

187



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

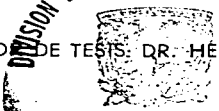
FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PRODUCCION DE HONGOS DE SHIITAKE (*Lentinula edodes*).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUAN ROVALO FLORES



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS: DR. HERMILO LEAL LARA.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.



GOBIERNO NACIONAL
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de hongos de Shiitake (Lentinula edodes)"

realizado por Juan Rovalo Flores

con número de cuenta 9250136-2, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Hermilo Leal Lara

Propietario M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo

Propietario M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Suplente Dr. Sigfrido Sierra Galván

Suplente Biol. Alfonso Montañez Arce

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

Dr. Eberto Novelo Maldonado

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

Primero doy gracias a Dios por su presencia y su gracia, por darnos este lugar tan maravilloso con bosques y lluvias con tanta belleza, con tantas formas colores, aromas, con estos seres que llamamos hongos, con esta capacidad nuestra de observar y darnos cuenta, con esta curiosidad que se hace ciencia para poder percibir con dulzura y asombro El Misterio.

Gracias a mis padres por todo, por ser como son, por darme siempre su tesoro mas grande, su enseñanza, su corazón y su amor.

Gracias a mis hermanos Pablo e Isabel por todo lo que hemos vivido, por compartir sin obstáculos ni juegos su propia experiencia, su creatividad y facilidad de reír, su amor.

Gracias a Hermilo Leal y a Rebeca Ramírez por su guía, apoyo y consejo, por su enseñanza, conocimiento y amistad, por su claridad y amor a la ciencia.

Gracias a todos mis maestros de la facultad y fuera de ella, todos me han enseñando el arte de aprender y de todos he aprendido.

Gracias a todos mis compañeros por compartir y andar este camino de continuo asombro y fascinación por la naturaleza.

Gracias Silvia por tu amor, tu magia, tu fuerza, por enseñarme a comunicar, a estar, a abrirme, a amar, gracias por concebir y permitir que Andrés llegara a nuestra vida.

Gracias Andrés por enseñarme a crecer y ser padre, de forma totalmente espontánea natural y amorosa.

Gracias Regina y León por invitarme a su familia, por enseñarme tantas cosas, y entre otras a terminar la tesis.

Gracias por tantos regalos, bendiciones, y gracias.

CONTENIDO

Resumen.	2
Introducción.	3
1. Antecedentes.	5
2. Justificación y objetivos.	12
3. Materiales y métodos.	13
4. Experimentos y resultados.	15
5. Discusión y conclusiones.	21
6. Tablas.	23
7. Fotografías.	40
8. Bibliografía.	49

Resumen

El cultivo tradicional de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. se realiza utilizando troncos y ramas gruesas de árboles de maderas duras (encino principalmente). Para la invasión de los troncos con el micelio de *Lentinula edodes*, éstos son perforados por medio de un taladro e inoculados con taquetes de madera (pequeños cilindros de 2 cm de largo x 1 cm Ø) previamente invadidos por el hongo. Una vez inoculados los troncos, la incubación tiene una duración de 8 meses a 1 año y el ciclo productivo se extiende de 4 a 6 años. Sin embargo, los rendimientos que se reportan son por lo general bajos (eficiencia biológica de 33%) (E.B.= g de hongos frescos/100 g de sustrato seco.) y se requiere de mucha mano de obra (Royse, 1997). Los altos costos de producción han sido reducidos con el desarrollo del cultivo en sustratos de aserrín estéril llamados artificiales y realizando el proceso bajo condiciones controladas con una duración de 4 – 6 meses. Bajo estas condiciones se han reportado E.B. que van de 40 a 100%. Las investigaciones realizadas para este hongo se han enfocado hacia la selección de cepas, la formulación de sustratos y tratamiento térmico del sustrato, sin embargo, existen muchos factores que pueden contribuir a incrementar o disminuir la eficiencia biológica, lo cual puede repercutir en la rentabilidad y permanencia de cualquier productor.

Para mejorar la rentabilidad del proceso, en este trabajo se estudio el efecto del tiempo de incubación sobre los rendimientos de 3 cepas de *Lentinula edodes* (procedentes de Canadá y Corea) en un sustrato comercial, sin someterlo a un choque térmico y/o hidratación del sustrato después de la incubación (como recomiendan algunos autores) (Badham, 1988; Royse, 1997; Chen, Arrol & Stamets, 2000; Pettipher, 1988).

Por cada período de incubación (6, 8 y 10 semanas) y cada cepa, se prepararon 5 bolsas con 2 kg de sustrato húmedo (54% de humedad) que fueron inoculadas al 5%, con inóculo preparado en grano de trigo estéril. El sustrato se incubó a 24°C y para inducir la fructificación se incrementó la humedad con 3 riegos por día de 20 minutos ventilando con aire húmedo (1 hora después de cada riego por 2 horas).

El análisis estadístico de los resultados indicó que existían diferencias altamente significativas entre las cepas y significativas entre los tiempos de incubación. De acuerdo a la prueba de Duncan, la cepa L9 fue la más productiva (E.B. = 109%), seguida de las cepas L15 (E.B. = 83%) y L5 (E.B. = 61%). Por otro lado, los rendimientos obtenidos con 10 semanas de incubación (98%) son significativamente mayores que los producidos por las 3 cepas al ser incubadas por 6 u 8 semanas (76 a 78%).

En relación al peso unitario de los hongos cosechados, la cepa L5 no presenta diferencia significativa en los tres tiempos de incubación, sin embargo, tanto la cepa L15 como la L9 si presentan diferencias significativas, produciendo hongos más pequeños conforme aumenta el período de incubación (84, 43 y 46 g/hongo fresco con la cepa L15 y 52, 50 y 13 g/hongo fresco con la cepa L9 para 6, 8 y 10 semanas respectivamente).

Introducción.

Pocas personas inclusive algunos antropólogos comprenden el grado de influencia que el uso de los hongos ha tenido a lo largo de la historia humana. Los hongos tuvieron gran importancia en Grecia, India y mesoamérica en tiempos pasados. Claudius II y el Papa Clemente VII fueron asesinados con hongos venenosos del género *Amanita*, Sakyamuni Buda también murió tras consumir un hongo (hasta ahora sin identificar) (Stamets, 1993).

Posiblemente el registro mas antiguo del uso de los hongos es la imagen de Tassili encontrada en la pared de una cueva en el norte de Argelia, que data de 5000 a.C. (ver ilustración 1). En 1991 en los Alpes italianos se encontraron los restos de un hombre que murió hace 5300 años, se le llamo el Hombre de hielo, y entre los objetos que portaba se encontraron dos tipos de hongos diferentes uno de ellos identificado como *Piptoporus betulinus*, el cual pudo haberse usado para encender fuego y como medicina para tratar heridas o en forma de infusión (Stamets, 1993).

Aristóteles, Platón, Homero y Sófocles, participaron en ceremonias religiosas en Eleusis, donde se honraba a Demeter, la diosa de la Tierra, en las que se utilizaba una cocción de hongos. En 1977 Gordon Wasson, Albert Hofmann y Carl Ruck postularon por primera vez que en dicha ceremonia se utilizaban hongos psicoactivos, el hecho de que Aristóteles y otros fundadores de la filosofía occidental hayan participado en dichas ceremonias, y el hecho de que éstas persistieron por mas de 2000 años, nos da una idea del profundo impacto que los hongos psicoactivos, considerados como sagrados han tenido sobre la evolución de la conciencia occidental (Stamets, 1993).

Por otro lado nuestra cultura es evidentemente micofílica, muchas de las tradiciones y pueblos que permanecen desde tiempos prehispánicos utilizan hoy en día hongos sagrados (teonanácatl, "carne de Dios" en náhuatl) en diferentes ceremonias de curación y oración. Por otro lado, la costumbre de consumir hongos en la dieta, se observa también en prácticamente cualquier mercado de nuestro país, la recolección y venta de hongos "de monte" como se les llama, es una labor que se repite todos los años durante la temporada de lluvias y el conocimiento que se conserva sobre los hongos en muchas de nuestras etnias es en algunos casos muy extenso y profundo, lo que nos habla de la antigüedad de la tradición micofílica (Guzmán *et al.*, 1993).

Contrario a lo que se pensaba, el valor nutritivo de los hongos es alto, los hongos tienen de 19-35% de proteínas aprovechables en peso seco, contrario a los vegetales que tienen solo 7.3-13.2% a excepción de la soya que tiene 39.1% (Guzmán *et al.*, 1993). Se sabe que los hongos también contienen elementos esenciales, vitaminas y otros compuestos que no sólo aumentan su valor nutritivo, además les confieren propiedades medicinales e inmunoestimulantes (Jones, 1995).

Buscando un suministro de hongos con fines alimenticios y medicinales se inició desde el siglo VII el cultivo de algunas especies en China y Japón (Guzmán *et al.*, 1993). El primer registro escrito del cultivo de shiitake se remonta a Wu Sang Kwuang, quien vivió en China durante la dinastía Sung (960-1127 d.C.) al que se le considera como el "padre" del cultivo de shiitake. El observó que se obtenían más hongos de los árboles de donde crecía, si se cortaban, sumergían y golpeaban (Stamets, 1993; Pryzbylowicz &

Donoghe, 1990). El cultivo de champiñón en Francia se inició hasta el siglo XVIII (Chang & Miles, 1989).

En México el cultivo se inició desde mediados de la década de los 30's, sin embargo la industria actual data de apenas 40 años (Guzmán *et al.*, 1993). A lo largo de estos años muchos cultivadores han surgido y la mayoría han desaparecido, de los cuáles predominan Hongos de México S.A. y Hongos Leben, como principales cultivadores de Champiñón y Seta respectivamente. Hongos Leben produce actualmente aproximadamente cuatro toneladas por día, lo cual representa cerca del 80% del producto que llega al mercado (Leal, 2000). Recientemente ambas compañías han ampliado su gama de productos con otras especies del género *Agaricus*, llamados hongos portobella y crimini, y recientemente con el Shiitake (*Lentinula edodes*).

1. Antecedentes

Los hongos habían sido clasificados dentro del reino vegetal desde Aristóteles (s. IV a.C.) hasta mediados del s. XIX (junto con la invención del microscopio), cuando Haeckel propuso un tercer reino, el Protista, para separar los organismos que no pertenecían al reino de las plantas ni al de los animales, entre ellos a los protozoarios, algunas algas y los hongos. Dentro del reino protista Haeckel distinguió un grupo especial llamado Monera donde incluyó a las bacterias y en 1956, Copeland reclasificó a los microorganismos y separó (desde entonces) en el reino Monera a las bacterias y cianofíceas (o cianobacterias) que son procariontes (es decir que carecen de un núcleo verdadero) y propuso el reino Protoctista en el que incluyó a los microorganismos eucariontes, abarcando a algas y hongos en su totalidad (Herrera & Ulloa, 1990).

Tiempo después gracias al conocimiento logrado por nuevas técnicas bioquímicas y de microscopía electrónica, se revelaron afinidades y diferencias de los organismos a nivel celular, por lo que se planteó un nuevo sistema de clasificación. El trabajo de Whittaker en 1959 sentó las bases para que Margulis y Schwartz (en 1982) presentaran el modelo de clasificación de cinco reinos: los organismos procariontes (bacterias y cianobacterias) se incluyen en el reino Monera, y los organismos eucariontes se clasifican en cuatro reinos:

- Protoctista (algas, protozoarios, mohos mucilaginosos, hongos acuáticos y anfibios con formas flageladas y muchos otros organismos).
- Fungi (mohos, líquenes y hongos macroscópicos).
- Animalia (animales metazoarios con o sin columna vertebral).
- Plantae (musgos, helechos, plantas con conos y plantas con flores).

