluación de la factibilidad de reutilización del sustrato degradado por *Neolentinus suffrutescens* para el cultivo de otras especies comestibles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Medición del crecimiento y comportamiento morfológico de los micelios de *Lentinula*, *Pleurotus* y *Neolentinus* en madera de pino

De acuerdo al análisis de varianza para un diseño bifactorial realizado a los datos, las cepas, substratos e interacción entre ellos resultaron ser significativos, es decir, al menos una de las cepas y substratos fue diferente, y cada una de las cepas tuvo un comportamiento distinto al menos en uno de los cinco substratos empleados (Tabla 3). La cepa con menor crecimiento para todos los tratamientos fue la IE-93 de *Lentinula boryana*, y la de mayor la cepa IE-133 de *Neolentinus suffrutescens*. El análisis de comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Tukey, determinó que para todos los tratamientos, la cepa IE-133 fue estadísticamente diferente a las demás. De acuerdo al análisis de interacciones entre cepas y substratos, no se observaron diferencias significativas entre los substratos II y V, excepto en *Pleurotus pulmonarius* (Tabla 3). En el IV se observó un diámetro micelial menor, y en el V el mayor. La cepa IE-133 tuvo un comportamiento similar en los substratos I, III y IV, sin diferencias estadísticas entre ellos; sin embargo el crecimiento del micelio fue menor que en el II y V (Tabla 3). El mejor desarrollo micelial de *N. suffrutescens* en todas los substratos respecto a las otras especies se debe a que la madera de coníferas es uno de los substratos principales en el que crece en forma silvestre (Guzmán 1977; Pegler, 1983). Donoghue y Denison (1996) citaron rendimientos distintos, logrados por *L. edodes*, en substratos con diferente tamaño de partícula. Sin embargo, aquí se destaca que el tamaño de partícula de los substratos

empleados, no influyó en el crecimiento, dado que en tres de las cepas no hubo diferencia estadística entre el II y V.

Tabla 3. Diámetro promedio de los micelios (cm) de *Lentinula boryana* (IE-93), *L. edodes* (IE-105), *Pleurotus pulmonarius* (IE-115) y *Neolentinus suffrutescens* (IE-133), a los 12 días de incubación, en los diferentes substratos probados

SUBSTRATOS	C E P A S			
	IE-93	IE-105	IE-115	IE-133
<i>Pinus</i> spp. (I)	2.88 c*	4.06 d	4.80 e	7.56 h
<i>Pinus</i> spp. (II)	5.06 e	6.87 g	6.99 g	8.52 i
<i>P. pseudostrobos</i> (III)	2.82 c	4.0 d	3.32 c	7.74 h
<i>P. ayacahuite</i> (IV)	2.42 a	3.42 c	2.76 b	7.38 h
<i>P. montezumae</i> (V)	5.55 e	7.11 g	5.87 f	8.58 i

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cuatro cepas y substratos, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

Respecto a las características morfológicas de los micelios, se observó que en el substrato V la cepa de *N. suffrutescens* fue la única que presentó una densidad muy alta, mientras que para el resto fue de muy baja a baja. En este substrato se observó una textura flocosa y lanosa, mientras que para los demás, las cepas presentaron una textura rala (Tabla 4).

Tabla 4. Características del micelio (densidad y textura)* de las diferentes cepas en cada uno de los sustratos probados

substratos	cepas	densidad	textura
<i>Pinus</i> spp. (I)	IE-93	MB	R
	IE-105	MB	R
	IE-115	MB	R
	IE-133	MB	R
<i>Pinus</i> spp. (II)	IE-93	MB	R
	IE-105	MB	R
	IE-115	MB	R
	IE-133	B	R
<i>P. pseudostrobus</i> (III)	IE-93	MB	R
	IE-105	MB	R
	IE-115	MB	R
	IE-133	MB	R
<i>P. ayacahuite</i> (IV)	IE-93	MB	R
	IE-105	MB	R
	IE-115	MB	R
	IE-133	MB	R
<i>P. montezumae</i> (V)	IE-93	B	L
	IE-105	MB	L
	IE-115	B	L
	IE-133	MA	F

MB muy baja; B baja; MA muy alta; R rala; L lanosa; F flocosa.

* todos los micelios fueron blancos.

Con los resultados de crecimiento micelial y comportamiento morfológico de las cuatro cepas evaluadas, se escogieron los sustratos II y V para las posteriores pruebas de crecimiento realizadas en este trabajo. En las cepas de *Lentinula* y *Pleurotus* el factor determinante para escoger dichos sustratos (II y V) fue el diámetro micelial, dado que no tuvieron un buen comportamiento morfológico.

II. Selección y evaluación de cepas de *Neolentinus suffrutescens*

Crecimiento de los micelios monospóricos

La germinación de esporas se observó entre los 4 a 6 días de incubación, lo cual coincide con lo reportado por Snell (1922). Los datos de crecimiento de los 12 monospóricos seleccionados al azar, de un total de 18 aislamientos, se aprecian en la tabla 5. El crecimiento registrado a los 12 días de incubación fluctuó de 4.16 a 8.54 cm (monospóricos 2 y 15, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 5. Diámetro promedio de los micelios monospóricos (cm) de *Neolentinus suffrutescens* a los 12 días de incubación en ADP-IM

nº de monospórico	diámetro	σ
1	6.64 d*	0.30
2	4.16 a	0.27
3	5.95 c	0.80
4	7.20 e	0.43
5	4.93 b	0.64
7	5.13 b	0.31
10	5.61 c	0.62
11	6.90 d	0.27
13	7.26 e	0.59
14	8.53 f	0.15
15	8.54 f	0.29
16	7.20 e	0.61

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Comportamiento de las cepas dicarióticas (cruzas) y medición del crecimiento en medio de cultivo (ADP-IM)

De acuerdo con el método utilizado aquí (Eger, 1978), con el comportamiento de los 66 apareamientos entre los 12 monospóricos probados, no se obtuvo el patrón de sexualidad de *Neolentinus suffrutescens* debido a la ausencia de fíbulas en algunas de las cruzas (Tabla 6). A la especie se le ha citado como heterotálica (Lamoure, 1989) y bipolar (Redhead y Ginns, 1985), sin embargo, no existe un estudio detallado al respecto. *N. suffrutescens* tiene un comportamiento nuclear astatocenocítico (Lamoure, 1989), es decir, la presencia de fíbulas varía de acuerdo con los niveles de aireación (acumulación de CO₂) (Boidin y Lanquetin, 1984), y considerando que varios de los apareamientos tuvieron un crecimiento micelial sumergido en el agar, el poco oxígeno pudo influir en la ausencia de fíbulas. La incompatibilidad entre los apareamientos probablemente también se debió a la presencia de un factor común A, similar a lo citado por Eugenio y Anderson (1968). Se ha mencionado en trabajos previos la ausencia de fíbulas en algunos basidiomicetes como en *Coprinus patouillardii* Qué. (Kemp, 1980), lo que dificulta identificar la compatibilidad entre los micelios (Miles, 1996). El estado dicariótico de los segmentos hifales en estos casos sólo puede ser corroborado empleando tinción nuclear o microscopía de contraste de fases (Boidin, 1986).

Tabla 6. Resultados del entrecruzamiento de micelios monospóricos de *Neolentinus suffrutescens*

		n° de monospórico											
		1	2	3	4	5	7	10	11	13	14	15	16
1		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2			-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3				-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4					-	-	-	-	-	-	-	+	+
5						-	-	-	-	-	-	+	+
7							-	-	-	-	+	+	+
10								-	-	-	-	-	+
11									-	-	-	-	+
13										+	+	+	+
14											-	-	-
15												-	-
16													-

De las 15 cruzas que resultaron positivas ninguna superó al parental en el diámetro micelial (Tabla 7). Los resultados del parental concuerdan con los registrados por Gaitán-Hernández *et al.* (1995), empleando la citada cepa en ADP sin infusión. Se observó que el diámetro micelial de las cruzas osciló entre los valores registrados para los monospóricos de los cuales se originaron (Tabla 5), excepto las cruzas NS4, NS5, NS12 y NS13.

Tabla 7. Diámetro promedio de los micelios (cm) de las cruzas obtenidas de *Neolentinus suffrutescens*, a los 12 días de incubación en ADP-IM, y comparación con el parental (IE-133)

cepas	código de identificación	diámetro	σ
IE-133	IE-133	7.07 i*	0.17
(1-11)	NS1	6.58 g	0.34
(2-11)	NS2	6.10 d	0.41
(3-11)	NS3	6.52 f	0.13
(4-15)	NS4	6.27 e	0.21
(4-16)	NS5	6.10 d	0.41
(5-15)	NS6	6.09 d	0.65
(5-16)	NS7	6.71 h	0.17
(7-14)	NS8	6.47 e	0.31
(7-15)	NS9	6.37 e	0.26
(7-16)	NS10	6.57 g	0.26
(10-16)	NS11	5.45 a	0.25
(11-13)	NS12	5.58 b	0.31
(11-14)	NS13	6.28 e	0.25
(11-15)	NS14	5.95 c	0.31
(11-16)	NS15	6.43 e	0.45

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

La densidad micelial fue de baja a muy alta, con una textura sedosa y flocosa, similar en todas las cepas; la mayoría de éstas presentaron agregaciones hifales, excepto las NS8, NS11, NS13 y NS15 (Tabla 8). En algunas cruzas se detectó la formación de primordios, un olor parecido a bálsamo de Perú y cambio de color en el agar, mencionado ya por Snell (1922, 1923), Cartwright (1938), Badcock (1939) y Gaitán-Hernández *et al.* (1995), mientras que Nobles (1948, 1965) no observó cambio de color en agar con

extracto de malta. Otha *et al.* (1990a) detectaron una coloración café en medio líquido con micelio de la especie aquí estudiada, argumentando que posiblemente se debía a la actividad de una fenol oxidasa. El olor en algunos cultivos es característico de *N. suffrutescens* y se debe a la producción de metabolitos secundarios, como el *p*-hidroxifenilpropanol, *trans*-metil *p*-metoxicinamato, *cis*-metil *p*-metoxicinamato, metil *p*-hidroxicinamato, metil isoferulato y metil *p*-metoxibenzoato (Birkinshaw y Findlay, 1940; Otha *et al.* 1990a,b).

Se observó la formación de cristales en 4 de las cruzas (NS2, NS4, NS6, NS14), los cuales fueron citados también por Birkinshaw y Findlay (1940). Estos cristales pueden ser de oxalato de calcio y su formación fue observada por primera vez por Bary (1887) y Hein (1930), citados por Hayes (1978). Se han detectado en *Resinicum bicolor* (Abertini & Schwein. : Fr.) Parmasto, *Gilbertella persicaria* (Eddy) Hesseltine, *Agaricus bisporus* y *Geastrum saccatum* (Fr.) Fischer (Whitney y Arnott, 1986a,b, 1987; Connolly y Jellison, 1995).

