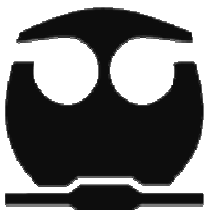


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de diferentes sustratos
sobre la producción de *Lentinula
edodes***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ERIKA GABRIELA SÁNCHEZ MARÍN



México, DF. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Hermilo Leal Lara
Vocal	Prof. Maricarmen Quirasco Baruch
Secretario	Prof. Rebeca Ramírez Carrillo
1 ^{er} suplente	Prof. Jorge Arturo Aburto Anell
2 ^{do} suplente	Prof. Sandra Paola Sánchez Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E", Laboratorio 324, UNAM.

Asesor del tema:

Sustentante:

M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo

Erika Gabriela Sánchez Marín

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por abrirme sus puertas.

A la Facultad de Química por todo lo que aprendí.

A Rebeca por asesorarme y escucharme durante todo este proceso de cambio.

A Fernando, Martha, Juan Fer, Edgar, Abuelos y toda la familia por estar siempre conmigo, por todo el apoyo y cariño brindado.

A los amigos y amigas muchas gracias por toda su alegría compartida.

Adán por todo lo que me has dado.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1 HONGOS.....	15
3.2 EL HONGO SHIITAKE.....	15
3.2.1 PROPIEDADES NUTRICIONALES.....	15
3.2.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ACTIVOS AISLADOS DE SHIITAKE.....	17
3.2.3 CICLO DE VIDA.....	18
3.2.4 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE <i>L. EDODES</i>	20
3.2.5 CULTIVO DE SHIITAKE.....	21
3.2.5.1 CULTIVO EN TRONCOS.....	21
3.2.5.2 CULTIVO EN SUSTRATOS SINTÉTICOS ESTÉRILES.....	22
3.2.5.2.1 FORMULACIÓN DEL SUSTRATO.....	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	26
5. OBJETIVOS.....	27
5.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	27
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
6. HIPÓTESIS.....	27
7. METODOLOGÍA.....	28
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
7.2 PREPARACIÓN DE AGAR EXTRACTO DE MALTA (AEM).....	28
7.3 PROPAGACIÓN VEGETATIVA DEL MICELIO.....	28
7.4 PRODUCCIÓN DEL INÓCULO DE GRANO.....	29
7.5 DETERMINACIÓN Y AJUSTE DE HUMEDAD.....	30
7.6 MATERIALES EMPLEADOS.....	30
7.7 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.....	31
7.7 INOCULACIÓN DE SUSTRATOS E INVASIÓN MICELIAL.....	32
7.8 FRUCTIFICACIÓN.....	32
7.9 COSECHA.....	33
7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.....	34
7.10.1 DETERMINACIÓN DE LA SEMANA CON RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO (RMS).....	34
7.10.2 ANÁLISIS DE LOS RMS OBTENIDOS PARA CADA SUSTRATO Y CEPA (PRIMERO Y SEGUNDO EXPERIMENTO).....	34
7.10.3 ANÁLISIS DEL RMS DE TODOS LOS SUSTRATOS PARA CADA CEPA.....	34
8. RESULTADOS.....	35
8.1 PRIMER EXPERIMENTO.....	35
8.2 SEGUNDO EXPERIMENTO.....	39
8.3 RESULTADOS DE LA CEPA L5 EN TODOS LOS SUSTRATOS.....	44
8.4 RESULTADOS DE LA CEPA L9 EN TODOS LOS SUSTRATOS.....	45

8.5 RESUMEN DE RESULTADOS.....	46
8.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS POR COMPONENTE DEL SUSTRATO.....	48
8.6.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CASCARILLA DE ALGODÓN.....	48
8.6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ASERRÍN.....	49
8.6.3 EFECTO DEL USO DE COMPLEMENTOS.....	50
9. DISCUSIÓN.....	52
ANEXO I: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR LA SEMANA DONDE SE ALCANZÓ EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO, PARA LAS CEPAS L5 Y L9 EN LOS 9 SUSTRATOS EVALUADOS	56
ANEXO II: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LAS CEPAS L5 Y L9.....	73
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO EN EL PRIMER EXPERIMENTO.....	73
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO.....	74
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LAS CEPAS L5 Y L9 POR SEPARADO EN LOS DOS EXPERIMENTOS.....	75
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LA CEPA L5 EN LOS SUSTRATOS DE LOS DOS EXPERIMENTOS.....	75
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LA CEPA L9 EN LOS SUSTRATOS DE LOS DOS EXPERIMENTOS.....	77
11. BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Ciclo de vida de <i>Lentinula edodes</i> (Chen, 2005).	20
Ilustración 2: Caja Petri con crecimiento micelial.	29
Ilustración 3: Grano de trigo invadido por micelio.	30
Ilustración 4: Sustrato completamente invadido por el micelio de shiitake	32
Ilustración 5: Cuerpos fructíferos en condiciones óptimas para su cosecha.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Eficiencia biológica acumulada de diferentes cepas de <i>Lentinula edodes</i> durante tres cosechas (Ramírez Carrillo & Leal Lara, 2002).	13
Tabla 2: Composición de los sustratos óptimos para las cepas L5 y L9 de <i>L. edodes</i> (Mireles Palomares y López García, 2005).	13
Tabla 3: Efecto del tiempo de incubación y del uso de las cepas de <i>L. edodes</i> (L5 y L9) con y sin resiembras sucesivas sobre la eficiencia biológica (Ayala Piña, 2008).	14
Tabla 4: Composición de shiitake seco y fresco cultivado en diferentes sustratos y comparado con otros alimentos.	16
Tabla 5: Contenido de vitaminas y minerales en shiitake seco y fresco cultivado en diferentes sustratos en comparación con otros alimentos.	16
Tabla 6: Producción mundial de <i>Lentinula edodes</i> en varios años (Chang, 2002).	20
Tabla 7: Producción y uso de subproductos y desechos alimenticios (Deposito de documentos de la FAO).	24
Tabla 8: Composición porcentual promedio de los principales desechos agropecuarios (Deposito de documentos de la FAO).	24
Tabla 9: Composición porcentual de los 9 sustratos evaluados para el cultivo de las cepas L5 y L9 de <i>Lentinula edodes</i> .	31
Tabla 10: Composición porcentual de los sustratos evaluados en el primer experimento para el cultivo de dos cepas de <i>L. edodes</i> (L5 y L9).	36
Tabla 11: Eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en el primer experimento.	37
Tabla 12: Eficiencia biológica semanal acumulada de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluado en el primer experimento	38
Tabla 13: Resultados del análisis estadístico para las variables cepas y sustratos evaluadas en el primer experimento	39
Tabla 14: Composición porcentual de los sustratos evaluados en el primer y segundo experimento para el cultivo de dos cepas de <i>L. edodes</i> (L5 y L9) y observaciones experimentales para los dos experimentos.	41
Tabla 15: Eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en el segundo experimento.	42
Tabla 16: Eficiencia biológica semanal acumulada de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluado en el segundo experimento.	43
Tabla 17: Resultados del análisis estadístico para la interacción de las variables sustratos x cepas evaluadas en el segundo experimento.	44
Tabla 18: Clasificación de los 9 sustratos evaluados en los dos experimentos para la cepa L5 de acuerdo a la Prueba de Duncan.	45
Tabla 19: Clasificación de los 9 sustratos evaluados en los dos experimentos para la cepa L9 de acuerdo a la Prueba de Duncan.	45
Tabla 20: Composición porcentual de los sustratos empleados en el cultivo de las dos cepas de <i>L. edodes</i> (L5 y L9) y eficiencia biológica obtenida al rendimiento máximo significativo para cada sustrato y cepa.	47

Tabla 21: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5 en el sustrato 2.	56
Tabla 22: Prueba Duncan para la cepa L5, sustrato 2.	57
Tabla 23: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 2.	58
Tabla 24: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 2	58
Tabla 25: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 3.	59
Tabla 26: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 3.	60
Tabla 27: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 3.	60
Tabla 28: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 4.	61
Tabla 29: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 4.	61
Tabla 30: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 4.	62
Tabla 31: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 4	62
Tabla 32: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 5.	63
Tabla 33: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 5.	63
Tabla 34: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 5.	64
Tabla 35: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 5.	64
Tabla 36: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 6.	65
Tabla 37: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 6.	65
Tabla 38: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 6.	66
Tabla 39: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 6.	66
Tabla 40: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 7.	67
Tabla 41: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 7.	67
Tabla 42: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 7.	68
Tabla 43: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 7.	68
Tabla 44: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 8.	69
Tabla 45: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 8.	69
Tabla 46: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 8.	70
Tabla 47: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 8.	70
Tabla 48: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 9.	71

Tabla 49: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 9.	71
Tabla 50: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 9.	72
Tabla 51: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 9.	72
Tabla 52: Análisis de varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica acumulada de las cepas L5 y L9 en los cuatro sustratos evaluados en el primer experimento.	73
Tabla 53: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para cada cepa en los cuatro sustratos evaluados en el primer experimento.	73
Tabla 54: Análisis de varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en segundo experimento.	74
Tabla 55: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para cada cepa en los cuatro sustratos evaluados en el segundo experimento.	74
Tabla 56: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de las cepas L5 y L9 en los sustratos de los dos experimentos.	75
Tabla 57: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de la cepa L5 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.	76
Tabla 58: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para la cepa L5 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.	76
Tabla 59: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de la cepa L9 en los sustratos de los dos experimentos.	77
Tabla 60: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para la cepa L9 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.	77

1. RESUMEN.

Lentinula edodes, mejor conocido como shiitake es un hongo muy apreciado por su sabor, valor nutricional y propiedades medicinales. El cultivo de este hongo ha ido aumentando en la medida en que avanza la aplicación de nuevas tecnologías para su cultivo. Así pasó del cultivo tradicional en troncos de árboles de maderas duras al cultivo en sustratos sintéticos estériles, lo que ha permitido un aumento considerable en la eficiencia biológica (EB).

En este trabajo, así como en investigaciones previas se establece la estrecha relación que existe entre la formulación del sustrato y la EB de shiitake. Se evaluó el efecto de la composición de 9 diferentes sustratos sobre la EB de dos cepas de *L. edodes* (L5 y L9). Para ello se realizaron 2 experimentos, en el primer experimento se evaluaron 5 sustratos y 4 en el segundo experimento. Los componentes principales del sustrato fueron: cascarilla de algodón (26 – 80%) y aserrín de encino (20 – 60%). Además se evaluó el efecto de la adición de suplementos como: mijo, salvado de trigo, sorgo molido, sulfato de amonio, ácido cítrico, benlate, CaCO_3 y CaSO_4 . Para cada sustrato y cepa se realizaron 10 replicas bajo condiciones de esterilidad. Una vez inoculados los sustratos se incubaron por 10 semanas y al terminar el período de incubación se indujo la fructificación (se bajo la temperatura a 15-18°C, promovió una alta humedad relativa con 3 riegos de 20 minutos cada 8 horas y ventilación por medio de inyección de aire fresco 15 minutos después de cada riego por dos horas e iluminación continua).

Para cada bolsa de sustrato se cosecharon diariamente los hongos producidos y pesaron durante 10 semanas de cosecha. Para cada cepa y sustrato se calculó la eficiencia biológica semanal (EBS) y semanal acumulada (EBSA). Con los datos de EBSA se realizó un análisis estadístico para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo para cada cepa en cada sustrato. Por medio de un segundo análisis estadístico se determinó si existía diferencia significativa entre los sustratos evaluados y en caso positivo por medio de la prueba de Duncan se identificaron los sustratos más productivos para cada cepa en cada experimento.

Como resultado se observó que concentraciones de cascarilla de algodón entre 70 y 80% promueven un muy bajo o nulo crecimiento micelial de las cepas de *L. edodes*. Las mayores EB para las dos cepas se obtuvieron en los sustratos con una concentración de cascarilla de algodón entre 36 y 40%, mientras que las concentraciones óptimas de aserrín fueron entre 40 y 50%. Para los complementos se observó que fue necesario adicionar CaCO_3 y CaSO_4 ó sulfato de amonio,

ácido cítrico y benlate para promover mayores EB. Para la cepa L5 fue indistinto el uso de sorgo molido y/o de salvado de trigo, mientras que para la cepa L9 el sorgo molido produjo un descenso significativo en la EB.

Se corroboró que la cepa L9 fue más productiva que la cepa L5. El benlate, sulfato de amonio y ácido cítrico en comparación con CaCO_3 y CaSO_4 pueden ser utilizados en forma indistinta si se considera el nivel de contaminación, pero la ausencia de este tipo de suplementos en el sustrato produjo una disminución considerable en los rendimientos.

2. INTRODUCCIÓN.

Se sabe que el hongo *Lentinula edodes*, mejor conocido como shiitake, es un hongo comestible nativo de Japón, Corea y China. Como este hongo se alimenta de lignina y celulosa ha sido cultivado con técnicas tradicionales por cientos de años en las regiones montañosas de Asia en troncos de árboles de maderas duras (ricos en lignina). El desarrollo de nuevas tecnologías utilizando aserrín como sustrato en bolsas esterilizables ha permitido que el cultivo de shiitake se realice de manera extensiva y más eficiente (Royse, 2001). Al comparar el uso de medios sintéticos con las técnicas tradicionales de cultivo se observan ventajas sustanciales como son: producción continua, mayores rendimientos y disminución del tiempo para completar su ciclo de cultivo (Royse, 2001). Los sustratos sintéticos utilizados en la producción de shiitake por lo general han sido aserrines provenientes de diferentes árboles de maderas duras, o algunos residuos industriales con alto contenido de lignina y celulosa para que provean al hongo de los nutrientes necesarios para su crecimiento micelial y fructificación (Fung & Franco, 2005). La formulación del sustrato, el genotipo de la cepa utilizada y el tiempo de incubación han sido identificadas como variables importantes para su producción a escala comercial. En México se tienen una gran diversidad de cultivos agrícolas, que producen cantidades importantes de subproductos que no tienen aplicación, algunos de éstos se han utilizado como sustrato en el cultivo de hongos del género *Pleurotus* y se han realizado algunos estudios para su uso en el cultivo de otros hongos comestibles, como *Lentinula edodes* (Bernabé-González *et al.*, 2006).

Las cepas evaluadas en este estudio (L5 y L9) ya han sido utilizadas en estudios previos. El reporte de Ramírez Carrillo y Leal Lara (2002) evaluó sus rendimientos bajo condiciones óptimas de crecimiento, con sustratos utilizados a escala comercial para este tipo de hongo. En la Tabla 1 se presentan las eficiencias biológicas reportadas por los autores (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco) para 7 cepas de *L. edodes* (incluidas L5 y L9). Como se observa en la Tabla 1 la cepa L9 fue la más productiva, pero con la desventaja de producir hongos pequeños, mientras que la cepa L5 también fue muy productiva y presentó la ventaja de producir hongos de mayor tamaño. Considerando lo anterior las cepas L5 y L9 fueron utilizadas en investigaciones posteriores. El trabajo de Mireles Palomares y López García (2005) evaluó ocho formulaciones diferentes de sustratos para tratar de identificar el sustrato

óptimo para el cultivo de estas cepas. En la Tabla 2 se presentan los sustratos donde se obtuvieron los mayores rendimientos para cada cepa. En este trabajo los autores observaron que la cepa L9 tuvo una mayor eficiencia biológica en el sustrato donde la cantidad de complementos fue mayor (30% mijo, 15% salvado de trigo, 5% sorgo molido) y la cantidad de aserrín de encino disminuyó a un 50%.

Tabla 1: Eficiencia biológica acumulada de diferentes cepas de *Lentinula edodes* durante tres cosechas (Ramírez Carrillo & Leal Lara, 2002).

Cepas	Eficiencia biológica acumulada (g hongo fresco/100 g de sustratos seco)		
	Cosechas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
L19	4.6 ± 7	17.1 ± 0	24.0 ± 10 a
L18	29.6 ± 23	54.8 ± 25	63.6 ± 17 b
L20	44.8 ± 51	79.2 ± 31	83.5 ± 34 b
L21	53.6 ± 18	70.5 ± 11	78.2 ± 8 b
L5	83.4 ± 7	130.5 ± 5	143.9 ± 11 c
L15	102.5 ± 6	151.2 ± 4	170.1 ± 10 d
L9	138.9 ± 10	176.8 ± 6	261.3 ± 7 e

Letras diferentes para los valores de EB de la tercera cosecha, indican diferencias significativas entre las cepas según Duncan

Por otro lado para la cepa L5 la mejor eficiencia biológica se obtuvo en el sustrato que contenía 60% de aserrín de encino y con los complementos: mijo al 15%, salvado de trigo 10% y sorgo molido 14%, los bajos rendimientos de la cepa L5 comparándolos con los de L9 pueden deberse a la relación específica que se establece entre el genotipo de la cepa y la formulación del sustrato (Mireles Palomares y López García, 2005).