La clasificación de los hongos ha generado polémica entre los científicos de todo el mundo, lo poco que se conoce sobre la filogenia de los hongos y lo flexible que resultan ser las "especies" de hongos favorecen esta polémica y aportan los elementos para el continuo estudio y replanteamiento de los hongos.

Esto se puede ver reflejado al considerar la historia que el hongo que nos ocupa en este trabajo, el shiitake, ha atravesado para que se le otorgue una posición aceptada por la comunidad científica. Cabe mencionar que a pesar de esta historia de reclasificaciones continuas para los que lo consumen, el shiitake ha sido por miles de años y siempre será el mismo.

1.1 Taxonomía.

El hongo shiitake fue descrito como *Agaricus edodes* por Berkeley en 1877, a partir de entonces se ha colocado al shiitake en los géneros *Collybia*, *Armillaria*, *Lepiota*, *Pleurotus*, *Lentinus* y otros, este último es el más conocido por los cultivadores como *Lentinus edodes* (Berk.) Singer. Sin embargo recientemente se ha colocado en el género *Lentinula* por Pegler (Stamets, 1993). El género *Lentinula* fue originalmente concebido por Earle en 1900 y retomado por Pegler en los 70's, para definir de forma más acertada a algunos miembros del género *Lentinus*.

Los dos géneros son caracterizados por presentar esporada blanca, con estípites central o excentrico, los bordes de las láminas son serrados. Ambos géneros se

diferencian por características microscópicas, principalmente los miembros del género *Lentinula* son monomíticos (fructificación con un solo tipo de hifas, el de las generativas, que son de pared delgada, tabicadas, frecuentemente fibuladas, ramificadas y fértiles, pues tienen la capacidad de producir basidios), no presentan hifas dimiticas (fructificación con dos tipos de hifas, generativas o fértiles (productoras de basidios) y esqueléticas o de sostén) en el contexto de las láminas y presenta células arregladas de forma paralela y descendente en relación con las láminas. El género *Lentinus* presenta un contexto compuesto por hifas dimiticas y las células que componen las láminas están arregladas de forma irregular (Stamets, 1993).

En 1975, Pegler propuso que el shiitake fuera transferido de *Lentinus* a *Lentinula*, y a pesar de que Singer se opuso a esta designación, muchos taxónomos han adoptado esta clasificación. Pegler sostiene que el shiitake está más relacionado con el género *Collybia* de la familia Tricholomataceae que con hongos como *Lentinus tigrinus*, especie tipo del género *Lentinus*, además *Lentinus* comparte ciertas afinidades con géneros de la familia Polyporaceae donde ahora se le ubica. Estudios recientes de DNA apoyan esta posición (Stamets, 1993). En 1975 el shiitake fue colocado bajo el género *Lentinula*, por lo que su nombre científico actual es: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. (Przybyłowicz & Donoghue, 1990).

Algunos sinónimos para *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. (Przybyłowicz & Donoghue, 1990).

<i>Agaricus edodes</i>	1877
<i>Collybia shiitake</i>	1886
<i>Armillaria edodes</i>	1887
<i>Agaricus russaticeps</i>	1888
<i>Lepiota shiitake</i>	1889
<i>Lentinus tonkinensis</i>	1890
<i>Mastaleucomyces edodes</i>	1891
<i>Pleurotus russaticeps</i>	1891
<i>Cortinellus shiitake</i>	1899
<i>Tricholoma shiitake</i>	1918
<i>Cortinellus berkeleyanus</i>	1925
<i>Lentinus shiitake</i>	1936
<i>Cortinellus edodes</i>	1938
<i>Lentinus edodes</i>	1941
<i>Lentinula edodes</i>	1975

(Se consideran sinónimos nomenclaturales los nombres que presentan el mismo epíteto específico (*edodes*) y diferente epíteto genérico (*Lentinus*, *Agaricus*, etc.), y sinónimos taxonómicos los que difieren en el epíteto específico (*shiitake*, *russaticeps*, etc.) (Sierra, comunicación personal).

Clasificación completa de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.1983 (Mata, 1990).

Reino: Fungi
División: Eumycota
Subdivisión: Basidiomycotina
Clase : Holobasidiomycetes
Subclase: Hymenomycetidae
Orden: Agaricales
Familia: Tricholomataceae
Género: *Lentinula*
Especie: *edodes*

Algunos nombres comunes son: Shiitake, Shiang-gu (Xian Gu) o Hoang-mo.

1.2 Características generales

1.2.1 Ciclo biológico de las especies heterotálicas tetrapolares.

Como especie perteneciente a los Basidiomicetos (Holobasidiomycetes), el shiitake forma esporas de origen sexual llamadas basidiosporas, a partir de células especializadas llamadas basidios, localizadas en la superficie de las láminas que forman el himenio. Cuando una espora germina, produce células alargadas llamadas hifas que en conjunto forman el micelio. El shiitake como todos los basidiomicetos, atraviesa durante su ciclo biológico por tres fases de desarrollo del micelio que corresponden a tres tipos: El primario, el secundario y el terciario, este último deriva del secundario que se organiza en tejidos especializados para formar fructificaciones.

El micelio primario se origina comúnmente de la germinación de una basidiospora y esta constituido por hifas uninucleadas o monocarióticas y haploides. El micelio secundario deriva del primario y esta constituido por hifas de células binucleadas o dicarióticas. La dicarización de las células del micelio primario se inicia con el reconocimiento de micelios genéticamente compatibles (heterotálisto), la anastomosis de las células y la división nuclear en la que se producen 4 núcleos, dos de los cuales pasan a la siguiente célula, uno de ellos a través de una fíbula o conexión de grapa, para así formar el micelio secundario con células binucleadas (provenientes de dos micelios primarios compatibles).

Después de que el micelio secundario se ha desarrollado lo suficiente para invadir el sustrato y acumular nutrientes, es posible comenzar a formar los primordios de los basidiocarpos o cuerpos fructíferos. Esto marca el inicio de la fase de reproducción sexual o desarrollo del micelio terciario, por medio del cual se forma el basidiocarpo típico de la especie agaricoide es decir con pileo, estípite e himenio en forma de láminas bien diferenciadas. En el himenio es donde se forman los basidios, y después de que ocurre la cariogamia y la meiosis, se forman cuatro basidiosporas haploides. Éstas son liberadas al alcanzar la madurez y si las condiciones lo permiten comienzan un nuevo ciclo germinando y produciendo micelio primario (Herrera & Ulloa, 1990).

1.2.2 Descripción morfológica de *Lentinula edodes*, shiitake o Xian Gu.

Lentinula edodes presenta un pileo de 5 a 11 (25) cm de diámetro, puede ser convexo a plano incluso ligeramente deprimido, es de color café claro a café oscuro con tonos de café rojizo casi negro al inicio de la fructificación, puede presentar escamas triangulares a areoladas hacia el margen. Las láminas son blanquecinas y se pueden manchar de café rojizo, son adnadas o anexas sinuadas pero ligeramente libres, serradas o irregulares al madurar. La esporada es blanca, las esporas son cilíndricas – elipsoides, de pared delgada de 5.8 – 6.4 X 2.8 – 3.3 μm de diámetro. El estípite es blanquecino a color café rojizo, generalmente excéntrico, con escamas color café oscuro, sólido, duro y subcoriáceo, de 30 - 40 X 8 - 13 mm (Mata, 1990).

1.3 El cultivo artificial de *Lentinula*.

El shiitake se ha utilizado desde hace miles de años, el primer registro que se tiene escrito es de 199 d.C. donde el emperador Chuai de Japón exalta los hongos que le obsequiaron los nativos de Kyushu. El primer registro escrito del cultivo de shiitake se remonta a Wu Sang Kwuang, quien vivió en China durante la dinastía Sung (960-1127 d.C.) al que se le considera como el "padre" del cultivo de shiitake. El observó que se obtenían más hongos de los árboles de donde crecía, si se cortaban, sumergían y golpeaban (Stamets, 1993; Pryzbylowicz & Donoghe, 1990).

En 1313 Wang Cheng escribió técnicas para el cultivo del shiitake en su obra "Libro de Agricultura", posteriormente fueron los granjeros Chinos quienes introdujeron diversos métodos a Japón para cultivar shiitake. Sin embargo, los métodos no formaban un sistema completo de cultivo y los resultados eran muy variables. Con el tiempo la investigación de campo fue avanzando al introducir en cortes en la corteza de los árboles, esporas de shiitake o una solución de esporas, también utilizaban pedazos de madera de troncos que produjeron buenos hongos para "infectar" nuevos troncos. Fue hasta 1920 que Kitayama desarrollo inóculo del micelio puro, genéticamente homogéneo y creciendo en un material adecuado. Esto hizo posible el seleccionar y propagar micelio con mejor vigor y productividad (Pryzbylowicz & Donoghe, 1990).

En 1943 Mori, produjo "cuñas" o pedazos de madera invadidos con micelio puro para introducirlos en muescas hechas con hacha en los troncos, con este método, los troncos eran inoculados rápidamente y se incrementó la colonización exitosa de los troncos por el micelio. Al incrementar la productividad, la industria del cultivo de shiitake se desarrolló con rapidez. Posteriormente se desarrolló el uso de "taquetes" de madera colonizados con micelio que hasta la fecha se utilizan para inocular los troncos. Recientemente se han utilizado piezas de madera cubiertas de micelio en forma de media luna, de forma que se insertan en aberturas echas con una sierra en los troncos, esto distribuye más homogéneamente el micelio por el tronco y reduce el tiempo necesario para colonizar el tronco y producir hongos (Pryzbylowicz y Donoghe, 1990).

Para China el actual líder en la producción de *Lentinula edodes* (Xian Gu) se pueden reconocer siete etapas en el desarrollo del "cultivo artificial" (Chang, 2002).

- 1) Cultivo en troncos de madera. Cultivo tradicional de *Lentinula edodes* en troncos de maderas duras, en la antigüedad, los productores abrían con un hacha la corteza de los troncos y esperaban que las esporas entraran al tronco, el micelio lo invadiera y produjera hongos, lo que resultaba en un método muy lento y muy poco predecible.
- 2) Inoculación de troncos. Basado en la inoculación de micelio puro desarrollado por los japoneses en 1928. Este método revolucionó el proceso productivo de *Lentinula edodes*, al desarrollar la capacidad de producir micelio puro.
- 3) Cultivo en bolsas de plástico con aserrín. Utilizando pequeñas bolsas de plástico con aserrín como sustrato. Este método fue desarrollado en Taiwán a principios de 1970.
- 4) Uso de ladrillos o bloques de sustrato comprimidos. Introducido en Shangai en 1979 para el cultivo a gran escala.