El ácido oxálico es producido por hongos de pudrición blanca y pudrición morena o café (Dutton *et al.*, 1993; Espejo y Agosin, 1991); en estos últimos, como la especie aquí estudiada, se ha propuesto como un importante factor precelulolítico, que posiblemente actúa como quelante, para ayudar a la movilización del hierro, magnesio u otros iones metálicos, que pueden ser usados durante los procesos no enzimáticos y en la reducción del pH del substrato durante su degradación (Espejo y Agosin, 1991; Goodell *et al.*, 1997).

Tabla 8. Características del micelio (color, densidad, textura, agregaciones hifales y formación de primordios) de la cepa parental (IE-133) y cruza obtenidas de *Neolentinus suffrutescens* en ADP-IM

cepas	color	densidad	textura	agregaciones hifales	primordios
IE-133	BL	MA	F	++	p
NS1	BL	MA	F	++	p
NS2	BL	A	F	+	-
NS3	BL	MA	F	++	-
NS4	BL	MA	F	++	p
NS5	BL	MA	F	++	p
NS6	BL	MA	F	++	-
NS7	BL	MA	F	++	p
NS8	CR	B	F	-	-
NS9	BL	MA	F	++	-
NS10	CR	MA	F	++	-
NS11	BL	B	S	-	-
NS12	BL	A	S	+	p
NS13	CR	RE	S	-	-
NS14	BL	A	F	+	p
NS15	BL	B	S	-	-

BL blanco; CR café rojizo; B baja; R regular; A alta; MA muy alta; F flocosa; S sedosa; - ausentes; + poco abundantes; ++ abundantes; p presentes.

Comportamiento de las cruza y crecimiento de las mismas en la madera de pino

Con base en los resultados anteriores, se escogieron 8 de las 15 cruza para su evaluación en los substratos II y V, seleccionadas del experimento I. En el substrato II, 3 cruza superaron al parental en el diámetro registrado a los 12 días de incubación (NS5, NS9, NS10). En el substrato V, ninguna de las cruza superó al parental en el diámetro micelial (Tabla 9). Con el análisis de varianza bifactorial, resultaron ser significativas las cepas, los substratos e interacción entre ellos (Tabla 9). Con base en el análisis de

comparación de medias, el crecimiento de las cruzas fue significativamente diferente en ambos sustratos, excepto para el parental que presentó un crecimiento de 8.50 y 8.57 cm (Tabla 9).

En los sustratos evaluados, todas las cruzas y su parental tuvieron un mayor crecimiento micelial que en el medio de cultivo (ADP-IM).

Tabla 9. Diámetro promedio micelial (cm) de las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* y cepa parental (IE-133), a los 12 días de incubación, en los sustratos de madera de pino

cepas	<i>Pinus</i> spp. (II)		<i>Pinus montezumae</i> (V)	
	diámetro	σ	diámetro	σ
IE-133	8.50 j*	0.29	8.57 j	0.35
NS1	8.22 h	0.37	6.78 b	0.56
NS4	8.02 g	0.45	6.89 c	0.72
NS5	9.0 k	0.00	7.96 g	0.27
NS6	8.33 h	0.20	7.63 f	0.79
NS7	8.20 h	0.58	6.41 a	1.0
NS9	8.84 k	0.20	7.52 e	0.65
NS10	8.66 j	0.38	7.25 d	0.41
NS14	8.37 i	0.50	7.08 c	0.29

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para todas las cepas y para ambos sustratos, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha= 0.05$ %).

El micelio fue blanco en ambos sustratos, la densidad de baja a muy alta y la textura rala, lanosa y flocosa. En el sustrato V se observó una densidad muy alta sólo en una de las cruzas (NS9), con características morfológicas similares al parental IE-133. También en el mismo sustrato, la mayoría de las cruzas presentaron abundantes

agregaciones hifales, no así en el II (Tabla 10).

Las cruzas y el parental en ADP-IM presentaron una densidad de alta a muy alta, superior a la de la mayoría de las cepas en los substratos II y V. En éstos no se observaron primordios, sin embargo, la textura y la formación de agregaciones hifales en *P. montezumae* (V) fue similar al detectado en el agar.

Tabla 10. Características del micelio (densidad, textura y agregaciones hifales)* de la cepa parental (IE-133) y cruzas de *Neolentinus suffrutescens* en los substratos de madera de pino

substratos	cepas	densidad	textura	agregaciones hifales**
<i>Pinus</i> spp. (II)	IE-133	B	R	-
	NS1	A	F	+
	NS4	A	F	+
	NS5	A	F	+
	NS6	RE	L	-
	NS7	RE	L	-
	NS9	A	F	+
	NS10	A	F	+
	NS14	A	F	+
<i>P. montezumae</i> (V)	IE-133	MA	F	++
	NS1	A	L	+
	NS4	A	F	++
	NS5	A	L	++
	NS6	A	F	++
	NS7	A	F	+
	NS9	MA	F	++
	NS10	A	F	++
	NS14	A	L	+

B baja; RE regular; A alta; MA muy alta; R rala; L lanosa; F flocosa.

* todos los micelios fueron blancos.

** - ausentes; + poco abundantes; ++ abundantes.

Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos por las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* y el parental a nivel planta piloto

El período de incubación de las 8 cruzas y del parental fue de los 37 a 49 días en el substrato II (IE-133 y NS1, respectivamente) y de 31 a 54 días en el V (IE-133 y NS7, respectivamente), semejante a lo reportado por Gaitán-Hernández *et al.* (1993). Se consideró como período de incubación el tiempo transcurrido a partir de la siembra de las muestras hasta la formación de primordios.

El número de cosechas obtenidas en el substrato II fue de 1 a 3, y en la V de 1 a 4. En los dos substratos, la primera cosecha fue siempre la más abundante, con una producción promedio mayor al 80 % en el II y mayor al 50 % en el V (Fig. 7a y b). En el substrato II se observaron tres grupos de cepas bien definidos en el número y producción por cosecha. Las de 3 cosechas (IE-133, NS6), que tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la producción de hongos por cosecha, las de 2 cosechas (NS4, NS9, NS14) y las de sólo 1 cosecha (NS1, NS7, NS10) (Fig. 7a). En el substrato V (Fig. 7b) las cepas produjeron más cosechas, excepto la NS9, NS10 y NS6; esta última, inclusive, produjo 2 cosechas más en el substrato II. La única cruza que igualó al parental (IE-133) en cuanto al número de cosechas obtenidas fue la NS14 (Fig. 7b). En general, las cruzas y el parental tuvieron un mejor comportamiento en cuanto al número de cosechas obtenidas en el substrato V que en el II; incluso la cruza NS5 no produjo hongos en este último.

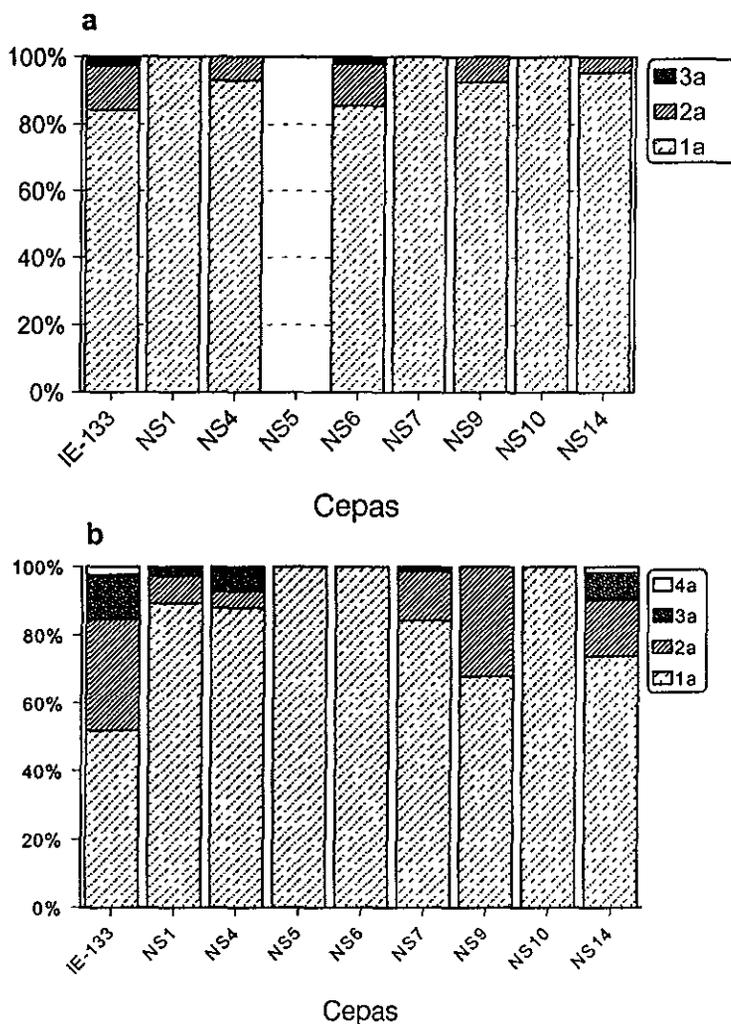


Fig. 7. Producción promedio de fructificaciones (%) por cosecha, de las cruces de *Neolentinus suffrutescens*, en *Pinus* spp.(a) y en *Pinus montezumae* (b) y comparación con la cepa parental (IE-133).

Respecto a la producción de hongos (g) por grupos de tamaño, en ambos substratos las cepas produjeron hongos de los 2 grupos establecidos (G1: < 5.0 cm y G2: de 5.0-9.9 cm). El análisis de varianza realizado por substrato indicó que las cepas y grupos, así como la interacción entre ellos, presentaron significancia. Las cepas tuvieron un comportamiento diferente en cuanto al tamaño de hongos y el peso (g) de

fructificaciones por grupo de tamaño varió de acuerdo a la cepa evaluada. Las cepas NS1, NS4 y NS9 no desarrollaron hongos del G2 en el substrato II (Tabla 11). Sin embargo, en este mismo substrato, las cepas NS4, NS7 y NS9 superaron al parental en cuanto a la producción de hongos del G1, y la NS6 en la producción de hongos del G2, siendo estadísticamente diferente del parental. La producción de hongos entre el G1 y G2 en el substrato II fue significativamente diferente en todas las cepas. En el substrato V, 3 de las 8 cruzas superaron al parental en cuanto a la producción de hongos desarrollados del G1 (NS4, NS9 y NS14) y 5 en la producción de hongos del G2 (NS4, NS5, NS6, NS7 y NS14). Las NS4, NS7 y NS9 también superaron al parental en los hongos del G1 en el II. En el V, sólo las cruzas NS4 y NS14 superaron al parental en los hongos de ambos grupos, sin diferencias estadísticas en el G1 entre estas dos. El G1 fue el más representativo (promedio/grupo), con 12.84 g y 56.05 fructificaciones en promedio, mientras que el G2 produjo 5.86 g de 4.88 fructificaciones, con diferencia estadística entre ambos grupos (Tabla 11).