Tabla 2: Composición de los sustratos óptimos para las cepas L5 y L9 de *L. edodes* (Mireles Palomares y López García, 2005).

Composición de los sustratos óptimos (%)		
Componentes	Cepas	
	L5	L9
Aserrín	60	50
Mijo	15	30
Salvado de trigo	10	15
Sorgo molido	14	5
Sorgo molido	0.5	0
Ácido cítrico	0.5	0
Benlate	0.095	0.095
Eficiencia biológica al RMS*	35.5±6	77.5±2

*RMS = Rendimiento máximo significativo

Considerando que los rendimientos de las dos cepas de *L. edodes* presentaron disminuciones considerables en los sustratos evaluados por Mireles Palomares y López García (2005), con respecto al sustrato comercial evaluado por Ramírez Carrillo y Leal Lara (2002), se realizaron algunos estudios posteriores para elucidar si existían otras razones por las cuales no se han logrado obtener rendimientos semejantes a los del primer estudio. Así el trabajo de Ayala Piña (2008) estudió el efecto del tiempo de incubación y envejecimiento de las cepas, causado por resiembras sucesivas. Como resultado encontró que el efecto del tiempo de incubación (5 y 10 semanas) tuvo un gran impacto sobre la eficiencia biológica (EB) de las dos cepas, observándose una mayor EB a las 10 semanas de incubación. Los resultados del uso de cepas con y sin resiembras sucesivas también indicaron diferencias significativas, siendo mayores los rendimientos cuando se utilizaron las cepas que no fueron sometidas a resiembras sucesivas (Tabla 3). Estos resultados permitieron concluir que las resiembras sucesivas muy probablemente causaron un envejecimiento del micelio, lo cual repercutió en una baja en los rendimientos de ambas cepas (Ayala Piña, 2008).

Tabla 3: Efecto del tiempo de incubación y del uso de las cepas de *L. edodes* (L5 y L9) con y sin resiembras sucesivas sobre la eficiencia biológica (Ayala Piña, 2008).

Cepas	Eficiencia biológica al rendimiento máximo significativo			
	Tiempo de incubación (semanas)		Resiembras sucesivas	
	5	10	Con	Sin
L5	53.06 ± 43 a	96.24 ± 14 b	65.89 ± 10 a	90.39 ± 17 b
L9	55.06 ± 24 a	127.06 ± 18 b	97.68 ± 18 a	114.05 ± 12 b

Letras diferentes en los tiempos de incubación de una misma cepa indican diferencias significativas en la EB.

Letras diferentes en la misma cepa con y sin resiembras indican diferencias significativas en la EB.

3. ANTECEDENTES.

3.1 HONGOS.

El reino fungí esta compuesto por aproximadamente 50 mil especies, caracterizadas por marcadas diferencias en estructura, fisiología y formas de reproducción. A diferencia de los organismos del reino vegetal, los hongos no realizan la fotosíntesis. Son microorganismos quimiotrópicos y obtienen sus nutrientes de sustancias químicas halladas en la naturaleza. Los hongos sobreviven por medio de la secreción de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos a nutrientes solubles que luego son absorbidos de forma pasiva o captados hacia las células por medio de sistemas de transporte activo (Jokilk *et al.*, 1994).

3.2 EL HONGO SHIITAKE.

Shiitake es un hongo tradicional de China y Japón, muy apreciado por su sabor y propiedades medicinales. El nombre científico de shiitake es *Lentinula edodes*, esta clasificado en el género: *Lentinula*; familia: Tricholomataceae; orden: Agaricales y clase: Basidiomicetos (Chen, 2005).

3.2.1 PROPIEDADES NUTRICIONALES.

Shiitake es un hongo que presenta un buen contenido de minerales (potasio, hierro, fósforo) y vitaminas (B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (niacina) y D). Por ello consumir shiitake puede prevenir deficiencias en las vitaminas B y D (Hyunjong & Hobbs, 2005). Además contiene todos los aminoácidos esenciales, lisina y arginina son particularmente abundantes (Liu & Bau Y, 1980), mientras que metionina y fenilalanina son los menos abundantes (Lasota & Sylwestrazk, 1989). El hongo seco es una fuente abundante de fibra dietética como se observa en la Tabla 4. La fibra dietética previene enfermedades como: obesidad, diabetes, hipertensión, cáncer de colon, arteriosclerosis y también disminuye el nivel de colesterol.

Tabla 4: Composición de shiitake seco y fresco cultivado en diferentes sustratos y comparado con otros alimentos.

Alimento	Contenido energético (Kcal)	Humedad (%)	Análisis químico proximal (%)				
			Proteína	Grasa	Cenizas	Carbohidratos	
						Azúcares	FDT
Shiitake/Sustrato empleado para su cultivo							
Seco/Pino	261	11.6	17.3	1.7	4.8	57.9	6.7
Seco/Aliso	277	11.0	14.2	2.7	2.8	62.5	6.5
Seco/Encino de Mongolia	277	8.9	17.1	2.5	3.7	60.8	7.0
Seco/Encino	272	10.6	18.1	3.1	4.5	57	6.7
Fresco/Encino	27	90.8	2.0	0.3	0.8	5.4	0.7
Otros alimentos							
Trigo	328	11.8	12.0	2.9	1.8	69.0	2.5
Arroz	350	11.6	7.6	2.1	1.6	74.4	2.7
Papa	66	81.4	2.8	0*	1.1	14.4	0.2
Pollo (carne)	180	69.4	19.0	10.6	0.9	0.1	0
Cerdo (lomo)	262	61.5	17.4	19.9	1.0	0.2	0
Res (lomo)	224	65.5	17.5	15.9	0.9	0.2	0

FDT = Fibra dietética total

Tabla 5: Contenido de vitaminas y minerales en shiitake seco y fresco cultivado en diferentes sustratos en comparación con otros alimentos.

Alimento	Contenido de minerales (mg)					Contenido de vitaminas (mg)				
	Ca	P	Fe	Na	K	A***	B ₁	B ₂	B ₃	C
Shiitake/Sustrato empleado para su cultivo										
Seco/Pino	20	206	3.6	-**	-	0	0.66	1.61	7.7	0
Seco/Aliso	16	352	7.4	-	-	0	0.62	1.05	6.4	0
Seco/Encino de Mongolia	16	343	6.9	-	-	0	0.70	1.56	9.8	0
Seco/Encino	19	268	3.3	25	2140	0	0.48	1.57	19.0	0
Fresco/Encino	6	28	0.6	5	180	0	0.08	0.23	4.0	0*
Otros alimentos										
Trigo	71	390	3.2	3	380	0	0.34	0.11	5.0	0
Arroz	6	279	0.7	79	326	0	0.23	0.008	3.6	0
Papa	4	63	0.6	3	485	0	0.11	0.06	1.0	36
Pollo (carne)	11	110	1.1	58	327	50	0.20	0.21	2.7	0
Cerdo (lomo)	6	152	0.8	34	291	5	0.61	0.15	7.4	0
Res (lomo)	15	159	1.6	44	333	6	0.07	0.23	4.3	0

0*: componente traza o nulo

-**: No detectado

*** Unidades para Vitamina A

Fuente: National Rural Living Science Institute, R.D.A. Corea, 2001

3.2.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ACTIVOS AISLADOS DE SHIITAKE.

Lentinan:

- Es un compuesto de la pared celular, extraído de los cuerpos fructíferos y el micelio de *Lentinula edodes*.
- Polisacárido altamente purificado de alto peso molecular (cerca de 1 millón).
- Libre de nitrógeno, fósforo, azufre y cualquier otro elemento que no sea carbono, oxígeno e hidrógeno.
- Soluble en agua, estable al calor, estable en medio ácido e inestable en medio básico (Aoki, 1984b).
- Efecto anti-tumoral: Los resultados de algunos estudios han mostrado que shiitake y sus derivados, especialmente lentinan y LEM, tienen gran actividad antitumoral y antiviral, cuando son tomados en forma oral e inyectable, en animales y humanos. Estas sustancias parecen mejorar varias funciones del sistema inmune en vez de atacar células con tumores o virus (Hyunjong & Hobbs, 2005). Lentinan es el compuesto más estudiado por su actividad antitumoral. Chihara (1970) reportó que al administrar dosis de lentinan (0.5 –1 mg /Kg de peso) a ratas de laboratorio con sarcoma 180, éste retrocedió o desapareció en 80 a 100% de los animales en estudio.
- Efecto anti-viral: El compuesto lentinan se probó en el tratamiento de un paciente infectado con VIH que presentaban bajos niveles de células T, linfocitos y actividad celular NK. Una infusión con lentinan restableció sus valores a niveles normales (Aoki, 1984a).
- Efecto anti-bacterial: El compuesto aislado de shiitake que ha probado tener actividad anti-bacterial es lentinan (Hyunjong & Hobbs, 2005).

Extracto micelial de *Lentinula edodes* pulverizado:

- Contiene proteína, azúcares (pentosas como xilosa y arabinosa, además de glucosa y pequeñas cantidades de galactosa, manosa y fructosa); derivados de ácidos nucleicos; vitaminas del complejo B (B₁ o tiamina y B₂ o riboflavina); ergosterol, eritadenina y lignina hidrosoluble (Hahafusa, 1990).
- Ha mostrado efecto anti-viral en el tratamiento del SIDA. También se ha demostrado que inhibe la infección con VIH de células T cultivadas (Izuka, 1990). Potencia el efecto de AZT (medicamento utilizado en el tratamiento de VIH) para

evitar la replicación de virus *in Vitro*. El mecanismo de acción no es conocido con certeza (Toshikura, 1987).

- Efecto protector hepático: Un estudio clínico realizado por el Dr. Amagase (1987), reporta que al administrar 6 g/día de LEM en forma oral durante 4 meses a 40 pacientes con hepatitis crónica, los síntomas de la hepatitis B fueron aliviados, y el virus fue inactivado.

KS-2:

- Es un polisacárido con uniones α -manosa y una pequeña cantidad de péptidos que han sido aislado de *L. edodes*.
- Inhibe el crecimiento de tumores al ser administrado por vía oral e intraperitoneal en ratones (a una dosis de 1-100 mg/Kg de peso corporal, Hyunjong & Hobbs, 2005).

JLS:

- Compuesto derivado del micelio que contiene lignina, polisacáridos y proteínas.
- Posee efecto anti-viral e inmuno modulador. Este compuesto ha presentado la habilidad de bloquear la liberación del virus infeccioso *Herpes simple* tipo I en animales (Sarkar, 1993; Hahafusa, 1990).

Eritadenina:

- Derivado del ácido nucleico.
- Efecto cardiovascular: Se cree que es el responsable de que shiitake tenga la habilidad de reducir el colesterol y los lípidos en sangre (Yamamura & Cochran, 1974).

EPS y EPS4:

- Compuestos con ligninas hidrosolubles.
- Poseen efecto anti-viral y actividad inmunológica contra *Herpes simples*, encefalitis, virus de la polio, sarampión, paperas y VIH (Susuki, 1989; Sorimachi, 1990).

3.2.3 CICLO DE VIDA.

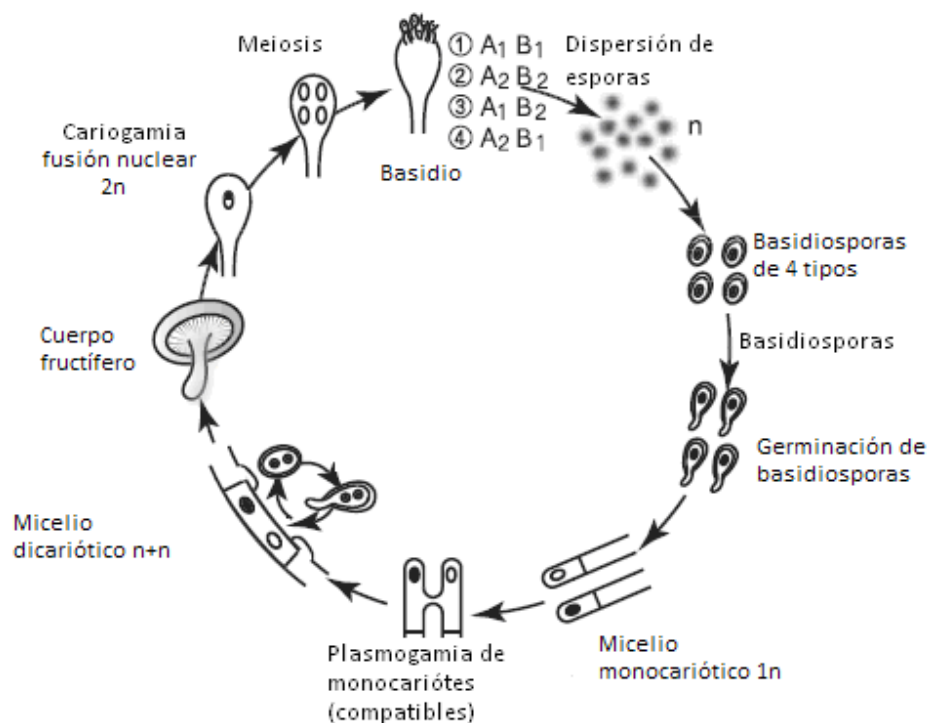
Cuando el micelio de un hongo ha acumulado suficientes nutrientes, en la periferia de la colonia se forman unos pequeños nudos hifales también conocidos como primordios. Éstos se desarrollan formando diminutos botones cuyos tejidos, con la humedad suficiente, se expandirán rápidamente dando lugar al cuerpo fructífero o

esporóforo. Los cuerpos fructíferos son el resultado del proceso de reproducción sexual del hongo y constituyen los cuerpos reproductores. En ellos se forman las esporas que constituyen la semilla de dispersión del hongo. Las esporas son de origen sexual, aunque también pueden ser asexuales, en el caso de las basidiosporas, son de tipo sexual.

Cuando las esporas sexuales se depositan sobre el sustrato adecuado, germinan produciendo hifas que al ramificarse integran el micelio. El micelio originado por una espora es de tipo monocariótico es decir, con un sólo núcleo. Cuando el micelio monocariótico o primario se fusiona con otro micelio primario compatible se produce un micelio dicariótico o secundario, cuyas células tendrán dos núcleos. Esta unión sexual se llama plasmogamia y constituye el primer paso en la reproducción sexual del hongo. Las fibulas constituyen la huella del intercambio nuclear entre las células e indican que la plasmogamia ha ocurrido, ya que una fibula es consecuencia de la conjugación del micelio monocariótico para originar el micelio dicariótico. Al inicio se origina una pequeña ramificación en el extremo de una hifa en crecimiento para posteriormente curvarse en forma de gancho (Guzmán *et al.*, 2002).

A partir del micelio secundario y con un cambio en las condiciones se forman el micelio terciario o primordios. Éstos bajo condiciones óptimas dan origen a los cuerpos fructíferos. En su himenio se forman los basidios, en los que antes de madurar, se lleva a cabo la cariogamia o fusión nuclear definitiva entre los dos núcleos que aparentemente se unieron en la plasmogamia. El núcleo cigótico resultante sufre rápidamente una meiosis en la cual los genes del tipo reproductivo y los que controlan otras características, se segregan en los cuatro núcleos hijos resultantes. El basidio tetra nucleado produce cuatro extensiones tubulares denominadas esterigmas cuyos ápices se expanden formando las esporas. Finalmente el núcleo haploide migra a través de los esterigmas hacia las basidiosporas (Statements & Chilton, 1983). Los hongos son haploides en casi todo su ciclo de vida (crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos), únicamente la célula formada en la cariogamia es diploide, dicha célula se divide inmediatamente (núcleo diploide), formando cuatro células haploide o basidiosporas.

Ilustración 1: Ciclo de vida de *Lentinula edodes* (Chen, 2005).



3.2.4 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE *L. EDODES*.

En la Tabla 6 se observa como la producción mundial de *L. edodes* se ha elevado de manera constante, en 1983 la producción mundial fue de 206,700 toneladas, y para 1997 se incrementó hasta 1,321,600 toneladas. Dicho incremento se debe a las modificaciones que se han realizado en los métodos de cultivo al pasar del cultivo tradicional en troncos, al uso de sustratos sintéticos estériles (Chang, 2002).

Tabla 6: Producción mundial de *Lentinula edodes* en varios años (Chang, 2002).

País	1983		1985		1991		1992		1993	
	Ton/año	%	Ton/año	%	Ton/año	%	Ton/año	%	Ton/año	%
China	19.5	9.4	50	13.9	380.0	60.5	450.0	63.9	550.0	68.9
Japón	171.2	88.2	227.3	63.3	179.7	28.6	177.1	25.2	170.4	21.3
Taiwán	7.5	3.6	49.0	13.7	36.8	5.9	39.4	5.6	36.4	4.6
Corea	4.9	2.4	23.4	6.5	17.2	2.7	22.5	3.2	25.8	3.2
Otros	3.6	1.8	9.4	2.6	14.5	2.3	15.0	2.1	16.0	2.0
Total	206.7	100	359.1	100	628.2	100	704.0	100	798.6	100

País	1994		1995		1996		1997	
	Ton/año	%	Ton/año	%	Ton/año	%	Ton/año	%
China	626.0	73.6	580.0	72.5	670.6	76.3	1125.0	85.1
Japón	157.4	18.5	155.2	19.4	144.0	16.4	132.6	10.0
Taiwán	28.0	3.3	26.9	3.4	27.0	3.1	27.0	2.1
Corea	22.0	2.6	19.0	2.4	18.7	2.1	17.0	1.3
Otros	17.0	2.0	18.0	2.3	19.0	2.1	20.0	1.5
Total	850.4	100	799.1	100	879.3	100	1321.6	100

Peso fresco en toneladas x 1000

3.2.5 CULTIVO DE SHIITAKE.

Como ya se mencionó anteriormente, shiitake se puede cultivar por dos métodos: tradicional, en troncos de maderas duras y recientemente en sustratos sintéticos empacados en bolsas y esterilizados.

3.2.5.1 CULTIVO EN TRONCOS.

El cultivo se lleva a cabo directamente en el tronco de algunas especies de árboles. En Japón su cultivo inicialmente se realizó en el árbol de shii (*Castanopsis cuspidata*), de donde shiitake obtiene su nombre (shii = árbol de shii y take = hongo). Sin embargo, en Estados Unidos se utilizan varias especies de encino. Una vez que los troncos están cortados en el tamaño deseado, están listos para ser inoculados. Los productores hacen perforaciones en el tronco donde posteriormente se introduce el inóculo en forma de tapones, después usualmente se sellan con cera para evitar que se seque demasiado el inóculo. El crecimiento micelial o etapa vegetativa puede durar entre 6 y 18 meses dependiendo de la especie, tamaño del tronco utilizado, cantidad de inóculo, humedad del ambiente y otros factores. Una vez que el micelio ha invadido por completo los troncos, éstos se trasladan al área de fructificación, la cual por lo general es más fría y húmeda que el área donde se llevó a cabo el crecimiento vegetativo del micelio. El cambio de temperatura y condiciones del medio ambiente provee las condiciones óptimas para la formación y desarrollo de los cuerpos fructíferos de shiitake. La eficiencia biológica reportada para este tipo de producción es de un 33%, la mayoría de los troncos tienen su mayor producción durante su segundo o tercer año donde se alcanza el 75% del total de su producción. Si la corteza del árbol se separa, los hongos competidores pueden colonizar el tronco reduciendo el tiempo de vida del tronco. La producción de shiitake no es posible cuando se pierde la corteza. El

tiempo aproximado para completar la producción por este método es de aproximadamente 6 años y la eficiencia biológica es baja, cercana a un 30% (Royse 2001).

3.2.5.2 CULTIVO EN SUSTRATOS SINTÉTICOS ESTÉRILES.

El método mencionado a continuación es uno de muchos de los que se han propuesto, cada autor menciona algunas variaciones en la forma de llevar a cabo este método de cultivo.

El aserrín ha sido utilizado como el componente principal en las formulaciones de sustrato. También se han utilizado otros componentes como ingrediente principal como son: trigo, mazorcas u otros cereales. Además del componente principal se utilizan algunos suplementos en proporciones que van desde 10 hasta 60% de la formulación. Los suplementos más utilizados han sido salvados de: trigo, arroz, mijo, centeno y maíz. Otros suplementos usados en menores cantidades han sido: carbonato de calcio, yeso y azúcar (Royse, 2001).

Una vez que los componentes del sustrato son pesados de acuerdo a la formulación se mezclan y se agrega la cantidad de agua necesaria para tener una humedad del 60% aproximadamente. En las granjas productoras a gran escala esta mezcla se transporta automáticamente a una llenadora que coloca 2.5 Kg en cada bolsa. Las bolsas son de polipropileno (resistente al calor) y tienen un parche especial que permite el intercambio gaseoso y al mismo tiempo impide la entrada de cualquier agente contaminante al sustrato. Las bolsas llenas con el sustrato se esterilizan en autoclave por 2 horas y después son inoculadas con grano con abundante crecimiento micelial y selladas. El inóculo se distribuye en la bolsa ya sea por métodos manuales o automáticos. El micelio crece durante 18-23 días a una temperatura de 21°C y 4 horas de luz por día. Una vez completado el crecimiento micelial, la bolsa se retira y los bloques de sustrato son expuestos a un ambiente donde se favorece el pardeamiento de la parte externa del sustrato. Durante el pardeamiento (4 semanas) los bloques se mantienen a una temperatura de 19°C y los niveles de CO₂ se regulan entre 2,200 y 3,000 ppm. Los bloques de sustrato pueden ser regados ligeramente cada día para mantener la humedad del sustrato. Cuando el proceso de pardeamiento se acerca a su final comienzan a aparecer los primordios del hongo. Esto indica que el sustrato está listo para producir hongos. La maduración de los primordios se estimula remojando los sustratos en agua fría (12°C) por 3 a 4 horas. Después del remojo los hongos comienzan a surgir y aproximadamente 7 a 11 días después, están listos para ser cosechados. Después de que todos los hongos

han sido cosechados se sumerge nuevamente el sustrato en agua, es posible que el remojo requiera de 12 horas o más para recuperar la humedad. Las principales ventajas de este método sobre el anterior es el tiempo total de cultivo que es 3 a 6 meses y además la eficiencia biológica es de 75 a 125% (Royse, 2001).

3.2.5.2.1 FORMULACIÓN DEL SUSTRATO.

En Estados Unidos se utiliza comúnmente 80% aserrín, 10% salvado y 10% de granos. Investigaciones en Suiza han reportado altos rendimientos al utilizar: 75% aserrín, 24% salvado de trigo y 1% de cal (Kilpatrik, 2000).

El uso del aserrín ha disminuido como consecuencia del aumento en el uso de suplementos en el sustrato. Incluso se ha producido *L. edodes* en sustratos sin aserrín, en su lugar se ha utilizado una mezcla de granos de cereales reportando muy buenos resultados (Hiramoto, 1991).

El uso de cascarilla de algodón como componente del sustrato para la producción de *Lentinula edodes* ha sido anteriormente estudiado por Fung & Franco (2005). Ellos utilizaron cascarilla de algodón en 78% y obtuvieron 47% de eficiencia biológica en un tiempo de 4.5 meses. Los autores sugieren que la cascarilla de algodón tiene algún compuesto que induce el desarrollo de la fase reproductiva, muy probablemente debido a la composición inicial de la cascarilla de algodón que tiene una relación de carbono / nitrógeno 11/1, lo cual probablemente hace que se acelere la fructificación.

Una revisión exhaustiva de la bibliografía permitió detectar que el uso de aserrín en el sustrato ha ido disminuyendo a través de los años, desde utilizarse a una concentración de 80% hasta, más recientemente una concentración de 45%. En contraparte se ha incrementado el uso de suplementos como: salvado de trigo y sorgo molido (Mireles Palomares y López García, 2005).

La cascarilla de algodón es un subproducto agrícola que se obtiene de manera abundante en nuestro país y que no tiene un costo de producción, por lo que se considera una buena alternativa para la producción de *L. edodes*.

En la Tabla 7 se observa que la cascarilla de algodón es un subproducto agrícola con alta producción y además es un desecho que se obtiene sin costo (Deposito de documentos de la FAO).

Tabla 7: Producción y uso de subproductos y desechos alimenticios (Deposito de documentos de la FAO).

Subproductos agrícolas ¹	Producción peso seco (Ton/año) ²	USO COMÚN (%) ²					Costo (\$/Ton)
		Exportación	Alimentación	Fertilizante	Combustible	Desecho	
Cáscara de cacahuete	108	-	-	-	-	100	Sin costo
Cascarilla de algodón	46,204	-	-	-	-	100	Sin costo
Forraje de chícharo	29,485	-	100	-	-	-	
Forraje de cebada	36,589	-	100	-	-	-	180,000
Harina de alfalfa	1'238,097	-	100	-	-	-	76,894
Rastrojo de maíz	23'468,019	-	20	-	10	70	150,000
Pulpa de café	3,214	-	-	15	-	85	Sin costo
Punta de caña de azúcar	1'084,680	-	-	-	-	100	Sin costo
Salvado de trigo	747,445	-	100	-	-	-	120,000

¹ S.A.R.H. 1980

² Valores calculados por el grupo de trabajo con base en la información brindada por la Dra. Rosa Ma. Flores Zavala. Subdirección de Estadística Agrícola, S.A.R.H. México

En la Tabla 8 podemos observar la composición química de algunos desechos de la agricultura. Para la cascarilla de algodón se observa que presenta un alto el contenido de fibra cruda (Deposito de documentos de la FAO), además su estructura puede contribuir a la formulación de sustratos poco compactos, lo cual favorece el desarrollo micelial del hongo.

Tabla 8: Composición porcentual promedio de los principales desechos agropecuarios (Deposito de documentos de la FAO).

DESECHOS AGROPECUARIOS	COMPONENTES (%)					
	HUMEDAD	PROTEINA	GRASA	FIBRA CRUDA	CENIZAS	ELN*
Cascarilla de café	10	24.85	0.56	62.04	1.45	1.10
Cascarilla de algodón	9.37	5.92	1.16	59.21	2.5	21.84
Forraje de chícharo	9	3.91	2	42.4	4.18	38.51
Forraje de cebada forrajera	10	3.15	0.93	40.81	14.52	30.59
Harina de alfalfa	6.58	12.51	1.34	37.86	9.08	32.63
Rastrojo de maíz	7.62	4.59	5.89	37.03	5.52	39.35
Bagazo de destilería de uva	18.45	36.48	1.39	33.87	8.71	1.1
Pulpa de café	10.7	8.92	10.09	31.38	6.52	32.39
Tamo de henequén	8.26	5.16	5.34	29.74	8.6	42.90
Bagazo de caña de azúcar	44.6	1.14	0.52	27.85	2.95	22.94

ELN* Extracto libre de nitrógeno

Al paso de los años se han utilizado muchos suplementos para el cultivo de shiitake. En general se prefieren los residuos de la agricultura ya que se obtienen a bajo costo y su uso promueve la utilización de subproductos que en vez de convertirse en basura son utilizados como materia prima para la obtención de un nuevo producto.

Otros componentes de los sustratos utilizados en esta investigación fueron: mijo, sorgo molido, salvado de trigo. Estos suplementos se han utilizado para proporcionar una mejor nutrición al hongo y su proporción en el sustrato puede variar dependiendo de la disponibilidad local de ellos. En algunas investigaciones se han utilizado maíz, arroz, trigo, azúcar, paja, etc. (Chen, 2005).

Los minerales más utilizados han sido fósforo, sulfatos, calcio, magnesio y potasio para coadyuvar en la construcción de componentes celulares y acelerar el metabolismo. Algunos minerales mantienen un balance en la presión osmótica en la célula. En particular el fósforo y el potasio son importantes tanto para el crecimiento micelial, como para la formación del cuerpo fructífero. Los elementos en cantidades mínimas como: Fe, Cu, Zn, Mg, Mo, son componentes o cofactores de enzimas y no es necesario adicionarlos ya que se encuentran en suficiente cantidad en los componentes del sustrato o en el agua (Chen, 2005).

4. JUSTIFICACIÓN.

El cultivo de *Lentinula edodes* tradicionalmente se realiza en troncos de maderas duras con costos de producción muy bajos. Sin embargo, este método presenta las desventajas de una producción estacional, es decir sólo durante otoño y primavera se dan las condiciones naturales de humedad y temperatura necesarias para que el hongo fructifique, además de periodos de incubación y producción sumamente largos (hasta 5 años en total) y muy bajos niveles de producción (20 a 30% de eficiencia biológica). Con la finalidad de reducir la duración del ciclo de cultivo y favorecer su cultivo bajo condiciones controladas se ha sustituido el método tradicional por el uso de sustratos sintéticos estériles como virutas y aserrines de maderas duras y algunos suplementos como salvado de trigo, arroz, avena, cebada, mijo y sorgo entre otros. Este nuevo método ha permitido una producción continua, pero con mayores costos de inversión y un alto consumo de energía (Kalberer, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2000; Ramírez y Leal, 2002).

Comparando los resultados de los trabajos previos en el laboratorio observamos una disminución muy drástica en los rendimientos de 146 y 261% para las cepas L5 y L9 respectivamente, hasta 35 y 77% de eficiencia biológica. Con el trabajo de Ayala Piña de nuevo se observa un incremento favorable al utilizar 10 semanas de incubación (96 y 127% de EB para las cepas L5 y L9), así como al utilizar cepas sin ser sometidas a resiembras sucesivas (90 y 114% de EB para las cepas L5 y L9). Sin embargo, los rendimientos todavía están por debajo de los reportados en el primer experimento (Ramírez y Leal, 2002). Considerando todos los resultados previos en este trabajo se planteó observar si es posible incrementar los rendimientos por medio de la incorporación de cascarilla de algodón al sustrato utilizando cepas sin resiembras sucesivas. Por información no publicada se sabe que la experiencia a escala comercial, considera a la cascarilla de algodón como un componente sumamente importante tanto para la estructura del sustrato, como para la nutrición del hongo. Además se consideró el efecto del uso de salvado de trigo o sorgo molido ya que la industria productora de shiitake utiliza estos dos componentes en forma indistinta (Mireles Palomares y López García, 2005). Al mismo tiempo se evaluó el efecto de algunos suplementos recomendados por los productores de shiitake. Para ello se planteó evaluar la eficiencia biológica de dos cepas de *L. edodes* (L5 y L9) utilizando nueve formulaciones diferentes.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO PRINCIPAL.

Optimizar la formulación del sustrato para el cultivo de *Lentinula edodes*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ☞ Determinar el efecto de distintas concentraciones de cascarilla de algodón en el sustrato sobre la producción del hongo *Lentinula edodes*.
- ☞ Observar el efecto de suplementar el sustrato con salvado de trigo ó sorgo molido.
- ☞ Observar el efecto del uso de complementos tales como: CaCO_3 , CaSO_4 , benlate, ácido cítrico y sulfato de amonio, en sustratos empleados para la producción del hongo comestible *Lentinula edodes*.
- ☞ Comparar la eficiencia biológica de dos cepas de *Lentinula edodes* en 9 sustratos.

6. HIPÓTESIS.

Si la composición y estructura del sustrato es un factor importante para el cultivo de shiitake, al incorporar diferentes proporciones de cascarilla de algodón y aserrín de encino al sustrato será posible incrementar la producción de hongos.

El uso de suplementos como salvado de trigo o sorgo molido darán rendimientos semejantes

El uso de complementos en la formulación del sustrato servirá para promover mayor producción de hongos.

7. METODOLOGÍA.

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron dos cepas de *Lentinula edodes* L5 y L9, la cepa L9 fue donada al Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM por Tai-Soo Lee de Corea y la cepa L5 fue donada por Ian Reid de Canadá. Las cepas se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración en medio de agar extracto de malta en el cepario del Departamento. Las principales características de las dos cepas utilizadas son las siguientes: L9: Es una cepa muy productiva, pero produce hongos pequeños, por su productividad es recomendada para los cultivadores.

L5: Es una cepa con capacidad para fructificar en agar papa dextrosa, produce buenos rendimientos, pero inferiores a la cepa L9 y presenta la ventaja de producir hongos de tamaño grande.

7.2 PREPARACIÓN DE AGAR EXTRACTO DE MALTA (AEM).

Para preparar 500 mL. de agar, se pesaron 7.5 g de extracto de malta en un matraz Erlenmeyer de 1 litro y se disolvieron en 100 mL. de agua destilada, se agitó hasta disolverse. Posteriormente se pesaron 9 g de agar bacteriológico, se agitó nuevamente para conseguir una mezcla homogénea y se agregaron 400 mL. de agua destilada. Se tapó el matraz y esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 50 minutos. Del medio estéril se vaciaron 12 mL. en cajas Petri estériles con la ayuda de una jeringa de llenado continuo. Una vez que el medio se solidificó se guardaron las cajas en bolsas de polietileno e incubaron a 24°C por 24 horas para verificar su esterilidad.

7.3 PROPAGACIÓN VEGETATIVA DEL MICELIO.

Después de verificar la esterilidad del medio, las cajas se sembraron con pequeños cuadros cortados de las cepas mantenidas en refrigeración (L5 y L9). Las cajas inoculadas se incubaron a 24°C hasta que el micelio invadió completamente el medio de la caja Petri, este crecimiento micelial se utilizó para inocular la semilla de grano de trigo.



Ilustración 2: Caja Petri con crecimiento micelial.

7.4 PRODUCCIÓN DEL INÓCULO DE GRANO.

El inóculo de grano es el medio donde se propaga el hongo para ser utilizado en la inoculación de los sustratos. El grano utilizado puede ser trigo, mijo, sorgo, dependiendo de la disponibilidad y los costos en cada región. Para este proyecto se utilizaron granos de trigo.

Para preparar el inóculo de grano, los granos de trigo se lavaron y colocaron en agua a punto de ebullición por aproximadamente 50 minutos. A continuación se enfrió el grano con agua corriente y se drenó el exceso de agua. Una vez drenado y frío el grano se pesó y agregó CaSO_4 al 1.3% y CaCO_3 al 0.3%, considerando el peso húmedo del grano. El grano húmedo con las sales se mezcló de forma homogénea y colocaron 400 g de grano en bolsas de polipapel. El grano empacado se esterilizó por 2 horas en autoclave a 121°C y 15 libras de presión. Las bolsas estériles con grano una vez que se encontraron a temperatura ambiente fueron inoculadas con micelio previamente desarrollado en placas con agar extracto de malta. Las cajas con el crecimiento micelial de cada cepa se cortaron en cuadros de 1 cm^2 aproximadamente,

con una aguja micológica estéril, se transfirió una caja con micelio a una bolsa con grano de trigo estéril. A continuación las bolsas se agitaron en forma manual para dispersar el micelio, se cerraron con cinta adhesiva y se incubaron a 24°C en total oscuridad hasta que los granos fueron completamente invadidos por el micelio.



Ilustración 3: Grano de trigo invadido por micelio.

7.5 DETERMINACIÓN Y AJUSTE DE HUMEDAD.

Para determinar el contenido de humedad de cualquier muestra se utilizó el método de secado en horno. Para determinar la humedad se toma el peso húmedo inicial de la muestra y se somete a un secado a 60°C hasta llegar a peso constante. El contenido de humedad se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

Peso inicial: Peso de la muestra húmeda.

Peso final: Peso de la muestra seca.

7.6 MATERIALES EMPLEADOS.

- ☞ Aserrín de encino blanco. Obtenido de aserradero "Tenango", ubicado en Tengo del Valle, Estado de México, la madera procesada en este aserradero proviene del sureste del país.

☞ Cascarilla de algodón. Obtenida de Champimex, ubicado en Amelaco Querétaro.

☞ Benlate. Es un fungicida cuya fórmula química es Metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato. Este fungicida se recomienda por los para prevenir la contaminación por hongos competidores durante la etapa de incubación del sustrato para el cultivo de hongos comestibles, entre ellos shiitake.

7.7 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.

Se probaron nueve diferentes formulaciones, cuya composición porcentual se presenta en la Tabla 9. Una vez que se contó con todos los componentes del sustrato se determinó tanto la humedad, como la capacidad de retención de agua del aserrín, cascarilla de algodón y mijo. Estos datos permitieron calcular las cantidades requeridas de cada componente para cada formulación evaluada. Para la preparación de cada sustrato se hidrataron durante 24 horas el aserrín, mijo y cascarilla de algodón. Posteriormente se drenó el exceso de agua y se pesó la cantidad de cada componente del sustrato establecida en cada formulación en base húmeda. Una vez pesados todos los componentes del sustrato, éstos fueron mezclados y para cada bolsa se colocó 1.5 Kg de la mezcla húmeda. El sustrato ya empacado en bolsas de polipapel se esterilizó en autoclave durante 2 horas a 121°C y 15 libras de presión. Una vez que el sustrato estéril alcanzó la temperatura ambiente, se inoculó.

Tabla 9: Composición porcentual de los 9 sustratos evaluados para el cultivo de las cepas L5 y L9 de *Lentinula edodes*.

Componentes del sustrato	Composición de los sustratos evaluados en base húmeda (%)								
	Control	Nuevas formulaciones							
	Primer experimento				Segundo experimento				
	1*	2**	3	4	5	6	7	8	9
Aserrín		50		40	20	50	50	50	60
Cascarilla de algodón	80	36	70	40	60	34	38	36	26
Mijo		6				6	6	6	6
Salvado de trigo	16	6	26	16	16				
Sorgo molido						6	6	6	6
Sulfato de amonio		0.5						0.5	0.5
Ácido cítrico		0.5						0.5	0.5
Benlate		1						1	1
CaCO ₃	3		3	3	3	3			
CaSO ₄	1		1	1	1	1			

* Sustrato 1 = Muy productivo para el cultivo de *Pleurotus eryngii*

** Sustrato 2 = Recomendado por Hongos Leben para el cultivo de shiitake

7.7 INOCULACIÓN DE SUSTRATOS E INVASIÓN MICELIAL.

Los sustratos fríos se inocularon con la semilla de grano en una proporción del 5% aproximadamente. Las bolsas inoculadas fueron agitadas en forma manual para tratar de distribuir el inóculo de grano en forma homogénea en todo el sustrato. A continuación la bolsa se cerró y se introdujo un tubo de PVC de 5 cm de largo y se tapó la boca del tubo con un cuadro de hule espuma estéril, sujetado con una liga. En todos los casos para cada sustrato y cepa se realizaron un total de 10 replicas. Las bolsas ya inoculadas se incubaron en total oscuridad a 24°C durante 10 semanas para que el micelio invadiera completamente el sustrato.



Ilustración 4: Sustrato completamente invadido por el micelio de shiitake

7.8 FRUCTIFICACIÓN.

Terminadas las 10 semanas de incubación se retiraron las bolsas que cubrían los sustratos y se identificó cada sustrato con los datos correspondientes (cepa, sustrato, réplica y fechas de inoculación e inducción). Una vez identificada cada bolsa, éstas se transfirieron al área de fructificación. En el cuarto de fructificación las condiciones fueron: temperatura de 15 a 22°C, 4 riegos de 20 minutos cada 6 horas (para incrementar la humedad relativa), ventilación de 1 hora después de cada riego e iluminación artificial continua.



Ilustración 5: Cuerpos fructíferos en condiciones óptimas para su cosecha.

7.9 COSECHA.

Una vez transferidos los sustratos al área de fructificación se requirió entre una y dos semanas para producir los primeros hongos. Las condiciones óptimas para la fructificación se mantuvieron durante las 10 semanas de cosecha. La cosecha de hongos se realizó cuando se observó que los bordes del sombrero aun quedaban enrollados hacia abajo. Con los hongos cosechados se registró su peso para cada bolsa y posteriormente se calculó la eficiencia biológica obtenida en cada semana de corte. La eficiencia biológica se calculó con la siguiente formula:

$$EB (\%) = \frac{g \text{ de hongo fresco}}{g \text{ de sustrato seco}} * 100$$

Para calcular el peso seco del sustrato se determinó la humedad del sustrato después del proceso de esterilización y con los pesos húmedos de cada bolsa fue posible calcular su peso seco.

$$Cantidad \text{ de sustrato seco por bolsa (g)} = \left(\frac{g \text{ de sustrato fresco} * (100 - Humedad (\%))}{100} \right)$$

Para todos los sustratos se determinó la eficiencia biológica acumulada (EBA), la cual representa la eficiencia biológica de la semana actual más la semana o semanas anteriores. Así para la primera semana sólo se considera el valor de esa semana, pero para la segunda semana se suma el valor de la semana 1 + la semana 2.

7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.

7.10.1 DETERMINACIÓN DE LA SEMANA CON RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO (RMS).

Para cada cepa, en cada sustrato se determinó la semana donde se obtiene el rendimiento máximo significativo, es decir cuando los incrementos posteriores en la eficiencia biológica ya no fueron estadísticamente significativos. Para ello primero se realizó un análisis de varianza y si como resultado se observaron diferencias significativas en la EBA de las semanas se realizó la prueba de Duncan. Esta prueba nos permitió conocer la semana donde se observa el último incremento en la eficiencia biológica, estadísticamente significativo.

7.10.2 ANÁLISIS DE LOS RMS OBTENIDOS PARA CADA SUSTRATO Y CEPA (PRIMERO Y SEGUNDO EXPERIMENTO).

Una vez identificada la semana donde se obtuvo el RMS para cada sustrato y cepa, con estos valores de eficiencia biológica se realizó un segundo análisis de varianza para las variables cepas y sustratos. Si como resultado del análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre los sustratos, por medio de la prueba de Duncan se identificaron los sustratos más productivos. Si para las cepas se observaron diferencias significativas en el análisis de varianza, sólo se observa su valor promedio y directamente se identifica la cepa más productiva. Si como resultado en el análisis de varianza se encontró una interacción significativa entre las dos variables de interés (sustratos y cepas) no se interpretaron las variables por separado. En este caso se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan para los valores obtenidos en la interacción sustratos x cepas. El mismo tipo de análisis se realizó de manera individual y conjunta para los dos experimentos.

7.10.3 ANÁLISIS DEL RMS DE TODOS LOS SUSTRATOS PARA CADA CEPA.

El comportamiento de cada una de las cepas en todos los sustratos (experimentos 1 y 2) fue evaluado mediante un análisis de varianza, utilizando los valores del RMS obtenidos para cada sustrato. El análisis de varianza determinó si existía o no diferencia significativa entre los sustratos para cada cepa por separado. Posteriormente si el análisis de varianza detectó diferencias significativas entre los sustratos se utilizó la prueba de Duncan para identificar el sustrato o sustratos más productivos para cada cepa.

Todos los análisis de varianza y pruebas de rango múltiple de Duncan se realizaron con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 17 para Windows.

8. RESULTADOS

8.1 PRIMER EXPERIMENTO.

Para cada cepa en cada sustrato se realizaron 10 replicas. Una vez que se indujo la fructificación se empezaron a formar los cuerpos fructíferos (hongos) y cuando el sombrero estaba apunto de abrir completamente se llevó a cabo la cosecha de hongos, la cual se realizó durante 10 semanas.

En este experimento se evaluaron los primeros 5 sustratos que se presentan en la Tabla 10. Las formulaciones fueron seleccionadas considerando la información previa o experiencia del laboratorio en el cultivo de otros hongos de tipo ligninolítico. Este fue el caso del sustrato 1 que probó en experimentos previos ser muy productivo para el hongo *Pleurotus eryngii* (Márquez Mota, 2009). Por otro lado se evaluó el sustrato 2 por ser recomendado por una empresa productora de hongos (Hongos Leben) para el cultivo de shiitake a escala comercial. A partir de las formulaciones de los sustratos 1 y 2, se probaron diferentes concentraciones de cascarilla de algodón en el sustrato para la producción de *Lentinula edodes*, (36, 40, 60, 70 y 80%). Para el aserrín también se probaron 4 concentraciones (0, 20, 40 y 50%). Para ajustar al 100% la composición de cada sustrato se utilizó salvado de trigo.

En la Tabla 10 (parte inferior) se presentan los resultados de humedad de cada sustrato después de la esterilización y su respuesta tanto en la invasión micelial, como en la fructificación. Como se puede observar sólo el sustrato 3 presentó una baja humedad (53.8%). El resto de sustratos presentaron una humedad aceptable (58 a 61%). Con respecto a la invasión micelial sólo el sustrato 1 no fue invadido por el micelio y por ello no fue posible inducir la fructificación. En el resto de los sustratos debido a que sí fueron invadidos por el micelio, se indujo la fructificación.

En la Tabla 11 se presenta la eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los cuatro sustratos donde se observó desarrollo micelial y producción de hongos (2, 3, 4, y 5). Como se puede observar para todos los sustratos el período donde se cosechó la mayor cantidad de hongos corresponde a las primeras semanas de producción. En el sustrato 3, la producción de hongos sólo se presentó durante las dos primeras semanas y en el período posterior fue decreciendo la producción de hongos al grado

de no producir ningún hongo, razón por la cual a partir de la séptima semana los sustratos fueron retirados del área de fructificación. Con los valores de eficiencia biológica semanal se calculó la eficiencia biológica semanal acumulada. Con estos valores para cada sustrato y cepa se realizó un análisis de varianza y si como resultado se observaron diferencias significativas entre las semanas de corte, por medio de la prueba de Duncan se determinó la semana donde se presentó el último incremento significativo en los rendimientos.

Tabla 10: Composición porcentual de los sustratos evaluados en el primer experimento para el cultivo de dos cepas de *L. edodes* (L5 y L9).

Componentes del sustrato	Sustratos control		Nuevas formulaciones		
	Muy productivo para <i>P. eryngii</i>	Recomendado por Hongos Leben	3	4	5
	1	2			
Aserrín		50		40	20
Cascarilla de algodón	80	36	70	40	60
Mijo		6			
Salvado de trigo	16	6	26	16	16
Sulfato de amonio		0.5			
Ácido cítrico		0.5			
Benlate		1			
CaCO ₃	3		3	3	3
CaSO ₄	1		1	1	1
Observaciones experimentales					
Invasión micelial	-	+	+	+	+
Fructificación	-	+	+	+	+
Humedad del sustrato (%)	60.2	61.2	53.8	57.9	58.0

Como resultado de este análisis estadístico fue posible determinar la semana donde se obtuvo el rendimiento máximo significativo (RMS) (Anexo I). Este valor indica que los rendimientos obtenidos en las semanas posteriores ya no representan un incremento estadísticamente significativo. En la Tabla 12 se presenta la eficiencia biológica acumulada de las cepas L5 y L9 en los 4 sustratos que fructificaron en el primer experimento. Remarcado en color gris se observa la semana donde se alcanzó el RMS. En términos generales se observa que para las dos cepas, la mayoría de los sustratos alcanzaron el RMS entre la 6^{ta} y 7^{ma} semana y sólo en el sustrato 2, la cepa L5 alcanzó el RMS hasta la 8^{va} semana. Sólo para el sustrato 3 el RMS se alcanzó para las dos cepas (L5 y L9) en la 1^{ra} y 2^{da} semana de cosecha.

Tabla 11: Eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en el primer experimento.

Semana de corte	Eficiencia biológica semanal (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)							
	Cepas							
	L5				L9			
	Sustratos							
	2	3	4	5	2	3	4	5
1	36.5 ± 23.2	9.7 ± 12.4	11.9 ± 11.7	13.8 ± 13.3	64.9 ± 18.9	7.2 ± 11.2	9.73 ± 8.9	24.8 ± 19
2	17.2 ± 12.2	10.0 ± 13.6	38.5 ± 19.5	12.0 ± 10.6	8.3 ± 5.3	20.0 ± 9.9	30.4 ± 11.4	8.2 ± 7.2
3	3.2 ± 4.5	2.6 ± 4.3	2.2 ± 3.1	10.1 ± 9.4	7.1 ± 3.5	0.2 ± 0.5	8.1 ± 6.9	2.1 ± 4.7
4	6.2 ± 8.8	0.5 ± 1.1	2.3 ± 3.8	7.6 ± 9.5	5.0 ± 5.8	0.0 ± 0	9.7 ± 14.1	8.9 ± 8.2
5	5.6 ± 5.6	1.5 ± 3.0	7.2 ± 8.8	8.7 ± 11.9	5.4 ± 4.6	0.0 ± 0	12.7 ± 15.0	15.2 ± 15.8
6	0.8 ± 1.6	0.0 ± 0.0	7.3 ± 10.4	9.1 ± 6.2	1.0 ± 1.6	0.0 ± 0	8.4 ± 10.4	6.4 ± 6.1
7	5.4 ± 8.9	0.0 ± 0.0	2.8 ± 4.2	5.8 ± 7.9	9.5 ± 7.6		9.0 ± 8.1	3.3 ± 4.6
8	4.5 ± 7.9		2.2 ± 3.1	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.4		6.4 ± 7.4	0.0 ± 0.0
9	2.3 ± 3.3		0.3 ± 0.5	4.6 ± 4.7	1.9 ± 3.3		0.1 ± 0.3	3.6 ± 4.7
10	3.0 ± 4.1		0.39 ± 1.23	1.7 ± 2.8	2.6 ± 5.6		1.2 ± 2.6	0.3 ± 0.8

Tabla 12: Eficiencia biológica semanal acumulada de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluado en el primer experimento

Semana de corte	Eficiencia biológica acumulada (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)							
	Cepas							
	L5				L9			
	Sustratos							
	2	3	4	5	2	3	4	5
1	36.5 ± 23 a	9.7 ± 12 a	11.9 ± 11.7 a	13.8 ± 13 a	64.9 ± 19 a	7.2 ± 11.2a	9.73 ± 9 a	24.8 ± 19 a
2	53.7 ± 23 b	19.7 ± 9 a	51.3 ± 21 b	25.8 ± 20 b	73.2 ± 18 b	27.2 ± 5 b	40.10 ± 11 b	33.0 ± 24 a
3	56.9 ± 23 bc	22.3 ± 12 a	53.5 ± 20 bc	35.9 ± 20 bc	80.3 ± 20 bc	27.4 ± 5 b	49.10 ± 10 bc	45.1 ± 25 ab
4	63.2 ± 20cd	22.8 ± 13 a	55.8 ± 22 bc	43.6 ± 22 cd	85.4 ± 22 cd	27.4 ± 5 b	58.77 ± 13 c	44.1 ± 27 b
5	68.7 ± 21 de	24.3 ± 16 a	63.0 ± 27 cd	52.3 ± 27 de	90.8 ± 21 d	27.4 ± 5 b	71.51 ± 12 d	59.2 ± 23 c
6	69.6 ± 20 de	24.3 ± 16 a	70.3 ± 28 de	61.4 ± 26 ef	91.8 ± 22 d	27.4 ± 5 b	79.88 ± 16 de	65.7 ± 23 cd
7	74.9 ± 27 ef		73.1 ± 28 de	67.3 ± 24 fg	101.3 ± 27e		88.9 ± 15 ef	69.0 ± 24 cd
8	79.4 ± 28 fg		75.3 ± 29 e	67.3 ± 24 fg	101.4 ± 27 e		95.89 ± 19 f	69.0 ± 24 cd
9	81.8 ± 28 fg		75.6 ± 29 e	71.8 ± 22 fg	103.9 ± 29 e		95.89 ± 19 f	72.6 ± 27 d
10	84.8 ± 30 g		75.9 ± 29 e	73.5 ± 22 g	106.5 ± 32 e		96.61 ± 21 f	72.9 ± 27 d
	Semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS)							
Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan $\alpha = 0.05$)								

Con los valores del rendimiento máximo significativo para cada cepa en los 4 sustratos evaluados se realizó un segundo análisis de varianza para las variables cepas y sustratos. Como resultado se encontraron diferencias significativas entre las cepas y altamente significativas entre los sustratos (Anexo II: Tabla: 52). Además no se observó una interacción significativa entre las dos variables, razón por la cual se pueden interpretar las variables por separado.

En la Tabla 13 se presenta un resumen de los resultados del análisis estadístico para las dos variables (cepas y sustratos). Para las cepas se observó que la cepa L9 fue más productiva que la cepa L5. Para los sustratos la prueba de Duncan indicó que el sustrato 3 fue el menos productivo y los sustratos 2 y 4 fueron los más productivos.

Tabla 13: Resultados del análisis estadístico para las variables cepas y sustratos evaluadas en el primer experimento

Cepas	Rendimiento máximo significativo (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)				Promedio por cepa
	Sustratos				
	2	3	4	5	
L5	79.4 ± 28	9.7 ± 12	70.3 ± 28	67.3 ± 24	65.0 ± 32 a
L9	101.3 ± 27	27.2 ± 5	88.9 ± 15	65.7 ± 23	77.6 ± 33 b
Promedio por sustrato	90.4 ± 29 c	20.2 ± 12 a	80.0 ± 24 bc	66.7 ± 23 b	

Letras diferentes en los valores promedio de cepas indican diferencias estadísticamente significativas.

Letras diferentes en los valores promedio de los sustratos indican diferencias estadísticamente significativas.

En términos generales se observa en el primer experimento que altas concentraciones de cascarilla de algodón en el sustrato no son favorables para el cultivo de *L. edodes*; en el sustrato 1 con 80% de cascarilla de algodón, el micelio no fue capaz de desarrollarse y el sustrato 3 con 70% de cascarilla de algodón mostró la más baja producción de hongos

8.2 SEGUNDO EXPERIMENTO

Con los resultados del primer experimento se plantearon las formulaciones del segundo experimento donde se usó la misma concentración de cascarilla de algodón del sustrato 2 (34 a 38%), con excepción del sustrato 9 donde se redujo hasta 26%. La concentración de aserrín en los nuevos sustratos se mantuvo semejante al sustrato 2 (50%), excepto en el sustrato 9 donde se incrementó a un 60%. Para completar las formulaciones al 100% se evaluó el uso de sorgo molido en el sustrato, en vez de salvado de trigo (considerando la información de Mireles y López (2005), donde se propone el uso de sorgo molido.

Además se incorporó el uso de otros suplementos (CaCO_3 , CaSO_4) empleados en el cultivo de otros hongos.

En la Tabla 14 (parte inferior) se observa el contenido de humedad de cada sustrato después de la esterilización y la respuesta a la invasión micelial y a la fructificación. Los sustratos del segundo experimento presentaron una humedad aceptable (56 a 59%). Con respecto a la invasión micelial todos los sustratos del segundo experimento fueron invadidos por el micelio y se indujeron a la etapa de fructificación.

En la Tabla 15 se presenta la eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en el segundo experimento (6, 7, 8, y 9). Como se puede observar en todos los sustratos en la primera semana no hubo producción de hongos o fue muy baja. A partir de la segunda semana y hasta la cuarta semana fue cuando se cosechó la mayor cantidad de hongos para la mayoría de los sustratos. En este segundo experimento todos los sustratos se dejaron en el área de fructificación por 10 semanas, ya que como se observa siempre hubo una producción de hongos.

Con los valores de la eficiencia biológica semanal se calculó la eficiencia biológica semanal acumulada. Con estos valores para cada sustrato y cada cepa se realizó un análisis de varianza y si como resultado se observaron diferencias significativas entre las semanas de corte, por medio de la prueba de Duncan se determinó la semana donde se presentó el último incremento significativo en los rendimientos. Como resultado de este análisis estadístico fue posible determinar la semana donde se obtuvo el rendimiento máximo significativo (Anexo I). Este valor indica que los rendimientos obtenidos en las semanas posteriores ya no representan un incremento estadísticamente significativo.

En la Tabla 16 se presenta la eficiencia biológica acumulada de las cepas L5 y L9 en los sustratos del segundo experimento. Remarcado en color gris se observa la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS). Para la cepa L5 se observa que el RMS se obtuvo entre la 3^a y 6^a semana de producción, mientras que para la cepa L9 se obtuvo entre la 6^a y 8^a semana de producción.

Tabla 14: Composición porcentual de los sustratos evaluados en el primer y segundo experimento para el cultivo de dos cepas de *L. edodes* (L5 y L9) y observaciones experimentales para los dos experimentos.

Componentes del sustrato	Sustratos evaluados								
	Primer experimento					Segundo experimento			
	1*	2**	3	4	5	6	7	8	9
Aserrín		50		40	20	50	50	50	60
Cascarilla de algodón	80	36	70	40	60	34	38	36	26
Mijo		6				6	6	6	6
Salvado de trigo	16	6	26	16	16				
Sorgo molido						6	6	6	6
Sulfato de amonio		0.5						0.5	0.5
Ácido cítrico		0.5						0.5	0.5
Benlate		1						1	1
CaCO ₃	3		3	3	3	3			
CaSO ₄	1		1	1	1	1			
Observaciones experimentales									
Invasión micelial	SC	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructificación	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Humedad del sustrato (%)	60.2	61.2	53.8	57.9	58.0	56.6	59.0	56.7	59.5
Resultados de eficiencias biológicas al RMS (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)									
Cepas	L5	SC	79.4 ± 28	9.7 ± 12	70.3 ± 28	67.3 ± 24			
	L9	SC	101.3 ± 27	27.2 ± 5	88.9 ± 15	65.7 ± 23			

1* Sustrato muy productivo para *P. eryngii*.

2** Sustrato recomendado por Hongos Leben para el cultivo de shiitake.

SC Sin crecimiento micelial.

Tabla 15: Eficiencia biológica semanal de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en el segundo experimento.

Semana de corte	Eficiencia biológica semanal (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)							
	Cepas							
	L5				L9			
	Sustratos							
	6	7	8	9	6	7	8	9
1	4.8 ± 10.7	2.7 ± 5.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	16.9 ± 13.0	23.4 ± 16.0	4.6 ± 10.4	0.0 ± 0.0	23.5 ± 15.7	34.9 ± 19.0	46.9 ± 21.4	51.9 ± 37.8
3	4.9 ± 3.4	12.8 ± 17.9	26.3 ± 14.8	31.0 ± 30.8	10.0 ± 11.1	9.9 ± 11.4	15.0 ± 21.1	10.9 ± 19.1
4	11.8 ± 18.4	0.0 ± 0.0	7.8 ± 17.5	10.3 ± 17.8	3.4 ± 6.2	0.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0	13.5 ± 28.0
5	5.0 ± 4.6	5.3 ± 6.7	4.3 ± 6.4	1.7 ± 2.9	7.6 ± 9.6	0.8 ± 2.2	5.5 ± 6.6	1.2 ± 3.0
6	4.4 ± 9.9	9.6 ± 19.1	5.3 ± 1.4	0.0 ± 0.0	9.1 ± 12.4	6.3 ± 12.7	1.1 ± 2.9	0.6 ± 1.5
7	2.8 ± 4.8	0.0 ± 0.0	5.7 ± 5.2	3.9 ± 6.8	0.5 ± 1.4	1.3 ± 2.2	4.1 ± 5.7	6.4 ± 6.0
8	1.1 ± 1.4	3.8 ± 5.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.9 ± 7.2	12.7 ± 13.2	1.0 ± 1.6	3.8 ± 5.9
9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7	0.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.6 ± 2.8
10	2.0 ± 4.5	0.4 ± 0.8	3.0 ± 4.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.3 ± 6.5	10.1 ± 17.4

Tabla 16: Eficiencia biológica semanal acumulada de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluado en el segundo experimento.

Semana de corte	Eficiencia biológica acumulada (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)							
	Cepas							
	L5				L9			
	Sustratos							
	6	7	8	9	6	7	8	9
1	4.8 ± 9 a	2.7 ± 5 a	0.0 ± 0 a	0.0 ± 0 a	0.0 ± 0 a	0.0 ± 0 a	0.0 ± 0 a	0.0 ± 0 a
2	21.7 ± 17 b	26.2 ± 15 b	4.6 ± 9 a	0.0 ± 0 a	23.5 ± 16 b	34.9 ± 19 b	46.9 ± 21 b	51.9 ± 38 b
3	26.6 ± 16 b	39.0 ± 2 bc	30.9 ± 18 b	31.0 ± 31 b	33.5 ± 13 c	44.8 ± 11 c	61.9 ± 8 c	62.8 ± 38.4 bc
4	38.4 ± 14 c	39.0 ± 2 bc	38.8 ± 10 bc	41.3 ± 14 b	36.9 ± 11 cd	45.6 ± 11 c	61.9 ± 8 c	76.3 ± 20 cd
5	43.4 ± 17 c	44.3 ± 7 cd	43.1 ± 12 c	42.9 ± 13 b	44.6 ± 10 de	46.4 ± 12 c	67.3 ± 6 cd	77.5 ± 18 cd
6	47.8 ± 9 cd	53.9 ± 14 cd	48.4 ± 13 cd	42.9 ± 13 b	53.6 ± 13 ef	52.7 ± 13 c	68.4 ± 8 cd	78.1 ± 18 cd
7	50.7 ± 9 cd	53.9 ± 14 cd	54.1 ± 7 d	46.9 ± 12 b	54.2 ± 14 ef	53.9 ± 13 c	72.6 ± 9 de	84.5 ± 20 de
8	51.8 ± 9 d	57.7 ± 11 d	54.1 ± 7 d	46.9 ± 13 b	64.0 ± 13 f	66.7 ± 10 d	73.5 ± 9 de	88.3 ± 19 de
9	51.8 ± 9 d	57.7 ± 11 d	54.4 ± 7 d	47.4 ± 16 b	64.0 ± 13 f	66.7 ± 10 d	73.5 ± 9 de	89.9 ± 18 de
10	53.8 ± 11 d	58.1 ± 10 d	57.4 ± 9 d	47.4 ± 16 b	64.0 ± 13 f	66.7 ± 10 d	79.8 ± 12 e	99.9 ± 19 e
	Semana donde se alcanza el rendimiento máximo significativo (RMS)							

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Con los valores del rendimiento máximo significativo para cada cepa en los 4 sustratos evaluados se realizó un segundo análisis de varianza para las variables sustratos y cepas. Con este análisis estadístico no se observó diferencia significativa entre los sustratos, pero se observó diferencia altamente significativa para las variables cepas y la interacción entre sustratos x cepas. Como se indicó, al presentarse una interacción significativa entre las dos variables, estas no se pueden interpretar por separado (Anexo II, Tabla 54). Para su interpretación se realizó la Prueba de Duncan para identificar el mejor sustrato para cada cepa. En la Tabla 17 se presentan los resultados de la Prueba de Duncan para la interacción sustratos x cepas. Para la cepa L5 se observó que los sustratos donde se obtuvo el mayor rendimiento fueron 6 y 8, mientras que para la cepa L9 los sustratos más productivos fueron 7, 8 y 9 (Anexo II, Tabla 55).

Tabla 17: Resultados del análisis estadístico para la interacción de las variables sustratos x cepas evaluadas en el segundo experimento.

Cepas	Rendimiento máximo significativo (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)			
	Sustratos x cepas			
	6	7	8	9
L5	47.8 ± 9 abc	44.3 ± 7 ab	48.4 ± 13 abc	31.0 ± 31 a
L9	53.6 ± 13 bcd	66.7 ± 10 cde	72.6 ± 9 de	84.5 ± 20 de

Letras diferentes en los valores promedio de la interacción sustratos x cepas indican diferencias estadísticamente significativas.

8.3 RESULTADOS DE LA CEPA L5 EN TODOS LOS SUSTRATOS.

Con el objeto de evaluar el efecto de todos los sustratos para cada cepa se realizó un análisis estadístico para los 8 sustratos que fueron llevados a la etapa de fructificación. El análisis en forma conjunta de todos los sustratos evaluados en los dos experimentos se justifica al considerar que la composición del sustrato 2 y 8 es muy similar (ya que lo único que varía es el uso de salvado de trigo o sorgo molido en igual proporción). Como resultado se encontró diferencia altamente significativa entre los sustratos y con la prueba de Duncan se identificaron los sustratos más productivos para el cultivo de la cepa L5. El análisis de varianza y los resultados de la Prueba de Duncan se presentan en el Anexo II (Tablas 57 y 58). En la Tabla 18 se observa que la prueba de Duncan dio como resultado 4 grupos (a, b, c y d). Los sustratos donde se observó la mayor eficiencia biológica fueron: 2, 4, 5, 6 y 8 con una EBA al máximo rendimiento significativo entre 47 y 79%.

Tabla 18: Clasificación de los 9 sustratos evaluados en los dos experimentos para la cepa L5 de acuerdo a la Prueba de Duncan.

Sustratos	Rendimiento máximo significativo (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)
3	9.7 ± 12 a
9	31.0 ± 31 ab
7	44.3 ± 7 bc
6	47.8 ± 9 bcd
8	48.4 ± 13 bcd
5	67.3 ± 24 cd
4	70.3 ± 28 cd
2	79.4 ± 28 d

Letras diferentes en los valores promedio de los sustratos indican diferencias estadísticamente significativas.

8.4 RESULTADOS DE LA CEPA L9 EN TODOS LOS SUSTRATOS.

Para observar el comportamiento de la cepa L9 en todos los sustratos evaluados (primero y segundo experimento) se realizó un análisis de varianza considerando el RMS obtenido en todos los sustratos. Como resultado se encontró diferencia altamente significativa entre los sustratos y con la prueba de Duncan se identificaron los sustratos más productivos para el cultivo de esta cepa. El análisis de varianza y los resultados de la Prueba de Duncan se presentan en el Anexo II (Tablas 59 y 60). En la Tabla 19 se observa que la prueba de Duncan dio como resultado 5 grupos (a, b, c, d y e). Los sustratos donde se observó la mayor eficiencia biológica fueron: 2, 4 y 9 con una EBA al rendimiento máximo significativo entre 84 y 101%.

Tabla 19: Clasificación de los 9 sustratos evaluados en los dos experimentos para la cepa L9 de acuerdo a la Prueba de Duncan.

Sustratos	Rendimiento máximo significativo (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)
3	27.2 ± 5 a
6	53.6 ± 13 b
5	65.7 ± 23 bc
7	66.7 ± 10 bc
8	72.6 ± 9 bcd
9	84.5 ± 20 cde
4	88.9 ± 15 de
2	101.3 ± 27 e

Letras diferentes en los valores promedio de los sustratos indican diferencias estadísticamente significativas.

8.5 RESUMEN DE RESULTADOS.

Como resultado global se observó:

- ☹ Para las dos cepas los sustratos 2 y 4 fueron los más productivos.
- ☹ La cantidad de aserrín recomendada debe ser entre 40 y 50%.
- ☹ La cantidad de cascarilla de algodón recomendada debe ser entre 36 y 40%.
- ☹ La cascarilla de algodón como componente principal del sustrato inhibió el crecimiento micelial de las dos cepas de *L. edodes*, lo cual indica que la cascarilla de algodón por si sola no es adecuada para el cultivo de shiitake. Estos resultados se confirman con el sustrato 3, el cual contiene 70% de cascarilla de algodón, sin adición de aserrín en su formulación, siendo en este sustrato donde se obtuvieron las menores eficiencias biológicas para las dos cepas.
- ☹ Como complementos se pueden utilizar mijo al 6% o salvado de trigo al 16%.
- ☹ El uso de benlate, sulfato de amonio y ácido cítrico en comparación con CaCO_3 y CaSO_4 en sustratos semejantes (2 y 6) indicó que pueden ser utilizados en forma indistinta si se considera el nivel de contaminación. Sin embargo, en términos de rendimientos se observan mayores rendimientos al usar benlate, sulfato de amonio y ácido cítrico para la cepa L9, mientras que para la cepa L5 los rendimientos son semejantes.
- ☹ Por otro lado si no se utiliza ninguno de estos suplementos el riego de contaminación fue muy bajo (10% sólo para la cepa L5), pero la ausencia de este tipo de suplementos en el sustrato produjo una disminución considerable en los rendimientos (de 79 a 44% para la cepa L5 y de 101 a 66% para la cepa L9).
- ☹ La cepa más productiva fue L9.

En la Tabla 20 se presenta la composición de los nueve sustratos evaluados y la eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para cada cepa. Para cada cepa se indican los sustratos donde se obtuvieron los mayores rendimientos.

Tabla 20: Composición porcentual de los sustratos empleados en el cultivo de las dos cepas de *L. edodes* (L5 y L9) y eficiencia biológica obtenida al rendimiento máximo significativo para cada sustrato y cepa.

Componentes del sustrato	Sustratos evaluados									
	1*	2**	3	4	5	6	7	8	9	
Aserrín		50		40	20	50	50	50	60	
Cascarilla de algodón	80	36	70	40	60	34	38	36	26	
Mijo		6				6	6	6	6	
Salv. de trigo	16	6	26	16	16					
Sorgo molido						6	6	6	6	
Sulfato de amonio		0.5						0.5	0.5	
Ácido cítrico		0.5						0.5	0.5	
Benlate		1						1	1	
CaCO ₃	3		3	3	3	3				
CaSO ₄	1		1	1	1	1				
Resultados de eficiencias biológicas al rendimiento máximo significativo (g de hongo fresco/100 g de sustrato seco)										
Cepas	L5	SC	79.4±28 d	9.7±12 a	70.3±28 cd	67.3±24 cd	47.8±9 bcd	44.3±7 bc	48.4 ±13 bcd	31.0±31 ab
	L9	SC	101.3±27 e	27.2±5 a	88.9±15 de	65.7±23 bc	53.6±13 b	66.7±10 bc	72.6±9 bcd	84.5±20 cde
Contaminación durante la incubación (%)	L5	25	0	9	0	0	0	10	50	60
	L9	25	0	9	0	50	0	0	0	0
Sustratos con mayores EB para cada cepa (sin diferencias significativas entre ellos).										

1* Sustrato muy productivo para *P. eryngii*.

2** Sustrato recomendado por Hongos Leben para el cultivo de shiitake.

SC Sin crecimiento micelial.

8.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS POR COMPONENTE DEL SUSTRATO.

8.6.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CASCARILLA DE ALGODÓN

El uso de cascarilla de algodón en diferentes proporciones se estudió en los primeros cinco sustratos evaluados. La concentración más alta de 80% fue evaluada considerando que en un trabajo previo donde se cultivó *Pleurotus eryngii* (hongo que degrada lignina y celulosa) bajo condiciones semejantes al cultivo de *Lentinula* dicha concentración de cascarilla resultó ser el sustrato más productivo para dicho hongo (Márquez Mota, 2009). El límite inferior de la concentración de cascarilla (36%) se tomó de las recomendaciones indicadas para el cultivo de *Lentinula edodes* en forma comercial.

☹ 80% de cascarilla de algodón.

Para esta concentración se observó que el crecimiento micelial fue nulo para las dos cepas (sustrato 1), es decir altas concentraciones de cascarilla de algodón no permitieron el desarrollo del micelio en todas las réplicas en las dos cepas evaluadas.

☹ 70% de cascarilla de algodón

El sustrato 3 con un 70% cascarilla de algodón permitió el crecimiento micelial del hongo y el paso de los sustratos a la etapa de fructificación. Sin embargo, los rendimientos para las dos cepas fueron los más bajos (10 y 27%). Esto indica que altas concentraciones de cascarilla de algodón sin aserrín producen muy bajos rendimientos o incluso no hay desarrollo micelial en el sustrato.

☹ 60% de cascarilla de algodón

El sustrato 5 con 60% de cascarilla de algodón se observó diferencia en la cepa utilizada ya que para la cepa L5 se produjeron rendimientos semejantes al sustrato 2 con 36% de cascarilla de algodón. Sin embargo, para la cepa L9, dicha concentración de cascarilla de algodón no está considerada entre los sustratos más productivos. Estos resultados sugieren que la cepa L5 se adapta mejor a altas concentraciones de cascarilla de algodón siempre y cuando haya aserrín en el sustrato.

☹ 40% de cascarilla de algodón

En el sustrato 4 se tiene la misma concentración de aserrín y cascarilla de algodón (40% para los dos componentes). Esta formulación produjo eficiencias biológicas estadísticamente similares al sustrato "2" o sustrato control (36% cascarilla de algodón)

para las dos cepas, siendo al igual que el sustrato control uno de los mejores sustratos para las dos cepas.

38% de cascarilla de algodón

El sustrato 7 con 38% de cascarilla de algodón produjo bajos rendimientos para las dos cepas, sin embargo es probable que esto se deba a la falta de complementos en dicho sustrato (sulfato de amonio, ácido cítrico y Benlate o CaCO_3 y CaSO_4)

36% de cascarilla de algodón

En el sustrato 2 con 36% de cascarilla de algodón se produjeron las más altas eficiencias biológicas para las dos cepas.

En el sustrato 8 con 36% de cascarilla de algodón se observó que para la cepa L5 no existe diferencia significativa al compararlo con el sustrato control (sustrato 2). Sin embargo, para la cepa L9 se observó una disminución significativa en la eficiencia biológica. Cabe mencionar que el único cambio con respecto al sustrato 2 es el uso de sorgo molido en lugar de salvado de trigo.

34% de cascarilla de algodón

El sustrato 6 con 34% de cascarilla de algodón produjo una alta eficiencia biológica para la cepa L5 y bajos rendimientos para la cepa L9.

26% de cascarilla de algodón

El sustrato 9 con 26% de cascarilla de algodón produjo una alta eficiencia biológica para la cepa L9 y bajos rendimientos para la cepa L5.

7.6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ASERRÍN.

60% de aserrín

En el sustrato 9 la concentración de aserrín utilizada fue la más alta, con un porcentaje de 60. Esta concentración de aserrín produjo altas eficiencias biológicas para la cepa L9 y bajos rendimientos para la cepa L5.

50% de aserrín

Esta concentración de aserrín se utilizó en los sustratos 2, 6, 7 y 8, el sustrato 2 es uno de los mejores para las dos cepas mientras que el sustrato 6 es uno de los mejores solamente para la cepa L5, al igual que el sustrato 8. En el sustrato 7 no se obtuvieron buenos resultados para ninguna de las dos cepas.

40% de aserrín

En el sustrato 4 se evaluó esta concentración de aserrín, para las dos cepas y fue en este sustrato donde se obtuvieron las mayores eficiencias biológicas.

20% de aserrín

En el sustrato 5 se evaluó esta concentración y se obtuvo un valor de eficiencia biológica estadísticamente similar al más alto para la cepa L5, mientras que para la cepa L9 no fue estadísticamente similar al mayor valor obtenido.

0% de aserrín

Esta concentración se probó en los sustratos 1 y 3, siendo en ambos casos la concentración de aserrín menos recomendable para el cultivo de shiitake. Así en el sustrato 1 no se logró tener invasión micelial y en el sustrato 3 se obtuvieron los valores más bajos de eficiencia biológica para las dos cepas.

8.6.3 EFECTO DEL USO DE COMPLEMENTOS.

Uso salvado de trigo o sorgo molido

Como se menciona en los antecedentes se sabe que el uso de salvado de trigo o sorgo molido se utiliza en forma indistinta (Mireles Palomares y López García (2005)). Así en el sustrato 2 (control), donde se usó 6% de salvado de trigo en comparación con los sustratos 6, 7, 8 y 9 donde se sustituyó por 6% de sorgo molido. En el sustrato 8 en donde el cambio en este complemento es la única variación con respecto al sustrato control (sustrato 2) se observa que hay una disminución significativa en la EB de la cepa L9, mientras que para la cepa L5 no se observa disminución significativa.

Uso de mijo

Se usó en los sustratos 2, 5, 6, 7, 8 y 9 a una concentración de 6%, mientras que en los sustratos 1, 3, 4 y 5 no se utilizó este componente. Se observa que para las dos cepas se tienen buenos rendimientos en sustratos con y sin mijo como se hace evidente en los sustratos 2 y 4, en donde en el sustrato 2 se utilizó mijo, mientras que en el sustrato 4 no se utilizó mijo.

Uso de CaCO_3 y CaSO_4 o ácido cítrico, sulfato de amonio y benlate como complementos.

En general se puede decir que es posible utilizar cualquiera de los dos tipos de complementos. Se observa que para las dos cepas se tienen buenos rendimientos al utilizar de manera indistinta uno u otro tipo de complementos (así en el sustrato 2 se utiliza ácido cítrico, sulfato de amonio y Benlate, mientras que en el sustrato 4 se utiliza CaCO_3 y CaSO_4). Sin embargo en el sustrato 7 donde se mantuvo la composición de cascarilla de algodón y aserrín semejantes al sustrato control y se suprimió el uso todos los complementos se observó un descenso estadísticamente significativo en la eficiencia biológica de las dos cepas.

Uso de benlate como fungicida

Se utilizó benlate a una concentración de 1% en los sustratos 2, 8 y 9. La cepa L9 no presentó sustratos contaminados durante la etapa de incubación, mientras que la cepa L5 en el sustrato 2 no presentó contaminaciones, pero en los sustratos 8 y 9 presentó un 50 y 60% de contaminaciones. Para los sustratos en donde no se utilizó benlate (1, 3, 4, 5, 6 y 7) en general se observó nula o muy bajo nivel de contaminación, con excepción del sustrato 5, cepa L9 donde se observó una contaminación del 50%.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo una eficiencia biológica acumulada al rendimiento máximo significativo para la cepa L5 de 79.4 ± 28 en el sustrato 2 en la octava semana de cosecha, mientras que para la cepa L9 fue de 101.3 ± 27 en ese mismo sustrato (cuya composición fue de 50% de aserrín y 36% de cascarilla de algodón) en la séptima semana de cosecha.

La incorporación de cascarilla de algodón como uno de los componentes principales en la formulación del sustrato produjo un incremento significativo en la EB comparado con el trabajo de Mireles Palomares y López García (2005) donde la cepa L5 produjo una EB al rendimiento máximo significativo de 35.5 ± 6 en un sustrato con 60% de aserrín y sin cascarilla de algodón y la cepa L9 dio una EB al RMS de 77.5 ± 2 en un sustrato con 50% de aserrín y sin cascarilla de algodón.

Por otro lado en el trabajo de Ayala Piña (2008) se utilizó el sustrato más productivo del reporte de Mireles Palomares y López García (2005) y al utilizar cepas que no habían sido sometidas a resiembras sucesivas se obtuvieron eficiencias biológicas al RMS semejantes a los valores obtenidos en este trabajo (para la cepa L5 fue de 90.4 ± 17 con respecto a 79.4 ± 28 y para la cepa L9 fue de 114.05 ± 12 con respecto a 101.3 ± 27).

Finalmente al compara con el trabajo de Ramírez Carrillo y Leal Lara (2002) nuestros valores de EB al RMS fueron significativamente menores a los de dicho trabajo (así para la cepa L5 ellos reportan una EB de 143.9 ± 11 al tercer brote y para la cepa L9 de 261.3 ± 7 al tercer brote). Sin embargo en ese trabajo no se menciona la composición del sustrato utilizado.

Con respecto al comportamiento de las cepas en las investigaciones previas realizadas en el laboratorio se observa que la cepa L9 es más productiva que la cepa L5, lo cual también se confirmó en este trabajo.

Al compara nuestros resultados con investigaciones realizadas en otros centros de investigación se ha observado una tendencia a disminuir la cantidad de aserrín para incorporar a la formulación del sustrato otros componentes para tratar de incrementar los valores de eficiencia biológica. En este sentido se ha evaluado una gran cantidad de formulaciones con las que se han observado beneficios tales como: incrementos en la EB,

así como reducción en los costos de producción (al incorporar a los sustratos residuos agroindustriales que no tenían ningún uso).

Así en el trabajo de Fung & Franco, (2005) se evaluaron varios sustratos en los que se incorporaron diferentes residuos agroindustriales como: bagazo de caña de azúcar y residuos de algodón. La composición del sustrato fue de 78% del residuo, 20% de grano de trigo, 1% de azúcar y 1% de CaSO_4 . La cepa de *Lentinula edodes* utilizada se incubó durante 70 días. Como resultados reportan para el bagazo de caña de azúcar una EB de 94% y con el residuo de algodón de 47.4% en tiempos de producción de 148 días para el sustrato con bagazo de caña de azúcar y 127 días para el sustrato con residuos de algodón. Si comparamos con nuestras eficiencias biológicas observamos que nuestros rendimientos al utilizar cascarilla de algodón casi duplican sus valores con el sustrato que contenía residuo de algodón (EB de 79.4 y 101% con respecto a 47.4% de EB). Sin embargo al compara nuestros resultados con el sustrato donde ellos incluyeron bagazo de caña de azúcar se puede decir que en ambos casos se obtienen EB muy semejantes (EB de 79.4 y 101 con respecto a 94% de EB). Lo cual indica que los valores de EB obtenidos en este trabajo están dentro de los rangos reportados en la bibliografía.

Curveto y colaboradores (2005) han utilizado el residuo de la semilla de girasol para el cultivo de shiitake, debido a que este residuo se produce en forma abundante en la industria productora de aceite vegetal comestible.

Para evaluar su efecto sobre la producción del hongo shiitake evaluaron las siguientes formulación: Cáscara de semilla de girasol 37.5% (CSG), CaCO_3 0.5%, CaSO_4 2%, agua al 60% y pH 6, así como dos formulaciones adicionales con CSG y salvado de trigo en proporciones 8:2 y 9:1, en bolsas con 1.5 kg del sustrato inoculado al 7%. Los resultados de eficiencia biológica acumulada que reportaron fueron de 108% para el sustrato con 37.5% de CSG; 112% de EBA para el sustrato con CSG y salvado de trigo en proporción 8:2 y una EBA de 102% para el sustrato CSG y salvado de trigo en proporción 9:1. Estos resultados los obtuvieron en 55 días de cosecha y en general se observa que con los tres sustratos utilizados obtuvieron altas EBA en un tiempo menor a 8 semanas de fructificación, lo cual al ser comparado con nuestros resultados se observa que las eficiencias biológicas son muy semejantes y además en nuestro caso los rendimientos se obtuvieron a la séptima semana de cosecha.

Por otro lado Royse en el 2001 menciona que una formulación comúnmente utilizada en Estados Unidos para el cultivo de *L. edodes* es aquella que contiene aserrín como ingrediente basal, así como algunos otros componentes como paja, mazorcas de maíz o ambos. También indica que se deben utilizar suplementos en concentraciones entre 10 y 60% y entre ellos incluye al salvado de trigo, salvado de arroz, mijo, centeno y maíz. Los sustratos así formulado producen una EBA entre 75 y 125%. Así observamos que los resultados de nuestro trabajo concuerdan con lo mencionado por Royse (2001). Es decir en el sustrato donde se obtuvieron los mayores rendimientos (50% aserrín, 36% cascarilla de algodón, 6% mijo, 6% salvado de trigo, 0.5% sulfato de amonio, 0.5% ácido cítrico, 1% benlate) se utilizó como componente basal el aserrín y los suplemento empleados están incluidos dentro de los mencionados (a excepción de la cascarilla de algodón) y en la proporción sugerida (10 a 60%). Bajo estos parámetros los valores de EBA obtenidos en este trabajo (79 y 101%) también entran dentro del rango mencionado (75 a 125%).

Fue posible tener buenos rendimientos suplementando con cascarilla de algodón ya que se obtienen resultados de EB dentro de los rangos reportados por otros autores que utilizan distintos tipos de suplementos para el cultivo de *L. edodes*.

10. CONCLUSIONES

- ☹ La incorporación de la cascarilla de algodón como uno de los componentes principales permitió un aumento en la EB comparada con trabajos previos en el laboratorio.
- ☹ La cepa L5 creció mejor en un sustrato con mayor concentración de cascarilla de algodón (60%)
- ☹ Muy altas concentraciones de cascarilla de algodón (80%) no permiten el crecimiento micelial de *L. edodes*.
- ☹ Las cepas evaluadas de *Lentinula edodes* L5 y L9 crecen bien a concentraciones de cascarilla de algodón entre 36 y 40%, con un contenido de aserrín de encino entre 40 y 50%.
- ☹ La cepa L9 creció mejor en un sustrato con mayor concentración de aserrín de encino (60%).
- ☹ Para la cepa L5 es indistinto el uso de salvado de trigo o sorgo molido, mientras que para la cepa L9 es más recomendable el uso de salvado de trigo.
- ☹ La composición del sustrato repercute directamente sobre la producción de hongos.
- ☹ En términos de rendimientos se observan mayores rendimientos al usar benlate, sulfato de amonio y ácido cítrico para la cepa L9, mientras que para la cepa L5 los rendimientos son semejantes.
- ☹ Por otro lado si no se utiliza ninguno de estos suplementos el riesgo de contaminación fue muy bajo (10% sólo para la cepa L5), pero la ausencia de este tipo de suplementos en el sustrato produjo una disminución considerable en los rendimientos (de 79 a 44% para la cepa L5 y de 101 a 66% para la cepa L9).
- ☹ Los requerimientos nutricionales de las cepas L5 y L9 de *Lentinula edodes* son diferentes.
- ☹ Los sustratos 2 y 4 fueron los más productivos para las dos cepas evaluadas.

ANEXO I: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR LA SEMANA DONDE SE ALCANZÓ EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO, PARA LAS CEPAS L5 Y L9 EN LOS 9 SUSTRATOS EVALUADOS

Todos los análisis de varianza y pruebas Duncan se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0. Los valores de F de tablas fueron tomados del libro Diseño y análisis de experimentos (Montgomery, 2004).

Cepa L5, sustrato 2:

En la Tabla 21 se observa que existe diferencia altamente significativa en los factores semana y replica por lo que se realizó la prueba Duncan para poder determinar la semana en la que se alcanzó el rendimiento máximo significativo. Es posible identificar la semana donde se alcanza observando la siguiente tabla donde se muestran los resultados de la prueba Duncan.

Tabla 21: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5 en el sustrato 2.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	19841.18	9	2204.58	33.03	2.00	2.63	**
Réplica	53481.19	9	5942.35	89.03	2.00	2.63	**
Error	5406.48	81	66.75				
Total	78728.85	99					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan en la Tabla 22 se observa que el paquete estadístico reportó 7 grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo empezando por la letra "a" para el primer grupo que corresponde a la primera semana de cosecha. El segundo grupo correspondió a la 2^{da} y 3^{ra} semana de cosecha y se le asignó la letra b. Esto significa que no existe diferencia significativa en la eficiencia biológica acumulada entre la segunda y tercer semana de cosecha, pero si existe diferencia significativa con la primera semana de cosecha. El tercer grupo que correspondió a la 3^{ra} y 4^{ta} semana de cosecha y se le asignó la letra "c". El cuarto correspondió a la 4^{ta}, 5^{ta} y 6^{ta} semana de cosecha y se asignó la letra "d". El quinto grupo correspondió a la 5^{ta}, 6^{ta} y 7^{ma} semana de cosecha y se asignó la letra "e". El sexto grupo

correspondió a la 7^{ma}, 8^{va} y 9^{na} semana de cosecha y se asignó la letra “f”. Finalmente el séptimo grupo correspondió a la 8^{va}, 9^{na} y 10^{ma} semana de cosecha y se asignó la letra “g”. Para determinar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso del grupo “g”, la primera semana corresponde a la octava semana de producción. Así después de la octava semana de producción, los incrementos en los rendimientos ya no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 22: Prueba Duncan para la cepa L5, sustrato 2.

Semana de cosecha	Grupos							Interpretación
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	36.49							36.49 ± 23.17 a
2		53.69						53.69 ± 22.60 b
3		56.93	56.93					56.93 ± 22.51 bc
4			63.16	63.16				63.16 ± 20.17 cd
5				68.73	68.73			68.73 ± 20.70 de
6				69.56	69.56			69.56 ± 20.61 de
7					74.93	74.93		74.93 ± 26.97 ef
8						79.42	79.42	79.42 ± 26.21 fg
9						81.76	81.76	81.76 ± 28.46 fg
10							84.77	84.77 ± 30.06 g
	Semana donde se alcanza el rendimiento máximo significativo							

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas en la EBA entre las semanas de cosecha (Duncan $\alpha= 0.05$).

Cepa L9, sustrato 2:

En la Tabla 23 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 23: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 2.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	17653.53	9	1961.50	29.16	2.00	2.63	**
Réplica	47397.03	9	5266.34	78.28	2.00	2.63	**
Error	5449.04	81	67.27				
Total	70499.61	99					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "V" o "e", la primera semana corresponde a la séptima semana de producción. Así después de la séptima semana de producción, los incrementos en los rendimientos ya no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 24: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 2

Semana de cosecha	Grupos					Interpretación
	I	II	III	IV	V	
1	64.91					64.91 ± 18.90 a
2		73.23				73.23 ± 18.27 b
3		80.34	80.34			80.34 ± 19.87 bc
4			85.39	85.39		85.39 ± 21.65 cd
5				90.84		90.84 ± 21.21 d
6				91.84		91.84 ± 22.15 d
7					101.32	101.32 ± 27.05 e
8					101.38	101.38 ± 27.76 e
9					103.88	103.88 ± 29.20 e
10					106.49	106.49 ± 31.96 e
	Semana donde se alcanza el rendimiento máximo significativo.					

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 3:

En la Tabla 25 se observó que no existe diferencia significativa para la variable semana. Se tomó el resultado de Eficiencia biológica de la primera semana como la semana donde se obtuvo el rendimiento máximo significativo, para L5 en el sustrato 3.

Tabla 25: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 3.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	667.03	6	111.17	1.80	2.66	4.01	NS
Réplica	2696.18	3	898.73	14.59	3.16	5.09	**
Error	1109.04	18	61.61				
Total	4472.23	27					

NS No existe diferencia significativa.

****** Existe diferencia altamente significativa.

El valor de la Eficiencia biológica de la primera semana es de 9.7 ± 12 por lo que este valor se utilizó como rendimiento máximo significativo.

Cepa L9, sustrato 3:

En la Tabla 26 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 26: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 3.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	2037.14	5	407.43	25.78	2.60	3.85	**
Réplica	818.15	5	163.63	10.35	2.60	3.85	**
Error	395.08	25	15.80				
Total	3250.38	35					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 2 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "II" o "b", la primera semana corresponde a la segunda semana de producción. Así después de la segunda semana de producción los incrementos en los rendimientos ya no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 27: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 3.

Semana de cosecha	Grupos		Interpretación
	I	II	
1	7.18		7.18 ± 11.17 a
2		27.22	27.22 ± 4.81 b
3		27.40	27.41 ± 4.87 b
4		27.40	27.41 ± 4.87 b
5		27.40	27.41 ± 4.87 b
6		27.40	27.41 ± 4.87 b
	Semana con rendimiento máximo significativo		

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan α = 0.05).

Cepa L5, sustrato 4:

En la Tabla 28 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 28: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	34643.89	9	3849.32	31.51	2.00	2.63	**
Réplica	47277.97	9	5253.11	43.00	2.00	2.63	**
Error	9895.86	81	122.17				
Total	91817.73	99					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "V" o "e", la primera semana corresponde a la sexta semana de producción. Así después de la sexta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 29: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 4.

Semana de cosecha	Grupos					Interpretación
	I	II	III	IV	V	
1	19.79					19.79 ± 7.64 a
2		51.32				51.32 ± 21.04 b
3		53.49				53.49 ± 20.06 b
4		55.76	55.76			55.76 ± 22.26 bc
5			62.97	62.97		62.97 ± 26.72 cd
6				70.30	70.30	70.30 ± 28.23 de
7					73.08	73.08 ± 28.06 e
8					75.26	75.26 ± 29.38 e
9					75.56	75.56 ± 29.29 e
10					75.95	75.95 ± 29.26 e
	Semana con rendimiento máximo significativo					

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 4:

En la Tabla 30 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 30: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	82152.97	9	9128.11	60.79	1.99	2.63	**
Réplica	8757.75	10	875.77	5.83	2.04	2.72	**
Error	13514.36	90	150.16				
Total	104425.08	109					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 6 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "VI" o "f", la primera semana corresponde a la séptima semana de producción. Así después de la séptima semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 31: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 4

Semana de cosecha	Grupos						Interpretación
	I	II	III	IV	V	VI	
1	9.73						9.73 ± 9 a
2		40.10					40.10 ± 11 b
3		49.10	49.10				49.10 ± 10 bc
4			58.77				58.77 ± 13 c
5				71.51			71.51 ± 12 d
6				79.88	79.88		79.88 ± 16 de
7					88.9	88.9	88.9 ± 15 ef
8						95.89	95.89 ± 19 f
9						95.89	95.89 ± 19 f
10						96.61	96.61 ± 21 f
	Semana con rendimiento máximo significativo						

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan, $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 5:

En la Tabla 32 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 32: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 5.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	38719.03	9	4302.11	29.39	2.00	2.63	**
Réplica	33392.07	9	3710.23	25.35	2.00	2.63	**
Error	11855.26	81	146.36				
Total	83966.36	99					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 7 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "VII" o "g", la primera semana corresponde a la séptima semana de producción. Así después de la séptima semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 33: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 5.

Semana de cosecha	Grupos							Interpretación
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	13.85							13.85 ± 13.67 a
2		25.83						25.83 ± 19.57 b
3		35.94	35.94					35.94 ± 19.68 bc
4			43.57	43.57				43.57 ± 21.97 cd
5				52.32	52.32			52.32 ± 27.44 de
6					61.42	61.42		61.42 ± 26.00 ef
7						67.26	67.26	67.26 ± 24.41 fg
8						67.26	67.26	67.26 ± 24.41 fg
9						71.81	71.81	71.81 ± 22.13 fg
10							73.47	73.47 ± 22.11 g
	Semana con rendimiento máximo significativo							

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 5:

En la Tabla 34 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 34: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 5.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	21819.83	9	5454.96	27.53	2.18	3.00	**
Réplica	15313.70	4	1701.52	88.27	2.66	3.95	**
Error	2224.69	36	61.80				
Total	39358.21	49					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "IV" o "d", la primera semana corresponde a la sexta semana de producción. Así después de la sexta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 35: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 5.

Semana de cosecha	Grupos				Interpretación
	I	II	III	IV	
1	30.96				30.96 ± 15.09 a
2	41.28	41.28			41.29 ± 18.69 ab
3		43.89			43.89 ± 18.35 b
4		44.07			44.07 ± 26.81 b
5			59.26		59.26 ± 23.27 c
6			65.66	65.66	65.66 ± 22.70 cd
7			68.98	68.98	68.98 ± 24.22 cd
8			68.98	68.98	68.98 ± 24.22 cd
9				72.58	72.58 ± 26.80 d
10				72.93	72.93 ± 27.21 d
	Semana con rendimiento máximo significativo				

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 6:

En la Tabla 36 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 36: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 6.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	12003.61	9	1333.73	16.82	2.15	2.95	**
Réplica	5677.49	4	1419.37	17.90	2.63	3.89	**
Error	2854.65	36	79.30				
Total	20535.75	49					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "IV" o "d", la primera semana corresponde a la sexta semana de producción. Así después de la sexta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 37: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 6.

Semana de cosecha	Grupos				Interpretación
	I	II	III	IV	
1	4.78				4.78 ± 10.71 a
2		21.75			27.15 ± 16.75 b
3		26.65			33.32 ± 16.13 b
4			38.42		38.42 ± 13.56 c
5			43.41		43.41 ± 15.06 c
6			47.85	47.85	47.85 ± 8.93 cd
7			50.67	50.67	50.67 ± 9.39 cd
8				51.78	51.78 ± 9.37 d
9				51.78	51.78 ± 9.37 d
10				53.78	53.78 ± 11.52 d
	Semana con rendimiento máximo significativo				

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 6:

En la Tabla 38 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 38: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 6.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	27425.84	9	3047.31	38.76	2.02	2.76	**
Réplica	4915.49	6	819.25	10.42	2.27	3.16	**
Error	4244.96	54	78.61				
Total	36586.28	69					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 6 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "VI" o "f", la primera semana corresponde a la sexta semana de producción. Así después de la sexta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 39: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 6.

Semana de cosecha	Grupos						Interpretación
	I	II	III	IV	V	VI	
1	0.00						0.00 ± 0.0 a
2		23.50					23.50 ± 15.70 b
3			33.54				33.54 ± 12.64 c
4			36.95	36.95			36.95 ± 11.17 cd
5				44.57	44.57		44.57 ± 10.49 de
6					53.64	53.64	53.64 ± 13.52 ef
7					54.17	54.17	54.17 ± 14.02 ef
8						64.05	64.05 ± 12.99 f
9						64.05	64.05 ± 12.99 f
10						64.05	64.05 ± 12.99 f
	Semana con rendimiento máximo significativo						

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 7:

En la Tabla 40 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 40: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 7.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	11322.73	9	1258.08	14.23	2.25	3.15	**
Réplica	1579.96	3	526.65	5.95	2.96	4.60	**
Error	2387.76	27	88.43				
Total	15290.45	39					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "IV" o "d", la primera semana corresponde a la quinta semana de producción. Así después de la quinta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 41: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 7.

Semana de cosecha	Grupos				Interpretación
	I	II	III	IV	
1	2.75				2.75 ± 5.5 a
2		26.19			26.19 ± 17.55 b
3		38.97	38.97		38.97 ± 1.90 bc
4		38.97	38.97		38.97 ± 1.90 bc
5			44.31	44.31	44.31 ± 6.05 cd
6			53.88	53.88	53.88 ± 13.54 cd
7			53.88	53.88	53.88 ± 13.54 cd
8				57.67	57.67 ± 10.53 d
9				57.67	57.67 ± 10.53 d
10				58.09	58.09 ± 10.30 d
	Semana con rendimiento máximo significativo				

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 7:

En la Tabla 42 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 42: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 7.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	25189.81	9	2798.87	33.46	2.06	2.76	**
Réplica	3884.31	6	647.38	7.74	2.27	3.16	**
Error	4516.54	54	83.64				
Total	33590.66	69					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "IV" o "d", la primera semana corresponde a la octava semana de producción. Así después de la octava semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 43: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 7.

Semana de cosecha	Grupos				Interpretación
	I	II	III	IV	
1	0.0				0.0 ± 0.0 a
2		34.94			34.94 ± 19.04 b
3			44.81		44.81 ± 11.46 c
4			45.59		45.59 ± 10.86 c
5			46.42		46.42 ± 12.48 c
6			52.68		52.68 ± 13.39 c
7			53.95		53.95 ± 12.88 c
8				66.69	66.69 ± 9.78 d
9				66.69	66.69 ± 9.78 d
10				66.69	66.69 ± 9.78d
	Semana con rendimiento máximo significativo				

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 8:

En la Tabla 44 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 44: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 8.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	19520.82	9	2168.98	35.18	2.15	2.95	**
Réplica	2561.32	4	640.33	10.39	2.63	3.89	**
Error	2219.79	36	61.66				
Total	24301.93	49					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "IV" o "d", la primera semana corresponde a la sexta semana de producción. Así después de la sexta semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 45: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 8.

Semana de cosecha	Grupos				Interpretación
	I	II	III	IV	
1	0.00				0.0 ± 0.0 a
2	4.63				4.63 ± 10.36 a
3		30.94			30.94 ± 20.53 b
4		38.78	38.78		38.78 ± 9.90 bc
5			43.08		43.08 ± 10.37 c
6			48.40	48.40	48.40 ± 12.62 cd
7				54.10	54.10 ± 6.75 d
8				54.10	54.10 ± 6.75 d
9				54.41	54.41 ± 6.44 d
10				57.45	57.45 ± 8.23 d
	Semana con rendimiento máximo significativo				

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan, $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 8:

En la Tabla 46 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 46: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 8.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	33734.05	9	3748.23	58.54	2.06	2.76	**
Replica	3109.08	6	518.18	8.09	2.27	3.16	**
Error	3457.77	54	64.03				
Total	40300.90	69					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "V" o "e", la primera semana corresponde a la séptima semana de producción. Así después de la séptima semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 47: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 8.

Semana de cosecha	Grupos					Interpretación
	I	II	III	IV	V	
1	0.0					0.0 ± 0.0 a
2		46.88				46.88 ± 21.36 b
3			61.88			61.88 ± 8.27 c
4			61.88			61.88 ± 8.27 c
5			67.35	67.35		67.35 ± 6.04 cd
6			68.45	68.45		68.45 ± 8.45 cd
7				72.58	72.58	72.58 ± 9.30 de
8				73.54	73.54	73.54 ± 8.84 de
9				73.54	73.54	73.54 ± 8.84 de
10					79.83	79.83 ± 12.28 e
	Semana con rendimiento máximo significativo					

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L5, sustrato 9:

En la Tabla 48 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 48: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L5, en el sustrato 9.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	9661.74	9	1073.53	11.83	2.46	3.60	**
Réplica	3855.09	2	1927.54	21.24	3.55	6.01	**
Error	1633.72	18	90.76				
Total	15150.54	29					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 2 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "II" o "b", la primera semana corresponde a la tercera semana de producción. Así después de la tercera semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 49: Prueba Duncan para la cepa L5 en sustrato 9.

Semana de cosecha	Grupos		Interpretación
	I	II	
1	0.0		0.0 ± 0.0 a
2	0.0		0.0 ± 0.0 a
3		30.99	30.99 ± 31.0 b
4		41.26	41.26 ± 14.33 b
5		42.95	42.95 ± 13.34 b
6		42.95	42.95 ± 13.34 b
7		46.87	46.87 ± 12.58 b
8		46.87	46.87 ± 12.58 b
9		47.41	47.41 ± 15.67 b
10		47.41	47.41 ± 15.67 b
Semana con rendimiento máximo significativo			

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

Cepa L9, sustrato 9:

En la Tabla 50 se observó que existen diferencias altamente significativas para las variables semana y réplica. Por ello se realizó la prueba Duncan para la variable semanas y así determinó la semana en donde se obtiene el rendimiento máximo significativo.

Tabla 50: Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica acumulada durante 10 semanas de cosecha, para la cepa L9, en el sustrato 9.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Semana	43634.60	9	4848.29	22.979	2.10	2.83	**
Réplica	17441.13	5	3488.23	16.533	2.42	3.45	**
Error	9494.43	45	210.99				
Total	70570.16	59					

** Existe diferencia altamente significativa.

Como resultado de la prueba de Duncan el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para identificar la semana donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se consideró la primera semana del último grupo. En este caso para el grupo "V" o "e", la primera semana corresponde a la séptima semana de producción. Así después de la séptima semana los incrementos en los rendimientos ya no son estadísticamente significativos.

Tabla 51: Prueba Duncan para la cepa L9 en sustrato 9.

Semana de cosecha	Grupos					Interpretación
	I	II	III	IV	V	
1	0.00					0.00 ± 0.0 a
2		51.86				51.86 ± 37.78 b
3		62.79	62.79			62.79 ± 38.38 bc
4			76.29	76.29		76.29 ± 19.95 cd
5			77.52	77.52		77.52 ± 18.20 cd
6			78.13	78.13		78.13 ± 17.91 cd
7				84.54	84.54	84.54 ± 19.75 de
8				88.30	88.30	88.30 ± 18.98 de
9				89.86	89.86	89.86 ± 17.97 de
10					99.94	99.95 ± 19.02 e
	Semana con rendimiento máximo significativo					

Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

ANEXO II: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LAS CEPAS L5 Y L9.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO EN EL PRIMER EXPERIMENTO.

Para determinar el mejor sustrato (2, 3, 4 y 5) para las dos cepas en el primer experimento, se realizó un análisis de varianza considerando los valores de eficiencia biológica acumulada para la semana donde se obtuvo el RMS (Anexo I). En la Tabla 52 se presenta el análisis de varianza realizado para identificar si existe diferencia entre los sustratos y las cepas para el primer experimento. Como resultado del análisis de varianza se encontró diferencia altamente significativa entre los sustratos evaluados y diferencia significativa entre las cepas. Para identificar el mejor sustrato se realizó la prueba de Duncan y como resultado se observa que los sustratos 2 y 4 fueron los más productivos. Para las cepas observando su valor promedio se sabe que la cepa L9 fue más productiva que la cepa L5 (Tabla 53).

Tabla 52: Análisis de varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica acumulada de las cepas L5 y L9 en los cuatro sustratos evaluados en el primer experimento.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Sustratos	36362.74	3	12120.92	22.93	2.76	4.12	**
Cepas	3714.24	1	3714.24	7.02	4.00	7.07	*
Error	32248.22	61	528.66				
Total	71237.05	65					

* Existe diferencia significativa

**Existe diferencia altamente significativa

Tabla 53: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para cada cepa en los cuatro sustratos evaluados en el primer experimento.

Cepas	Eficiencia biológica acumulada al RMS				Promedio por cepa
	Sustratos				
	2	3	4	5	
L5	79.42 ± 28	9.74 ± 12	70.30 ± 28	67.26 ± 24	64.96 ± 32 a
L9	101.33 ± 27	27.21 ± 5	88.89 ± 15	65.68 ± 23	77.58 ± 33 b
Promedio por sustrato	90.37 ± 29 c	20.23 ± 12 a	80.04 ± 24 bc	66.73 ± 23 b	
RMS: Rendimiento Máximo Significativo					

Letras diferentes en los valores promedio de cepas y sustratos indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO.

Para determinar el mejor sustrato (6, 7, 8 y 9) para las dos cepas en el segundo experimento, se realizó un análisis de varianza considerando los valores de eficiencia biológica acumulada para la semana donde se obtuvo el RMS (anexo I). Se encontró que existe diferencia altamente significativa en entre las cepas utilizadas pero no se encontró diferencia significativa entre los sustratos utilizados, además se encontró una diferencia altamente significativa en la interacción sustratos y cepas, razón por la cual fue necesario analizar los resultados para las 2 cepas en los 4 sustratos evaluados. En la Tabla 55 se presentan los valores de la EBA de las dos cepas, en los 4 sustratos evaluados en el segundo experimento. Para identificar el mejor sustrato para cada cepa se realizó la prueba de Duncan y como resultado se observa que para la cepa L5 los mejores sustratos fueron el 6 y el 8 (letra "c") y para la cepa L9 fueron los sustratos 7, 8 y 9 (letra "e").

Tabla 54: Análisis de varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de las cepas L5 y L9 en los sustratos evaluados en segundo experimento.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Sustratos	585.35	3	195.12	0.97	2.87	4.38	NS
Cepas	7106.43	1	7106.43	35.44	4.11	7.40	**
Sustratos x Cepas	2719.95	3	906.65	4.52	2.87	4.38	**
Error	7217.88	36	200.50				
Total	17436.91	43					

**Existe diferencia altamente significativa

NS No existe diferencia significativa

Tabla 55: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para cada cepa en los cuatro sustratos evaluados en el segundo experimento.

Cepas	Eficiencia biológica acumulada al RMS				Promedio por cepa
	Sustratos				
	6	7	8	9	
L5	47.85 ± 9 abc	44.31 ± 7 ab	48.4 ± 13 abc	31.0 ± 31 a	44.2 ± 15 a
L9	53.64 ± 13 bcd	66.7 ± 10 cde	72.6 ± 9 de	84.5 ± 20 de	68.8 ± 17 b

RMS: Rendimiento Máximo Significativo

Letras diferentes en los valores promedio de cepas y sustratos indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LAS CEPAS L5 Y L9 POR SEPARADO EN LOS DOS EXPERIMENTOS.

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia entre los factores Cepa y Sustrato, y conocer si es que existe una interacción entre ellos.

Tabla 56: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de las cepas L5 y L9 en los sustratos de los dos experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Sustratos	42089.21	7	6012.74	14.78	2.11	2.84	**
Cepas	9806.30	1	9806.30	24.11	3.94	6.91	**
Sustratos x Cepas	4464.06	7	637.72	1.57	2.11	2.84	NS
Error	38229.74	94	406.70				
Total	43125.73	109					

**Existe diferencia significativa.

NS No existe diferencia significativa.

Se observó que existe diferencia altamente significativa en el sustrato utilizado así como en la cepa utilizada, no se observó una interacción significativa entre los factores, por lo que se realizó la prueba de Duncan para cada cepa en todos los sustratos por separado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LA CEPA L5 EN LOS SUSTRATOS DE LOS DOS EXPERIMENTOS.

Para determinar el mejor sustrato para la cepa L5 en los dos experimentos, se realizó un análisis de varianza considerando los valores de eficiencia biológica acumulada para la semana donde se obtuvo el RMS (Anexo I). En la Tabla 57 se presenta el análisis de varianza realizado para identificar si existe diferencia entre el sustrato utilizado en los dos experimentos. Como resultado del análisis de varianza se encontró diferencia altamente significativa entre los sustratos evaluados. En la tabla 58 se presentan los valores de EBA de L5 en los dos experimentos. Para identificar el mejor sustrato se realizó la prueba de Duncan y como resultado se observa que los sustratos 6, 8, 5, 4 y 2 (letra "d") fueron los más productivos para la cepa L5.

Tabla 57: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de la cepa L5 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Sustrato	20187.93	7	2883.99	5.41	2.23	3.09	**
Error	22937.79	43	533.44				
Total	43125.73	50					

**Existe diferencia significativa.

Tabla 58: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para la cepa L5 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.

Cepa	Eficiencia biológica acumulada al RMS							
	Sustratos							
	2	3	4	5	6	7	8	9
L5	79.42 ± 28 cd	9.7 ± 12 a	70.30 ± 28 d	67.26 ± 24 cd	47.85 ± 9 bcd	44.31 ± 7 bc	48.4 ± 13 bcd	31.0 ± 31 ab

RMS: Rendimiento Máximo Significativo

Letras diferentes en los valores promedio de cepas y sustratos indican diferencias significativas (Duncan $\alpha = 0.05$).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IDENTIFICAR EL MEJOR SUSTRATO PARA LA CEPA L9 EN LOS SUSTRATOS DE LOS DOS EXPERIMENTOS.

Para determinar el mejor sustrato para la cepa L9 en los dos experimentos, se realizó un análisis de varianza considerando los valores de eficiencia biológica acumulada para la semana donde se obtuvo el RMS (Anexo I). En la Tabla 59 se presenta el análisis de varianza realizado para identificar si existe diferencia entre el sustrato utilizado en los dos experimentos. Como resultado del análisis de varianza se encontró diferencia altamente significativa entre los sustratos evaluados. En la tabla 60 se presentan los valores de EBA de L9 en los dos experimentos. Para identificar el mejor sustrato se realizó la prueba de Duncan y como resultado se observa que los sustratos 9, 4 y 2 (letra “e”) fueron los más productivos para la cepa L9.

Tabla 59: Análisis de Varianza realizado a los resultados de eficiencia biológica de la cepa L9 en los sustratos de los dos experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculado	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Sustrato	27331.89	7	3904.55	13.02	2.25	3.12	**
Error	15291.95	51	299.84				
Total	42623.84	58					

**Existe diferencia significativa.

Tabla 60: Eficiencia biológica acumulada obtenida al rendimiento máximo significativo para la cepa L9 en los sustratos evaluados en los dos experimentos.

Cepa	Eficiencia biológica acumulada al RMS							
	Sustratos							
	2	3	4	5	6	7	8	9
L9	101.33 ± 27 e	27.21 ± 5 a	88.10 ± 15 de	65.68 ± 23 bc	53.64 ± 13 b	66.69 ± 10 bc	72.58 ± 9 bcd	84.5 ± 20 cde

RMS: Rendimiento Máximo Significativo

Letras diferentes en los valores promedio de cepas y sustratos indican diferencias significativas (Duncan, $\alpha = 0.05$).

11. BIBLIOGRAFÍA

- Amagase, H. (1987). Treatment of hepatitis B with *Lentinus edodes* mycelium. *Proceedings of the 12th International Congress of Gastroenterology*. Lisbon, 197.
- Aoki, T. (1984a). Antibodies to HTL VI and HTL VII in sera from two Japanese patients, one with possible pre-AIDS. *Lancet*, 20: 936-937.
- Aoki, T. (1984b). Lentinan. In: R. L. Fenchel, M. A. Chirgis (Ed.). *Immunology studies immune modulation agents and their mechanisms*, 25: 62-67.
- Ayala Piña, P. (2008). *Evaluación de la producción del hongo comestible Lentinula edodes (shiitake) en 2 tiempos de incubación con cepas almacenadas con y sin resiembras*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, Distrito Federal.
- Bernabé-González, T., G. Mata, M. Cayetano-Catarino, G. Reyes, (2006). Cultivo experimental del hongo Shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero México. *Revista Mexicana de Micología*, 23: 63-68.
- Chang, S. (2002). Past and present trends in the production of *Lentinula edodes*. In: Sánchez, J.E., G. Huerta, E. Montiel (Ed.). *Mushroom Biology and Mushroom Products, Proceedings of the fourth international conference*, UAEM, Cuernavaca, 1-8.
- Chen, A. W. (2005). What is Shiitake?. In: Mush World. *Mushroom growers Handbook 2 Shiitake cultivation* Seoul, Korea, 1-11.
- Chihara, G. (1970). Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. an edible mushroom. *Cancer research*, 30: 2776-2781.
- Curveto, N.R., D. Figlas, R. González Matute, S. Delmastro. (2005). Alternative substrate for Shiitake. In: Mush World. *Mushroom growers Handbook 2 Shiitake cultivation* Seoul, Korea, 127-133.
- Deposito de documentos de la FAO. 1988. *Atlas de ubicación de productos agropecuarios utilizables en la planificación y desarrollo de la acuicultura en México*.
- Fung, T., M. Franco. (2005). Evaluation of different Colombian agroindustrial wastes as substrates for the growth and production of *Lentinula edodes*. In: Tan et al (eds) *Fifth international conference on mushroom biology and mushroom products*, 285-290.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salomones, C. Soto, L. Guzmán. (2002). *El cultivo de los hongos comestibles*. 1°ed. IPN, Distrito Federal, 5-25.

- Hiramoto, B. T. (1991). Comparative analysis of Shiitake culture systems. *In: Maher (Ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 13: 489-595.
- Hahafusa, T. (1990). Intestinal absorption and tissue distribution of immunoactive and antiviral water-soluble [14C] lignins in rats. *Yakubutsu Dotai* 5: 661-574.
- Hyunjong, K., C. Hobbs. (2005). Nutritional and medicinal values of shiitake. *In: Mush World. Mushroom Growers' Handbook 2 Shiitake cultivation* Seoul, 12-21
- Izuka, C. (1990). Antiviral composition extracts from basidiomycetes. *European Patent Application EP 464,311*, CA, 116: 76531z.
- Jokilk, W. K., H. P. Willett, B. Amos, C.M. Wifert. (1994). *Zinsser Microbiología*. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Kalbeber, P. (2000). Influence of Urea and Ammonium Chloride on Crop Yield and Fruit Boby Size of Shiitake (*Lentinula edodes*)*In: Maher (Ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam: 509-516.
- Khan, S. J. (1991). Studies on Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). *In: Maher (Ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 13: 503-508.
- Kilpatrik, M. D.J. Murray, F Ward (2000). Influence of substrate formulation and autoclave treatment on *Lentinula edodes* production. *Mushroom Science*, 15: 803-810.
- Lasota, W., J. Sylwestrazk, (1989). Chemical composition of cultivated mushrooms. Part III. Shiitake *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Bromatol Chem. Toksykol* 22: 167-171.
- Liu, B., Y. Y. S. Bau. (1980). *Fungi Farmacopédia*. Oakland: Kinoko press.
- Márquez Mota, C. C. (2009). *Evaluación de la producción del hongo comestible Pleurotus eryngii empleando sustratos disponibles en México*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, Distrito Federal.
- Mireles Palomares, C., E. López García. (2005). *Evaluación de la producción del hongo comestible lentinula edodes (Shiitake) en sustratos de aserrín con suplementos*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, Distrito Federal.
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. México D.F. Limusa Wiley.
- Ramírez Carrillo, R., & H. Leal Lara, (2002). Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. *In: Sánchez, J.E., G. Huerta, E. Montiel (Ed.). Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the fourt international conference*. UAEM, Cuernavaca, 289-294.
- Royse, D. J. (2001). Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs. *Publications Distribution Center, The Pennsylvania State University* .

Sarkar, S. (1993). Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of Herpes simplex type I. *Antiviral Reserch*, 20:293-303.

Sorimachi, K. (1990). Antiviral activity of water-solubilized lignin derivates in vitro. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1337-1339.

Statements, P., J. S Chilton. (1983). *The mushroom cultivator: A practical guide to growing mushroom at home*. United States, Washington: Agarikon Press.

Susuki, H. (1989). Inhibition of the infectivity and cytopathic of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in a extract of the culture medium of *Lentinus edodes* micelia (LEM). *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*, 160: 367-373.

Toshikura, T. (1987). Suppression of human immunodeficiency virus replication by 3-azido-3-deoxythymidine in various human hematopoietic cell lines *in vitro*: argumentation by the effect of lentinan. *Japan Journal of Cancer Reserch. Gann*, 78: 583.

Yamamura, Y., K.W. Cochran. (1974). Chronic hypocoesterolemic effect of *Lentinus edodes* in mice and absence of effect on scrapie. *Mushroom Science IX (part I)*, 489-483.