- 5) Cultivo en "truncos sintéticos". Desarrollado en 1986 en el municipio de Gutin en la provincia de Fujian. Esta innovación expandió la industria de *L. edodes* en China. Con lo que la producción ha crecido más de 20 veces en 15 años, y desde 1987 le quitó a Japón la posición de mayor productor de hongos dominando el mercado mundial desde entonces.
- 6) Uso de "bolsas sintéticas". Desarrollado en el condado de Qinguan, en la provincia de Zhejiang. Las bolsas de fructificación son más cortas que los truncos sintéticos pero mucho más anchas, las bolsas inoculadas se colocan en repisas. La producción en este municipio representa el 10% de toda la producción mundial y una quinta parte de la producción total de China.
- 7) El cultivo en invernaderos de plástico. Se deriva del método de la bolsa sintética. Fue adaptado en el condado de Biyang, en la provincia de Henan. Las bolsas son más grandes y se colocan en repisas dentro del invernadero. Durante climas secos y fríos, se produce con este método la mejor calidad de hongos, Donko o flor de Donko, donde el contexto es notablemente más grueso y el pileo se resquebraja descubriendo un patrón como una flor con las grietas en la superficie.

La evolución de los métodos de cultivo antes descrita ha ocurrido simultáneamente al tremendo incremento que se ha observado en la producción de hongos comestibles en el mundo, la que ha aumentado más de 14 veces en los últimos 30 años, de 350,000 ton en 1965 a cerca de 4,909,000 ton en 1994 (Royse, 1997). La producción de shiitake se incrementó de 18,000 toneladas en 1936 a 200,000 toneladas en 1983 (Royse, 1985) y por más de 7 veces de 1983 a 1997. Hoy en día es el segundo hongo cultivado en el mundo (Chang, 1996; Royse, 1997). La mayor parte de este incremento durante este período de 14 años ocurrió en China, donde el shiitake es ampliamente consumido y exportado (la producción de *L. edodes* en China en 1998 fue de 1,338,000 ton).

Hoy en día, se utiliza aún el método Tradicional, donde el shiitake se produce en truncos con rendimientos relativamente bajos, dependiendo de los eventos climáticos, requiriendo de 3 a 5 años para completar un ciclo productivo. En las últimas décadas, la producción de shiitake se ha introducido a los EU y Europa, sustituyendo el método de cultivo tradicional por el llamado "método sintético" con aserrín como ingrediente básico de la fórmula del sustrato (Pryzbylowicz & Donoghue, 1990). Se requiere un control muy preciso de las condiciones ambientales tanto para la propagación del micelio como para la fructificación, por lo que también se requiere de inversiones elevadas.

El método sintético muestra dos ventajas importantes sobre el método tradicional, el tiempo de cultivo y la eficiencia. Mientras que para el método sintético se requieren de 4 a 6 meses desde la inoculación hasta el agotamiento del sustrato, para el método tradicional el ciclo de cultivo toma hasta 6 años. Las bajas eficiencias biológicas, 9 a 35% (g de hongos frescos/100 g sustrato seco) alcanzadas con el método tradicional (Royse & Schisler, 1986; Royse, Shisler & Diehle, 1985) se incrementan con el cultivo en sustrato sintético de 45 a 65% (Delpech & Olivier, 1991; Rincker, 1991; Levanon *et al.*, 1993) y recientemente, rendimientos más elevados, de 75 a 125%, han sido reportados por Royse (1997), algunos autores reportan rendimientos aún mayores (Hiromoto, 1991).

Existe actualmente un gran esfuerzo en la investigación para determinar los factores que afectan el rendimiento y su variación. Desde un punto de vista comercial, es preferible contar con un método que permita predecir los rendimientos. Según Royse (1985) entre los factores que afectan en forma considerable la producción se pueden mencionar la duración del periodo de incubación, la concentración y el tipo de suplementos nutricionales, el contenido de agua y la tasa de intercambio gaseoso, entre otros (Royse & Sánchez-Vázquez, 2000).

2. Justificación y objetivos.

Se ha desarrollado una gran cantidad de investigaciones en relación al cultivo de *Lentinula edodes*, misma que ha impulsado el crecimiento de la industria. Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto del tiempo de incubación sobre la productividad a pesar de que el período de incubación es crítico para la producción de hongos, ya que es en esta etapa que el micelio se propaga por el sustrato y lo degrada, generando enzimas y almacenando nutrientes, preparándose para la fructificación. En términos generales se sabe que el micelio debe alcanzar cierta madurez para sostener una buena cosecha, sin embargo para un cultivador comercial el disminuir el tiempo del ciclo productivo es un factor importante para aumentar su productividad y con esto sus utilidades.

Royse (1985) incubó tres diferentes sustratos de aserrín inoculados con *Lentinula edodes* por 58 y 116 días. Se observó que la E.B. para los sustratos incubados por 58 días fue de 16, 18, y 19%, mientras que los sustratos incubados por 116 días se alcanzaron E.B. de 44, 62 y 71%.

Por otro lado, Delpech & Olivier (1991) no encontraron diferencias significativas entre los niveles de producción en paja de trigo pasteurizada incubados por 3 y 5 semanas. Sin embargo, observaron que los períodos de incubación menores generan los períodos de fructificación más largos, y que la formación espontánea de primordios, previa a la remoción de las bolsas, varía con el tiempo de incubación dependiendo de la cepa. Estos autores reconocen que sus resultados no coinciden con reportes previos de Takizawa (Delpech & Olivier 1991) quien sustenta que es necesario un período de incubación largo para obtener una producción regular y de buena calidad, sin embargo no menciona un período específico.

Rinker (1991), por su parte no encontró influencia significativa en la producción al prolongar el período de incubación de 32 a 60 días. Las diferencias en los resultados de estos autores podría deberse al genotipo de las cepas estudiadas o al tipo de sustrato.

2.1 Objetivos

Objetivo principal.

El presente estudio se planteo evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la eficiencia biológica de *Lentinula edodes*. Para ello se incubaron las bolsas de sustrato comercial de aserrín por 6, 8 y 10 semanas (42, 56 y 70 días).

Objetivos particulares

Establecer un método que permita evaluar el desarrollo micelial de *Lentinula edodes*, para lo cual se realizaron pruebas preliminares para determinar el tamaño de partícula y el contenido de humedad adecuado para crecimiento micelial en tubos de vidrio.

Observar la producción de esporóforos sin someter el sustrato a los tratamientos de inmersión, choque térmico y/o período de obscurecimiento.

3. Materiales y Métodos.

3.1 Material biológico.

Se utilizaron cuatro cepas de *Lentinula edodes*, las cuales se mantuvieron en refrigeración en cajas de Petri con medio sólido de extracto de malta agar (EMA). Las cepas utilizadas fueron: LR proveniente de Japón y utilizada en Ocampo Michoacán, L5, L9 y L15 provenientes de Canadá y Corea. Las cepas se encuentran en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

3.2 Medio de cultivo extracto de malta agar (EMA).

Para preparar 500 ml de medio de extracto de malta agar, se pesaron 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de un litro. Se adicionaron 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación se tapó el matraz y se dejó reposar por 20 minutos. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg² durante 30 min, el medio estéril se vació en cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Y una vez solidificado el medio se guardaron las cajas Petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

3.3 Inóculo de grano.

Se utilizó grano de trigo para preparar el inóculo, el cual fue lavado con agua corriente para eliminar los residuos orgánicos, el polvo y tierra que pudiera contener. Posteriormente se hirvió por 45 min, transcurrido este tiempo se lavó una vez más con agua corriente para enfriarlo y eliminar los residuos de almidón. El exceso de agua se drenó para evitar su acumulación en las bolsas. Posteriormente se le añadió 0.3% de CaCO₃ y 1.3% de CaSO₄ como suplementos. Con esta mezcla se llenaron bolsas de polipropileno con 400 g, se cerraron doblando la bolsa y se colocaron dentro de una segunda bolsa. Así envueltas se esterilizaron por 2 h a 121°C y 15 lb/pulg² y se dejaron enfriar dentro de una campana de flujo laminar, donde se inocularon cada una, con el contenido completo (seccionado) de una caja Petri (EMA) totalmente invadida con el micelio correspondiente. Las bolsas inoculadas se empacaron dentro de otras bolsas y se trasladaron al cuarto de incubación, con una temperatura constante de 24°C en condiciones de oscuridad.

3.4 Crecimiento micelial en aserrín de encino empacado en tubos de vidrio.

Las muestras de aserrín se colectaron del desecho que genera uno de los talleres de fabricación de cabos de pala, hacha y martillo en la localidad de Ocampo en el estado de Michoacán. El aserrín se tamizó con tres tamices de 4.76, 1.41 y 0.1 mm de criba para separarlos en las fracciones correspondientes, determinándose su contenido de humedad después de colocarlo en un horno a 40°C, hasta determinar su peso constante.

Para evaluar el crecimiento micelial en aserrín ajustado a diferentes contenidos de humedad se llenaron 15 g de aserrín seco en tubos de 2.5 cm Ø x 15 cm con doble boca

a los que se les colocó un tapón de polipapel sostenido con ligas de un extremo. A cada tubo se le añadió el agua necesaria para ajustar la humedad del aserrín en un intervalo de 30 a 80% con incrementos de 5%. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento se selló el otro extremo de igual forma que el primero y se esterilizaron por 1,5 h a 121°C. Cada tubo se inoculó por un extremo con semilla de trigo invadida con micelio de *Lentinula edodes* (cepa LR), y se incubaron a 25°C por 24 días. Se registro el crecimiento lineal del micelio en cuatro puntos del tubo cada día.

3.4.1 Determinación y ajuste de humedad.

Para determinar el contenido de humedad de cualquier muestra, se utilizó el método del peso seco de horno, en el cual se toma el peso inicial (húmedo), se seca el material en un horno y con el peso seco se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = ((\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) / \text{peso húmedo}) * 100$$

Para ajustar una muestra de aserrín seco a una humedad determinada, primero se determinó el contenido de humedad que tiene en seco, utilizando el método anterior, posteriormente se utilizó la siguiente fórmula:

Para que una muestra de X g de sustrato seco alcance una humedad de Y% se le añaden la siguiente cantidad de agua:

$$(\text{ml}) = ((X * Y) / (100 - Y)) - \text{contenido de humedad inicial de X (ml)}$$

3.5 Producción de esporóforos de *Lentinula edodes*.

Hongos Leben proporcionó sustrato comercial de aserrín suplementado con una humedad de 41.6%. La humedad del sustrato se ajustó a 55%, se empacaron 2 kg en bolsas de plástico de 32 cm x 49 cm con un filtro microporo las que se esterilizaron por 2 h a 121°C y 15 lb/pulg².

Cada bolsa se inoculó con 100 g (5%) de semilla de trigo ya invadida. Las bolsas se incubaron en un cuarto oscuro a 25°C por 6, 8 y 10 semanas (foto 1).

Transcurrido el tiempo de incubación las bolsas fueron transferidas al cuarto de fructificación sin ningún otro tratamiento (choque térmico o inmersión). Para inducir la fructificación, se incrementó la humedad con 3 riegos diarios de 20 minutos ventilando por 2 horas con aire húmedo 1 hora después de cada riego (foto 2 y 3).

Se cortaron los esporomas producidos procurando hacerlo antes de que el borde del píleo se abriera por completo. Se cuantificó su peso y en algunos cortes se cuantificó el peso de los píleos y los estípites por separado. En algunos cortes se les determinó el contenido de humedad (fotografías 4, 5, 6, 7 y 8).

4. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS.

El cultivo tradicional de *Lentinula edodes* en troncos de maderas duras es un proceso que requiere de tiempos prolongados y se obtienen rendimientos muy bajos. Para optimizar este proceso se ha introducido el cultivo en bolsas con aserrín de encino y otras maderas como material básico. El tiempo de incubación es un factor importante que afecta el rendimiento. Se sabe que en caso de que la propagación del micelio sobre el sustrato sea pobre, también lo será la productividad. Sin embargo, para un cultivador comercial es importante reducir los tiempos de producción por medio de ciclos productivos cortos para reducir así los costos, lo que debe lograrse sin disminuir la producción de hongos. Debido a los reportes contradictorios al respecto resultaba importante evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre el rendimiento máximo. Para ello, se caracterizó el tamaño de partícula y el contenido de humedad del aserrín de encino, para evaluar la propagación del micelio en aserrín con diferentes contenidos de humedad. Posteriormente se inocularon bolsas con sustrato comercial de aserrín con tres cepas de *Lentinula edodes* y después de incubarse por 6, 8 y 10 semanas, se colocaron en condiciones de fructificación cuantificándose la producción de esporóforos.

4.1 Crecimiento micelial de *Lentinula edodes* en tubos con aserrín de encino a diferente contenido de humedad.

El aserrín de maderas duras es el ingrediente básico para el cultivo de *Lentinula edodes* en naves con control ambiental (invernaderos) por lo que resultaba importante conocer las características de este residuo industrial. Para establecer un método que permitiera medir el desarrollo micelial de este hongo se realizaron algunas pruebas con varios lotes de aserrín de encino proveniente de Ocampo, Michoacán. Se caracterizó la distribución de los tamaños de partícula presentes en este material para definir que tamaño de partícula resultaba más adecuado para formular un sustrato homogéneo y con buena capacidad de captación y retención de agua.

El aserrín se tamizó utilizando tres mallas consecutivamente más pequeñas. En la **Tabla 1** se observa que la mayor parte del material presentó tamaños intermedios, 38% del aserrín presenta tamaños entre 0.3 – 0.45 cm y 29% entre 0.2 – 0.3 cm mientras que se observaron proporciones similares de las partículas mayores de 0.8 cm (17%) y en las menores de 0.2 cm (15%).

En pruebas preliminares se encontró que con la fracción del material con un tamaño de partícula entre 0.2 – 0.3 cm fue posible llenar fácilmente los tubos de ensayo, manteniendo buena uniformidad en toda su longitud y sin que se presentara el apelmazamiento observado con el polvillo que se obtiene como excedente del tamizado. Las partículas menores de 0.2 cm, se compactaban excesivamente, no dejando huecos que permitieran un intercambio de gases adecuado, lo que a la vez podría dificultar la penetración del micelio. En la fracción de mayor tamaño, por otro lado, se presentan partículas y astillas que dejaban huecos muy grandes entre sí al ser empacadas en los tubos de ensayo, al igual que en la fracción entre 0.3 – 0.45 que tampoco permitía un empaque homogéneo del sustrato.

Por la facilidad de llenado y homogeneidad del sustrato se seleccionó la fracción con un tamaño de partículas entre 0.2 - 0.3 cm. En pruebas preliminares se observó que el llenado de los tubos con el aserrín húmedo dificulta el proceso, ya que se apelmaza y

se forman espacios dentro del tubo. Por otro lado el llenado de los tubos con el aserrín seco es sumamente fácil y se logra un empaque homogéneo, por lo que se requería entonces estudiar el efecto que tenía el ajustar el aserrín a la humedad deseada ya empacado en los tubos. Para esto se llenaron tubos de vidrio con aserrín seco añadiéndose a continuación el agua necesaria para lograr un contenido de humedad de 50, 60 o 70%. Después de añadir el agua se mantuvieron 24 h en reposo y se determinó su contenido de humedad. En la Tabla 2 se observa que el contenido de humedad obtenido (69.7, 59.5 y 49.2%) es prácticamente igual al calculado (70, 60 y 50%), por lo que el método de empacar los tubos con aserrín seco y ajustar la humedad en el tubo es adecuado para lograr que el sustrato tenga un contenido de humedad específico.

Sin embargo al ajustar el aserrín seco a un contenido de humedad determinado, añadiéndole agua una vez empacado en los tubos presenta la posibilidad de que se genere un gradiente de humedad a lo largo del sustrato como resultado de la fuerza de gravedad, de la posición de reposo del tubo y de la cantidad de agua libre. Para observar este comportamiento, se empacaron con aserrín seco tubos de vidrio a los que se les añadió el agua necesaria para alcanzar 70, 60 y 50% de humedad y se dividieron en dos grupos. Los tubos del primer grupo (base) se les dejó reposar por 24 h determinándose después el contenido de humedad en los estratos superior (1), medio (2) e inferior (3). Los tubos del segundo grupo (invertido) en ese momento se giraron 180° y se les dejó reposar 24 h nuevamente, determinándoseles la humedad en los tres estratos (invertidos).

En la Tabla 3 se presenta el contenido de humedad de cada estrato en los tubos en reposo e invertidos. La mayor diferencia se observa en los tubos en reposo ajustados a 70% de humedad donde los estratos 1 y 2 presentan humedades de 52 y 60% mientras que en el estrato 3, al fondo del tubo, la humedad se incrementa hasta 78%. En los tubos invertidos se observa como el agua libre migra y se establece un nuevo gradiente, opuesto al anterior, con 77% 66 y 58% en los estratos 1, 2 y 3, es evidente el gran contenido de agua libre que se desplaza a través del sustrato en los tubos ajustados a 70% de humedad. En los tubos ajustados a 60 y 50% de humedad también se observa un gradiente, pero este es considerablemente menor. En los tubos en reposo ajustados a 60% se observa una humedad de 50, 53 y 67% en los estratos 1, 2 y 3 mientras que en los invertidos se observa un gradiente de 65, 57 y 56.4% en los estratos 1, 2 y 3. En los tubos ajustados a 50% el gradiente se reduce aún mas, en los tubos en reposo el contenido de humedad es de 44, 48 y 52% en los estratos 1, 2 y 3, en los tubos invertidos el gradiente se modifica muy poco, 46, 49 y 51% para los estratos 1, 2 y 3.

La diferencia que se obtiene entre el contenido de humedad del estrato 3 en los tubos en reposo con el mismo estrato 3 en los tubos invertidos refleja la cantidad de agua libre que se desplaza a través del aserrín y no fue retenida por éste. En la Tabla 4 se observa que el porcentaje de agua libre que se mueve a través de los estratos es de 20% en los tubos ajustados a 70%, de 10.7% en los tubos ajustados a 60% y se reduce hasta 1% en los tubos ajustados a 50%, esto indica que el punto de saturación del aserrín de encino, considerando partículas de 0.2 - 0.3 cm, se encuentra cerca del 50% de contenido de humedad.

Para determinar el contenido de humedad óptimo para la propagación del micelio de *Lentinula edodes* sobre aserrín de encino se empacaron tubos de vidrio con aserrín de encino seco y se ajustó a contenidos de humedad de 30 a 80% en incrementos de 5%. Después de esterilizarlos se inocularon con micelio de *Lentinula edodes* en granos de trigo y se incubaron por 24 días, midiendo el crecimiento del micelio diariamente.

En la **Tabla 5** pudo observarse que existe poca diferencia en el crecimiento micelial en tubos con contenido de humedad que va desde 30% (8.5 cm) hasta 60% (8.5 cm), el mejor crecimiento lo presenta los tubos con 45% (9.3 cm), seguidos por los tubos de 50% y 40% (9.2 cm), y después por los tubos con 35% (8.8 cm), y los tubos con 60% y 30% (8.5 cm por igual). Los tubos con 65% se quedaron muy rezagados (6.2 cm), los de 70% tardaron 19 días para comenzar a crecer (1.2 cm), y los ajustados a 75% y 80% nunca crecieron.

Esto indica que el crecimiento micelial óptimo se encuentra en aserrín ajustado cerca del punto de saturación que se encuentra entre los 45 y 50% de humedad

4.2 Influencia del tiempo de incubación sobre la producción de esporóforos de *Lentinula edodes*.

Para observar el efecto que ejerce el tiempo de incubación sobre la producción de esporóforos frescos, bolsas empacadas con 2 kg de sustrato comercial de aserrín de encino con 55% de humedad, se inocularon con tres cepas de *Lentinula edodes* (L5, L9 y L15) y se incubaron por 6, 8 y 10 semanas. Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron en condiciones de fructificación y se cuantificó la producción. El ciclo productivo se extendió a 10 semanas.

4.2.1 Efecto del tiempo de incubación sobre el rendimiento máximo.

En la **Tabla 6** se presenta la producción semanal de hongos frescos por bolsa de 2 kg durante las 10 semanas de producción para las 3 cepas de *Lentinula edodes*, cada una de ellas incubada por 6, 8 o 10 semanas. En la primera semana de corte se observa el valor mínimo, 17.7 g hongos frescos/bolsa, para la cepa L15 incubada por 6 semanas. La producción máxima semanal para cada cepa se obtuvo para las tres cepas en la primera semana de corte. Esta fue de 258, 363, y 768 g de hongos frescos/bolsa para las cepas L5, L15 y L9 respectivamente. Dichos valores se obtuvieron para las cepas L15 y L9 en el periodo mas largo de incubación (10 semanas) mientras que para la cepa L5 fue en el mas corto (6 semanas).

Además se observa que la mayor parte de la producción se obtiene en las primeras 5 o 6 semanas de corte, con excepción de la cepa L15 que con 6 semanas de incubación produjo 124 g en la 10ª semana de corte. Así, los rendimientos después de la 7ª semana de corte son por lo general mínimos (0 - 60 g).

Resulta evidente que la producción por brote no permite una adecuada interpretación de los resultados. Por ello en la **Tabla 7** se presentan los valores correspondientes de la producción semanal acumulada para cada cepa y tratamiento. De esta manera resulta mas fácil comparar los resultados obtenidos en este experimento. En términos generales se observa que la cepa L9 fue la más productiva, con 1046, 1070 y 1037 g hongos frescos/bolsa para 6, 8 y 10 semanas de incubación. En una segunda posición se encuentra la cepa L15 con 769, 750 y 1043 g de hongos frescos/bolsa para los tres tiempos de incubación. Por último la cepa L5 produjo 667, 486 y 680 g de hongos frescos/bolsa para las 6, 8 y 10 semanas de incubación.

Se observa en la misma tabla que conforme pasan las semanas de corte los valores tienden a un valor máximo que se estabiliza en las últimas semanas. Con excepción de L15 incubada por 6 semanas que presentó un incremento significativo en las últimas semanas. Precisamente para identificar con claridad el momento donde se alcanza el rendimiento máximo significativo se realizó un análisis de varianza, con los valores de producción expresados en términos de Eficiencia biológica (E.B. = g de hongos frescos/100 g de sustrato seco). De esta forma se indica en la Tabla 8 el rendimiento máximo significativo y la semana de corte en el que se alcanza. La cepa L9 alcanza el rendimiento máximo a la 6ª, 4ª y 3ª semanas de corte en el sustrato incubado por 6, 8 y 10 semanas con 98, 108 y 123 g respectivamente, (éste último valor fue el más precoz). L15 presenta un comportamiento similar, alcanza más rápidamente el rendimiento máximo conforme aumenta el tiempo de incubación, lo alcanza a la 9ª, 5ª y 4ª semanas de corte al incubarse por 6, 8 y 10 semanas con 73, 77 y 100% de E.B. respectivamente. La cepa L5 alcanza el rendimiento máximo a la 4ª semana de corte cuando el sustrato es incubado por 6 y 8 semanas y a la 6ª para los incubados por 10 semanas con 56, 44 y 78% de E.B. respectivamente. El valor más bajo lo presentó L5 incubada por 8 semanas (44% de E.B. y el más alto de la cepa L9 incubada 10 semanas 123% de E.B.)