Tabla 11. Peso promedio de hongos producidos (g) por las cruzas de *N. suffrutescens*, por grupos de tamaño, en los dos sustratos evaluados y comparación con el parental (IE-133)

cepas	<i>Pinus spp.</i> (II)				<i>P. montezumae</i> (V)			
	G1		G2		G1		G2	
IE-133	13.17	g*	6.22	c	16.71	i	5.32	b
NS1	9.70	e	-		12.78	h	5.17	b
NS4	19.91	k	-		19.82	k	8.93	e
NS5	-		-		7.93	d	6.76	c
NS6	12.06	f	17.15	i	9.02	e	19.05	j
NS7	14.20	h	2.50	a	7.80	d	11.70	g
NS9	18.50	j	-		23.73	l	2.86	a
NS10	11.42	f	2.12	a	7.16	d	1.66	a
NS14	7.88	d	5.57	b	19.37	k	10.47	f
promedio/grupo	G1=12.84 b (56.05)**				G2=5.86 a (4.88)			

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para los grupos de tamaño de las cepas, de un mismo sustrato, así como entre el promedio/grupo, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha= 0.05$ %).

** los valores entre paréntesis indican el número promedio de hongos obtenidos.

La eficiencia biológica (EB) alcanzada por las cruzas y el parental en los sustratos II y V fluctuó de 4.85 a 14.60 % (NS1 y NS6), y de 4.41 a 14.92 % (NS10 y NS14), respectivamente (Tabla 12). Con el análisis de varianza resultaron ser estadísticamente significativos las cepas y sustratos. Sin considerar a la cepa NS5 que no produjo hongos en el sustrato II, la cepa que presentó la menor EB para todos los tratamientos fue la NS1 y la mayor, la NS14. En el sustrato II, 2 de las cruzas superaron a la cepa parental, la NS4 y la NS6, con una EB de 9.95 y 14.60%, respectivamente; sin diferencia estadística de la primera con el parental. En el sustrato V, estas mismas cepas y las NS9

y NS14 fueron superiores, con diferencias estadísticas entre ellas, excepto entre la NS4 y la NS6. En esta última, la EB fue estadísticamente similar entre los dos substratos. Con los valores promedio obtenidos por cepa en ambos substratos (EB promedio/cepa), se observó que las cruzas NS4, NS6, NS9 y NS14 superaron al parental, aunque la última de éstas no fue estadísticamente diferente al mismo. También, con los valores promedio de las cepas para cada uno de los substratos (EB promedio/substrato), la mayor EB fue en el V y significativamente diferente a la EB del II (Tabla 12). Gaitán-Hernández *et al.* (1993) reportaron una EB de 7.90 a 27.55 %, empleando la misma cepa de este estudio (IE-133), en substratos a base de madera de pino, lo cual coincide con los valores aquí obtenidos, sin embargo, éstos no superaron a la EB máxima reportada (27.55 %).

Se debe mencionar que la cepa NS9 produjo hongos que no alcanzaron a desarrollar totalmente las láminas, sin embargo, esto es uno de los riesgos de los apareamientos al azar. El defecto se pudo deber principalmente a una combinación genética no deseable o a la no expresión de un gen determinado.

La tasa de producción (TP) lograda por las cruzas y su parental en el substrato II fluctuó de 0.07 a 0.19 % (NS1 y NS9, respectivamente) y de 0.06 a 0.23 % en el V (NS10 y NS6, respectivamente). El análisis de varianza realizado con los datos de TP, indicó que sólo los substratos no presentaron significancia, esto es, que para todos los tratamientos los substratos se comportaron de manera similar (Tabla 13). En el substrato II, 2 de las cruzas superaron al parental (NS6, NS9) con una TP de 0.18 y 0.19 %, respectivamente. Las dos fueron estadísticamente similares al parental, así como la NS7, aunque ésta no lo superó. En el substrato V todas las cruzas lo superaron, excepto la NS10. El parental

fue estadísticamente diferente a todas las cruzas. Los valores promedio por cepa para los 2 substratos (TP promedio/cepa), indicaron que 3 de las 8 cruzas fueron superiores y estadísticamente diferentes a la cepa parental (NS4, NS6, NS9), aunque ésta fue significativamente semejante a la NS7 y NS14. Además al obtener el promedio de cada uno de los substratos (TP promedio/substrato) el de *P. montezumae* presentó la mayor TP, aunque no significativamente diferente a *Pinus* spp. (Tabla 13).

Tabla 12. Eficiencia biológica promedio (%) obtenida por las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* y comparación con la cepa parental (IE-133)

cepas	<i>Pinus</i> spp.(II)		<i>P. montezumae</i> (V)		EB promedio/cepa	
IE-133	9.70	f*	11.01	g	10.35	e
NS1	4.85	a	8.98	d	6.91	c
NS4	9.95	f	14.38	i	12.16	g
NS5	-		7.35	c	3.67	a
NS6	14.60	i	14.03	i	14.31	h
NS7	8.35	d	9.75	f	9.05	d
NS9	9.12	e	13.30	h	11.21	f
NS10	6.77	b	4.41	a	5.59	b
NS14	6.72	b	14.92	j	10.48	e
EB promedio/substrato	7.78	a	10.90	b		

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cepas y ambos substratos, así como entre la EB promedio/cepa y EB promedio/substrato, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$ %).

Tabla 13. Tasa de producción promedio (%) obtenida por las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* y comparación con la cepa parental (IE-133)

cepas	<i>Pinus</i> spp. (II)	*	<i>P. montezumae</i> (V)	*	TP promedio/cepa	*
IE-133	0.17	d	0.11	b	0.14	d
NS1	0.07	a	0.13	c	0.10	c
NS4	0.13	c	0.21	e	0.17	e
NS5	-		0.13	c	0.06	a
NS6	0.18	d	0.23	f	0.20	f
NS7	0.16	d	0.13	c	0.14	d
NS9	0.19	d	0.18	d	0.18	e
NS10	0.11	b	0.06	a	0.08	b
NS14	0.10	b	0.17	d	0.13	d
TP promedio/substrato	0.12	a	0.15	a		

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cepas, para ambos substratos, así como entre la TP promedio/cepa y TP promedio/substrato, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$ %).

III. Evaluación de las especies de *Lentinula* y *Pleurotus* en el substrato biodegradado por *Neolentinus suffrutescens*

El análisis de varianza realizado, señaló significancia en las cepas, substratos y proporciones evaluadas. En los substratos degradados mezclados con bagazo de caña, *Pinus* spp. II+BG (A) y *P. montezumae* V+BG (B), el mayor crecimiento micelial de las cepas se observó en la proporción 1:1 y el menor en la 3:1; inclusive, en el substrato B no hubo crecimiento de *L. boryana* ni de *L. edodes*. En ambos substratos el mayor crecimiento a los 12 días, se observó en *P. pulmonarius*, en la proporción 1:1, con 6.09 cm en el A y de 6.72 cm en el B. La cepa IE-93 tuvo el mayor diámetro micelial en el

substrato B, con 3.54 cm y la cepa IE-105 en el A con 4.30 cm. Estas dos cepas de *Lentinula* fueron estadísticamente similares en la proporción 1:1 del substrato B. En general para todas las cepas en ambos substratos (promedio/proporción), el mayor diámetro micelial se presentó en la proporción 1:1 y fue significativamente diferente a las otras. La cepa con mayor crecimiento fue la de *P. pulmonarius* (promedio/cepa) y con diferencia estadística al resto (Tabla 14).

Tabla 14. Diámetro promedio de los micelios (cm) de *Lentinula boryana* (IE-93), *L. edodes* (IE-105) y *Pleurotus pulmonarius* (IE-115) en los substratos degradados por *N. suffrutescens*, mezclados con bagazo de caña de azúcar, a los 12 días de incubación

proporción	<i>Pinus</i> spp. II+BG (A)			<i>P. montezumae</i> V+BG (B)			promedio/proporción
	IE-93	IE-105	IE-115	IE-93	IE-105	IE-115	
1:1	3.16 e*	4.30 g	6.09 i	3.54 f	3.52 f	6.72 j	4.55 c
2:1	2.35 b	2.90 d	4.10 g	3.11 e	3.15 e	5.13 h	3.45 b
3:1	1.95 a	1.94 a	2.63 c	-	-	4.16 g	1.78 a
promedio/cepa	2.48 a	3.04 b	4.27 c	2.21 a	2.22 a	5.33 d	

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para todas las cepas en las tres proporciones y ambos substratos, así como entre los promedios, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

El micelio en todas las cepas en las tres proporciones y en ambos substratos fue blanco, con una densidad de muy baja a regular y una textura rala y sedosa. La textura sedosa sólo se observó en la cepa IE-115, en las 3 proporciones (1:1, 2:1, 3:1) del substrato A (Tabla 15). En la tabla 14 se observó un mayor crecimiento de las cepas en

el sustrato A (promedio/cepa), excepto de la IE-115. Sin embargo, el comportamiento morfológico de los micelios fue similar en ambos sustratos (Tabla 15).

Tabla 15. Características del micelio (textura y densidad)* de las diferentes cepas en los sustratos degradados por *N. suffrutescens*, mezclados con bagazo de caña de azúcar

proporción	cepas	sustratos	densidad	textura
1:1	IE-93	A	MB	R
		B	B	R
	IE-105	A	MB	R
		B	B	R
	IE-115	A	RE	S
		B	B	R
2:1	IE-93	A	MB	R
		B	MB	R
	IE-105	A	MB	R
		B	MB	R
	IE-115	A	B	S
		B	MB	R
3:1	IE-93	A	MB	R
		B	-	-
	IE-105	A	MB	R
		B	-	-
	IE-115	A	B	S
		B	MB	R

sustratos: A *Pinus* spp. II+BG; B *P. montezumae* V+BG.

densidad y textura: MB muy baja; B baja; RE regular; R rala; S sedosa.

* todos los micelios fueron blancos.

- no hubo crecimiento.

Se compararon los datos de crecimiento micelial de los sustratos A y B en la proporción 1:1, que fue en donde se observaron los mejores resultados, con los obtenidos

en bagazo de caña de azúcar (C), *Pinus* spp. (II) y *P. montezumae* (V), estas dos últimas series de datos seleccionadas del **experimento I**. Con el análisis de varianza aplicado a los datos, las cepas, substratos e interacción entre estos fueron significativos. *P. pulmonarius* presentó el mejor crecimiento en todos los substratos, excepto en el V. Sin embargo, este substrato fue el mejor para *L. boryana* y *L. edodes*. En general (promedio/substrato), el C fue superior, pero estadísticamente similar al II y V, aunque se debe destacar que esto depende principalmente de la cepa, dado que el substrato C no fue de los mejores en las especies de *Lentinula* (Tabla 16). Los valores promedio de los substratos en cada cepa (promedio/cepa) indicaron que el mayor crecimiento lo presentó *P. pulmonarius*, después *L. edodes* y por último *L. boryana*, con diferencias estadísticas entre todas.

Tabla 16. Diámetro promedio de los micelios (cm) de las cepas en los substratos degradados mezclados con bagazo de caña en la proporción 1:1 (A y B) y comparación con los testigos (C, II y V), a los 12 días de incubación

substratos	C E P A S			promedio/substrato
	IE-93	IE-105	IE-115	
<i>Pinus</i> spp.II+BG (1:1) (A)	3.16 a*	4.30 c	6.09 f	4.51 a
<i>P. montezumae</i> V+BG (1:1) (B)	3.54 b	3.52 b	6.72g	4.59 a
Bagazo (C)	4.28 c	6.24 f	9.0 i	6.50 b
<i>Pinus</i> spp. (II)	5.06 d	6.87 h	6.99 h	6.30 b
<i>P. montezumae</i> (V)	5.55 e	7.11 h	5.87 e	6.17 b
promedio/cepa	4.31 a	5.60 b	6.93 c	

* los valores representan el promedio de 5 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para todas las cepas y substratos, así como entre los promedios, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

Considerando las características morfológicas de los micelios, las cepas presentaron un desarrollo similar aunque la de *P. pulmonarius* tuvo una densidad regular en dos de los substratos (A,C), no observada en las otras. Las cepas de *L. boryana* y *L. edodes* desarrollaron una textura lanosa en el substrato V y rala en el resto. En general las tres cepas tuvieron un comportamiento superior en *P. montezumae* sin degradar (Tabla 17).

Tabla17. Características del micelio (densidad y textura)* de las diferentes cepas en los substratos degradados mezclados con bagazo de caña (1:1) y testigos

cepas	substratos	densidad	textura
IE-93	A	MB	R
	B	B	R
	C	MB	R
	II	MB	R
	V	B	L
IE-105	A	MB	R
	B	B	R
	C	MB	R
	II	MB	R
	V	MB	L
IE-115	A	RE	S
	B	B	R
	C	RE	F
	II	MB	R
	V	B	L

substratos: A *Pinus* spp. II+BG (1:1); B *P. montezumae* V+BG (1:1); C bagazo de caña; II *Pinus* spp.; V *P. montezumae*.

densidad y textura: MB muy baja; B baja; RE regular; R rala; L lanosa; S sedosa; F flocosa

* todos los micelios fueron blancos.

Se determinó el pH de los substratos testigo, degradados, mezclados y bagazo de caña. El pH se consideró como un factor que pudo influir en el comportamiento de las cepas (Tabla 18).

Tabla 18. Determinación del pH de los substratos testigo, degradados por *Neolentinus*, y éstos mezclados con bagazo de caña de azúcar (BG).

substratos	pH
<i>Pinus</i> spp. (II)	4.8
<i>P. montezumae</i> (V)	3.8
<i>Pinus</i> spp. (II) degradado	3.2
<i>P. montezumae</i> (V) degradado	2.6
<i>Pinus</i> spp. (II) degradado+BG (1:1)	5.2
<i>Pinus</i> spp. (II) degradado+BG (2:1)	4.7
<i>Pinus</i> spp. (II) degradado+BG (3:1)	4.5
<i>P. montezumae</i> (V) degradado+BG (1:1)	4.6
<i>P. montezumae</i> (V) degradado+BG (2:1)	4.3
<i>P. montezumae</i> (V) degradado+BG (3:1)	4.3
bagazo de caña de azúcar	5.9

Pudieron ser varios los factores que influyeron en el nulo crecimiento micelial en los substratos degradados o en las variaciones observadas en las mezclas con bagazo de caña de azúcar. Uno de los que posiblemente determinó el comportamiento micelial en los substratos, fue el pH (Tabla 18). En los substratos II y V intactos, de un pH inicial de 4.8 y 3.8, respectivamente, con la degradación de *N. suffrutescens* decreció a 3.2 y 2.6. Ya había sido reportado por Goodell *et al.* (1997), que los hongos provocan una disminución del pH en los substratos durante la degradación. En particular Jennison *et al.* (1955) mencionaron un decremento del pH por *N. suffrutescens* en un medio de cultivo líquido

con extracto de malta, de un pH inicial de 4.9 a 1.6. La posible producción de oxalato de calcio por *N. suffrutescens* es un factor que pudo influir directamente en la disminución del crecimiento. Por otra parte, Reid (1989) mencionó un pH óptimo de 4 a 5 para el crecimiento de las especies de pudrición blanca, como las aquí probadas. Para *L. edodes* se han citado pH óptimos de 4.5 a 5.5 (Han *et al.*, 1981; Singer y Harris, 1987; Chang y Miles, 1989) y para *P. pulmonarius* de 5.5 a 7.0 (Zadrazil, 1978, Sobal *et al.*, 1989).

Se debe considerar que *N. suffrutescens*, aparte de producir metabolitos en medio de cultivo, también los produce en un sustrato a base de madera, como por ejemplo el metil-*p*-metoxicinamato, que tal vez influyó de manera negativa en el crecimiento de las especies evaluadas (Birkinshaw y Findlay, 1940).

La utilización del bagazo de caña de azúcar como suplemento de los sustratos degradados en las diferentes proporciones ayudó por una parte a estabilizar el bajo pH de éstos, y por otra, a enriquecerlos con fuentes de carbono. Se optó por emplear el bagazo por las grandes cantidades que se producen en los ingenios azucareros y por su disponibilidad en la región de Xalapa. Se ha estimado que actualmente se producen más de 10 millones de toneladas anuales de este residuo en México, al cual no se le da un uso adecuado (SAGAR, 1998). Este sustrato ya se había propuesto como suplemento de virutas, para el cultivo de *L. edodes* (Auetragul, 1984). Su utilización potencial para el cultivo de especies de los géneros *Lentinula* y *Pleurotus* se ha demostrado en trabajos previos (Guzmán-Dávalos *et al.*, 1987a,b; Martínez-Carrera, 1989; Martínez-Carrera *et al.*, 1990; Gutiérrez-Lecuona y Salmones, 1996; Salmones *et al.*, 1997a).

Por otra parte, se ha observado que *N. suffrutescens* tiene la capacidad de remover

las glucanas, mananas y xilanas de la madera de coníferas, dejando casi intacta la lignina (Kirk y Highley, 1973). Es decir, los elementos que quedan disponibles en el sustrato para las otras especies evaluadas influyen directamente en su desarrollo, considerando además que la lignina por sí sola aparentemente no puede servir como un sustrato de crecimiento (Blanchette, 1991; Tour *et al.*, 1995). Se ha mencionado que *L. edodes* tiene una actividad ligninolítica moderada y que causa un ataque no selectivo de la lignina (Leatham, 1986; Blanchette, 1991), esto es, necesita de fuentes de carbono de fácil asimilación para iniciar dicha actividad. Esto puede ser una explicación del por qué su crecimiento se activa al agregar bagazo de caña a los sustratos degradados y disminuye conforme aumenta la concentración de sustrato (Tabla 14). Lo anterior también pudo ocurrir con *L. boryana*, aunque no existen estudios de los procesos de degradación en esta especie; su afinidad con *L. edodes*, en especial en las enzimas que producen, supone un comportamiento similar (Mata *et al.*, 1997).

El mejor desarrollo de *P. pulmonarius* también se explica por el hecho de la demostración en especies del género *Pleurotus* de su selectividad por la degradación de la lignina, independientemente de la concentración de fuentes de carbono (Hadar *et al.*, 1993).

De los resultados obtenidos, se determinó que la mejor proporción de los sustratos biodegradados mezclados con bagazo de caña, fue la 1:1 y ésta, así como bagazo de caña, se utilizaron para la evaluación de las cepas de *Lentinula* y *Pleurotus* a nivel de planta piloto. A pesar de que *Lentinula* tuvo el mayor crecimiento micelial en los sustratos II y V sin degradar, inclusive mejor que en bagazo de caña (Tabla 16), las

cepas no se evaluaron a nivel de planta piloto en dichos substratos, dado que no era un objetivo del trabajo.

El período de incubación de *L. boryana*, *L. edodes* y *P. pulmonarius* en los substratos A, B y C, fue de 61 y 59 días, 36, 42 y 38 días, y de 19, 17 y 14 días, respectivamente. En todos los substratos hubo producción de hongos, excepto en el C con la cepa IE-93. Para el caso de las cepas de *Lentinula*, se consideró como período de incubación el tiempo transcurrido a partir de la siembra de las muestras hasta la formación del pseudosclerocio, y para *Pleurotus*, el tiempo transcurrido a partir de la siembra hasta la aparición de primordios.

El número de cosechas obtenidas en el substrato A fue de 2 (IE-93) y 3 (IE-105, IE-115); en el substrato B de 2 (IE-93), 3 (IE-105) y 4 (IE-115), y en el substrato C de 2 (IE-115) y 3 (IE-105). En los 3 substratos la primera cosecha fue siempre la más abundante, con una producción entre el 60 y 80 % (Fig. 8). En las cepas de *L. boryana* y *L. edodes* se observó un número de cosechas homogéneo para todos los substratos, 2 cosechas (IE-93) y 3 (IE-105). En el substrato B, la única cepa que produjo 4 cosechas fue la de *P. pulmonarius* (Fig. 8).