Para identificar el efecto del tiempo de incubación sobre la producción se realizó un análisis de varianza con el rendimiento máximo significativo alcanzado por cada cepa y tratamiento. En la Tabla 9 se observa que para las tres cepas, el rendimiento máximo se alcanza al incubar los bloques por 10 semanas (98% de E.B.). Los tratamientos incubados por 6 y 8 semanas (78 y 76% de E.B.) son significativamente inferiores.

El rendimiento máximo significativo de cada cepa, sin considerar los tiempos de incubación refleja las características de cada una, siendo L9 la más productiva seguida por L15 y por último L5 como la menos productiva (109, 83 y 61% de E.B. respectivamente). No se registraron interacciones entre la cepa y los tiempos de incubación, por lo que se consideran los valores de esta tabla por cepa y por tiempos de incubación de forma independiente.

La semana de corte en la que se alcanza el rendimiento máximo es la misma para las Tablas 7 y 8 aún cuando se expresan las unidades de diferente forma (g hongos frescos/bolsa vs. g hongos frescos/100 g de sustrato seco). En la Tabla 10 se presentan los resultados del análisis de los datos de la tabla 7 correspondientes a la cepa L15 (los que se dispersan más) presentados en la Tabla 7, observándose que la semana donde se alcanza el mayor rendimiento (9ª, 5ª y 4ª) coinciden con las indicadas en la tabla 8.

4.2.2 Efecto del tiempo de incubación sobre el número de esporóforos.

La **Tabla 11** nos muestra la producción semanal en términos del número de cuerpos fructíferos producidos. Resalta la cepa L9 que produjo en la primera semana de corte, 9, 34 y 49 esporóforos para los sustratos incubados por 6, 8 y 10 semanas respectivamente. En contraste las cepas L5 y L15 produjeron de 1-2 y 0-6 hongos respectivamente en la primer semana de corte. Para estas cepas, el mayor número de esporóforos (3 – 9) se obtienen en la 3-5 semana, en el resto de las semanas de corte el número de hongos que se obtienen por bolsa es mucho menor (0 – 2 esporóforos).

Para visualizar con mayor facilidad el efecto de este parámetro, en la **Tabla 12** se presentan los valores acumulados. Así se observa que la cepa L9 produjo mayor cantidad de esporóforos por bolsa 20, 48 y 77 esporóforos para las 6, 8 y 10 semanas de incubación. En segundo término se observa la cepa L15 con 10, 17 y 22 esporóforos para 6, 8 y 10 semanas. Es interesante notar que para estas dos cepas el número de esporóforos producido aumenta conforme aumenta el tiempo de incubación. Mientras que para la cepa L5 (con el menor número de esporóforos) fue semejante para los 3 tiempos de incubación (9, 12 y 10 esporóforos para 6, 8 y 10 semanas de incubación).

Se realizó un análisis de varianza de los valores promedio de la producción semanal acumulada de cuerpos fructíferos (**Tabla 12**). En la **Tabla 13** se observa que para la cepa L5 no hay efecto significativo del tiempo de incubación sobre el número de esporóforos producido por los tres tiempos de incubación (6 o 7 esporóforos). Sin embargo las cepas L15 y L9 si presentaron diferencias significativas en el número de esporóforos producidos en los tres tiempos de incubación. La cepa L15 produce más esporóforos conforme aumenta el tiempo de incubación (5, 11 y 17) al igual que la cepa L9 (15, 42, 70) que produce muchos más esporóforos que las dos anteriores.

4.2.3 Efecto del tiempo de incubación sobre el peso unitario de los esporóforos.

El peso unitario de los esporóforos nos permite conocer de forma general el tamaño y consistencia de los esporóforos producidos, es decir su calidad comercial. La **Tabla 14**, muestra el peso unitario acumulado, siendo interesante observar como este disminuye conforme avanzan las semanas de corte. Esto indica que el peso de los esporóforos producidos disminuye conforme se agota el sustrato a excepción de las cepas L15 y L9 incubadas por 6 semanas en las que éste aumenta conforme pasa el tiempo. El mayor valor del peso unitario lo observamos en los esporóforos producidos por la cepa L5 (150 g/hongo fresco) y los menores en los de L9 (16.5 g/hongo fresco). Esto indica que la cepa L9 que fue la más productora, generó los esporóforos más pequeños, y la cepa L5 que fue la menos productora, produjo los hongos más grandes.

En la **Tabla 15** se observan los resultados del análisis de varianza para el peso unitario correspondientes a la semana de mayor rendimiento y su interacción con los tiempos de incubación. La cepa L5 no presenta diferencia significativa entre los tiempos de incubación (81, 55, 85 g/hongo fresco) y produjo los esporóforos más pesados. La cepa L15 si presentó diferencia significativa, los esporóforos más grandes los produjo al incubarse por 6 semanas (84 g) resultando más pequeños y sin diferencia entre si al incubarse por 8 y 10 semanas (43 y 46 g/hongo fresco). De forma similar la cepa L9

produce los esporóforos más pequeños conforme aumenta el tiempo de incubación (52, 50 y 13 g/hongo fresco para 6, 8 y 10 semanas).

4.3 Diferencia en el contenido de humedad de los esporóforos producidos por 3 cepas de *Lentinula edodes*.

Se observó que la calidad de los esporóforos disminuye conforme son más pequeños con un contexto delgado y un contenido de humedad elevado. La **Tabla 16** muestra que los esporóforos producidos por la cepa L5 son los que presentan un menor contenido de humedad (91%), mientras que los de las cepas L15 y L9 son semejantes entre sí y presentan mayor contenido de humedad (93 y 94%).

No se evaluó este parámetro considerando los tres tiempos de incubación, por lo que no es posible definir si el tiempo de incubación tiene un efecto sobre el contenido de humedad. Sin embargo es recomendable que esto se realice pues los valores así obtenidos podrían ser de relevancia en cuanto a la calidad de los esporóforos producidos.

4.4 Degradación del sustrato por 3 cepas de *Lentinula edodes*.

En la **Tabla 17** se muestra la degradación del sustrato durante el cultivo, la cual se refleja en la pérdida de peso del bloque. Encontramos que la materia seca producida como tejido de los esporóforos va de 24 a 124 g. La cantidad de sustrato seco que se pierde como CO₂ y lixiviados va de 627 a 984 g lo cual representa un porcentaje considerable de 54 a 85% del peso total del bloque.

La tasa de conversión del sustrato en hongos va de 2.6 a 19.7 g hongos secos/100g de sustrato degradado.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Como vemos en la **Tabla 9** se encontraron diferencias altamente significativas entre las cepas y diferencias significativas entre los tiempos de incubación. La diferencia entre las cepas se debe a que éstas son diferentes, unas tienen mayor potencial productivo que otras (para las condiciones dadas), en este caso la cepa L9 es la más productiva y precoz. Este resultado expresa la gran diferencia intrínseca que contiene el genotipo propio de cada cepa, el cual se expresa de manera distinta en relación a las condiciones ambientales a las que fueron expuestas.

Los resultados obtenidos por la cepa L5 (56, 44, 77 % de E.B.) que como vimos son los mas bajos, son comparables con los resultados reportados por Royse (1985) (44, 62, y 71%) para sus valores mas altos, mientras que con la cepa L9, la mas productiva (98, 108 y 122 %) fueron muy superiores. Los resultados encontrados se ubican entre los valores mas elevados reportados en la literatura.

La diferencia significativa entre los tiempos de incubación es el resultado que da respuesta al objetivo de este estudio. Se puede sostener que para las condiciones propias de este protocolo, si existe un efecto del tiempo de incubación sobre la eficiencia biológica de *Lentinula edodes*. A diferencia de Rinker (1991) y de Delpech & Olivier (1991) que no encontraron diferencias significativas entre los niveles de producción que puedan relacionarse a la duración del periodo de incubación, nuestros resultados indican lo contrario, y en ese sentido apoyan los resultados de Royse (1985) que si encontró un efecto significativo sobre la Eficiencia Biológica al extender el periodo de incubación de 58 a 116 días.

En este trabajo se evaluaron 6, 8 y 10 semanas de incubación, es decir 42, 56, y 70 días encontrándose que la eficiencia biológica a las 10 semanas de incubación, es significativamente mayor que con 6 y 8 semanas (Tabla 9). En forma semejante Royse (1985) al evaluar tiempos de incubación más prolongados (58 y 116 días) también encontró diferencias significativas. Sin embargo, en estudios con tiempos de incubación relativamente cortos no se han encontrado diferencias significativas entre ellos, como es el caso de Rinker (1991) quien no encontró diferencia al incubar 32 y 60 días. De manera semejante Delpech & Olivier (1991) tampoco encontraron diferencias al incubar por periodos aún mas cortos (21 y 35 días).

Rinker (1991) propone que las variaciones entre dichos resultados pueden deberse a la relación específica que se establece entre el genotipo de la cepa y la formula del sustrato, y más aún, podría decirse que la forma en la que se comporta la cepa es propia de la expresión de su genotipo frente a (todas) las condiciones externas a las que es expuesta. Por ello, cada cepa reacciona de forma diferente a condiciones como: temperatura, humedad del sustrato y del medio ambiente, iluminación, formulación del sustrato, niveles de CO₂, etc. Así, la combinación de todos los factores a los que exponemos una cepa se ven reflejados en su velocidad de crecimiento, densidad y vigor del micelio, capacidad para degradar el sustrato, así como, el rendimiento y la productividad propios de cada cepa. Por todo lo anterior, se puede decir que el genotipo es uno de los factores que propician, las principales variaciones entre las diferentes cepas.

Desde el punto de vista de un productor, a éste le interesa obtener la mayor eficiencia biológica por medio de un aprovechamiento óptimo del substrato bajo sus condiciones particulares de cultivo. Para ello sería muy recomendable conocer con detalle los requerimientos de la cepa en particular para desarrollarse de forma óptima en términos de: temperatura, humedad, niveles de CO₂, formulación del substrato, tamaño de las unidades de producción (bloques), duración del período de incubación, método de inducción, etc. Es decir debe conocerse con detalle todas las condiciones y requerimientos de esa cepa en particular. Para ello sería necesario desarrollar protocolos de investigación que evaluaran las condiciones óptimas para cada cepa, lo cual a pesar de ser costoso y requerir de tiempos relativamente largos, podría redundar en incrementos considerables en los rendimientos finales.

Se observa en los resultados de este estudio que también el número de cuerpos fructíferos y el peso unitario de éstos son caracteres definidos por la interacción entre el genotipo y las condiciones a las que se expone. No sólo se debe entonces caracterizar la cepa en términos de eficiencia biológica sino que también la calidad de los esporomas producidos es importante, ya que son los cuerpos fructíferos, u "hongos" los que nos interesan.