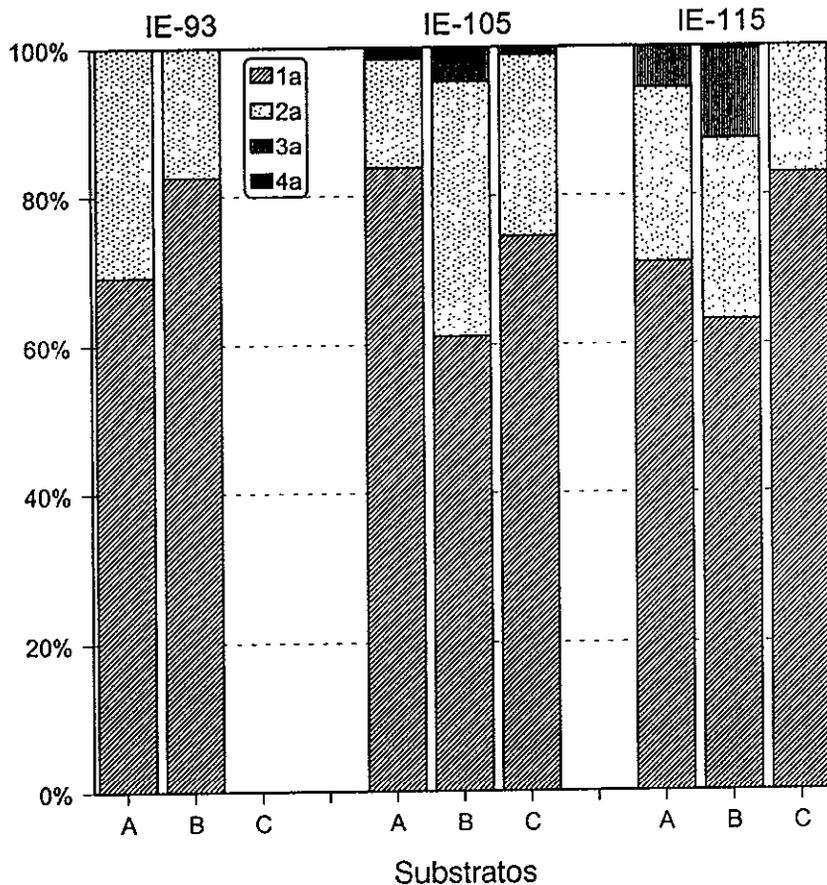


Fig. 8. Producción promedio de fructificaciones (%) por cosecha, por *Lentinula boryana* (IE-93), *L.edodes* (IE-105) y *Pleurotus pulmonarius* (IE-115) en substratos de *Pinus* spp. II+BG (1:1) (A), *P. montezumae* V+BG (1:1) (B) y bagazo de caña (C).

En la producción de hongos (g) por grupos de tamaño, *L. boryana* y *P. pulmonarius* produjeron hongos de 3 grupos de tamaño, excepto en el sustrato A para la cepa IE-93 y en el C para la IE-115, mientras que la cepa de *L. edodes* desarrolló hongos de los 4 grupos establecidos, excepto en el sustrato C (G1: < 5.0 cm, G2: 5.0-9.9 cm, G3: 10.0-14.9 cm, G4: > 10.0 cm) (Tabla 19, Fig. 9). El análisis estadístico aplicado a los datos se realizó de forma independiente para cada una de las cepas. El análisis de varianza mostró que para la cepa IE-93 e IE-105, sólo el tamaño de hongos presentó significancia, es

decir, la producción de hongos de los distintos grupos fue diferente en los substratos evaluados. Para la cepa IE-115, tanto los substratos como el tamaño de hongos fueron significativos. En las cepas IE-93 e IE-115, el G2 fue el mejor representado, con una producción promedio de 31.53 g de hongos frescos y 6.43 hongos en promedio, 58.85 g y 18.83 hongos, respectivamente, con diferencia estadística significativa con los otros grupos en ambas cepas (promedio/grupo). En la figura 9a y c, se observan cuerpos fructíferos de las dos especies citadas, en donde predominan los hongos del G2. En la cepa IE-105 (Fig. 9b) el G3 fue el mayoritario, con 41.06 g producidos y un promedio de 2.85 hongos; el G2 fue el segundo mejor con 32.76 g y 6.55 hongos, también con diferencias estadísticas entre todos los grupos (promedio/grupo). La producción más alta de hongos del G2 por las cepas IE-93 e IE-115, se observó en los substratos A y B, y del G3 por la IE-105, en los substratos B y C (Tabla 19). Los valores promedio de los grupos para cada una de las cepas, determinó que los hongos más grandes fueron producidos por la cepa de *L. edodes*, y la mayor cantidad los produjo la cepa de *P. pulmonarius*.

Tabla 19. Producción promedio de hongos (g) de *Lentinula boryana* (‡), *L. edodes* (♣) y *Pleurotus pulmonarius* (*) por grupos de tamaño, en los sustratos evaluados

sustratos		G1	G2	G3	G4
‡	A	17.14 b*	37.84 c	-	-
	B	6.11 a	25.22 b	6.51 a	-
promedio/grupo		11.62 b (8.31)**	31.53 c (6.43)	3.25 a (0.63)	
♣	A	6.67 a	22.54 b	19.04 b	21.19 b
	B	4.63 a	34.76 c	57.01 e	24.23 b
	C	9.99 a	40.99 d	47.15 d	-
promedio/grupo		7.09 a (5.86)	32.76 c (6.55)	41.06 d (2.85)	15.14 b (0.55)
*	A	46.76 d	67.21 f	12.31 a	-
	B	34.87 c	85.93 g	16.45 a	-
	C	55.28 e	23.41 b	-	-
promedio/grupo		45.63 b (69.73)	58.85 c (18.83)	9.58 a (1.08)	

A *Pinus* spp. II+BG (1:1); B *P. montezumae* V+BG (1:1); C bagazo de caña de azúcar.

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para los grupos de tamaño para los sustratos, así como entre el promedio/grupo, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %). El análisis estadístico, se realizó en forma independiente para cada una de las cepas.

** los valores entre paréntesis indican el número promedio de hongos producidos.

El análisis de varianza de la eficiencia biológica (EB) lograda por las cepas evaluadas, indicó que las variables consideradas fueron significativas. La EB obtenida por las cepas en los sustratos A, B y C, fluctuó de 36.82 a 84.19 % en el A, de 25.43 a 92.68 % en el B, y de 52.46 a 67.43 % en el C. La cepa de *L. boryana* logró su mejor EB en el sustrato A, con 36.82 %, superando los valores reportados por Gutiérrez-Lecuona y Salmones (1996) en viruta de *Carpinus* (7-24 %) y en bagazo de caña (6-15 %), aunque

en este último sustrato, en este estudio, no hubo fructificación (Tabla 20). También fue superior al 22.6 % citado por Mata y Guzmán (1993) en la viruta mencionada, pero suplementada con cascarilla de arroz y mijo, a pesar de que en este trabajo se empleó el sustrato degradado mezclado con bagazo como únicos componentes.

Cabe mencionar, que en la comparación de los resultados aquí obtenidos, con los de otros autores, se hace referencia a diferencias en los componentes de los sustratos o cepas, pero existen otros parámetros que no fueron considerados, como la cantidad de sustrato e inóculo, entre otros.

Las cepas de *L. edodes* y *P. pulmonarius* presentaron su mayor EB en el sustrato B, con 80.43 y 92.68 %, respectivamente, sin diferencia estadística entre los sustratos A y B para la cepa IE-115 (Tabla 20). Los valores promedio obtenidos por sustrato para las 3 cepas (promedio/sustrato), indicaron que la EB más alta se presentó en el B, pero no fue estadísticamente diferente al A. Los valores promedio por cepa para los 3 sustratos (promedio/cepa) mostraron que la EB de la cepa IE-115 fue superior y significativamente diferente a las otras (Tabla 20).

La EB más alta de *L. edodes* coincide con el 87.5 % reportado por Mata *et al.* (1990), utilizando como sustrato viruta de *Carpinus* suplementada con cascarilla de arroz y mijo, sólo que en un mes más de producción. También concuerda y/o supera la reportada en trabajos previos (4-124 %), en donde han utilizado virutas como las de *Arce*, *Bursera*, *Quercus* y *Alnus*, todas éstas suplementadas, principalmente con salvado de trigo, arroz y mijo (Diehle y Royse, 1985; Morales y Martínez-Carrera, 1991; Morales *et al.*, 1991; Royse, 1996).

Son pocos los trabajos en los que se han utilizado las maderas de coníferas para el cultivo de shiitake. San Antonio (1981) y Chu-Chou (1984) obtuvieron bajos rendimientos utilizando troncos o bloques de viruta de madera de pino. Auetragul (1984) hizo ver que la viruta de maderas duras y suaves, son adecuadas para el cultivo de shiitake, excepto la viruta de pino. Esta madera es utilizada intacta, mezclada con otras virutas o suplementada con harina y salvado de arroz, trigo y soya, entre otros, alcanzando una EB de 23 a 81 % (Blanco y Herrera, 1996; Dialetachi y Bononi, 1996). Sin embargo estos autores no citan período de producción ni cosechas obtenidas. La EB lograda por *L. edodes* en el substrato C fue inferior a la mencionada por Salmones *et al.* (1997a) (133.4 %) en el mismo substrato y con la misma cepa, esto debido probablemente a diferencias en el método de cultivo y factores medioambientales. La EB mayor de *P. pulmonarius* se obtuvo en los substratos A y B (Tabla 20). Éstas son similares a la EB de 89.4 % lograda en hojas de caña de azúcar con la misma cepa (Mata y Gaitán-Hernández, 1995) y superiores a la EB de 47.3 % en el substrato anterior pero con otras cepas (Singh *et al.*, 1995). La EB de 52.46 % obtenida en bagazo de caña es mayor a la citada en el mismo substrato por Guzmán-Dávalos *et al.* (1987a), Martínez-Carrera (1989), Martínez-Carrera *et al.* (1990) y Ragunathan *et al.* (1996), quienes reportaron una EB que fluctuó de 14 a 51 %.

La tasa de producción (TP) obtenida con las cepas en los substratos probados fue de 0.31 a 1.46 en el substrato A, de 0.16 a 1.51 % en el B, y de 0.65 a 1.49% en el C. De acuerdo al análisis de varianza sólo las cepas fueron significativas, esto es, para todos los tratamientos al menos una de las cepas fue diferente, sin embargo, los substratos y la

interacción entre éstos y las cepas no presentaron significancia (Tabla 21). La TP más alta para la cepa de *L. boryana* fue en el substrato A, con 0.31 %, y la de *L. edodes* y *P. pulmonarius* en el B, con 0.69 y 1.51 %, respectivamente. Los valores promedio obtenidos por substrato para las 3 cepas (promedio/substrato), mostraron que no hubo diferencia estadística en la TP entre los 3 substratos. La TP promedio por cepa para los substratos (promedio/cepa), indicó que la mejor fue la de *P. pulmonarius* y diferente estadísticamente al resto (Tabla 21). La TP obtenida en *L. boryana* y *L. edodes* se pueden considerar aceptables, comparándolas con las citadas por Royse (1989) para shiitake, las que fluctuaron de 0.29 a 0.79 %. La TP lograda en *P. pulmonarius* en los tres substratos fue superior al 0.69 % reportada por Salmones *et al.* (1997b) con la misma especie pero en paja de cebada.

Tabla 20. Eficiencia biológica promedio (%) obtenida por *Lentinula boryana* (IE-93), *L. edodes* (IE-105) y *Pleurotus pulmonarius* (IE-115), en cada uno de los substratos evaluados

substratos*	IE-93	IE-105	IE-115	promedio/substrato
A	36.82 b*	46.29 c	84.19 e	55.76 b
B	25.43 a	80.43 e	92.68 e	66.18 b
C	-	65.42 d	52.46 c	39.96 a
promedio/cepa	20.75 a	64.71 b	76.44 c	

* ver tabla 19.

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cepas en los 3 substratos, así como entre el promedio/substrato y promedio/cepa, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

Tabla 21. Tasa de producción (%) obtenida por *Lentinula boryana* (IE-93), *L. edodes* (IE-105) y *Pleurotus pulmonarius* (IE-115), en cada uno de los substratos evaluados

substratos*	IE-93	IE-105	IE-115	promedio/substrato
A	0.31 a*	0.53 b	1.46 c	0.76 a
B	0.16 a	0.69 b	1.51 c	0.78 a
C	-	0.65 b	1.49 c	0.71 a
promedio/cepa	0.15 a	0.62 b	1.48 c	

* ver tabla 19.

* los valores representan el promedio de 8 réplicas. Valores que no comparten una misma letra para las cepas en los 3 substratos, así como entre el promedio/substrato y promedio/cepa, indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$ %).

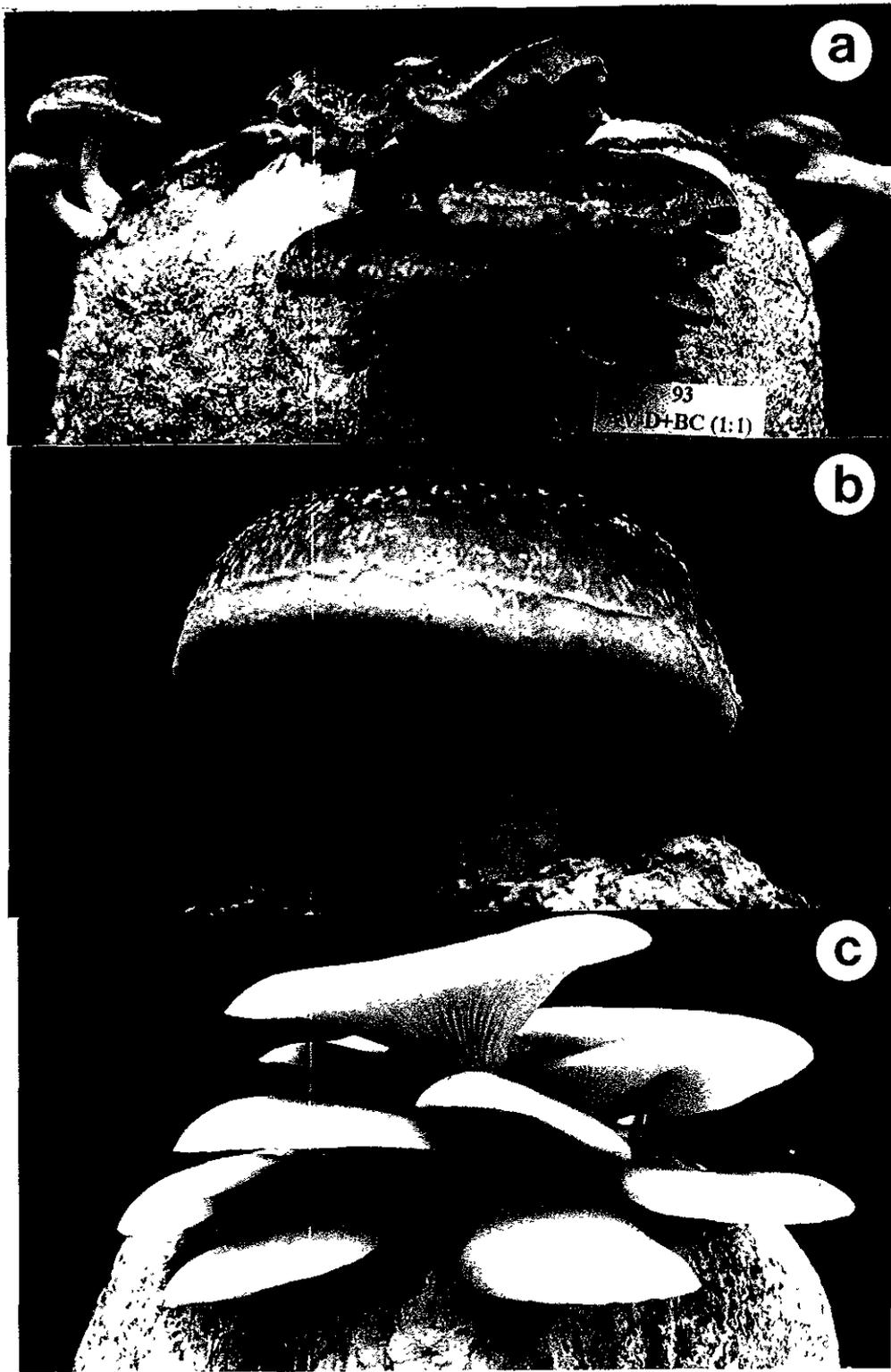


Fig. 9. Producción de hongos del G1 y G2 de *L. boryana* (a), del G3 de *L. edodes* (b) y del G1 y G2 de *P. pulmonarius* (c) en los substratos biodegradados mezclados con bagazo de caña, que presentaron la eficiencia biológica más alta.

CONCLUSIONES

El crecimiento micelial de las cruzas de *Neolentinus suffrutescens* fue mayor en los substratos de pino evaluados que en el medio de cultivo. Lo anterior está justificado por el hecho de que el primero es el substrato natural en el que este hongo crece. Sin embargo, la textura y el desarrollo de agregaciones hifales fue notable en el agar.

El crecimiento micelial de las cepas no estuvo relacionado con la productividad de las mismas. Una cepa de rápido crecimiento, no siempre será la más productiva.

Los resultados de la producción de cuerpos fructíferos por las cruzas de *N. suffrutescens* fueron satisfactorios, si se considera que la eficiencia biológica y la tasa de producción de algunas de las cruzas fueron superiores a las de la cepa parental. La TP refleja, más que otro valor, el comportamiento real de las cepas, dado que está en estrecha relación a la EB; y de acuerdo a los resultados de TP obtenidos, se determinó que los procesos de manipulación y selección repercutieron en la obtención de cepas más productivas que la cepa de la cual se originaron.

El substrato de madera de pino degradado por *N. suffrutescens* no es adecuado para el crecimiento y fructificación de las especies de *Lentinula* y *Pleurotus*. Puede ser utilizado principalmente para el cultivo de *Pleurotus*, si se neutraliza su pH. También puede ser empleado mezclándolo con otros substratos, como el bagazo de caña aquí probado.

Los resultados de la evaluación de *Lentinula* y *Pleurotus* son satisfactorios. Se logró obtener cuerpos fructíferos sobre un substrato en el que normalmente no se

desarrollan, lo cual se favoreció por el complemento con bagazo de caña. Algunos de los resultados fueron superiores a los previamente citados en los que se han empleado substratos generalmente enriquecidos.

Los datos de crecimiento micelial de *L. boryana* y *L. edodes* en los substratos II y V intactos, superiores a las mezclas y bagazo de caña, revelan la posibilidad de utilizar estos substratos en pruebas de cultivo de las citadas especies a nivel planta piloto.

Es factible llevar a cabo un cultivo seriado de *Neolentinus* y *Pleurotus*, utilizando como substratos los residuos de la madera de pino y el bagazo de caña de azúcar. Por una parte se obtiene proteína comestible (hongos) y, por otra, se le da un uso a los residuos mencionados dado que éstos son generalmente subutilizados.

LITERATURA CITADA

- Auetragul, A. 1984. The highest aspects for cultivating oak mushroom (*Lentinus edodes*) in plastic bags. *Mush. Newsletters for the Tropics* 5: 11-15.
- Badcock, E.C., 1939. Preliminary account of the odour of wood-destroying fungi in culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 23: 188-198.
- Bandala, V.M., G. Guzmán y L. Montoya, 1988. Especies de macromicetos citadas de México, VII. Agaricales, parte II (1972-1987). *Rev. Mex. Mic.* 4: 205-250.
- Birkinshaw, J.H. y W.P.K. Findlay, 1940. Biochemistry of the wood-rotting fungi. Metabolic products of *Lentinus lepideus* Fr. *Biochemical J.* 34: 82-88.
- Bisara, R., M. Madan y V.S. Bisaria, 1987. Mineral content of the mushroom *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-residues. *Mush. J. Tropics* 7: 53-60.
- Blanchette, R.A., 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 381-398.
- Blanco, N. y S. Herrera, 1996. Contribución al estudio del cultivo de *Lentinula edodes* en Cuba. *II Congreso Latinoamericano de Micología* (Resúmenes). La Habana.
- Boidin, J., 1986. Intercompatibility and the species concept in the saprobic basidiomycotina. *Mycotaxon* 26: 319-336.
- Boidin, J. y P. Lanquetin, 1984. Répertoire des données utiles pour effectuer les tests d'intercompatibilité chez les basidiomycetes. *Crypt. Mycol.* 5: 33-45.
- Bresinsky, A., M. Fischer, B. Meixner y W. Paulus, 1987. Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia* 79: 234-245.
- Buchanan, P.K., 1993. Identification, names and nomenclature of common edible mushrooms. In: Chang, S.T. y S.W. Chiu (eds.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Buller, A.H.R., 1909. The destruction of wood by fungi. *Sci. Prog.* 11: 1-18.
- Cailleux, R. y P. Joly. 1993. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.)Kummer et *P. pulmonarius* (Fr.)Quél.: Études préliminaires. *Bull. Soc. Mycol. France* 109: 27-41.

- Cartwright, K.G., 1938. The relation between field and laboratory work in mycology. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 22: 222-238.
- Chang, S.T., 1996. Mushroom research and development -equality and mutual benefit. In: Royse, D.J. (ed.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Penn State University, University Park, PA.
- Chang, S.T. y P.G. Miles., 1987. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. *Mush. J. Tropics* 7: 31-37.
- Chang, S.T. y P.G. Miles, 1989. *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press, Boca Raton.
- Chang, S.T. y P.G. Miles, 1993. Mushrooms: trends in production and technological development. *Genetic Engineering and Bio-technology Monitor* 41-42: 72-84.
- Chu-Chou, M. 1984. Cultivating edible forest mushrooms. *Mush. Newsletter for the Tropics* 5: 8-11.
- Clark, J.E. y E.C. Setliff, 1985. *Culture Collection of wood-inhabiting Fungi*. Forintek Canada Corp, Vancouver.
- Connolly, J.H. y J. Jellison, 1995. Calcium translocation, calcium oxalate accumulation, and hyphal sheath morphology in the white-rot fungus *Resinicium bicolor*. *Can. J. Bot.* 73: 927-936.
- Cooke, W.B., 1955. Fungi of Mount Shasta. In. *Syd. Ann. Mycol.* Editi in notitiam scientiae mycologicae universalis 9: 1-6.
- Cook, R.C. y A.D.M. Rayner, 1984. *Ecology of saprotrophic fungi*. Logman, Londres.
- Corner, E.J.H., 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus*. Cramer, Vaduz.
- De León Chocooj, R., C. Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos y G. Guzmán, 1993. Cultivation of *Pleurotus* on water hyacinth and determination of the heavy metals in Mexico. *Mush. Res.* 2: 37-40.
- Dialetachi, L.L.G. y V.L.R. Bononi, 1996. Utilizacao de substratos a base de serragem para o cultivo de *Lentinula edodes*. II Congreso Latinoamericano de Micología (Resúmenes). La Habana.

- Dickinson, D.J., 1982. The decay of commercial timbers. *In*. Frankland, J.C., J.N. Hedger y M.S. Swift (eds.), *Decomposer basidiomycetes: their biology and ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Diehle, D.A. y D.J. Royse, 1985. Shiitake cultivation on sawdust: evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. *Micologia* 78: 929-933.
- Dix, N.J. y J. Webster, 1995. *Fungal ecology*. Chapman & Hall, Londres.
- Donoghue, J.D. y W.C. Denison, 1996. Commercial production of shiitake (*Lentinula edodes*) using whole-log chip of *Quercus*, *Lithocarpus* and *Acer*. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Duncan, C.G. y M. H. Galbraith, 1972. Post-meiotic events in the homobasidiomycetidae. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58: 387-392.
- Duncan, C.G. y F.F. Lombard, 1965. *Fungi Associated with Principal Decays in Wood Products in the United States*. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Dutton, M.V., C.S. Evans, P.T. Atkey y D.A. Wood, 1993. Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 5-10.
- Eger, G., 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. *In*: Chang, S.T. y W.A. Hayes (eds.), *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press, Nueva York.
- Eger, G., S. F. Li y H. Leal-Lara, 1979. Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia* 71: 577-588.
- Eguiluz, T.P., 1977. *Los pinos del mundo*. Departamento de enseñanza. Investigación y servicio en bosques. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo.
- Espejo, E. y E. Agosin, 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1980-1986.
- Eugenio C.P. y N.A. Anderson, 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634.
- Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris y A.Y. Rossman, 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press, St. Paul.
- Fox, H.M., J. Burden, S.T. Chang y J.F. Peberdy, 1994. Mating-type incompatibility between commercial strains of *Lentinula edodes*. *Exp. Mycol.* 18: 95-102.

- Gaitán-Hernández, R., G. Mata y G. Guzmán, 1993. Cultivation of *Lentinus lepideus* in Mexico - production of fruiting bodies on coniferous wood shavings. *Mush. Res.* 2: 79-82.
- Gaitán-Hernández, R., G. Mata y G. Guzmán, 1995. Behavior of a Mexican strain of *Lentinus lepideus* on three solid media. *Rev. Mex. Mic.* 11: 23-27.
- Gilbertson, R.L., 1981. North American wood-rotting fungi that cause brown rots. *Mycotaxon* 12: 372-416.
- Ginns J.H., 1974. Secondarily homothallic hymenomycetes: several examples of bipolarity are reinterpreted as being tetrapolar. *Can. J. Bot.* 52: 2097-2110.
- Gispert, M., O. Nava y J. Cifuentes, 1984. Estudio comparativo del saber tradicional de los hongos en dos comunidades de la Sierra del Ajusco. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 253-264.
- González, T.B., M.S. Domínguez-Rosales y S.A. Bautista-Baltazar, 1993. Cultivo del hongo comestible *Plerotus ostreatus* var. *florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. *Rev. Mex. Mic.* 9: 13-18.
- Gómez-Nava, M.S., R. Echenique-Manrique y R. Salinas-Quinard, 1969. Índices de laboratorio sobre resistencia de la madera a la pudrición de once especies forestales mexicanas. *Bol. Téc. Inst. Nac. Invest. For.* 31. México, D.F.
- Goodell, B., J. Jellison, J. Liu, G. Daniel, A. Paszczyński, F. Fekete, S. Krishnamurthy, L. Jun y G. Xu., 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.* 53: 133-162.
- Gutiérrez-Lecuona, M.T. y D. Salmones, 1996. Obtención de cepas de *Lentinus boryanus* y selección de sustratos para el desarrollo de sus fructificaciones. *II Congreso Latinoamericano de Micología (Resúmenes)*. La Habana.
- Guzmán, G., 1977. *Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera*. Limusa, México, D.F.
- Guzmán, G., 1984. El uso de los hongos en Mesoamérica. *Ciencia y Desarrollo* 59: 17-27.
- Guzmán, G., 1996. Observations on some fungi from Louisiana and Mississippi in comparison with those of Mexico. *Tulane Studies in Zoology and Botany* 30: 69-74.

- Guzmán, G., 1997. *Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina*. CONABIO e Instituto de Ecología, Xalapa.
- Guzmán G., 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384.
- Guzmán, G., G. Mata y D. Salmones, 1994. Cultivo de los hongos comestibles, su biotecnología y proyección en México. *In: Olgún, E., C. Peña, E. Hernández y R. Camacho (eds.), Tecnologías ambientales para el desarrollo sustentable*. Instituto de Ecología A.C., Xalapa.
- Guzmán, G., D. Salmones y F. Tapia, 1997. *Lentinula boryana*: morphological variations, taxonomic position, distribution and relationships with *Lentinula edodes* and related species. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 35: 1-28.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco y L. Guzmán-Dávalos, 1993. *El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales*. I.P.N. México, D.F.
- Guzmán-Dávalos, L., C. Soto y D. Martínez-Carrera, 1987a. El bagazo de caña de azúcar como substrato para la producción de *Pleurotus* en Jalisco. *Rev. Mex. Mic.* 3: 79-82.
- Guzmán-Dávalos, L., D. Martínez-Carrera, P. Morales y C. Soto, 1987b. El cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*) sobre el bagazo del maguey en la industria tequilera. *Rev. Mex. Mic.* 3: 47-49.
- Hadar, Y., Z. Kerem y B. Gorodecki, 1993. Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus*. *J. Biotechnol.* 30: 133-139.
- Han, Y.H., W.T. Ueng, L.C. Chen y S. Cheng, 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.)Sing. *Mush. Sci.* 11: 623-658.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kirk, B.C. Sutton y D.N. Pegler, 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8a. ed., International Mycological Institute, Surrey.
- Hayes, W.A., 1978. Biological Nature. *In: Chang, S.T. y W.A. Hayes (eds.), The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, Nueva York.
- Herrera, T. y G. Guzmán, 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 32: 33-135.

- Herrera, T. y M. Ulloa, 1990. *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Hibbett, D.S., 1992. Towards a Phylogenetic Classification for Shiitake: Taxonomic history and molecular perspectives. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 30: 30-42.
- Hibbett, D.S. y R. Vilgalys, 1991. Evolutionary relationships of *Lentinus* to the polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83: 425-439.
- Hibbett, D.S. y R. Vilgalys, 1993. Phylogenetic relationships of *Lentinus* (Basidiomycotina) inferred from molecular and morphological characters. *Syst. Bot.* 18: 409-433.
- Hibbett, D.S., S. Murakami y A. Tsuneda, 1994. Postmeiotic nuclear behavior in *Lentinus*, *Panus* and *Neolentinus*. *Mycologia* 86: 725-732.
- Higuchi, T., 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- Iracabal, B., G. Zervakis y J. Labarere, 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141: 1479-1490.
- Jakucs E. y J. Vetter, 1992. Comparative studies on the lignocellulose degrading ability of various fungus species. *Int. J. Mycol. Lichenol.* 5: 217-235.
- Jennison, M.W., M.D. Newcomb y R. Henderson, 1955. Physiology of the wood-rotting basidiomycetes. I. Growth and nutrition in submerged culture in synthetic media. *Mycologia* 47: 275-304.
- Kalberer, P.P., 1974. The cultivation of *Pleurotus ostreatus*: experiments to elucidate the influence of different culture conditions on the crop yield. *Mush. Sci.* 9: 653-661.
- Kemp, R.F.O., 1980. Bifactorial incompatibility without clamp connexions in the *Coprinus patouillardii* group. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74: 355-360.
- Kirk, T.K. y T.L.I. Highley, 1973. Quantitative changes in structural componets of conifer woods during decay by white- and brown-rot fungi. *Phytopathology* 63: 1338-1342.
- Kollmann, F., 1959. *Tecnología de la madera y sus aplicaciones. Tomo 1*. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y Servicio de la Madera, Madrid.

- Kozak, M.E. y J. Krawczyk, 1993. *Growing shiitake mushroom in a continental climate*. Field & Forest Products, Inc., Marinette.
- Kühner, B.Y.R., 1977. Variation of nuclear behaviour in the homobasidiomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 68: 1-16.
- Kühner, B.Y.R., 1980. Les hyménomycètes agaricoides. Étude générale et classifications. *Bull. Soc. Linn. Lyon. Numéro spécial*.
- Lamoure, D., 1989. Répertoire des données utiles pour effectuer les tests d'intercompatibilité chez les Basidiomycètes. V.-Agaricales sensu lato. *Crypt. Mycol.* 10: 41-80.
- Leatham, G.F., 1982. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom on logs: a potential industry for the United States. *Forest Products J.* 32: 29-35.
- Leatham, G.F., 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 51-58.
- Li, G.S.F., 1984. A chamber fruiting of *Volvariella volvacea* in laboratories. *Mush. Newsletter for the Tropics* 4: 11-14.
- Lu, S., T.G. Leonard, S. Dick y G.F. Leatham, 1988. A new strategy for genetic improvement of edible fungi through enhancement of their lignocellulose degrading and fruiting abilities. *Micol. Neotrop. Apl.* 1: 5-19.
- Mapes, C., G. Guzmán y J. Caballero, 1981. *Etnomicología purépecha. El conocimiento y uso de los hongos en la cuenca de Pátzcuaro, Michoacán*. Etnomicología 2, Dir. Gral. Culturas Populares (SEP), Soc. Mex. Mic. y UNAM, México, D.F.
- Martínez-Carrera, D., 1987. Design of a mushroom farm for growing *Pleurotus* on coffee pulp. *Mush. J. Tropics* 7: 13-23.
- Martínez-Carrera, D., 1989. Past and future of edible mushroom cultivation in tropical America. *Mush. Sci.* 12: 795-805.
- Martínez-Carrera, D. y A. Larqué-Saavedra, 1990. Biotecnología en la producción de hongos comestibles. *Ciencia y Desarrollo* 16: 53-64.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales y M. Sobal, 1990. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada. *Micol. Neotrop. Apl.* 3: 49-52.

- Martínez, D., M. Quirarte, C. Soto, D. Salmones y G. Guzmán, 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 207-219.
- Mata, G., 1990. Cultivo del hongo comestible *Lentinus boryanus* en el laboratorio y su comparación con el shiitake japonés *Lentinus edodes*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. Tesis de Maestría.
- Mata, G., 1992. The optimum percentage of water content in the mycelial growth of *Lentinus boryanus* (fungi, Basidiomycotina) in five different woods. *Crypt. Bot.* 2: 387-390.
- Mata, G. y R. Gaitán-Hernández, 1992. Utilización de pulpa de café mezclada con viruta de madera para el crecimiento micelial de *Lentinus boryanus* y *Lentinus edodes*. *Rev. Mex. Mic.* 8: 125-129.
- Mata, G. y R. Gaitán-Hernández, 1994. Avances en el cultivo del shiitake en pulpa de café. *Rev. Iberoam. Micol.* 11: 90-91.
- Mata, G. y R. Gaitán-Hernández, 1995. Cultivo de *Pleurotus* en hojas de caña de azúcar. *Rev. Mex. Mic.* 11: 17-22.
- Mata, G. y G. Guzmán, 1991. Distribución y datos ecológicos del hongo *Lentinus boryanus* (Agaricales, Tricholomataceae) en México. *Brenesia* 35: 1-8.
- Mata, G. y G. Guzmán, 1993. Cultivation of *Lentinus boryanus* in wood shavings in Mexico. *Crypt. Bot.* 4: 47-49.
- Mata, G. y D. Martínez-Carrera, 1988. Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México. *Rev. Mex. Mic.* 4: 287-296.
- Mata, G., D. Salmones y G. Guzmán, 1990. Cultivo del shiitake japonés, *Lentinus edodes*, en bolsas con viruta de madera. *Rev. Mex. Mic.* 6: 245-251.
- Mata, G., J.M. Savoie y P. Delpech, 1997. Variability in laccase production by micelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in the presence of soluble lignin derivatives in solid media. *Material und Organismen* 31: 109-122.
- May, T.W. y A.E. Wood, 1995. Nomenclatural notes on Australian macrofungi. *Mycotaxon* 54: 147-150.

- Miles, P.G., 1993. Biological background for mushroom breeding. *In: Chang, S.T., J.A. Buswell y P.G. Miles (eds.), Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.* Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- Miles, P.G. 1996. Genetics and breeding of mushroom-from Bensaude and Kniep to molecular genetics. *In: D.J. Royse (ed.), Mushroom Biology and Mushroom Products.* Penn State University. University Park, PA.
- Miles, P.G., 1997. Mushroom biology-opportunities for synergism of applied and basic research. *Micol. Neotrop. Apl. 10:* 3-13.
- Miles, P.G. y S.T. Chang, 1986. Application of biotechnology in strain selection and development of edible mushrooms. *Asean Food J. 2:* 4-10.
- Molina, F.I., P. Shen, S.C. Jong y K. Orikono, 1992. Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentinus* and related genera. *Can. J. Bot. 70:* 2446-2452.
- Montgomery, R.A.P., 1982. The role of polysaccharidase enzymes in the decay of wood by basidiomycetes. *In: Frankland, J.C., J.N. Hedger y M.J. Swift (eds.), Decomposer Basidiomycetes: Their Biology and Ecology.* Cambridge University Press.
- Morales, P. y D. Martínez-Carrera, 1991. *Bursera* sawdust as a substrate for shiitake cultivation. *Micol. Neotrop. Apl. 4:* 41-47.
- Morales, P. y D. Martínez-Carrera y W. Martínez-Sánchez, 1991. Cultivo de shiitake sobre diversos substratos en México. *Micol. Neotrop. Apl. 4:* 75-81.
- Mueller, J.C., J.R. Gawley, H. Lanz y W.A. Hayes, 1985. Mineral and heavy content of *Pleurotus sajor-caju* grown on cellulosic residues from a bleached kraft pulp mill. *Mush. Newsletter for the Tropics 5:* 9-16.
- Nobles, M.K., 1948. Studies in forest pathology. VI Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. of Res. 6:* 281-431.
- Nobles, M.K., 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot. 43:* 1097-1139.
- Ohga, S., V.F. Rozendael, M. Aspinwall y M. Miwa, 1992. Yield and size response of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*, depending on incubation time on sawdust-based culture. *Trans. Mycol. Soc. Japan 33:* 349-357.

- Otha, A., M. Shimada, T. Hattori, T. Higuchi y M. Takahashi, 1990a. Production of secondary metabolites including a new metabolite *p*-methoxyphenylpropanol by the brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 36: 225-231.
- Otha, A., M. Shimada, T. Higuchi y M. Takahashi, 1990b. Effects of carbon and nitrogen nutrients on production of secondary metabolites by a brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 36: 565-572.
- Pegler, D.N., 1983. *The Genus Lentinus. A World Monograph*. Kew Bull., Addit. Ser. X, ed. Her Majesty's Stationary Office, Londres.
- Pegler, D.N. y T.W.K. Young, 1983. Anatomy of the *Lentinus* hymenophore. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80: 469-482.
- Petersen, R.H. y K.W. Hughes, 1993. Intercontinental interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and other species. *Sydowia* 45: 139-152.
- Przybylowicz, P. y J. Donoghue, 1990. *Shiitake Growers Handbook. The Art and Science of Mushroom Cultivation*. Kendall/Hunt, Dubuque.
- Ragunathan, R., R. Gurusamy, M. Palaniswamy y K. Swaminathan, 1996. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. *Food Chem.* 2: 139-144.
- Redhead, S.A. y J. H. Ginns, 1985. A reappraisal of agaric genera associated with brown rots of wood. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 26: 349-381.
- Reid, I.D., 1989. Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 786-803.
- Romeu, E., 1995. Los pinos mexicanos, récord mundial de biodiversidad. *Biodiversitas* 2: 11-15.
- Royse, D.J., 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of shiitake mushroom. *Mycologia* 77: 756-762.
- Royse, D.J., 1989. Factors influencing the production rate of shiitake. *Mush. J. for the Tropics* 9: 127-138.
- Royse, D.J., 1996. Yield stimulation of shiitake by millet supplementation of wood chip substrate. In: Royse, D.J. (ed.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Penn State University. University Park, PA.

- Rune, F., 1994. *Neolentinus*-a well founded genus in Pleurotaceae that includes *Heliocybe*. *Mycol. Res.* 98: 542-544.
- Rzendowski, J., 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México, D.F.
- SAGAR, 1998. Fideicomiso para el mercado de azúcar, México, D.F.
- Salmones, D. y G. Guzmán, 1994. Cámara para la obtención de fructificaciones del hongo comestible *Volvariella volvacea* en el laboratorio. *Rev. Mex. Mic.* 10: 193-198.
- Salmones, D., R. Gaitán-Hernández, V. Álvarez y R. Pérez-Merlo, 1997a. Cultivo de shiitake en bagazo de caña de azúcar. *VI Congreso Nacional de Micología (Resúmenes)*. Tapachula.
- Salmones, D., R. Gaitán-Hernández, R. Pérez y G. Guzmán, 1997b. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 173-176.
- San Antonio, J.P., 1981. Cultivation of the shiitake mushroom. *HortScience* 16: 151-156.
- Scheffer, T.C. y E.B. Cowling, 1966. Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4: 147-170.
- SEMARNAP, 1998. Gobierno de México. México, D.F.
- Singh, A.K., S.K. Awasthi y B. Rai, 1995. Utilization of sugarcane trash (dried leaves) for production of oyster mushroom, *Pleurotus florida*. *Mush. Res.* 4: 35-38.
- Singer, R., 1949. The Agaricales (mushrooms) in modern taxonomy. *Lilloa* 22: 5-832.
- Singer, R., 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy*, 4a. ed., Koeltz Sc. Books, Koenigstein.
- Singer, R. y B. Harris, 1987. *Mushrooms and truffles*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smith, A.H., 1949. *Mushrooms in Their Natural Habitats*. Afner Press, Nueva York.
- Snell, W.H., 1922. Studies of certain fungi of economic importance in the decay of building timbers, with special reference to the factors which favor their development and dissemination. *Bull. U.S. Dept. Agric.* 1053: 1-47.
- Snell, W.H., 1923. Occurrence and identity of cotton mill fungi. *Mycologia* 15: 153-165.

- Sobal, M., P. Morales y D. Martínez-Carrera, 1989. Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 19-39.
- Sobata, C. y H. Nall, 1994. *Shiitake Mushroom Production on Logs*. Alabama Cooperative Extension Program. Alabama.
- Soto-Velazco, C., S. Fausto y L. Guzmán-Dávalos, 1995. Cultivation of the mushrooms *Lentinus boryanus* and *L. edodes* on a mixture of maguey tequilero bagasse and sugarcane bagasse. *Afr. J. Mycol. Biotechnol.* 3: 115-120.
- Stalpers, J.A., 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol.* 16: 1-248.
- Suominen, J., 1973. On the occurrence of the fungus *Lentinus lepideus* Fr. on railway sleepers in Finland. *Karstenia* 13: 40-43.
- Tokimoto, K. y M. Komatsu, 1978. Biological nature of *Lentinus edodes*. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes (eds.), *The Myology and Cultivation of Edible Mushroom*. Academic Press, Nueva York.
- Tour, U., K. Winterhalter y A. Fiechter, 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17.
- Ulloa, M., 1991. *Diccionario Ilustrado de Micología*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Vilgalys, R., 1997. Biodiversity of the oyster mushroom *Pleurotus*. *Mushroomnews* 32-35.
- Vilgalys, R., A. Smith, B.L. Sun y O.K. Miller, 1993. Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Can. J. Bot.* 71: 113-128.
- Villarreal, L. y J. Pérez-Moreno, 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 77-114.
- Webster, J., 1991. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press.
- Weir, J.R., 1918. Notes on the altitudinal range of forest fungi. *Mycologia* 10: 4-14.
- Whitney, K.D. y H.J. Arnott, 1986a. Morphology and development of calcium oxalate deposits in *Gilbertella persicaria* (Mucorales). *Mycologia* 78: 42-51.

- Whitney, K.D. y H.J. Arnott, 1986b. Calcium oxalate crystals and basidiocarp dehiscence in *Geastrum saccatum* (Gasteromycetes). *Mycologia* 78: 649-656.
- Whitney, K.D. y H.J. Arnott, 1987. Calcium oxalate crystals morphology and development in *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 79: 180-187.
- Zadrazil, F., 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes, (eds.), *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press, Nueva York.
- Zelenak, I., 1990. Lignocellulose materials. In: Bodá, K.J. (ed.), *Nonconventional Feedstuffs in the Nutrition of Farm Animals. Development in Animals and Veterinary Sciences*. Bratislava, Checoslovaquia.
- Zeller, S.M., 1929. Contribution to our knowledge of Oregon fungi-III. *Mycologia* 21: 97-111.
- Zervakis, G. y C. Balis, 1996. A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycol. Res.* 100: 717-731.