Finalmente puede concluirse que para un cultivador, el éxito del proceso depende de la planeación y desarrollo de cada etapa del cultivo, comenzando con la elección de la cepa a utilizar y reuniendo toda la información posible en relación a los requerimientos de la cepa y las condiciones que de acuerdo a su infraestructura y localización geográfica sea capaz de generar y mantener de forma constante.

Es de esperarse que mas países comiencen a producir el shiitake, debido tanto a su valor medicinal y culinario, como a lo accesible de la tecnología y métodos de cultivo (Chang, 2002).

**Tabla 1. Distribución del tamaño de partículas
en el aserrín de encino.**

Tamaño de partícula (cm)	Proporción (%)
> 0.8	17
0.3 - 0.45	38
0.2 - 0.3	29
< 0.2	15

Tabla 2. Ajuste de humedad en tubos de ensaye con aserrín de encino

Aserrín seco (g)	Agua añadida (ml)	Peso húmedo (g)	Contendio de humedad (%)	
			Calculado	Experimental
8	18.4	26.4	70	69.7
8	11.7	19.7	60	59.5
8	7.7	15.7	50	49.2

Tabla 3. Estratificación de la humedad del sustrato de aserrín empacado en tubos de 2.5 cm Ø X 15 cm largo

Mezcla (%)	Estratos	Contenido de humedad (%)			
		Grupo Reposo	Promedio	Grupo Invertido	Promedio
70	1	52.5	63.5 ± 13.3	77.5	67.2 ± 9.8
	2	59.8		66.0	
	3	78.2		58.1	
60	1	50.1	56.8 ± 9.1	65.0	56.5 ± 4.7
	2	53.2		57.2	
	3	67.2		56.4	
50	1	44.4	48.4 ± 4.1	46.5	49.2 ± 2.5
	2	48.1		49.6	
	3	52.5		51.4	

Tabla 4. Efecto del contenido de humedad del sustrato sobre la migración de agua.

Ajuste (%)	Porcentaje migratorio de agua (%)
70	20.1
60	10.7
50	1.1

Tabla 5. Crecimiento micelial en tubos de vidrio con aserrín de encino ajustado a diferentes contenidos de humedad

Contenido de humedad (%)	Crecimiento micelial (cm)		
	Día 1 - 8	Día 9 - 16	Día 17 - 24
30	1.4 ± 1.4	5.4 ± 1.1	8.5 ± 1.2
35	1.5 ± 1.4	5.8 ± 1.0	8.8 ± 1.1
40	1.6 ± 1.5	5.9 ± 1.1	9.2 ± 1.2
45	1.6 ± 1.5	6.0 ± 1.1	9.3 ± 1.2
50	1.6 ± 1.5	5.9 ± 1.1	9.2 ± 1.2
55	1.4 ± 1.3	5.3 ± 1.0	8.3 ± 1.1
60	1.5 ± 1.4	5.5 ± 1.0	8.5 ± 1.2
65	1.0 ± 1.0	3.9 ± 0.8	6.2 ± 0.8
70	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.0
75	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
80	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Tabla 6. Producción semanal (g hongos frescos/bolsa) de 3 cepas de *Lentinula edodes* incubadas por 6, 8 y 10 semanas.

Semanas de corte	Producción semanal de hongos frescos (g hongos frescos/bolsa)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	258.7 ± 245.0	53.1 ± 106.2	107.0 ± 128.6	17.7 ± 30.7	19.4 ± 43.4	363.3 ± 364.1	348.8 ± 129.3	511.7 ± 383.8	768.3 ± 370.6
2	0.0 ± 0.0	73.1 ± 146.2	226.7 ± 153.4	0.0 ± 0.0	53.2 ± 74.5	51.9 ± 79.5	60.5 ± 121.0	49.0 ± 63.3	26.1 ± 46.6
3	93.9 ± 162.6	37.0 ± 25.7	99.7 ± 95.6	66.3 ± 81.9	227.1 ± 253.2	278.8 ± 353.5	36.3 ± 30.4	232.0 ± 257.8	211.2 ± 89.7
4	142.2 ± 123.5	212.3 ± 129.1	108.1 ± 164.3	14.0 ± 24.2	167.9 ± 155.9	134.8 ± 102.8	139.2 ± 276.3	126.5 ± 110.8	0.0 ± 0.0
5	95.7 ± 85.7	59.8 ± 51.5	9.3 ± 20.9	319.2 ± 69.2	192.3 ± 153.9	18.5 ± 27.0	142.2 ± 126.3	34.0 ± 55.8	0.0 ± 0.0
6	44.7 ± 42.9	11.7 ± 23.4	84.3 ± 71.5	78.7 ± 54.3	16.9 ± 37.7	147.1 ± 218.7	142.4 ± 232.7	12.7 ± 25.5	7.9 ± 10.0
7	31.4 ± 27.2	0.0 ± 0.0	25.5 ± 39.8	55.8 ± 96.6	0.0 ± 0.0	26.9 ± 53.7	74.3 ± 87.3	36.3 ± 72.6	0.0 ± 0.0
8	0.0 ± 0.0	14.6 ± 12.9	5.9 ± 13.2	35.3 ± 61.2	41.6 ± 93.1	0.0 ± 0.0	21.3 ± 42.6	67.6 ± 135.1	12.1 ± 10.3
9	0.0 ± 0.0	3.7 ± 7.3	0.0 ± 0.0	57.9 ± 100.2	18.1 ± 40.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	0.0 ± 0.0	21.1 ± 25.0	13.2 ± 21.7	124.6 ± 15.6	13.6 ± 30.3	21.3 ± 42.6	82.1 ± 100.7	0.0 ± 0.0	11.5 ± 23.0

Tabla 6. Producción semanal (g hongos frescos/bolsa) de 3 cepas de *Lentinula edodes* incubadas por 6, 8 y 10 semanas.

Semanas de corte	Producción semanal de hongos frescos (g hongos frescos/bolsa)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	2587 ± 2450	531 ± 1052	1070 ± 1286	177 ± 307	194 ± 434	3633 ± 3541	3488 ± 1293	5117 ± 3838	7683 ± 3705
2	00 ± 00	731 ± 1462	2257 ± 1534	00 ± 00	532 ± 745	519 ± 795	605 ± 1210	490 ± 633	261 ± 466
3	939 ± 1626	370 ± 257	997 ± 956	663 ± 819	2271 ± 2532	2788 ± 3535	363 ± 304	2320 ± 2578	2112 ± 897
4	1422 ± 1235	2123 ± 1291	1081 ± 1643	140 ± 242	1679 ± 1559	1348 ± 1028	1382 ± 2763	1265 ± 1108	00 ± 00
5	957 ± 857	598 ± 515	93 ± 209	3192 ± 692	1923 ± 1539	185 ± 270	1422 ± 1263	340 ± 558	00 ± 00
6	447 ± 429	117 ± 234	843 ± 715	787 ± 543	165 ± 377	1471 ± 2187	1424 ± 2327	127 ± 255	79 ± 100
7	314 ± 272	00 ± 00	255 ± 398	558 ± 966	00 ± 00	269 ± 537	743 ± 873	363 ± 726	00 ± 00
8	00 ± 00	146 ± 129	59 ± 132	353 ± 612	416 ± 931	00 ± 00	213 ± 426	676 ± 1351	121 ± 103
9	00 ± 00	37 ± 73	00 ± 00	579 ± 1002	181 ± 404	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
10	00 ± 00	213 ± 250	132 ± 217	1246 ± 156	136 ± 303	213 ± 426	821 ± 1007	00 ± 00	115 ± 230

Tabla 7. Producción semanal acumulada (g de hongos frescos/bolsa) de 3 cepas de *Lentinula edodes* incubadas por 6, 8 y 10 semanas.

Semanas de corte	Producción semanal acumulada (g hongos frescos/bolsa)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	258.7 ± 245.0	53.1 ± 106.2	107.0 ± 128.6	17.7 ± 30.7	19.4 ± 43.4	363.3 ± 364.1	348.8 ± 129.3	511.7 ± 383.8	768.3 ± 370.6
2	258.7 ± 245.0	126.2 ± 149.3	333.7 ± 176.7	17.7 ± 30.7	72.6 ± 101.1	415.3 ± 353.6	409.3 ± 208.9	580.8 ± 339.1	784.3 ± 339.4
3	352.6 ± 116.7	163.2 ± 148.1	433.5 ± 174.3	84.0 ± 64.3	299.7 ± 249.1	694.1 ± 180.2	445.6 ± 231.2	792.8 ± 156.0	1005.5 ± 266.4
4	494.8 ± 201.3	375.5 ± 77.7	541.6 ± 72.5	98.0 ± 88.4	467.6 ± 222.9	828.9 ± 184.5	583.8 ± 400.1	919.3 ± 66.3	1005.5 ± 266.4
5	590.5 ± 122.5	435.4 ± 88.6	550.9 ± 76.4	417.2 ± 20.5	659.9 ± 180.9	847.4 ± 158.3	726.0 ± 453.1	953.3 ± 67.2	1005.5 ± 266.4
6	635.2 ± 137.3	447.0 ± 71.8	635.2 ± 85.7	495.9 ± 60.7	676.7 ± 153.0	994.5 ± 77.9	858.4 ± 262.8	966.0 ± 88.5	1013.5 ± 267.8
7	666.6 ± 142.6	447.0 ± 71.8	660.7 ± 120.6	551.6 ± 118.9	676.7 ± 153.0	1021.4 ± 45.1	942.7 ± 332.8	1002.4 ± 158.2	1013.5 ± 267.8
8	666.6 ± 142.6	461.6 ± 84.2	666.6 ± 118.5	586.9 ± 134.2	718.4 ± 112.3	1021.4 ± 45.1	964.0 ± 310.1	1069.9 ± 167.4	1025.5 ± 275.2
9	666.6 ± 142.6	465.3 ± 88.8	666.6 ± 118.5	644.8 ± 206.0	736.4 ± 115.3	1021.4 ± 45.1	964.0 ± 310.1	1069.9 ± 167.4	1025.5 ± 275.2
10	666.6 ± 142.6	486.3 ± 97.3	679.8 ± 124.5	769.4 ± 190.5	750.0 ± 88.3	1042.7 ± 51.0	1046.1 ± 232.9	1069.9 ± 167.4	1037.0 ± 282.0

Tabla 8. Rendimiento máximo significativo (g de hongos frescos/100g de sustrato seco) de 3 cepas de *Lentinula edodes* con 6, 8 y 10 semanas de incubación.

Semanas de corte	Producción semanal acumulada (g hongo/100 g sustrato seco)																	
	Cepas																	
	L5				L15				L9									
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación								
	6	8	10	6	8	10	6	8	10	6	8	10						
1	29.8 ± 28.0	a	6.3 ± 12.7	a	13.0 ± 15.7	a	2.0 ± 3.5	a	2.3 ± 5.1	a	44.0 ± 44.1	a	39.4 ± 14.8	a	59.8 ± 44.2	a	93.9 ± 44.7	a
2	29.6 ± 26.0	a	15.0 ± 17.8	a	40.9 ± 21.7	b	2.0 ± 3.5	a	8.5 ± 11.9	a	50.2 ± 42.0	a	46.4 ± 24.5	ab	95.5 ± 33.9	a	99.8 ± 40.9	a
3	40.3 ± 13.4	ab	19.4 ± 17.6	a	53.1 ± 21.3	b	9.5 ± 7.3	a	34.9 ± 29.0	b	83.7 ± 21.7	b	50.5 ± 27.1	ab	92.9 ± 17.1	b	122.9 ± 32.1	b
4	56.5 ± 23.0	bc	44.5 ± 9.2	b	66.3 ± 8.5	c	11.1 ± 10.0	a	54.5 ± 25.8	c	100.0 ± 22.5	bc	68.1 ± 45.6	bc	107.8 ± 6.4	bc	122.6 ± 32.1	b
5	67.4 ± 14.0	c	51.6 ± 10.5	b	87.4 ± 9.9	cd	47.1 ± 2.8	b	77.0 ± 21.2	d	102.2 ± 19.4	bc	82.2 ± 52.0	cd	111.8 ± 6.7	bc	123.6 ± 32.1	b
6	72.5 ± 15.6	c	53.0 ± 8.5	b	77.7 ± 10.1	cd	56.1 ± 7.7	bc	78.9 ± 17.9	d	119.9 ± 9.2	c	98.5 ± 30.8	de	113.3 ± 9.1	bc	123.6 ± 32.3	b
7	78.1 ± 16.4	c	53.0 ± 8.5	b	80.8 ± 14.4	de	62.4 ± 14.0	bc	78.9 ± 17.9	d	123.1 ± 4.7	c	106.7 ± 38.4	de	117.4 ± 16.8	bc	123.6 ± 32.3	b
8	76.1 ± 16.4	c	54.7 ± 10.0	b	81.6 ± 14.1	de	86.4 ± 16.0	c	83.8 ± 13.0	d	123.1 ± 4.7	c	109.1 ± 35.9	e	125.3 ± 18.0	c	125.0 ± 33.2	b
9	76.1 ± 16.4	c	55.2 ± 10.5	b	81.6 ± 14.1	de	73.0 ± 23.9	cd	85.8 ± 13.2	d	123.1 ± 4.7	c	109.1 ± 35.9	e	125.3 ± 18.0	c	125.0 ± 33.2	b
10	76.1 ± 16.4	c	57.6 ± 11.5	b	83.2 ± 14.8	e	87.0 ± 22.4	d	87.4 ± 10.1	d	125.7 ± 5.7	c	118.3 ± 27.2	e	125.3 ± 18.0	c	126.4 ± 31.6	b

Letras diferentes en las semanas de corte para cada cepa y tiempo de incubación indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Tabla 9. Efecto de la cepa de *Lentinula edodes* y del tiempo de incubación sobre el rendimiento máximo significativo (g hongos frescos/100g sustrato seco).

Cepa	Rendimiento máximo significativo (g hongos frescos/100g sustrato seco)				
	Semanas de incubación			Promedio por cepa	
	6	8	10		
L5	56.5 ± 23.0	44.5 ± 9.2	77.7 ± 10.1	61.3 ± 19.7	a
L15	73.0 ± 23.9	77.0 ± 21.2	100.0 ± 27.5	83.6 ± 23.5	b
L9	98.3 ± 30.8	107.8 ± 6.4	122.6 ± 32.1	109.5 ± 25.6	c
Promedio por tiempo de incubación	78.17 ± 30.1	76.4 ± 29.1	98.3 ± 28.1		
	a	a	b		

Letras diferentes en las semanas de incubación y en el promedio por cepa indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Tabla 10. Rendimiento máximo significativo (g de hongos frescos/bolsa) de la cepa L15 de *Lentinula edodes* incubada por 6, 8 y 10 semanas.

Semanas de corte	Producción semanal acumulada (g hongo fresco/bolsa)					
	Cepa L15					
	Semanas de incubación					
	6		8		10	
1	17.7 ± 30.7	a	19.4 ± 43.4	a	363.3 ± 364.1	a
2	17.7 ± 30.7	a	72.6 ± 101.1	a	415.3 ± 353.6	a
3	84.0 ± 64.3	a	299.7 ± 249.1	b	694.1 ± 180.2	b
4	98.0 ± 88.4	a	467.6 ± 222.9	c	828.9 ± 184.5	bc
5	417.2 ± 20.5	b	659.9 ± 180.9	d	847.4 ± 158.3	bc
6	495.9 ± 60.7	bc	676.7 ± 153.0	d	994.5 ± 77.9	c
7	551.6 ± 118.9	bc	676.7 ± 153.0	d	1021.4 ± 45.1	c
8	586.9 ± 134.2	c	718.4 ± 112.3	d	1021.4 ± 45.1	c
9	644.8 ± 206.0	cd	736.4 ± 115.3	d	1021.4 ± 45.1	c
10	769.4 ± 190.5	d	750.0 ± 88.3	d	1042.7 ± 51.0	c

Letras diferentes en las semanas de corte para cada tiempo de incubación indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Tabla 11. Producción semanal de cuerpos fructíferos (no. de hongos/bolsa) de 3 cepas de *Lentinula edodes* incubadas a 6, 8 y 10 semanas.

Semanas de corte	Producción semanal promedio (No. de hongos / bolsa)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	2 ± 3	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	6 ± 6	9 ± 2	34 ± 37	49 ± 25
2	0 ± 0	2 ± 3	2 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
3	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 2	1 ± 1	5 ± 4	9 ± 11	1 ± 1	2 ± 2	24 ± 10
4	3 ± 3	5 ± 3	2 ± 3	0 ± 1	4 ± 5	3 ± 2	1 ± 3	4 ± 4	0 ± 0
5	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	4 ± 2	6 ± 6	1 ± 1	2 ± 2	1 ± 2	0 ± 0
6	1 ± 1	1 ± 2	1 ± 1	2 ± 2	0 ± 1	2 ± 2	3 ± 3	0 ± 1	1 ± 1
7	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	3 ± 3	5 ± 10	0 ± 0
8	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	2 ± 3	1 ± 1
9	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10	0 ± 0	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2

Tabla 12. Producción semanal acumulada de cuerpos fructíferos (no. de hongos/bolsa)

Semanas de corte	Producción semanal acumulada promedio (no. de hongos/bolsa)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	2 ± 3	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	6 ± 6	9 ± 2	34 ± 37	49 ± 25
2	2 ± 3	2 ± 3	4 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	7 ± 6	9 ± 2	35 ± 36	50 ± 24
3	3 ± 2	3 ± 3	5 ± 2	1 ± 0	5 ± 4	15 ± 7	11 ± 3	36 ± 35	74 ± 16
4	6 ± 1	7 ± 2	6 ± 2	1 ± 1	9 ± 6	19 ± 6	12 ± 5	40 ± 34	74 ± 16
5	7 ± 1	9 ± 2	7 ± 2	5 ± 2	15 ± 3	19 ± 5	14 ± 5	42 ± 33	74 ± 16
6	8 ± 1	9 ± 3	8 ± 2	7 ± 4	16 ± 3	21 ± 5	17 ± 3	42 ± 33	74 ± 15
7	9 ± 1	9 ± 3	9 ± 2	8 ± 4	16 ± 3	21 ± 5	19 ± 6	47 ± 40	74 ± 15
8	9 ± 1	10 ± 3	9 ± 2	8 ± 5	16 ± 3	21 ± 5	20 ± 5	48 ± 38	76 ± 15
9	9 ± 1	11 ± 3	9 ± 2	9 ± 5	16 ± 3	21 ± 5	20 ± 5	48 ± 38	76 ± 15
10	9 ± 1	12 ± 5	10 ± 2	10 ± 4	17 ± 3	22 ± 5	20 ± 5	48 ± 38	77 ± 15

Tabla 13. Efecto de la cepa de *Lentinula edodes* y del tiempo de incubación sobre el número de cuerpos fructíferos producidos

Cepa	Número de hongos promedio					
	Semanas de incubación					
	6		8		10	
L5	6.3 ± 2.9	ab	7.2 ± 4.5	ab	6.7 ± 3.2	ab
L15	5 ± 4.4	ab	11.2 ± 7	bc	17.23 ± 7.5	d
L9	14.9 ± 5.8	cd	41.8 ± 32.3	e	69.52 ± 18.5	f

Letras diferentes en las cepas y tiempos de incubación indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Tabla 14. Peso unitario acumulado de 3 cepas de *Lentinula edodes* incubadas por 6, 8 y 10 semanas (g/hongo fresco)

Semanas de corte	Peso unitario acumulado (g/hongo fresco)								
	Cepas								
	L5			L15			L9		
	Semanas de incubación			Semanas de incubación			Semanas de incubación		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10
1	150.7 ± 131.4	106.2	74.1 ± 32.0	53.2	97.0	60.4 ± 8.0	39.4 ± 15.9	59.8 ± 59.3	16.2 ± 4.7
2	150.7 ± 131.4	77.5 ± 40.7	91.5 ± 20.4	53.2	90.7 ± 18.6	71.0 ± 26.4	45.1 ± 26.5	44.8 ± 37.7	16.5 ± 4.1
3	147.4 ± 93.1	61.4 ± 30.1	93.5 ± 38.0	84.0 ± 64.3	55.5 ± 20.8	48.2 ± 10.6	41.7 ± 20.8	68.1 ± 64.5	13.6 ± 2.3
4	81.7 ± 29.9	55.2 ± 15.5	92.9 ± 38.6	64.7 ± 31.1	58.6 ± 19.2	46.2 ± 8.7	46.6 ± 22.6	50.3 ± 45.8	13.6 ± 2.3
5	86.1 ± 26.1	52.4 ± 12.0	92.5 ± 39.0	93.3 ± 37.1	43.8 ± 13.2	45.1 ± 8.6	47.4 ± 19.3	43.7 ± 35.4	13.6 ± 2.3
6	84.0 ± 24.6	51.1 ± 14.4	85.7 ± 27.1	80.7 ± 29.0	44.0 ± 13.0	50.3 ± 14.6	52.5 ± 12.9	43.8 ± 35.2	13.7 ± 2.3
7	78.8 ± 24.1	51.1 ± 14.4	77.4 ± 17.4	80.7 ± 29.0	44.0 ± 13.0	50.7 ± 14.1	49.5 ± 12.3	43.5 ± 35.6	13.7 ± 2.3
8	78.8 ± 24.1	49.3 ± 14.9	75.8 ± 19.4	80.8 ± 28.8	45.7 ± 12.0	50.7 ± 14.1	50.1 ± 12.2	41.9 ± 34.5	13.5 ± 2.3
9	78.8 ± 24.1	47.3 ± 14.6	75.8 ± 19.4	84.1 ± 29.8	46.3 ± 12.0	50.7 ± 14.1	50.1 ± 12.2	41.9 ± 34.5	13.5 ± 2.3
10	78.8 ± 24.1	44.8 ± 16.0	71.9 ± 16.0	77.6 ± 19.9	46.3 ± 11.9	50.3 ± 14.0	53.6 ± 11.1	41.9 ± 34.5	13.6 ± 2.3

Tabla 15. Efecto de la cepa de *Lentinula edodes* y del tiempo de incubación sobre el peso unitario de los cuerpos fructíferos.

Cepa	Peso unitario promedio (g/hongo fresco)					
	Semanas de incubación					
	6		8		10	
L5	81.7 ± 29.8	cd	55.2 ± 23.7	bcd	85.7 ± 27.1	d
L15	84.1 ± 29.8	d	43.74 ± 13.1	b	46.1 ± 8.6	b
L9	52.5 ± 12.8	bc	50.3 ± 45.7	b	13.6 ± 2.3	a

Letras diferentes en las cepas y tiempos de incubación indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

Tabla 16. Contenido de humedad promedio de los hongos de las cepas L5, L9 y L15 de *Lentinula edodes*.

Cepa	Contenido de humedad (%)	
L5	91.5 ± 3.8	a
L15	93.5 ± 1.4	b
L9	94.4 ± 1.7	b

Letras diferentes en cada cepa indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Tabla 17. Balance de masa del proceso de producción de *Lentinula edodes* .

Muestra		Peso del sustrato (g sustrato seco/bolsa)		Perdida de sustrato		Hongos producidos (g hongos secos)	Conversión de sustrato en Hongos (g hongos secos/100g de sustrato seco degradado)
Cepa	Semanas de incubación	Inicial	Final	g	%		
L5	6	1167.2	297.6	775.2	66.4	94.4	12.2
L5	8	1139.2	159.8	954.5	83.8	24.9	2.6
L5	8	1137.3	121.8	970.8	85.4	44.6	4.6
L5	10	1137.6	292.3	792.2	69.6	53	6.7
L15	8	1165.2	486.4	627.5	53.9	51.2	8.2
L15	8	1152.9	119.2	984.4	85.4	49.2	5.0
L9	8	1162.4	380	700.9	60.3	81.5	11.6
L9	10	1132.9	379.7	629.1	55.5	124.2	19.7
L9	10	1131.5	260.4	793	70.1	78.1	9.8



Foto 1. Cuarto de incubación con bolsas inoculadas.

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

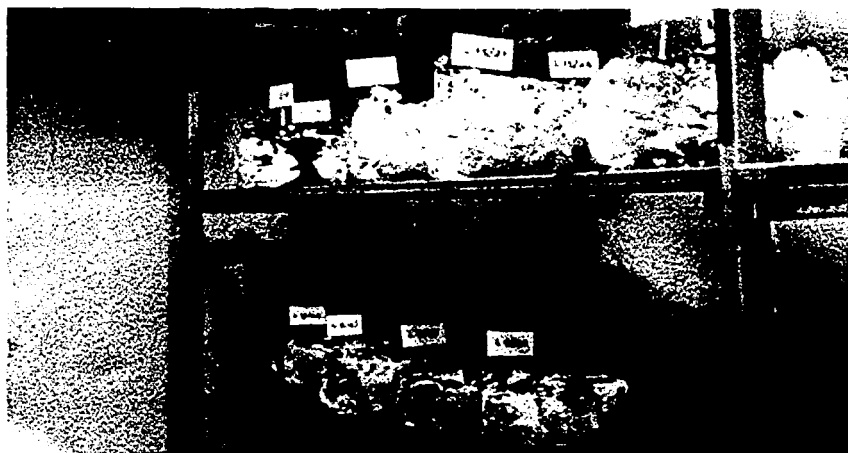


Foto 2. Cuarto de fructificación con bloques totalmente invadidos.



Foto 3. Bloques en cuarto de fructificación al término del periodo de incubación.



Foto 4. Primordios desarrollándose.

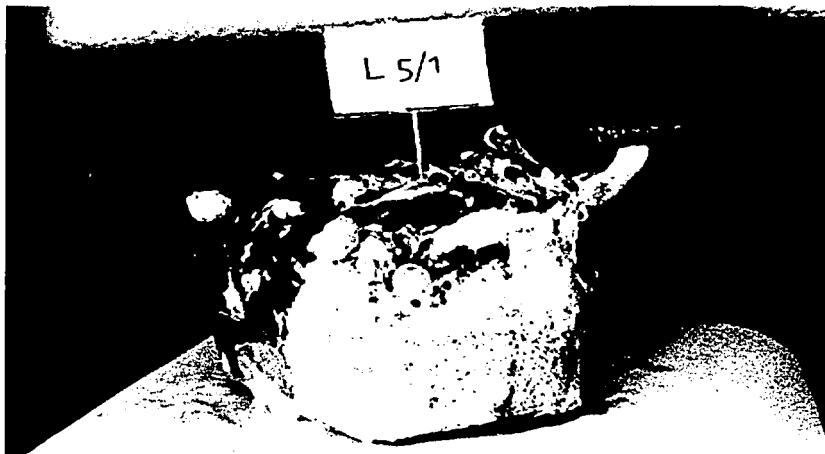


Foto 5. Bloque con un solo primordio viable y varios abortados.

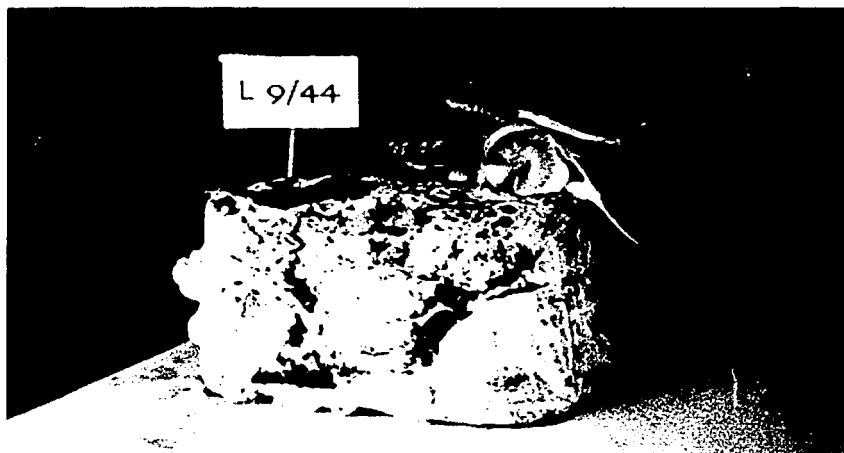


Foto 6. Bloque con fructificaciones listas para ser cosechadas.



Foto 7. Bloque con esporomas maduros



Foto 8. Bloque con esporomas maduros.

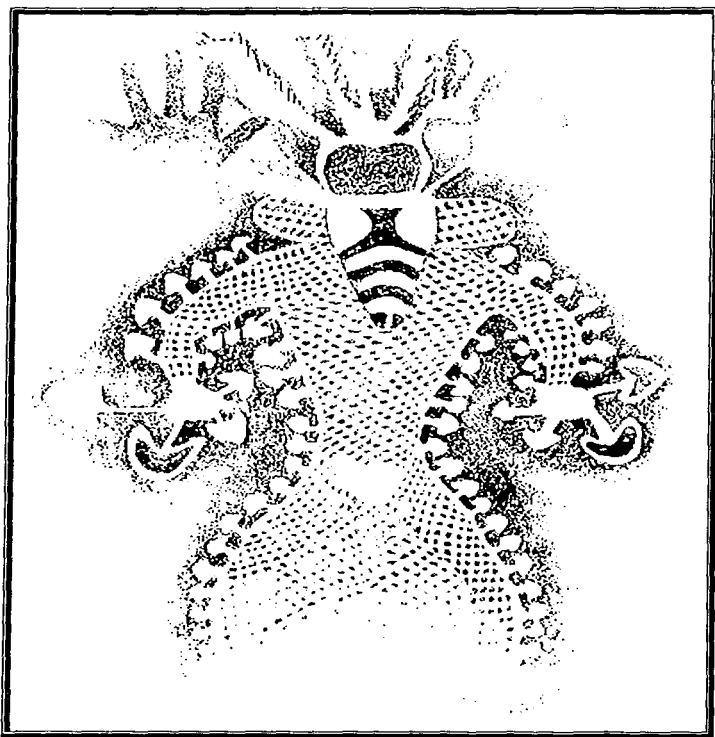


Ilustración 1. Pintura rupestre en Argelia, con fecha aproximada de 5000 años a.C.
(Stamets, 1993).

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Badham, E.R. 1988. Is autoclaving Shiitake substrate necessary? *Mush. J. Tropics* 8:129-136.
2. Chang, S.T., P.G. Miles. 1989. *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press, Boca Ratón.
3. Chang, S.T. 1996. Mushroom research and development equality and mutual benefit. *Mushroom Biol. Mushroom Prod.* 2: 1-10.
4. Chang, S.T. 2002 Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. *Mushroom biology and mushroom products*. Sánchez (eds). UAEM.
5. Chen A.W., N. Arrol, P. Stamets. 2000. Shiitake cultivation systems. *Science and cultivation of Edible Fungi*, Van Griensven (ed). Rotterdam, 771 – 778.
6. Delpech, P., J.M. Olivier. 1991. Cultivation of Shiitake on straw based pasteurized substrates *In: Maher* (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam. 523-528.
7. Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos. 1993. *El cultivo de los hongos comestibles*. Instituto Politécnico Nacional. México.
8. Herrera, T., M. Ulloa. 1990. *El reino de los Hongos, Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica. México.
9. Hiromoto, B.T. 1991. Comparative analysis of Shiitake culture system. *In: Maher* (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 489-496.
10. Jones, K. 1995. Shiitake: *The healing mushrooms*. Healing Arts Press.
11. Leal -Lara H. 2000. *Guía Técnica para la producción de setas en pequeña y mediana escala*. FONAES, SEDESOL México.
12. Levanon, D., N. Rothschild, O. Danai, & S. Masaphy. 1993. Strain selection for cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) on straw. *Bioresource Technology* 45: 9-12.
13. Margulis, L., K. V. Schwartz. (?), *Los cinco reinos*, edición de la facultad de Ciencias, "por una educación popular".
14. Mata, G. 1990. Cultivo del hongo comestible *Lentinus boryanus* en el laboratorio y su comparación con el shiitake japonés *Lentinus edodes*. Tesis de Maestría, UNAM.
15. Pettipher, G.L. 1988. Cultivation of the oyster and shiitake mushrooms on lignocellulosic wastes. *The Mushroom Journal*, 491-493.

16. Pettipher, G.L. 1988. Cultivation of the shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic waste. *J. Sci. Food Agric.* 42: 195-198.
17. Przybylowicz, P., J. Donoghue. 1990. *Shiitake Growers Handbook: The Art and Science of Mushroom Cultivation*. Kendall / Hunt Publishing Company. Iowa, USA.
18. Rinker, D.L. 1991. The influence of heat treatment, genotype and other cultural practices on the production of Shiitake mushrooms on sawdust. *In: Maher (ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 497-502.
19. Royse, D.J., L.C. Shisler, D. Diehle. 1985; Shiitake Mushrooms, Consumption, Production and Cultivation, *Interdisciplinary Science Reviews*, 10 (4).
20. Royse, D.J., L.C., Schisler. 1986 Cultivation of Shiitake on supplemented sawdust. *Shiitake News*, 3(1): 1-4.
21. Royse, D.J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia* 77(5): 756-762.
22. Royse, D.J. 1997. Specialty mushrooms: consumption, production and cultivation. *Rev. Mex. Mic.* 13: 1-11.
23. Royse D.J., J.E. Sánchez-Vázquez. 2000. Influence of wood chip particle size used in substrate on biological efficiency and post-soak log weights of shiitake. *In: Maher (ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 367-373.
24. Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley.