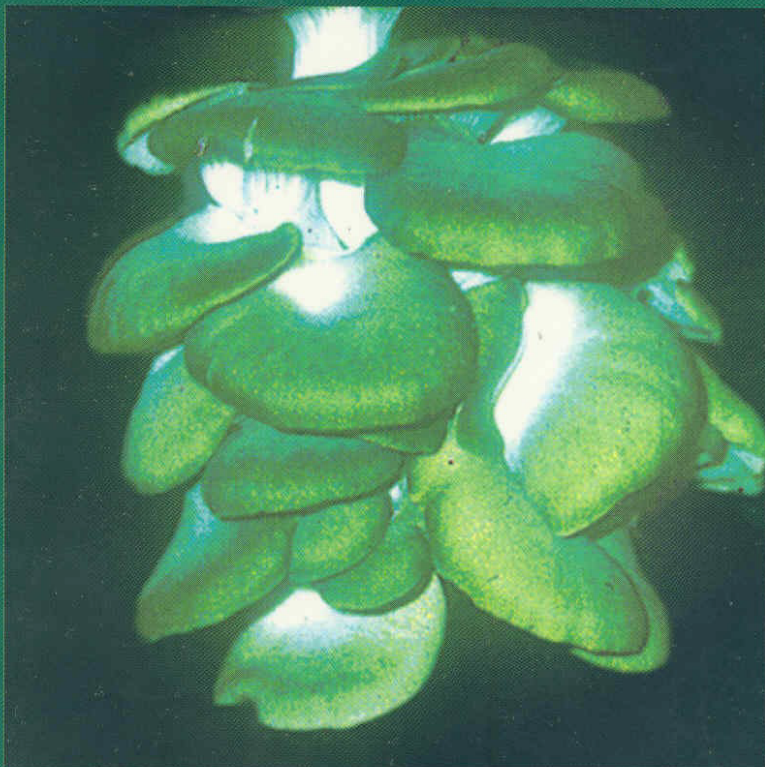


La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.

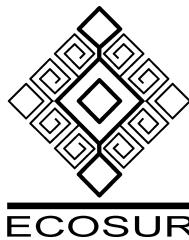


José E. Sánchez • Daniel Royse

La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.

La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.

José Ernesto Sánchez Vázquez y Daniel J. Royse



EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR

1a edición, 2001

D.R. © El Colegio de la Frontera Sur
Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n
Barrio de María Auxiliadora
San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México

Impreso en México / Printed in Mexico

CONTENIDO

Lista de colaboradores	14
Agradecimientos	15
Capítulo I. La importancia del cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica	17
INTRODUCCIÓN	19
PRODUCCIÓN MUNDIAL DE HONGOS COMESTIBLES	20
PRIMER CULTIVO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	21
PRODUCCIÓN DE <i>PLEUROTUS</i> EN HISPANOAMÉRICA	21
España	21
México	21
Estados Unidos y Canadá	22
Otros países del área	24
PERSPECTIVAS	25
REFERENCIAS	26
Capítulo II. Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos	27
CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LOS HONGOS	29
Hábitat y función en la naturaleza	29
Reproducción de los hongos	30
LOS BASIDIOMICETOS	32
El micelio de los basidiomicetos	34
El septo en el micelio de los basidiomicetos	37
Los basidiocarpos	39
La basidia	43
Las basidiosporas	44
Ciclo de vida de hongos comestibles	45
REFERENCIAS	47
Capítulo III. Crecimiento y fructificación	49
INTRODUCCIÓN	51
CÓMO CRECEN LOS HONGOS	51
FASES DEL CRECIMIENTO	54
La fase de latencia	54
La fase exponencial	54
La fructificación	57
La fase de declinación	58
La fase estacionaria y muerte	59
FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y LA FRUCTIFICACIÓN. EL CASO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	59
La temperatura	59
El pH	59
El sustrato	60

La humedad en el sustrato	63
La humedad del aire	64
El tamaño de partícula	64
La aireación	64
La luz	64
REFERENCIAS	66
Capítulo IV. Sistemática del género <i>Pleurotus</i> con énfasis en las especies cultivadas	69
INTRODUCCIÓN	71
SISTEMÁTICA TRADICIONAL	72
Color y forma	72
Estudios de incompatibilidad genética	73
SISTEMÁTICA MOLECULAR	75
RESUMEN Y PERSPECTIVAS FUTURAS	77
REFERENCIAS	79
Capítulo V. La conservación y el uso de los recursos genéticos de <i>Pleurotus</i> spp.	83
INTRODUCCIÓN	85
INTERÉS DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN <i>PLEUROTUS</i>	86
Alimentación humana	86
Alimentación de ganado	86
Control biológico	87
Degradación de productos	87
Potencial para usar los sustratos agrícolas	87
CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	91
El tipo de incompatibilidad sexual (<i>mating-type</i>) de <i>Pleurotus</i> spp.	91
Colección de cepas	93
Obtención de homocariotes	94
A partir de esporas	94
A partir de protoplastos	95
A partir de micelio molido	96
Las distancias genéticas	96
Los cruzamientos	98
La mutagénesis	100
Los ensayos	101
RECURSOS GENÉTICOS DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	102
Caracterización del germoplasma	103
Caracterización morfológica y fisiológica	103
Caracterización isoenzimática	104
Caracterización por RFLP	104
Caracterización por RAPD	106
Caracterización por PCR	106
Almacenamiento del germoplasma	109

Agua destilada estéril	111
Subcultivo	111
Almacenamiento en aceite mineral	111
Bancos de datos	112
Bancos de recursos genéticos	112
DISCUSIÓN	113
AGRADECIMIENTOS	117
REFERENCIAS	118

Capítulo VI. Una revisión de técnicas de mantenimiento de cepas, con énfasis en las que se adaptan a *Pleurotus* spp. 125

INTRODUCCIÓN	127
LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS	127
Cultivo del tejido	127
Cultivos multi y monospóricos	128
Descripción de la técnica para obtener cultivos de esporas	128
Fuentes de cultivos	129
Pruebas de validación de cultivos	129
TECNOLOGÍA DE MANTENIMIENTO	129
Transferencia de agar a agar	129
Tasa de crecimiento	132
Almacenamiento en papel filtro	134
Esporada	134
Agua destilada estéril	134
Almacenamiento con nitrógeno líquido	135
Sectorización y otras anomalías	136
EL MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	136
Las precauciones	136
El personal	137
REFERENCIAS	139

Capítulo VII. Preparación de la semilla 141

INTRODUCCIÓN	143
SUBSTRATOS PARA LA SEMILLA	143
RECIPIENTES PARA LA SEMILLA	144
PREPARACIÓN DE LA SEMILLA MADRE	145
Preparación del grano	145
Esterilización	146
Inoculación con cultivo micelial	146
Inoculación con inóculo líquido	151
Incubación	152
PREPARACIÓN DE LA SEMILLA SECUNDARIA EN GRANO (PARA SIEMBRA)	152
Preparación de la semilla de aserrín	152

Preparación del sustrato de aserrín	153
Inoculación de la semilla de aserrín con grano primario	153
Incubación	153
ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA	154
Calidad de semilla	154
PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD POR MANEJO DE	
SEMILLA POR PRODUCTORES Y CULTIVADORES	155
REFERENCIAS	156
Capítulo VIII. La preparación del sustrato	
INTRODUCCIÓN	159
MATERIAS PRIMAS: ALGUNAS FUENTES DE APROVISIONAMIENTO, COMPOSICIÓN QUÍMICA	
Y CRITERIOS DE SELECCIÓN Y EVALUACIÓN	160
RECORRIDO HISTÓRICO POR LA UTILIZACIÓN EXPERIMENTAL DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS.	
ALGUNAS FORMULACIONES USUALES	166
MÉTODOS USADOS EN LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO	167
Operaciones preliminares de tipo general	170
<i>Pellets</i> de paja	172
Esterilización y semiesterilización térmica	172
Tratamiento con agua caliente. Cocido y lavado de paja	173
Pasteurización	174
Fermentación aerobia	175
Esterilización química	176
Fermentación en el medio natural	177
Fermentación anaerobia o <i>en frío</i>	179
REFERENCIAS	184
Capítulo IX. El cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.	187
INTRODUCCIÓN	189
LA PASTEURIZACIÓN	189
La pasteurización con agua caliente	190
La pasteurización por vapor	191
El composteo	191
EL RECIPIENTE PARA EL SUSTRATO	192
LA SIEMBRA	193
La semilla	194
La tasa de inoculación	194
El lugar para sembrar	195
LA INCUBACIÓN	195
CUIDADOS DURANTE LA SIEMBRA Y LA INCUBACIÓN	196
LA FRUCTIFICACIÓN	197
La fructificación bajo condiciones controladas	197
La temperatura	197

La humedad relativa	197
El riego	198
La ventilación	198
La luz	201
Fructificación a la intemperie	201
LA COSECHA	202
REFERENCIAS	203

Capítulo X. Plagas y enfermedades del género <i>Pleurotus</i> spp.	205
INTRODUCCIÓN	207
LAS PLAGAS	208
Dípteros	208
Esciáridos	208
Fóridos	209
Cecidómidos	210
Colémbolos	211
Ácaros	211
LAS ENFERMEDADES	212
Hongos	212
Tela de araña	212
Mole seca	213
Hongos verdes	213
Otros hongos competidores	216
Bacterias	216
Mancha amarilla	216
Mancha parda	217
Otras bacteriosis	218
Virus	218
ANOMALÍA NO PARASITARIAS	219
Falta de luz	219
Exceso de CO ₂	220
Efectos de gases y plaguicidas	220
Otras alteraciones no parasitarias	220
MEDIDAS GENERALES DE HIGIENE	220
REFERENCIAS	222

Capítulo XI. Los criterios para el diseño y la distribución de una planta productora de <i>Pleurotus</i> spp.	225
ANTECEDENTES	227
MERCADO: CAPACIDAD Y UBICACIÓN	227
Mercado	227
Capacidad de producción	228
Ubicación	228

DISTRIBUCIÓN DE PLANTA	229
El laboratorio	229
La central para la preparación del sustrato	232
La sala de cultivo	233
REFERENCIAS	236
Capítulo XII. Factores que afectan la vida de anaquel de los hongos comestibles frescos	237
INTRODUCCIÓN	239
COLOR DE LOS HONGOS	239
Evaluación del consumidor	239
Mecanismo de obscurecimiento	240
PÉRDIDA DE AGUA	241
MADURACIÓN	242
Mecanismo	242
Evaluación del consumidor	244
MÉTODOS PARA PROLONGAR LA VIDA DE ANAQUEL DE LOS HONGOS FRESCOS	244
Tratamientos antes de la cosecha	244
Tratamientos poscosecha	245
Almacenamiento a baja temperatura	245
Secado	246
Irradiación	246
Lavado	247
Cortado del estípite	248
Empaques con atmósfera controlada y modificada	248
Concentración gaseosa y vida de anaquel	249
Riesgos potenciales de EAM	250
Empaques con humedad modificada	251
Formas para reducir la humedad en el empaque	251
REFERENCIAS	253
Capítulo XIII. Aspectos ambientales en el cultivo de hongos	259
INTRODUCCIÓN	261
SUBSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	261
Criterios analíticos para seleccionar el sustrato	261
Reciclamiento de los desechos orgánicos a través de la producción de <i>Pleurotus</i>	262
CONSIDERACIONES AMBIENTALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS	262
Colección del sustrato, transporte, almacenamiento y proceso	262
Daño posible al ambiente por la producción de hongos comestibles	264
Daño potencial a los trabajadores por alergias a esporas	265
USO DEL SUBSTRATO DEGRADADO POR LOS HONGOS (SDH)	266
Uso de SDH de especies de <i>Pleurotus</i> como alimeto para rumiantes	266
Potencial de especies del género <i>Pleurotus</i> en la biodegradación de contaminantes ambientales	268

Usos adicionales	268
Observaciones finales	269
REFERENCIAS	271
Capítulo XIV. Aspectos económicos de la producción de <i>Pleurotus</i> spp.	273
INTRODUCCIÓN	275
ECONOMÍA DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA	275
Capital de inversión	276
Costo de producción	276
Costo total	276
Egresos / recuperación	276
Análisis económico	277
Eficiencia económica	277
EFICIENCIA EN EL COSTO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS	278
Inversión, costos y retorno	278
Plantas del sur de la India	279
Plantas de NABARD (India). Especificaciones	280
Plantas en NEH India	282
Plantas basadas en la pulpa de café en México	282
Pequeñas plantas de Filipinas	283
Plantas de Hiratake en el Japón	283
ECONOMÍAS DEL MANEJO POSCOSECHA	284
Inversión y costos	284
Mercado fresco	284
Conservación	285
Valor agregado	286
ECONOMÍA DE MERCADO	287
Costo a nivel del productor	287
Costo al nivel intermediario	287
Limitaciones del mercado	288
REFERENCIAS	290

LISTA DE COLABORADORES

ANANTHESWARAN, R.C.
116 B Borland Laboratory
Department of Food Science
Pennsylvania State University
University Park, PA, 16802, EUA
Tel: (814) 863-6132
E-mail: rca3@psu.edu

BOIS, FRÉDÉRIC
Laboratorio de Genética Molecular e Hibridación de
Hongos Comestibles
CRA de Bordeaux, BP 81
33 883 Villenave d'Ornon Cedex, France

CALVO-BADO, LEO A.
Horticulture Research International
Plant Pathology and Microbiology Department
Mushroom Genetics Group
Wellesbourne, Warwickshire, CV35 9EF, England
E-mail: Leonides.Calvo-Bado@hri.ac.uk

DANAI, OFER
Galilee Technical Center MIGAL80,
South Industrial Zone, Kiryat shmona
P.O. Box 90000 Rosh-Pina, 12 100, Israel
Tel: 972-6-953511

GEA, FRANCISCO
Centro de Investigación y Experimentación y Servi-
cios del Champiñón (CIES)
Ap. no. 8, 16220, Quintanar del Rey, Cuenca, España
Tel: 967-496240
E-mail: gena.cies@citelan.es

HUERTA-PALACIOS, GRACIELA
Departamento de Biotecnología Ambiental
El Colegio de la Frontera Sur
A.P. 36, Tapachula, Chiapas, 30700, México
Tel: (52) (962) 6281103 y 04
E-mail: ghuerta@tap-ecosur.edu.mx

LABARÈRE, JACQUES
Laboratorio de Genética Molecular e Hibridación de
Hongos Comestibles,
CRA de Bordeaux, BP 81
33 883, Villenave d'Ornon Cedex, France
E-mail: labarere@bordeaux.inra.fr

LEVANON, DAN
Galilee Technical Center MIGAL80,
South Industrial Zone, Kiryat shmona

P.O. Box 90000 Rosh-Pina, 12 100, Israel
Tel: 972-6-953511

MUEZ ORORBIA, MIGUEL ÁNGEL
Larrabide, 9 3o 1, 31003, Pamplona (Navarra), España

PARDO, JOSÉ
Centro de Investigación y Experimentación y Servi-
cios del Champiñón (CIES)
Ap. no. 8, 16220, Quintanar del Rey, Cuenca, España
Tel: 967-496240
e-mail: pardo.cies@citelan.es

QUIMIO, TRICITA
Department of Plant Pathology,
College of Agriculture
University of the Philippines at Los Banos
College Laguna, Filipinas
e-mail: thq@laguna.net

ROY, S.
Department of Food Science
The Pennsylvania State University
University Park, PA 16802
EUA

ROYSE, DANIEL J.
Department of Plant Pathology,
316 Buckhout Laboratory
Pennsylvania State University
University Park, PA 16802 EUA
Tel: (814) 863-7217
e-mail: djr4@psu.edu

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, JOSÉ E.
Departamento de Biotecnología Ambiental
El Colegio de la Frontera Sur
A.P. 36, Tapachula, Chiapas, 30700, México
Tel: (52) (962) 6281103 y 04
E-mail: esanchez@tap-ecosur.edu.mx

VERMA, R.N.
National Centre for Mushroom Research and Training
Chambaghat, Solan 173 213, India
Tel: (91) 1792 30451
E-mail: ncmrt@x400.nic.nicgw.nic.in

WILKINSON, VJIA
Department of Plant Pathology,
117 Buckhout Laboratory
Pennsylvania State University
University Park, PA 16802 EUA
Tel: (814) 863-7217
E-mail: vxw2@psu.edu

Agradecimientos

Tenemos a bien agradecer al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, Curador del Herbario Micológico de la Facultad de Ciencias de la UNAM y al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, Jefe del Departamento Hongos del Instituto de Ecología, AC, por sus críticas y sugerencias al contenido de esta obra. Así mismo, quisiéramos agradecer al Dr. Manuel Ospina Giraldo, al Dr. Francisco Infante Martínez, a la M. C. Guadalupe Nieto López, a la QFB Consuelo Nieto López y a la C.P. María del Carmen Castillo Ojeda, por la lectura de toda la obra y sus importantes contribuciones para mejorar la redacción. Además, deseamos hacer patente nuestro agradecimiento a la Srita. Sofía Carballo, Jefa del Departamento de Difusión de ECOSUR, por su apoyo constante en la revisión, el formato y el trámite final para la impresión de este libro. Finalmente, hacemos un reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Sistema de Investigación Benito Juárez (SIBEJ), porque a través de los apoyos a los proyectos de investigación 3015-N9411, 96 MT-01, 97-05013 y 00-34199B desarrollados en Ecosur, sobre la biología y el cultivo de especies de *Pleurotus*, contribuyeron de manera indirecta a la realización de este libro.

José E. Sánchez y Daniel J. Royse

I La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica.

Daniel J. Royse y José E. Sánchez Vázquez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	19
PRODUCCIÓN MUNDIAL DE HONGOS COMESTIBLES	20
PRIMER CULTIVO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	21
PRODUCCIÓN DE <i>PLEUROTUS</i> EN HISPANOAMÉRICA	21
España	21
México	21
Estados Unidos y Canadá	22
Otros países del área	24
PERSPECTIVAS	25
REFERENCIAS	26

INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de 200 años en Europa con el cultivo del champiñón *Agaricus bisporus* y en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edodes* y *Auricularia* spp. Esta tecnología llegó al nuevo mundo hacia finales del siglo 19 y la primera mitad del siglo 20 de una manera muy discreta. No fue sino hacia la segunda mitad de este siglo, gracias al mejoramiento de las técnicas existentes, que esta industria se hizo presente de una manera importante en varios países de América. Después de los años setenta, debido a la necesidad de desarrollar fuentes no convencionales de alimentos y de optimizar los recursos disponibles, así como gracias al aprovechamiento de técnicas para el cultivo comercial de otras especies, se dio de manera creciente el interés por cultivar este tipo de hongos. Tal interés encontró un eco importante con el florecimiento a nivel mundial de una cultura ecológica ávida de tecnologías “ambientalmente seguras” y el avance de la agricultura orgánica. Ante esta situación, poco a poco se va conformando una conciencia naturalista mundial en la cual el cultivo de hongos encaja perfectamente bien.

El cultivo de *Pleurotus* spp. pertenece al siglo 20. A pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un desarrollo muy rápido, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece una atención especial: más que cualquier otro de los géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de substratos sobre los que es capaz de crecer, permite apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios.

A pesar de haber sido cultivado comercialmente por menos de 30 años, *Pleurotus* spp. se ha destacado por una rápida aceptación en el mercado y un crecimiento igualmente rápido de la agroindustria relacionada. Actualmente, el cultivo de este género disputa con *L. edodes* el segundo lugar en producción mundial, solo después de *A. bisporus* (tabla 1). Este hecho no tiene precedentes en el cultivo de hongos y no resulta fácil encontrar otro ejemplo similar entre los productos alimenticios naturalmente cultivados. La razón de este crecimiento es que las especies de este género tienen una calidad organoléptica excelente, crecen sobre una gran diversidad de substratos en un amplio rango de temperaturas, son fáciles de cultivar, además de que para la instauración de naves para su cultivo se precisa poco capital inicial. En efecto, el hecho de que para la preparación del substrato no se requiera un proceso de composteo complejo y prolongado, ni de la aplicación de tierra de cobertura al final del crecimiento micelial como lo demanda el champiñón, o que tampoco necesite una fase de oscurecimiento ni de inmersión en agua como en el caso del shiitake, hacen que su cultivo sea tal vez el más sencillo de todos los macromicetos conocidos.

Por otra parte, el potencial que tiene este hongo en procesos de bioremediación, aunque poco conocido, parece muy prometedor. Esto lo convierte en un hongo aún más interesante y digno de ser estudiado. Todas estas circunstancias hacen pensar

que el avance y el desarrollo tecnológico actual para esta especie es significativo y que importantes mejoras son esperables en el tercer milenio que ahora empieza.

PRODUCCIÓN MUNDIAL DE HONGOS COMESTIBLES

La producción mundial de hongos comestibles se ha incrementado más de 14 veces en 30 años, desde 350 mil ton en 1965 hasta cerca de 4'909,000 ton en 1994. La mayor parte de este incremento ocurrió durante los últimos 15 años, en los cuales también se observó un considerable cambio en los géneros cultivados. En 1979, la producción del champiñón común *A. bisporus* (= *A. brunnescens* Peck) representaba más del 70% de la oferta mundial. En 1994, solamente el 38% de dicha producción correspondía a *A. bisporus* (tabla 1). La República Popular China es el mayor productor de hongos comestibles con 2'640,900 ton o sea el 54% del total. En 1994, China produjo 654,000 ton de *Pleurotus* spp. lo que representó el 82% del total mundial (tabla 2). La mayor parte de la producción china es consumida localmente ya sea en forma fresca o seca.

De todos los países hispanoparlantes, España es el mayor productor de *Pleurotus* spp. (tabla 3). En 1998 este país produjo aproximadamente 11,640 ton (alrededor del 1.5% del total mundial), lo que representó cerca de tres veces la producción total de todas las demás naciones americanas, incluyendo Estados Unidos, Canadá, México y Brasil. Los incrementos de la producción de *Pleurotus* spp. en España han alcanzado un promedio de 6.2% anual desde 1966 (Pardo, 1999).

Tabla 1. Producción mundial de hongos comestibles cultivados en 1986 y 1994. Peso fresco

Nombre	1986		1994		Incremento (%)
	1000 ton	%	1000 ton	%	
<i>Agaricus bisporus</i>	1,215	55.8	1,846	37.6	51.9
<i>Lentinula edodes</i>	320	14.7	826	16.8	158.1
<i>Pleurotus</i> spp.	169	7.8	797	16.3	371.6
<i>Auricularia</i> spp.	119	5.5	420	8.5	301.0
<i>Volvariella volvacea</i>	178	8.2	299	6.1	68.0
<i>Flammulina velutipes</i>	100	4.6	230	4.7	130.0
<i>Tremella fuciformis</i>	40	1.8	156	3.2	290.0
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	—	—	55	1.1	—
<i>Pholiota nameko</i>	25	1.1	27	0.6	8.0
<i>Grifola frondosa</i>	—	—	14	0.3	—
Otros	10	0.5	239	4.8	2,290.0
Total	2,176	100.0	4,909	100.0	125.6

Fuente: Chang (1996)

PRIMER CULTIVO DE *PLEUROTUS* SPP.

La producción comercial de *Pleurotus* spp. es una actividad relativamente reciente. Falck (1917) fue el primero en reportar el cultivo de este hongo en tocones y en troncos en Europa, en los inicios del siglo XX. Más tarde, Etter (1929) produjo cuerpos fructíferos en cultivo. Block, Tsao y Han (1958, 1959) fueron los primeros en escribir un reporte detallado sobre el cultivo de *P. ostreatus* en Estados Unidos, mientras que la primera explotación comercial de este hongo fue establecida en Europa, hasta la mitad de los años setenta.

Una de las razones del incremento en la popularidad de las especies de *Pleurotus* spp. es la habilidad de este hongo para crecer en una amplia variedad de materias primas agrícolas. En el Trópico, el hongo ostra, o setas, como se le llama también en México, puede ser producido sobre una mezcla de aserrín y salvado de arroz, salvado y rastrojo de arroz, aserrín y hojas de guaje *Leucaena* spp. y otras combinaciones de materiales tropicales como olote de maíz, cáscara de semilla y ramas de algodón, bagazo y hojas de caña, tallos y hojas de maíz, pastos, cáscara de arroz, lirio acuático, entre otros (Quimio, 1986, Quimio *et al.*, 1990). Muchos otros substratos pueden ser utilizados, dependiendo de su disponibilidad en cada región.

PRODUCCIÓN DE *PLEUROTUS* SPP. EN HISPANOAMÉRICA

España

España cuenta con una infraestructura importante para la producción de hongos comestibles, que le permite aportar el 22% de la producción europea de *Pleurotus* spp. y que le sitúa como el segundo productor europeo de este hongo después de Italia (tabla 3). La producción comercial de las especies de este género en España empezó en la mitad de los años ochenta, con incrementos mayores durante los años noventa (Pardo 1999). Existen dos áreas de producción: la región de La Rioja-Navarra y la región de Castilla-La Mancha. En ambas zonas, *Pleurotus* spp. se siembra sobre rastrojo de trigo picado y se incuba en bolsas de plástico negro. En La Rioja-Navarra, cada bolsa contiene aproximadamente 18 kg (70-75 % de humedad), de donde se obtiene en promedio una producción de 2.7 kg por bolsa y una eficiencia biológica (EB) de alrededor del 15% (basado en el peso húmedo del substrato). En Castilla-La Mancha, cada bolsa contiene alrededor de 22 kg (70-75% de humedad), y con la misma EB rinde una producción aproximada de 3.5 kg por bolsa. En 1998, los cultivadores sembraron aproximadamente 1.4 millones de bolsas de substrato en la región de La Rioja-Navarra, mientras que en Castilla-La Mancha los cultivadores sembraron cerca de 2.4 millones de bolsas, con estas cantidades España produjo 11,640 ton de *Pleurotus* spp. en ese año.

México

El cultivo de *P. ostreatus* inició en 1974 en la población de Cuajimalpa (Martínez-Carrera *et al.*, 1991). Actualmente, debido a diversas investigaciones y adaptaciones tecnológicas

desarrolladas, el interés por cultivarlo se ha difundido en todos los ámbitos del país. Esto ha dado lugar a un innumerable grupo de pequeñas iniciativas de producción a baja escala, aún de economía familiar, las cuales comercializan el producto en fresco. Según Martínez-Carrera (1997), con este cultivo se observan dos tipos de tecnologías: una de tipo industrial que requiere de un composteo aerobio con pasteurización por vapor en túnel; y otra más rústica, que se utiliza en pequeñas plantas de tipo familiar. Esta última, de producción limitada y no contabilizada en la economía regional, emplea la inmersión del sustrato en agua alcalina fría o en agua caliente para la eliminación de la microbiota concurrente. La mayoría de las empresas que usan esta tecnología enfrentan muchas dificultades tanto técnicas como financieras en su operación. Los sustratos utilizados en este país suelen variar, aunque los más frecuentes son el olote, el tamo y el rastrojo de maíz, las pajas, y la pulpa de café, entre otras. La elección depende de la disponibilidad. Las cepas utilizadas son principalmente de la especie *P. ostreatus*, las cuales pueden ser de origen nacional o extranjero. Entre los problemas de cultivo más frecuentes, están los daños causados por los deuteromicetos *Trichoderma*, *Monilia* y *Penicillium* en la fase de producción de semilla y de incubación del sustrato, y por *Coprinus* spp. y *Poronia* durante la fructificación (Guzmán *et al.*, 1993; López *et al.*, 1996; Leal-Lara, 1998).

Tabla 2. Producción estimada (peso fresco) de *Pleurotus* spp. durante 1994.

País	Producción 1,000 ton	%
China	654.0	82.0
Corea del Sur	57.9	7.3
Japón	20.8	2.6
Tailandia	15.0	1.9
Taiwán	4.6	0.6
Indonesia	1.0	0.1
E.U.A	0.9	0.1
Otros	43.2	5.4
Total	797.4	100.0

Fuente: Chang (1996)

Durante el periodo 1990-1997 se observó en México un incremento en la producción de dicha especie superior al 400%. En este último año se estimó una producción de 1825 toneladas, lo cual significó un nivel de producción comercial de unas 5 ton/día. (Martínez-Carrera, 1997; Leal-Lara 1998). Por esta razón se ha considerado a México como el principal productor de América (tabla 4).

Estados Unidos y Canadá

En Estados Unidos las especies de *Pleurotus* fueron cultivadas de manera comercial por primera vez hacia el inicio de los años setenta (Royse y Schisler, 1987). Sin embargo,

debido a la falta de un mercado constante, la producción fue descontinuada durante 8 años. Al principio de los años ochenta, el mercado de *Pleurotus* spp. comenzó a desarrollarse. En 1998 la producción de este hongo fue de 908 ton (tabla 3).

La mayor parte de la producción de los Estados Unidos se hace con rastrojo de trigo picado, con cáscara de semilla de algodón o con mezclas de ambos. Para la producción con rastrojo de trigo, el material es cortado hasta un tamaño de 2 a 6 cm. La producción de *Pleurotus* spp. en cáscara de semilla de algodón tiene la ventaja sobre la producción en rastrojo de que no se requiere cortar o moler el material (Royse, 1997). Sin embargo, la cáscara no tiene tanta capacidad de retención de agua como el rastrojo, por lo que el contenido de humedad es generalmente más alto con éste. Debido a esta característica, muchos productores han optado por usar una combinación de rastrojo y cáscara. El material es pasteurizado, complementado con nutrientes comerciales de acción retardada, sembrado y puesto en bolsas de polietileno negro perforado de 12 a 14 kg. La eficiencia biológica puede variar entre 70 y 100% (con base en substrato seco) según la cantidad de suplemento agregado al momento de la siembra. Una característica del sistema productivo norteamericano es que la mano de obra que labora en la industria productora de hongos es en su mayoría de origen latinoamericano, especialmente mexicano. En efecto, se estima que entre el 60 y el 80% de los trabajadores en esta industria tiene este origen.

Tabla 3. Producción de *Pleurotus* spp. en Europa, con énfasis en los países de la Comunidad Económica Europea (1997).

País	Producción (ton)	Porcentaje
Bélgica	650	1.94
Dinamarca	450	1.34
Finlandia	90	0.27
Francia	2,000	5.96
Alemania	1,300	3.87
Gran Bretaña	170	0.51
Grecia	65	0.19
Hungría	1,500	4.47
Irlanda	5	0.01
Italia	19,000	56.63
Países Bajos	600	1.79
Portugal	120	0.36
España	7,500	22.35
Suecia	100	0.30
Total	33,550	100.00

Fuente: *Lelley (1999)*

Tabla 4. Producción estimada (peso fresco) de *Pleurotus*spp. en algunos países de América (1998).

País	Toneladas	%
México ¹	1,825	47.53
Estados Unidos ²	908	23.65
Canadá ³	568	14.79
Brasil ⁴	450	11.72
Guatemala ⁵	22	0.57
Venezuela ⁶	18	0.47
Cuba ⁷	12	0.31
Colombia ⁸	9	0.23
Otros	28	0.73
Total (Amer)	3,846	100.00

Fuente: ¹ H. Leal-Lara, Mexico (1998);

² United States Department of Agriculture, Washington, DC (1998);

³ Danny Rinker, Guelph University, Canadá (1999);

⁴ Claudia Azevedo, Brasil (1999);

⁵ Ruth De León, Guatemala (1999);

⁶ Teresa Iturriaga, Venezuela (1999);

⁷ Miguel Rodríguez, Cuba (1999);

⁸ S. T. Chang, Hong Kong (1999).

En Canadá, según Rinker y Chalmers (1998), se cultivan entre 600 y 900 ton de diferentes especies del género *Pleurotus*, principalmente en las regiones de Ontario y Columbia Británica. Para el cultivo se utiliza como sustrato aserrín suplementado, rastrojo de trigo u olote de maíz, ya sea esterilizado o pasteurizado. El uso de este último en la provincia de Ontario recuerda la preparación del champiñón, ya que el olote se tritura hasta un tamaño de 1-1.5 cm, se compostea por un periodo de 6 semanas con volteos frecuentes, durante los cuales se repone el agua evaporada, y finalmente se coloca en charolas para pasteurizarlo por lo menos 4 horas. Algunos productores hacen el cultivo en bolsas, las cuales pueden contener hasta 22 kg de sustrato, mientras que otros emplean las mismas charolas del cultivo de *A. bisporus*.

Otros países del área

El cultivo de *Pleurotus* spp. adquiere cada vez más interés en los países de América. No existen estadísticas oficiales al respecto, sin embargo, es cultivado en Cuba, Colombia, Guatemala, Venezuela y Brasil. Por otra parte, se sabe que ha habido intentos por desarrollarlo o que existen pequeñas empresas de producción variable en El Salvador, Perú, Ecuador y en general en aquellos países donde se cultiva *A. bisporus* (Argentina, Costa Rica). Dada la extrema facilidad para cultivar este género, es previsible que su producción se siga incrementando en los años venideros y que se inicie en otros países no

citados ahora; sin embargo, la falta de una tradición por el consumo de los hongos comestibles en esas naciones probablemente hará que este incremento sea lento.

PERSPECTIVAS

En resumen, es previsible que la producción de *Pleurotus* spp. en todo el mundo y específicamente en los países hispanoparlantes, continuará incrementándose debido a la relativa facilidad de su producción y porque representa una alternativa alimenticia para el autoconsumo y para la venta. Existen pocos estudios sobre la dimensión de la demanda de hongos comestibles cultivados en los países hispanoamericanos. Sin embargo, si se generalizan los pocos datos disponibles que se tienen, según los cuales, países como México, tienen un consumo anual per cápita del orden de los 0.3 Kg, puede concluirse que la demanda actual es más de 10 veces inferior a la observada en algunos países europeos o asiáticos. Sin estimar un incremento en este valor, solo considerando de manera conservadora que la demanda de hongos seguirá el perfil del aumento de la población (lo cual es probable porque las costumbres alimenticias se transmiten de padres a hijos). Villegas de Gante en 1994, estimó que la demanda de hongos comestibles se incrementaría en los próximos años mientras que la planta productiva lo haría en una proporción menor. Este análisis permite esperar buenos tiempos para los cultivadores de hongos, específicamente para los que cultivan *Pleurotus* spp.

La producción de varias especies de *Pleurotus* permite al cultivador tomar ventaja de los diferentes colores de los basidiomas con propósitos de mercadotecnia, sin embargo, se necesita más investigación para extender la vida de anaquel de los hongos y disminuir la esporulación durante el cultivo. El desarrollo de tecnología mejorada para cultivar cada especie de una manera más eficiente permitirá que los precios disminuyan y al mismo tiempo la calidad del producto se incremente en respuesta a la demanda. En la medida en que la tecnología existente se adapte a las condiciones de los países de Centro y Sudamérica, la producción de *Pleurotus* spp. en esta región podrá incrementarse en los años venideros.

REFERENCIAS

- Azevedo, C. 1999. Comunicación personal.
- Block, S. S., G. Tsao, and L. Han. 1958. Production of mushrooms from sawdust. *J. Agric. Food Chem.* 6: 923-927.
- Block, S. S., G. Tsao and L. Han. 1959. Experiments in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 4:309-325.
- Chang S. T. 1991. Recent trends in world production of cultivated edible mushrooms. *Mush. J.* 504:15-18.
- Chang, S. T. 1996. Mushroom research and development – equality and mutual benefit. Pp. 1-10. In: D. J. Royse (ed.) *Mushroom Biology and Mushroom Products, Proceedings of the Second International Conference*, University Park, Pennsylvania, June 9-12.
- De León, R. 1999. Comunicación personal.
- Etter, B. E. 1929. New media for developing sporophores of wood-rot fungi. *Mycologia* 21: 197-203.
- Falck, R. 1917. Über die Walkultur des Austernpilzes (*Agaricus ostreatus*) auf Laubholzstubben. *Z. Forst-Sagdwes* 49: 159-165.
- Guzmán, G., and D. Martínez. 1986. *Pleurotus* growing on coffee-pulp in a semi-industrialized plant – new promising mushroom cultivation technology in the subtropics of Mexico. *Mush. Newsl. Tropics* 6(3): 7-10.
- Iturriaga, T. 1999. Comunicación personal.
- Leal-Lara, H. 1998. Research priorities for production of edible fungi in Mexico. *Inoculum* 49(2):31.
- Lelley, J.I. 1999. Overview of Specialty Mushrooms Production Technology Used in Eastern and Western Europe. Keynote Lecture. 9th Annual Specialty Mushroom Workshop. June 13-14, 1999. Penn State University. University Park.
- Pardo, P. 1999. Comunicación personal.
- Quimio, T. H. 1986. Guide to low-cost mushroom cultivation in the tropics. University of the Philippines at Los Banos. 73 p.
- Quimio, T. H., S. T. Chang, and D. J. Royse. 1990. Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. FAO Plant Production and Protection Paper 106. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rinker, D.L y W. Chalmers. 1998. Specialty mushroom industry in Canada. *Mush. World* 9, 4,7-8.
- Rodríguez, M. 1999. Comunicación personal.
- Royse, D. J. and L. C. Schisler. 1987. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* 26:191-194.
- Royse, D. J. 1997. Specialty mushrooms and their cultivation. *Hort. Rev.* 19:59-97.
- United States Department of Agriculture. 1998. Mushrooms. Agricultural Statistics Board. Washington, DC.
- Villegas de Gante, A. 1994. Un estudio de tecnología intermedia en México: la producción de hongos comestibles. Departamento de Producción Económica. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Tesis de Maestría. México, D. F. p. 37-38.

II Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos.

Graciela Huerta Palacios

CONTENIDO

CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LOS HONGOS	29
Hábitat y función en la naturaleza	29
Reproducción de los hongos	30
LOS BASIDIOMICETOS	32
El micelio de los basidiomicetos	34
El septo en el micelio de los basidiomicetos	37
Los basidiocarpos	39
La basidia	43
Las basidiosporas	44
Ciclo de vida de hongos comestibles	45
REFERENCIAS	47

CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LOS HONGOS

Los hongos constituyen un grupo muy variable y polimórfico difícil de caracterizar, sin embargo, cuando se hace referencia a ellos se habla de organismos que nacen de esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente y tienen un cuerpo generalmente formado por filamentos muy ramificados llamados hifas, los cuales en conjunto forman el micelio. El crecimiento del micelio sólo se da en las puntas, por lo que forman masas algodonosas o afelpadas de forma radial, que es común observar en la hojarasca, troncos caídos y en el suelo de bosques y praderas húmedas. Se distinguen de las plantas porque no almacenan su energía en forma de almidón, polisacárido insoluble que forma las reservas alimenticias de las plantas. En su lugar, almacenan otros polisacáridos como la trehalosa y el glucógeno, polímero de la glucosa que los animales utilizan para almacenar energía por corto tiempo.

La estructura de su cuerpo es diferente al de las plantas; si bien los hay unicelulares como las levaduras, la mayoría de ellos están formados por conjuntos de hifas o micelio. Esta estructura, contrariamente a los tejidos animales y vegetales, no posee células. En las hifas de los hongos inferiores el citoplasma es generalmente continuo, no está separado por septos, posee numerosos núcleos minúsculos, que se desplazan libremente por una corriente citoplasmática que también permite el transporte de elementos nutritivos al interior del micelio. Por el contrario, los hongos superiores tienen septos con perforaciones centrales que permiten el paso del citoplasma (Herrera y Ulloa, 1990; France loisirs, 1990).

Hábitats y función en la naturaleza

Los hongos se encuentran en todos lados; pueden vivir en el suelo, en aguas dulces y marinas y sus esporas son abundantes en el aire. Sin importar donde estén, podemos decir que hay muy pocos substratos libres de hongos. Para alimentarse secretan enzimas sobre el substrato donde se encuentran, lo degradan en sustancias simples y absorben los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Los que producen este tipo de cambios se conocen como saprófitos, debido a que se alimentan de cuerpos muertos o de desechos de organismos. Los parásitos pueden penetrar las células de tejidos vegetales y animales y tomar sus nutrimentos del interior de éstas. Algunos de los saprófitos pueden vivir como parásitos si se les presenta la oportunidad, mientras que otros son siempre parásitos y no pueden vivir de otra manera. Sean saprófitos o parásitos, todos los hongos son heterótrofos, pues ninguno de ellos es capaz de sintetizar compuestos de carbono complejos a partir de dióxido de carbono como las plantas. Algunos pueden formar asociaciones de tipo simbiótico con las raíces de las plantas, conocidas como micorrizas (figura 1), o con algas para dar origen a nuevos organismos llamados líquenes. Los hongos juegan un papel muy importante en la naturaleza, pues junto con las bacterias forman el grupo de los descomponedores dentro de los ciclos tróficos del carbono, nitrógeno y azufre (Herrera y Ulloa, 1990; Webster, 1986).

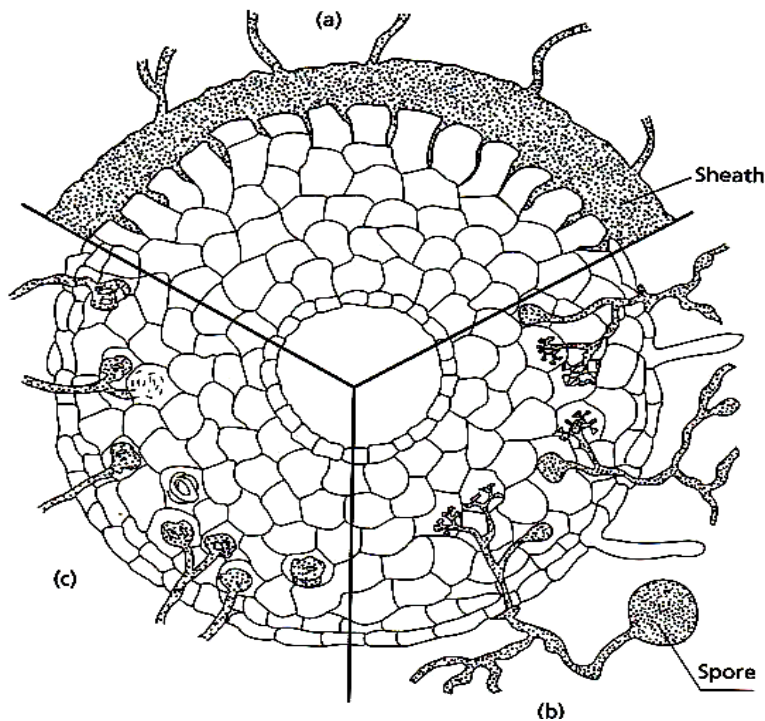


Figura 1. Diagrama de una sección transversal de la raíz micorrizada de una planta por tres tipos de micorrizas: a) Ectomicorriza en un árbol forestal mostrando la red de Harting del hongo y el límite de la invasión; b) Micorriza arbuscular en plantas herbáceas y árboles tropicales. Se muestran arbuscúlos y vesículas en células del hospedante; c) Micorriza endotrófica de orquídeas. Tomado de Deacon (1997).

La reproducción de los hongos

La reproducción es la formación de nuevos individuos con características típicas de la especie. En el caso de los hongos podemos observar que hay dos formas para dar origen a nuevos individuos: la sexual y la asexual. A esta última también se le conoce como somática o vegetativa, debido a que no involucra fusión de núcleos. Se puede dar por fragmentación del micelio, el cual al colocarse bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y sustrato, da origen a un nuevo individuo. Esta forma de reproducción es muy utilizada para multiplicar los hongos comestibles en el laboratorio, pues permite mantener las características de la cepa que se está cultivando (Herrera y Ulloa, 1990).

En otros casos el micelio da origen a esporas asexuales por división mitótica; las cuales se denominan según el nombre de la estructura que las produce. A las que se forman por simple fragmentación del micelio se les conoce como artrosporas u oidios; a aquellas que se producen sobre hifas especializadas denominadas conidióforos, se les llama conio-

diosporas; a las que se producen dentro de estructuras en forma de saco (esporangio), esporangiosporas (figuras 2 y 3), (Hawksworth *et al.*, 1983).

Figura 2. Diferentes tipos de estructuras que producen esporas asexuales. Los tres primeros son esporangios, y los otros conidióforos.

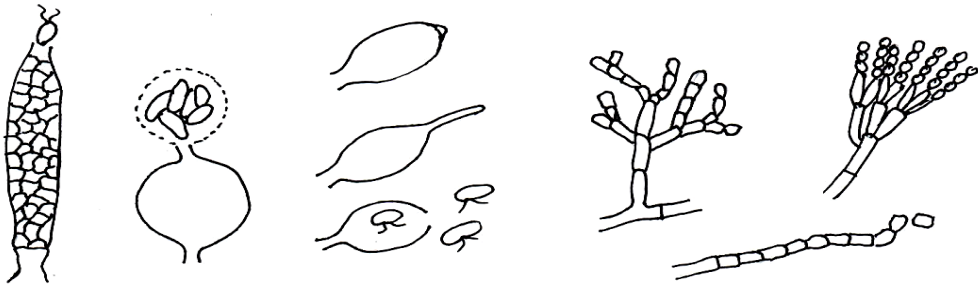
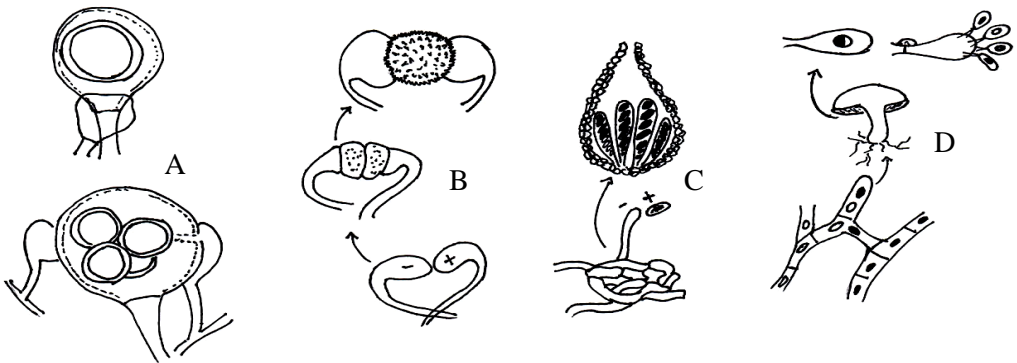


Figura 3. Diferentes tipos de estructuras que producen esporas sexuales: a) ooginio; b) cigospora; c) ascocarpo; d) basidiocarpo.



Las esporas asexuales presentan formas, tamaños y colores muy variados y juegan un papel importante en la propagación de las especies, pues favorecen la ocupación de nichos disponibles al producir un gran número de individuos en corto tiempo. Este tipo de reproducción es poco frecuente en hongos comestibles, aunque algunas especies producen estructuras parecidas a oidios (Alexopoulos, 1996; Stamets, 1983).

La reproducción sexual no es rápida e implica somatogamia (unión de hifas o gametas), cariogamia (fusión de núcleos) y la producción de gametos por meiosis. Estos pueden observarse sobre estructuras especializadas (gametangios) y tener formas diferenciadas (anisogametas) o tener la misma forma o ser indiferenciadas (isogametas). En hongos comestibles las hifas que forman el micelio actúan como gametos y su sexuali-

dad está determinada por genes nucleares, que confieren un carácter genético conocido como compatibilidad sexual. Esto hace que sólo aquellas hifas provenientes de micelios compatibles se fusionen y den origen por somatogamia a un compartimento hifal con dos tipos de núcleos diferentes. A partir de este compartimento se produce la dicarionización del micelio para dar origen a lo que es llamado micelio heterocariótico (con diferentes tipos de núcleos). La cariogamia generalmente se presenta tiempo después de la somatogamia, por lo que el micelio heterocariótico se puede multiplicar y mantener sin dificultad. La fusión de núcleos sólo se dará en la basidia, la cual originará por meiosis las esporas de origen sexual (basidiosporas). La reproducción sexual en hongos permite la variación genética y capacita a las especies para ocupar nuevos nichos o sobrevivir a condiciones adversas y les permite tener una vida más larga que aquellos que solo se reproducen asexualmente (Alexopoulos, 1996; Herrera y Ulloa, 1990; Stamets, 1983).

Las esporas de tipo sexual al igual que las de origen asexual se denominan según el tipo de estructura que las porta, las producidas por la fusión de un oogonio (gameto femenino) y un anteridio (gameto masculino), se llama oospora; las formadas por la fusión de gametos compatibles pero indiferenciados: cigosporas, ascosporas y basidiosporas. Así aquellas que se producen dentro de un saco o asca se llaman ascosporas, las formadas sobre estructuras similares a un mazo, basidiosporas (figura 3). La mayoría de los hongos presenta ciclos alternos de reproducción asexual y sexual como parte de su desarrollo (Alexopoulos, 1996; Herrera y Ulloa, 1990).

LOS BASIDIOMICETOS

Forman un grupo de hongos muy grande y diverso que se caracteriza porque produce esporas sexuales en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos, también conocidos como basidiomatas o basidiomas (del griego *basidion*= base pequeña, basidio + *karpos*= fruto), el cual porta estructuras especializadas conocidas como basidias. En la mayoría de las especies, cada basidia produce cuatro basidiosporas, que son fuertemente disparadas al llegar a su madurez (balistosporas). La mayoría de estos hongos produce un micelio bien desarrollado, con septos simples o doliporo, dependiendo del orden taxonómico. Usualmente es blanco, amarillo brillante o naranja, y a menudo se dispersa hacia el frente, creciendo en forma de abanico, puede entretorse formando estructuras parecidas a cuerdas o raíces llamadas rizomorfos, resistentes a condiciones adversas como la falta de nutrientes o la humedad. En condiciones adversas pueden permanecer latentes hasta que las condiciones favorables para el crecimiento se presenten nuevamente. Los rizomorfos se conforman de un número de hifas arregladas paralelamente y algunas veces envueltas en una vaina o corteza. Las formas mejor desarrolladas semejan agujetas de zapatos. Comúnmente son producidos por muchas especies de hongos ectomicorrízicos y por varios descomponedores de la madera y son importantes no sólo en la dispersión de ciertas especies sino también en las actividades de exploración y acumu-

lación de nutrientes. Se ha observado que la tasa de extensión de los rizomorfos de *Armillaria* es mucho más grande que la de las hifas individuales, por lo que se sugiere que su función está relacionada con la conducción de nutrientes (Cairney, 1991 y Rayner, 1991, citados por Alexopoulos, 1996).

Mientras que los rizomorfos de algunas especies pueden tener de 4-5 mm de diámetro, la mayoría miden entre 0.5 y 2 mm de diámetro. Son comunes en los horizontes de suelos orgánicos y en las capas de la materia en descomposición, aunque algunas especies pueden producirlos entre las ramas de los árboles. Esta última situación es particular de los rizomorfos producidos por ciertas especies del género *Marasmius* que crece en bosques tropicales con temperatura caliente (figura 4) (Hedger, 1990).

Figura 4. Rizomorfo sobre una rama de árbol tropical.



El micelio también pueden organizarse y formar tejidos durante la fase sexual de su ciclo reproductivo y dar origen a cuerpos fructíferos de formas muy diversas, que van de unos cuantos milímetros hasta varios metros. Por ejemplo, el aparente registro mundial de un basidiocarpo perenne del poliporo *Rigidoporus ulmarius* midió 147 cm de diámetro en 1990 (Anónimo, 1990), y una sola seta puede pesar alrededor de 5 libras (Stamets, 1993). Pueden ser delgados, costrosos o gruesos. Pueden presentar forma de seta, repisa, coral, bejín, estrella, falo o nido de pájaro. Pueden estar brillantemente coloreados o no, tener consistencia gelatinosa, cartilaginosa, papirosa, carnosa, esponjosa, corchosa, le-

Éstas crecen a través del substrato obteniendo así su alimento. De manera individual las hifas son microscópicas, pero pueden ser vistas a simple vista cuando están en masa como micelio.

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos heterotálicos pasa por tres diferentes etapas de desarrollo, antes de que el hongo complete su ciclo de vida. El micelio primario u homocarión, llamado así para enfatizar que todos sus núcleos son idénticos (cuando se sabe que cada compartimento hifal contiene un solo núcleo, también puede llamarse monocarión). Este estado usualmente se desarrolla después de la germinación de una basidiospora. Los nuevos compartimentos miceliales pueden ser multinucleados al principio, debido a que el núcleo o los núcleos de la basidiospora se dividen muchas veces mientras el tubo germinativo emerge de la espora y comienza a crecer. Sin embargo, la fase multinucleada del micelio primario parece ser de corta duración en algunas especies, pues tan pronto como los septos se forman, éstos dividen al micelio en compartimentos típicamente uninucleados. En otras especies, la formación de septos empieza inmediatamente después de que se completa la primera división del núcleo o núcleos de la espora, de tal forma de que el micelio primario es septado y compuesto de células o compartimentos hifales uninucleados desde un principio. Sin embargo, se conocen especies que tienen un micelio primario que permanece multinucleado (Alexopoulos, 1996; Webster, 1986).

Aunque el micelio primario en la mayoría de los basidiomicetos parece capaz de tener un crecimiento indefinido, no es común encontrarlo en la naturaleza de esta manera, pues da origen casi inmediatamente al llamado micelio secundario o heterocarión. Debido a que la mayoría de los basidiomicetos son heterotálicos, la formación del micelio secundario usualmente involucra una interacción entre dos micelios homocarióticos compatibles (Alexopoulos, 1996; Casselton, 1978; Webster, 1986). Éste puede ser resultado de la espermatización o de la fusión de dos compartimentos de micelio homocariótico compatible, dando origen a un compartimento heterocariótico (cuando se conoce que cada compartimento hifal contiene dos núcleos, puede llamarse dicarión). A partir de este compartimento de micelio secundario, la dicarionización del resto del micelio puede darse aparentemente en una de dos formas: a) la célula binucleada produce una ramificación en la cual los dos núcleos migran y posteriormente se dividen conjuntamente, aunque los núcleos hijos migran cuando el compartimento hifal es dividido en dos por la formación de un nuevo septo. Repetidas divisiones de este tipo acompañadas por la formación de nuevos septos da como resultado la formación de un micelio extenso y dicariótico. b) El segundo método de dicarionización, fue propuesto por Raper (1966), y ocurre mucho más comúnmente que el primero. Aquí se menciona que hay división de los núcleos en la célula binucleada seguida por la migración de los núcleos hijos hacia el micelio primario que pertenece al un grupo de compatibilidad opuesto ("mating type"). En otras palabras, un núcleo a se muda hacia el micelio b, mientras que el núcleo b se muda hacia el micelio a. Al llegar al nuevo compartimento, los núcleos extranjeros se dividen rápidamente y su progenie migra de un compartimento a otro

hasta que ambos micelios se dicarionizan completamente. Los septos de los homocariones usualmente deben de ser degradados para que permitan el paso de los núcleos (Alexopoulos, 1996; Casselton, 1978; Webster, 1986).

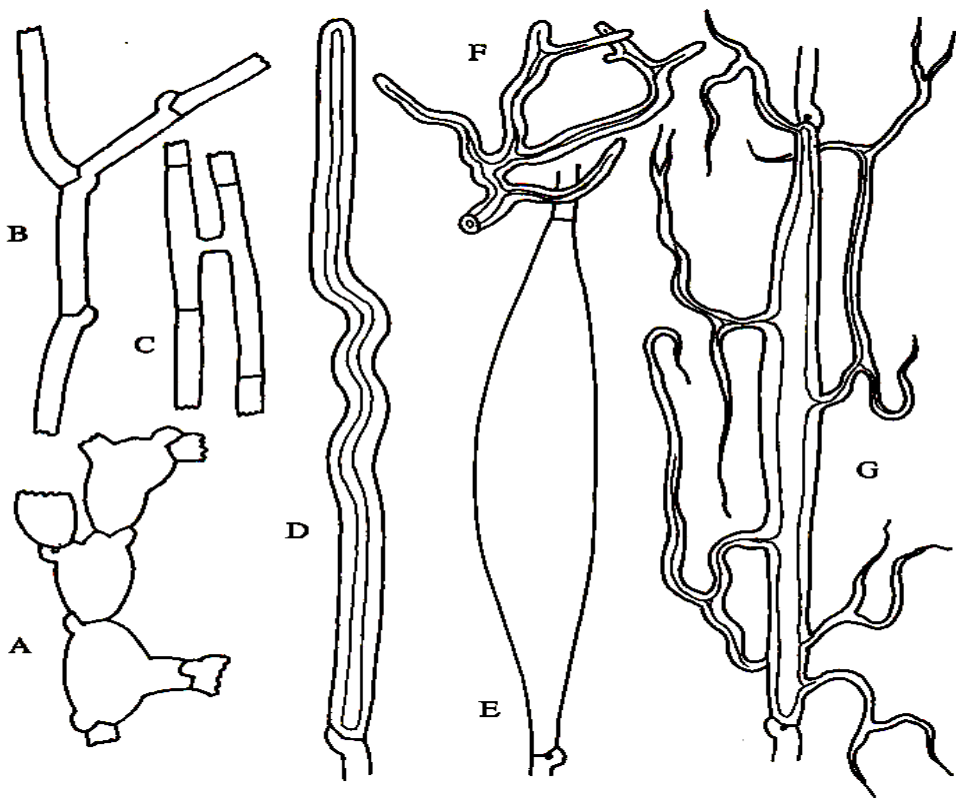
El mecanismo mediante el cual muchos de los basidiomicetos aseguran el mantenimiento de la condición dicariótica en cada nuevo compartimento del micelio secundario, involucra la formación de estructuras especializadas llamadas conexiones grapa o fibulas, que son formadas durante la división los núcleos en el extremo de la hifa en crecimiento. Cuando una punta hifal binucleada está lista para dividirse, una rama corta —la conexión grapa— se origina entre los núcleos a y b y empieza a formar un gancho. En este momento, los núcleos se dividen simultáneamente. Se produce una división oblicua de tal forma que un núcleo hijo, b, se localiza en la conexión grapa y el otro, b' se encuentra en la célula en división. La división del segundo núcleo está orientada a lo largo del eje grande del compartimento en división, de tal forma que un núcleo hijo, a, se forma cerca de un extremo y el otro a', se acerca al núcleo b' en el otro extremo de la célula. Mientras tanto la grapa se encorva y se fusiona con el compartimento subterminal, formando un puente a través del cual uno de los núcleos hijos de b pasa al otro extremo y se aproxima a uno de los núcleos hijo de a. Un septo se forma para cerrar la grapa en el punto de su origen y otro septo se forma verticalmente bajo el puente para dividir el compartimento madre en dos, con núcleos a y b en cada uno de ellos y a' y b' en el otro. La presencia de conexiones grapa se considera generalmente como indicativo de la condición dicariótica. Sin embargo, existen excepciones, puesto que el micelio homocariótico de algunas especies tiene grapas, mientras que el micelio heterocariótico de muchas otras no las tiene (Alexopoulos, 1996; Casselton, 1978; Webster, 1986).

El micelio terciario de los basidiomicetos es representado por los tejidos organizados y especializados que comprenden los basidiocarpos de las especies más complejas. En este caso las hifas se entretajan para formar el esporóforo y en algunas especies pueden diferenciarse morfológicamente en varios tipos. Esto ocurre, por ejemplo, en el orden *Aphyllphorales*, donde pueden presentarse tres tipos de hifas (generativas, esqueléticas y de enlace). Aunque no es aplicable a todos los grupos, el análisis microscópico del tipo de hifas presentes en los basidiocarpos es importante para la identificación de los hongos y para establecer relaciones entre las diferentes especies (Alexopoulos, 1996).

Las hifas generativas son septadas y tienen fibulas, generalmente paredes delgadas, pero pueden estar engrosadas en algunas especies (hifas generativas esclerificadas). Se encuentran en todos los basidiocarpos y dan origen a las basidias y a las hifas vegetativas cuando estas están presentes en una especie en particular. Las hifas vegetativas no tienen septos y son llamadas de enlace o ligadura e hifas esqueléticas. Estas últimas generalmente no son ramificadas, tienen paredes gruesas y su crecimiento puede ser indeterminado. Por otra parte, las hifas de ligamiento usualmente son ramificadas, sinuosas, con paredes delgadas a gruesas y su crecimiento puede ser restringido. Un basidiocarpo de estructura monomítica solo estará formado por hifas generativas. En un dimítico

encontraremos hifas generativas y esqueléticas o generativas y de ligadura o enlace, y en los trimiticos habrá hifas generativas y ambos tipos de hifas vegetativas (Domanski, 1972) (figura 6).

Figura 6. Tipos de hifas que pueden formar el basidiocarpo en basidiomicetos: a) hifas generativas infladas; b) hifas generativas no infladas; c) generativas con conexiones grapa; d) esqueléticas no ramificadas; e) sacro hifas; f) hifas de ligadura o conexión; g) hifa ligativa esquelética. Tomado de Ainsworth *et al* (1996).

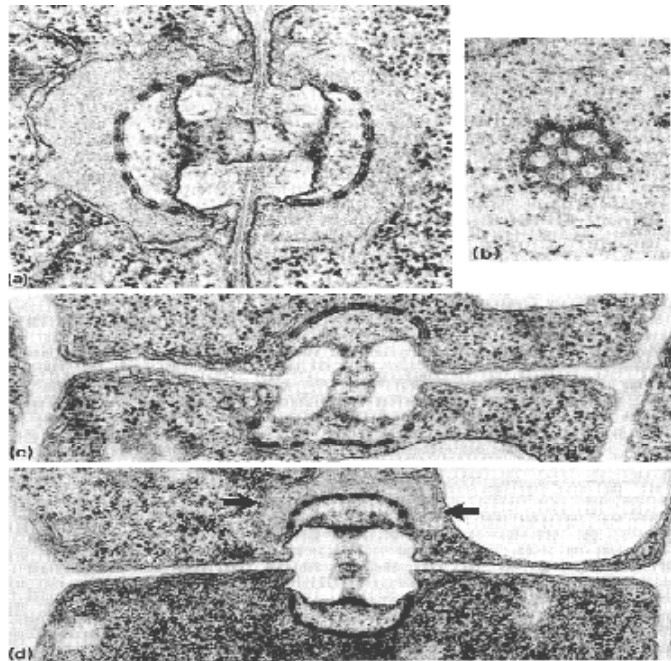


El septo en el micelio de los basidiomicetos

En años recientes, se ha dado particular atención a las características ultraestructurales de los septos de los basidiomicetos. La mayoría de las especies parecen poseer septos simples con un solo poro central, aunque se han reportado septos multiperforados en *Kriegeria epiophori*. En algunas especies la pared del septo cercana al poro está engrosada y forma una hinchazón en forma de dona o de barril. A este tipo se le ha llamado septo doliporo, y algunas veces está cubierto en alguno de los lados por una estructura

membranosa en forma de domo llamada tapa del poro del septo, o parentosoma. Esta estructura parece ser una modificación del retículo endoplásmico y es parte integral y funcional del septo. Se han reportado varios tipos de poros en los septos de basidiomicetos, aunque las tapas de algunas especies parecen ser estructuras continuas no porosas, pero en la mayoría de las especies están perforadas. En algunos casos las perforaciones son grandes, de tamaño irregular y espaciadas, mientras que en otros, son más pequeñas y de tamaño regular y espaciadas (figura 7) (Gull, 1978; Alexopoulos, 1996).

Figura 7. Doliporo en basidiomicetos: a) septo doliporo de *Agrocybe praecox* X43,400; b) sección del parentosoma X70,000; c) septo del himenio de *Agrocybe praecox* X62,500; d) septo de la sección de transición del himenio y subhimenio de *Agrocybe praecox*. Tomado de Smith (1996).



Flegler *et al.*, 1976 citados por Alexopoulos (1996), señalaron que no se conoce la función exacta del septo doliporo, aunque parece que la tapa del poro actúa como una malla o un filtro, que permite el paso de algunos componentes del citoplasma del hongo de un compartimento hifal al próximo, pero retarda el paso de otros. Ha sido reportado que hay disolución del septo antes de las migraciones nucleares durante la dicarionización en algunos basidiomicetos. Varios cambios ultraestructurales y citochímicos también han sido reportados en el septo doliporo, durante el desarrollo del basidiocarpo.

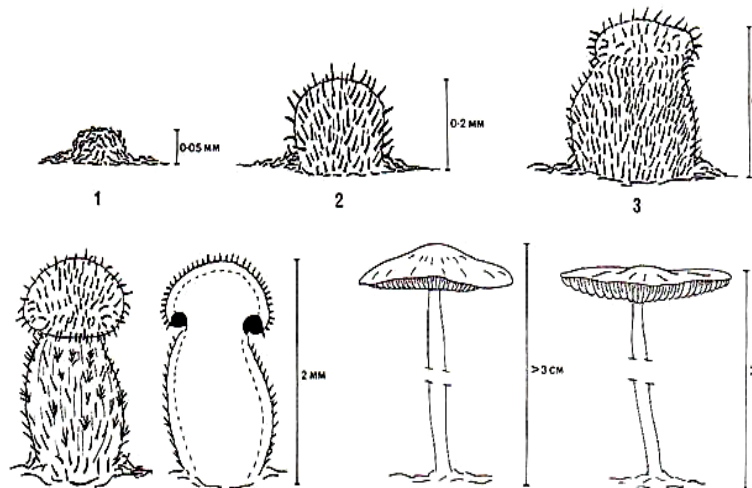
Doublés y McLaughlin (1991), citados por Alexopoulos (1996), mencionaron que las características ultraestructurales de los poros de los septos son conservadas evolutivamente, por lo que hay una concordancia fuerte entre los datos moleculares basados en la ultraestructura del poro del septo y las divisiones en los basidiomicetos.

Los basidiocarpos de los hongos seta

Los hongos comestibles forman cuerpos visibles a simple vista que portan las esporas de origen sexual, éstos se conocen comúnmente como hongos y pueden tener formas muy diversas, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, dado que un buen número de hongos comestibles tiene forma de sombrilla o seta, sólo se describirá tal tipo de morfología en esta sección.

Los tejidos que forman la seta son hifas dicarióticas bien empaquetadas. La inducción y la subsecuente formación de los basidiocarpos es regulada o influenciada por la interacción de un gran número de factores, algunos de los cuales se conocen muy poco, y otros son completamente ignorados. Williams *et al.* (1985), mencionó que la primera señal morfológica del inicio del basidiocarpo en *Flammulina velutipes* es la formación de pequeños agregados de hifas en las zonas muy ramificada del micelio dicariótico. En este estado, el primordio del basidiocarpo está compuesto de hifas ampliamente espaciadas, ramificadas y entretejidas. A medida que éste crece, las hifas exteriores forman numerosas cystídias cónicas que dan al primordio una apariencia "espinosa". El crecimiento y la diferenciación continúan, hasta que aparece el pileo rudimentario. Posteriormente se forma una seta miniatura con un estípite, un pileo y un himenio cubierto de lamelas. Después de esto, hay un agrandamiento muy rápido dando lugar a la aparición del basidiocarpo maduro, salvo algunas pequeñas diferencias el desarrollo de otros Agaricales es similar (figura 8).

Figura 8. Formación y diferenciación del carpóforo de *Flammulina velutipes*. Tomado de Williams *et al.* (1985).



Se considera que hay tres tipos básicos de desarrollo de un basidiocarpo en Agaricales; éstos fueron descritos considerando básicamente la posición del himenio en relación con la presencia o ausencia de algún tejido de protección. Para describir estas formas de diferenciación de los basidiocarpos se han usado los términos: gimnocarpo y pseudoangiocarpo. Este último se caracteriza por el hecho de que aun durante los estados tempranos de desarrollo del basidiocarpo, el himenio o la capa fértil esta envuelta por los tejidos del basidiocarpo. Es decir, el margen del pileo esta conectado al estípite por una membrana que se conoce como velo interno. El himenio sólo queda expuesto cuando el pileo se expande, desgarrando el velo interno. Esto ocurre antes de que las esporas maduren y sean descargadas. Con frecuencia el velo se separa completamente del margen del pileo y permanece unido al estípite para formar el anillo. En algunas especies el velo se desgarrá en tal forma que queda colgando del pileo como si fuera una cortina. En otras especies, como las *Amanita*, el primordio completo también está cubierto por un velo universal. Cuando el esporóforo se agranda y el pileo se expande, el velo universal se desgarrá y deja un cuerpo en forma de copa, la volva, que rodea la base bulbosa del estípite. Los remanentes del velo universal que cubrían al pileo se pueden observar como escamas sobre éste. Las estructuras vestigiales que quedan como rastros del desarrollo del hemiangiocarpo son importantes en la clasificación de muchas especies de Agaricales.

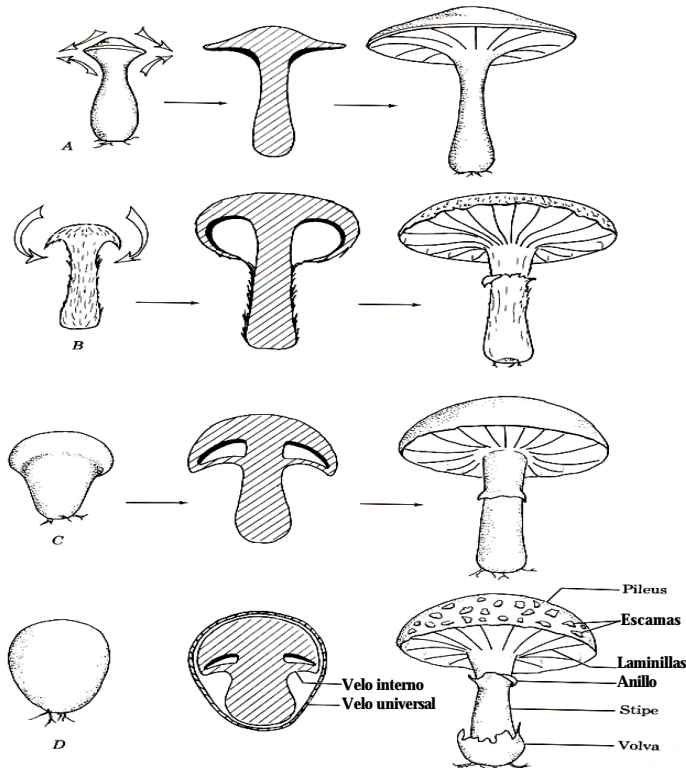


Figura 9. Diagrama que ilustra diferentes tipos de desarrollo del basidiocarpo en basidiomicetos:

a) tipo gimnocárpico;

b) tipo pseudoangiocárpico;

c) tipo hemiangiocárpico con anillo;

d) hemiangiocárpico con anillo y velo.

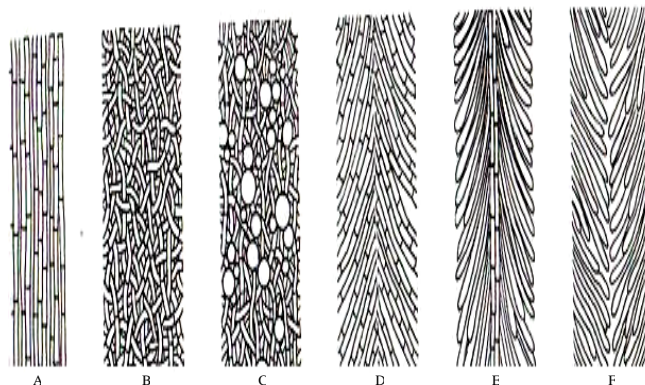
Tomado de Alexopoulos *et al.* (1996).

En el desarrollo del tipo gimnocarpo, el basidiocarpo permanece desnudo y nunca se encuentra cubierto por alguna estructura. En el pseudoangiocarpo, sin embargo, el himenio queda encerrado por el margen encorvado del pileo y algunas veces también por un sobre crecimiento del estípite. El himenio puede permanecer encerrado hasta que la seta está madura y el pileo se expande. No hay estructuras vestigiales en ninguno de estos dos métodos (figura 9).

Los himenios de las setas pueden ser tubulares o lamelares. Estas últimas son bandas delgadas de tejido que irradian del margen del pileo hacia el estípite. Se mencionan dos tipos básicos de lamelas que están presentes en los Agaricales y se han llamado equi-himeníferas e inequi-himeníferas. El primer tipo de lamelas observadas es típico en la mayoría de los Agaricales y mantienen su forma cuando son vistas en sección cruzada y tienen basidias que maduran y liberan sus esporas sobre la superficie de la lamela. Los lados de una lamela inequi-himenifera, comúnmente llamada “lamela tipo coprinus”, son paralelos. Las basidias, cuando son maduras, sueltan las esporas progresivamente de abajo hacia arriba. A medida que se sueltan las esporas, una zona de delicuescencia se presenta, destruyéndose algunas partes de la lamela.

Una o más capas de hifas están entre la superficie del himenio sobre los dos lados de la lamela. La estructura de esta parte, llamada trama himenoforal, puede ser determinada usando un microscopio de luz para examinar secciones delgadas cortadas en ángulo recto a la superficie de la lamela. Debido a que la estructura de la trama es importante en los estudios taxonómicos, este procedimiento es necesario para identificar los Agaricales. Dos tramas básicas existen, la homoiómera y la heterómera. La primera consiste en hifas mas o menos similares mientras que la trama heterómera contiene células grandes globosas a ovales entre la trama, llamadas esferocistos, esparcidas entre las hifas. Existen diferentes tipos de arreglos hifales que han sido identificados en la trama homoiómera: regular, irregular, bilateral e inversa (figura 10).

Figura 10. Tipos de trama en basidiomicetos: a) homoiómera regular; b) homoiómera irregular; c) heterómera con esferocistos; d-e) homoiómera bilateral; f) homoiómera inversa. Tomado de Alexopoulos *et al.* (1996).



La posición del margen interno de la lamela, con relación al estípite, también es valiosa taxonómicamente. En algunas especies las lamelas están libres del estípite, mientras que en otras pueden estar unidas (adnadas). El término decurrente es usado para describir las lamelas que están unidas y avanzan hacia abajo, sobre el estípite (figura 11).

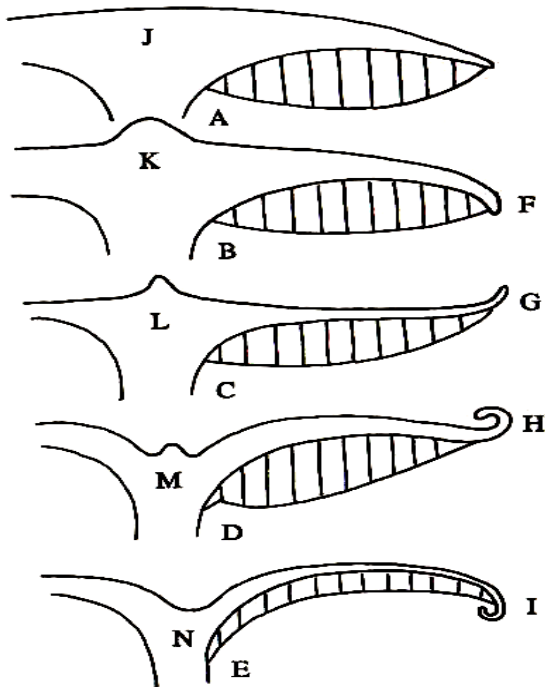


Figura 11. Características del pileo.

A-E, Tipos de inserción de las lamelas:

a) lamelas libres; b) adnexas;

c) adnadas; d) sinuadas; e) decurrentes.

F-I, Tipos de margen en el pileo:

f) inflexo; g) reflejo; h) revoluto;

i) involuto. J-N, Tipos de pileo: j) plano

convexo; k) bulboso; l) umbonado;

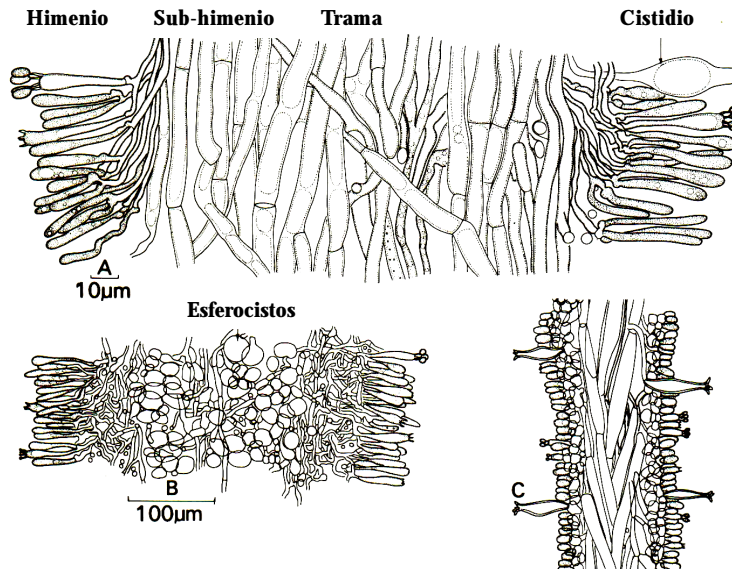
m) umbilicado; n) hundido.

Tomado de Ainsworth et al. (1996).

En un basidiocarpo el himenio es una capa compuesta de basidias y elementos estériles conocidos como basidiolas y las cistidias (Gr. *kystis*=globo + *idion*=diminutivo de forma). Las primeras son células semejantes a basidias que todavía no producen esporas y su función al parecer es dar soporte a las basidias fértiles. Por otro lado, las cistidias son más grandes y sobresalen de los otros elementos del himenio (figura 12). Se ha sugerido que las cistidias pueden actuar como trampas de aire y ayudar en la evaporación de la humedad y otros compuestos volátiles (Smith, 1966); sin embargo, no se conoce con exactitud cuál es su función. Aunque no están presentes en todas las especies, las cistidias son muy importantes en los estudios taxonómicos. Hay diferentes tipos y la terminología usada para describirlas es bastante complicada (Singer, 1986).

En aquellas especies que tienen sus basidias expuestas, el himenio puede cubrir completamente la superficie del basidiocarpo o puede también estar sólo confinado a partes especializadas del basidiocarpo. Tradicionalmente, la forma en la cual los basidiomicetos tienen su himenio, ha sido usada para delimitar las categorías taxonómicas superiores, tales como familias y órdenes. Además, las características microscópicas del hime-

Figura 12. Componentes del himenio en agaricales: a) *Fallemulina velutipes*; b) *Russula cyanoxantha*, con esferocitos en su trama; c) *Pluteus cervinus*, con trama invertida y cistidos en el himenio. Tomado de Webster (1986).

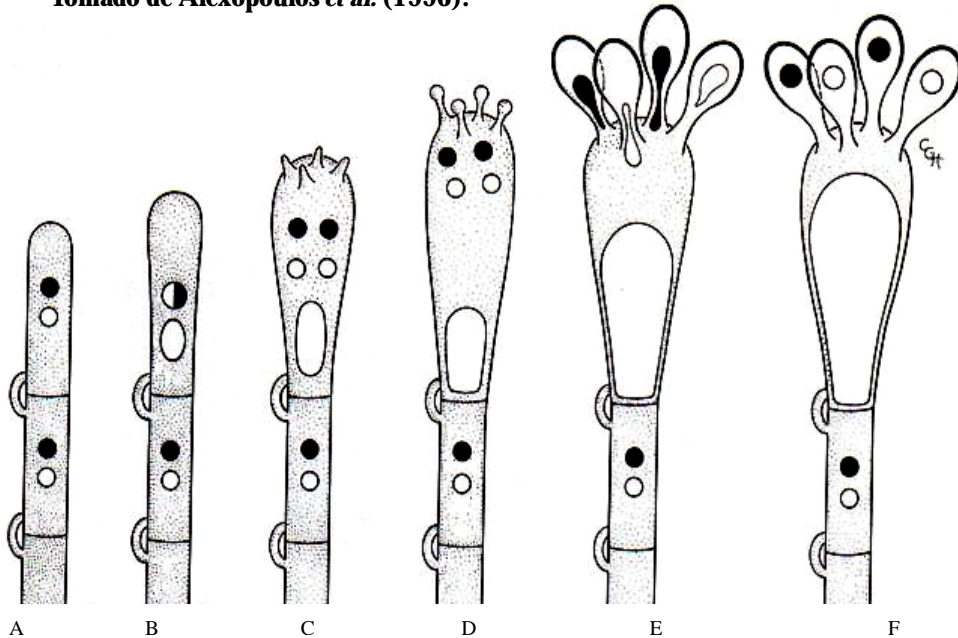


no son importantes en la taxonomía de ciertos grupos, tales como los Agaricales, el orden que contiene las setas y los boletos (Alexopoulos, 1996).

La basidia

Una basidia es una estructura que sostiene un número definido de basidiosporas (usualmente cuatro), formadas como resultado de cariogamia y de meiosis. Normalmente tiene forma de mazo y se origina del compartimento terminal de una hifa binucleada. Esta separada del resto de la hifa por un septo sobre la cual se observa una conexión. Al principio la basidia es estrecha y alargada pero pronto se ensancha. Mientras estos cambios externos se llevan a cabo, los dos núcleos dentro de la joven basidia se fusionan (cariogamia) y el núcleo resultante da origen por meiosis a cuatro núcleos. Mientras tanto cuatro pequeñas excrescencias llamadas esterigmatas sobresalen en la punta de la basidia y sus puntas se agrandan, formando eventualmente los primordios de las basidiosporas (figura 13). Durante este proceso una vacuola se forma en la base de la basidia y al incrementar de tamaño parece empujar el contenido de la basidia hacia los primordios de las basidiosporas. Sin embargo, no se ha demostrado si la vacuola está realmente involucrada en este proceso o si simplemente se desarrolla como una consecuencia de la salida del contenido de la basidia.

Figura 13. Desarrollo de las basidias y de las basidiosporas: a) punta de la hifa binucleada; b) basidia uninucleada y diploide después de la cariogamia; c) basidia con cuatro núcleos haploides producto de la meiosis; d) basidiosporas jóvenes sobre esterigmas; e) inicio de la migración de núcleos hacia las basidiosporas; f) basidia madura con basidiosporas uninucleadas y con vacuola grande en la base. Tomado de Alexopoulos *et al.* (1996).



Las basidiosporas

La basidiospora es típicamente una estructura unicelular haploide y usualmente recibe un solo núcleo de la basidia, aunque en algunos casos dos núcleos pueden mudarse hacia dentro de la misma espora. Una espora que es uninucleada en su origen también puede llegar a ser binucleada como resultado de una división mitótica de su núcleo. Las basidiosporas de la mayoría de las especies germinan para formar micelio primario. Esto se conoce como germinación directa. En algunos grupos, sin embargo, las basidiosporas germinan para formar esporas secundarias o geman para formar grandes números de conidias o microconidias, a partir de las cuales se forma el micelio primario. Esto se ha sido llamado germinación indirecta y es similar al proceso que se observa en los ascomicetos.

Las basidiosporas pueden ser globosas, ovals, alargadas, en forma de salchicha, o incluso angulares. Ellas pueden no tener color o ser pigmentadas; sin embargo, en muchos casos los pigmentos están muy diluidos y sólo pueden ser detectados cuando grandes masas de esporas están juntas. Por esto la obtención de esporada es necesaria para la determinación del color de las esporas. Las hay de color verde, amarillo, naranja, ocre, rosa, café, café-violeta o negro.

La forma de la espora, marcas en su superficie, su color y su tamaño son características taxonómicas importantes utilizadas para diferenciar géneros y especies de Agaricales.

Una basidiospora a menudo descansa sobre la punta de un esterigma de una manera oblicua y, en las formas con las basidias expuestas, como regla general son expulsadas de manera forzada del esterigma.

Ciclo de vida de hongos comestibles

Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan cuando entran en contacto con un substrato y encuentran una temperatura, pH y humedad adecuadas para su crecimiento. Dan origen a un micelio primario bien desarrollado, conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleos generalmente haploides. En algunas especies donde es bien conocido que únicamente hay un núcleo por compartimento hifal se le llama monocarión. En estos casos, los términos se utilizan como sinónimos. En la mayoría de los basidiomicetos el micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. En ciertos tipos de hongos comestibles, puede formar esporas asexuales del tipo oidio que al germinar dan origen a micelio homocarión como en el caso de *Auricularia*, favoreciendo con esto la invasión del substrato. En otros casos como el de *Coprinus lagopus*, los oidios funcionan como gametos masculinos y se unen a hifas de micelio compatible para formar el micelio heterocariótico, típico de la reproducción sexual.

Para que el cuerpo fructífero (seta) se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes de cada uno de los compartimentos que se fusionaron. Es a partir de estos, que por divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos y su posterior migración, hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra se forma el micelio heterocarión o dicarión, según sea el caso. A este tipo de micelio también se le conoce como micelio secundario. En la mayoría de los casos, pero no en todos, este micelio presenta en cada septo una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula (figura 14). El micelio que presenta este tipo de estructura es frecuentemente identificado como heterocarión, y el que no las tiene como homocarión. Esto no es del todo verdadero, pues en un buen número de hongos el heterocarión no las forma (Casselton, L.A., 1978).

El micelio heterocarión es capaz de crecer vigorosamente y de multiplicarse vegetativamente en esta condición de forma indefinida. Esto ha permitido mantener las características de alta producción, color, sabor y excelente calidad culinaria, de muchas de las cepas de hongos comestibles que en la actualidad se cultivan comercialmente en diferentes partes del mundo. Por tanto, éste es el tipo de micelio que muchas casas comerciales y laboratorios vende a los cultivadores de hongos comestibles, quienes al inocularlo sobre el substrato lo multiplican.

Aun cuando la inducción y la formación de los basidiocarpos o setas son reguladas por la interacción de un gran número de factores, se pueden mencionar que estas son favorecidas por los cambios bruscos de humedad y concentración de CO₂ (Smith, 1996).

La cariogamia de los núcleos que forman el micelio heterocariótico, se presenta en las puntas de las hifas que forman la capa fértil del basidiocarpo (himenio), dando origen a basidias monocarióticas y diploides. Posteriormente el núcleo (2n) presenta meiosis y da origen a cuatro núcleos haploides (1n) que migran hacia los esterigmas, para formar las basidiosporas generalmente haploides y con un solo tipo de núcleo.

Las basidiosporas maduras son liberadas y pueden ser diseminadas por el viento, insectos, agua, animales y otros factores, para dar origen a hifas somáticas uninucleadas e iniciar nuevamente el ciclo de vida del hongo.

REFERENCIAS

- Ainsworth, D.L., P.M. Kirk, B.C. Sutton y D.N. Pegler. 1996. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8a edit. International Mycological Institute. CAB International. 616 p.
- Alexopoulos C.J., C.W. Mims y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc. N.Y. 869 p.
- Anonymus. 1990. Profiles of fungi 29. *Mycologist* 4: 146
- Bold, H.C., C.J. Alexopoulos y T. Delevoryas. 1980. *Morphology of plants and fungi*. 4 ed. Harper & Row, N.Y.
- Cairney, J.W.G. 1991. Rhizomorphs: organs of exploration or exploitation. *Mycologist* 5: 5-10.
- Campbell, N. A., 1993. *Biology*. 3th ed. The Benjamin / Cummings Publishing Co., Inc. 1190 p.
- Casselton, L.A. 1978. Dikarion formation in higher basidiomycetes. In: J.E., Smith y R. Berry (Eds). *The filamentous fungi*. Volume III. Development mycology. Eduard Arnold. p.275- 297.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern mycology*. 3 ed. Blackwell Science. 303 p.
- Donk, M.A. 1954. A note on sterigmata in general. *Bothalia* 6: 301-302.
- Domanski, S. 1972. *Fungi polyporaceae I (resupinatae)*. U.S.D.A. and N.S.F. Washington, D.C. p. 146.
- Doublés, J. Y D.J. McLaughlin. 1991. A new basidiomycetous septal pore: multiperforate septum in *Kriegeria epiophori*. *Am. J. Bot.* 78:1542-1548.
- Fleger, S.L., G.R. Hooper y W.G. Fields. 1976. Ultrastructural and cytological changes in the basidiomycete dolipore septum associated with fruiting. *Can. J. Bot.* 54: 2243-2253.
- France loisirs. 1990. Les champignons. In . La vie: évolution et diversité . Le monde des sciences. L. Gamlin y G. Vines. France Loisirs. 37-42.
- Gull, K. 1978. Form and function of septa in filamentous fungi. In: J.E., Smith y R. Berry (Eds). *The filamentous fungi*. Volume III. Development mycology. Eduard Arnold. 78-93.
- Herrera, T y M. Ulloa. 1990. *El reino de los hongos*. Micología básica aplicada. UNAM FCE. 552p.
- Hawksworth, D.L. B.C. Sutton y G.C. Ainsworth. 1983. *Dictionary of the fungi* (including the lichens). Commonwealth mycological institute. 444 p.
- Hedger, J. 1990. Fungi in the tropical Forest canopy. *Mycologist* 4: 200-202.
- Raper, J.R. 1966. *Genetics and sexuality in the higher fungi*. Ronald. N.Y.
- Rayner, A.D.M. 1991. The challenge of individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48-71.
- Singer, R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific, Koenigstein, Germany.
- Smith, A.H. 1966. The hyphal structure of the basidiocarp. In: G.C. Ainsworth y A.S. Sussman (Eds). *The fungi* Vol. II Academic N.Y. p.151-177.
- Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed, Berkeley, C.A.
- Stamets, P y J.S. Chilton. 1983. *The mushroom cultivator*. A practical guide to growing mushrooms at home. Agarikon Press. 415 p.
- Sundberg, W.J. 1978. Hymenial citodifferentiation in basidiomycetes. In: J.E., Smith y R. Berry (Eds). *The filamentous fungi*. Volume III. Development mycology. Eduard Arnold. p. 78-93.
- Webster, J. 1986. *Introduction to fungi*. 2 ed. Cambridge University Press. 669p.
- Williams, M.A.J., A. Beckett y N.D. Read. 1985. Ultrastructural aspects of fruit body differentiation in *Flammulina velutipes*. In: D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood y J.C. Frankland (Eds). *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Worral, J.J. 1999. *Structure and dynamics of fungal populations*. Klumer Academic publishers. Dordrecht/ Boston/London. p. 1-18.

III Crecimiento y fructificación.

José E. Sánchez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	51
CÓMO CRECEN LOS HONGOS	51
FASES DEL CRECIMIENTO	54
La fase de latencia	54
La fase exponencial	54
La fructificación	57
La fase de declinación	58
La fase estacionaria y la muerte	59
FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y LA FRUCTIFICACIÓN.	
EL CASO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	59
La temperatura	59
El pH	59
El substrato	60
La humedad en el substrato	63
La humedad del aire	64
El tamaño de partícula	64
La aireación	64
La luz	64
REFERENCIAS	66

INTRODUCCIÓN

El crecimiento es un fenómeno complejo que no tiene una definición sencilla. Según Prosser (1995), es un incremento ordenado de los componentes celulares que involucra un aumento de biomasa. Es un proceso balanceado que implica generalmente el mantenimiento más o menos constante de la composición química de un organismo, va acompañado de procesos de desarrollo y diferenciación y es muy diferente de la simple acumulación de reservas, alargamiento o engrosamiento físico (Griffin, 1994).

Los estudios sobre cinética del crecimiento de microorganismos se han hecho fundamentalmente con bacterias y levaduras, las cuales difieren enormemente en morfología con los hongos filamentosos. El crecimiento de una colonia de organismos unicelulares se da por el incremento de individuos dentro de dicha colonia, mientras que en los hongos se da por la elongación y ramificación de las hifas. Por lo mismo, dichos estudios no son totalmente aplicables a los hongos; por ejemplo, en el caso de los hongos comestibles, se presenta una fase macroscópica muy importante que hasta ahora ha sido poco estudiada.

En general, el crecimiento en los hongos es un fenómeno mal conocido. Se sabe que la síntesis de componentes celulares, la absorción de agua por la hifa y la presión de turgor juegan un papel importante en la elongación del ápice; sin embargo poco se sabe sobre el fenómeno de ramificación. Seguramente que el hecho de que la tasa de síntesis en toda la hifa sea mayor que la tasa de incorporación en el ápice, es un factor que interviene en dicho fenómeno; sin embargo, mucho queda todavía por ser aclarado (Prosser, 1995). Con las limitaciones del caso, a continuación se hará una breve revisión de lo que se conoce sobre el crecimiento y la fructificación de estos organismos.

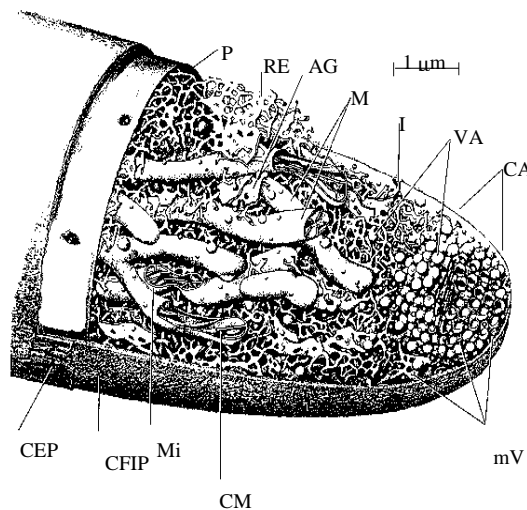
CÓMO CRECEN LOS HONGOS

El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una spora o de una fracción viable de hifa. Dicho crecimiento se da en forma polarizada o apical porque la elongación de la superficie se da en un punto y no en toda la célula. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, denominada hifa, delimitada por una pared que se extienden de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio.

El crecimiento sólo se da en la parte apical de la hifa, la cual tiene la capacidad de elongarse alejándose del centro de la colonia. El ápice penetra nuevos territorios y establece nuevas fronteras (Trinci, 1969 y 1971; Koch, 1975). Por esta característica, según el tamaño y la edad de la colonia, un hongo puede presentar de manera simultánea una zona de crecimiento, una zona de poco o nulo crecimiento e inclusive, una zona de autólisis.

A la zona apical de la hifa (figura 1) fluye protoplasma proveniente de la zona periférica de crecimiento, conocida como *w*. Esta zona es la parte que se ubica de manera inmediatamente adyacente al ápice y se caracteriza por aportar protoplasma y enzimas necesarias para la elongación celular, además de que sintetiza materiales precursores de pared. Fue Trinci (1969, 1971, 1974), quien con sus trabajos demostró que dicha zona existe y la definió como la máxima extensión de una hifa que apoya el crecimiento apical. Bajo condiciones constantes de crecimiento, el tamaño de *w* no varía significativamente con el tiempo ya que cuando hay una elongación del ápice, se disminuye una zona equivalente en el margen opuesto de la zona periférica; es decir, una parte de la hifa deja de aportar protoplasma hacia el ápice porque se bloquean los septos y se rigidifica la pared (figura 2). *w* varía, sin embargo, con las condiciones ambientales, la composición del sustrato, la presencia de inhibidores y entre cepas.

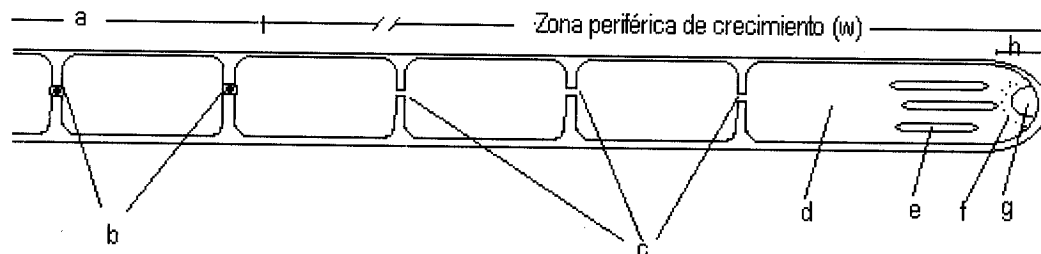
Figura 1. Esquema de la parte apical de una hifa, según Girbardt, 1969. CEP= Capa externa de la pared; CFIP= Capa fibrilar interna de la pared; Mi= invaginaciones mitocondriales; CM= Cristales mitocondriales; mV= microvesículas, P= Plasmalema; RE= Reticulo endoplasmático; AG= Aparato de Golgi; M= Mitocondria; I= Invaginación; VA= Vesícula apical; CA= Cuerpo apical o Spitzenkörper.



Cuadro 1. Tamaño de la zona periférica de crecimiento *w* de varios hongos

Género y especie	<i>w</i> (mm)	Tasa radial de crecimiento (m/h)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	1.137± 0.313	157± 6	Trinci 1971
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.496± 0.084	76 ± 3	Trinci 1971
<i>Agaricus bisporus</i>	15. 0	325	Straatsma <i>et al.</i> , 1993

Fig. 2. Partes de una hifa. a: Zona que no contribuye con protoplasma a la extensión hifal; b: Septos obstruidos; c: Septos no obstruidos; d: Célula apical; e: Mitocondria; f: Vesículas apicales; g: Cuerpo apical; h: Zona en extensión; w: Zona periférica de crecimiento (Trinci, 1971; Prosser y Trinci, 1979; Gow, 1995)



Los materiales sintetizados por el aparato de Golgi en la zona periférica de crecimiento fluyen por medio de vesículas desde esta zona (*w*), pasan a través de los poros abiertos (septos) de las células que la integran y se concentran en la punta de la hifa, donde forman una zona que se denomina Centro Suministrador de Vesículas (CSV). A este punto es a donde las vesículas llegan y desde donde son finalmente distribuidas completamente al azar y en cualquier dirección hacia la superficie celular. Según López Franco y Bracker (1996), las vesículas, microvesículas, microtúbulos y microfilamentos presentes en el domo apical definen una región aproximadamente esférica, oscura, dotada de polaridad, muy densa, y de simetría bilateral denominada cuerpo apical (Spitzenkörper, por su nombre original en alemán). Este cuerpo apical, que no está rodeado de una membrana, funciona como un organelo muy específico de los hongos, juega un papel muy importante en la polaridad, la extensión hifal, en la morfogénesis y en la ramificación de las hifas (Gow, 1995; Markham, 1995). Girbardt en 1957, había indicado ya que *P. ostreatus*, al igual que otros hongos septados, poseía este cuerpo apical.

Según Bartnicki-García *et al.* (1989) y Bartnicki-García (1997), la clave de la morfogénesis se encuentra en el desplazamiento del CSV. Si éste permanece estacionario durante el crecimiento, se forma una célula redonda, pero si se desplaza en línea recta automáticamente se producirá una célula con la forma de una hifa. Él indica que este proceso es descrito por la ecuación $y = x \cot(xV/N)$ en la cual *V* es la velocidad a la que se mueve el CSV y *N* es el número de vesículas por unidad de tiempo emanadas del CSV.

Al fusionarse las vesículas a la membrana apical, se incorporan enzimas como la β (1-3) quitina sintetasa. Estas enzimas producen compuestos como la quitina y diferentes glucanos que pasan a formar parte de una pared naciente. Otros compuestos como glucanos y manoproteínas son depositados en la pared por exocitosis de las microvesículas. En el domo apical, la quitina y los β (1-3) glucanos se vuelven más cristalinos por la formación progresiva de puentes hidrógeno y ligaduras covalentes. Por otra parte, la formación de ramificaciones se produce de la misma manera, en otros puntos de la hifa donde ha habido un debilitamiento enzimático de la pared y un abultamiento inicial provocado por la presión de turgor (Gooday, 1995).

Así como existe un flujo de materiales hacia el ápice, aparentemente también existe un movimiento de nutrientes desde el ápice hacia el interior de la colonia (translocación). Esto al menos ha sido demostrado con la glucosa y es probable que suceda con otros nutrientes (Jennings, 1995). Debido a la existencia de este flujo dentro de las hifas, cuando una de ellas es cortada transversalmente, el protoplasma escurre y la hifa empieza a vaciarse hasta que reacciona y bloquea los septos necesarios.

FASES DEL CRECIMIENTO

El crecimiento de un hongo varía según si se da en un medio líquido o en un medio sólido. En medio líquido crece solo sobre la superficie cuando el líquido está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pelotitas”. En medio líquido agitado, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos, y que consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte. Este desarrollo se puede representar de manera gráfica mediante una curva como la que se muestra en la figura 3. Cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal (Lilly y Barnett, 1951) y si se trata de un basidiomiceto, además puede presentarse, según las condiciones, una etapa de fructificación.

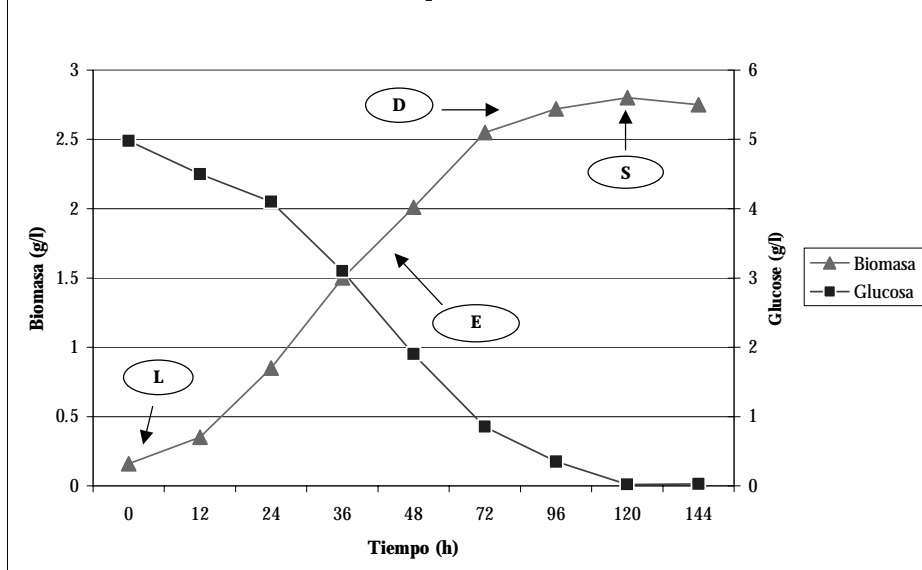
La fase de latencia

Esta fase se presenta inmediatamente después de que el hongo ha sido inoculado en un medio apropiado para su crecimiento. Es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular. Si el hongo fue dañado durante la siembra, en esta etapa de latencia sintetizará pared celular y preparará puntos de crecimiento. La duración de la fase de latencia es muy variable y depende del tipo y del estado fisiológico del hongo, así como del tipo de sustrato y de las condiciones de cultivo. La fase de latencia se minimiza o aun puede ser suprimida si un hongo es reinoculado, a partir de una colonia que crece en fase exponencial, a otro medio de características similares (composición, pH, temperatura). La fase de latencia puede sin embargo presentarse aún en estas condiciones si el hongo es maltratado durante la siembra.

La fase exponencial

Esta fase es alcanzada cuando un hongo crece en medio líquido, después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que éste le ofrece. Durante esta etapa el hongo alcanzará la tasa de crecimiento máxima que el sustrato sobre el que crece le permite. Cuando los hongos filamentosos crecen en medio sólido no presentan una fase exponencial (o no la mantienen por largo tiempo, Koch, 1975), sino más bien presentan una fase de crecimiento lineal. La tasa de

Figura 3. Crecimiento del *Pleurotus ostreatus* ECS-0110 en medio líquido. Se observan las diferentes fases de desarrollo: L= latencia; E= exponencial; D= declinación; S= estacionaria. Condiciones de cultivo: caldo de glucosa-extracto de levadura, agitación 200 rpm, aireación 1 vvm y temperatura 26°C. Tasa de crecimiento = 0.036 h⁻¹ (Márquez-Rocha *et al.*, 1999)



crecimiento es una característica muy importante de cada hongo, que varía con las condiciones del medio y que sirve para hacer comparaciones o predicciones sobre el comportamiento entre cepas o substratos diferentes. Las adiciones de nutrientes o complementos al substrato tiene en muchos casos como consecuencia un mejoramiento de la tasa de crecimiento.

Velocidad de crecimiento:

En condiciones óptimas, el crecimiento de un hongo se da de manera constante y el incremento se da como una fracción de la población celular presente en el medio. Es decir,

$$dx/dt = x$$

lo cual mediante integración conduce a la siguiente expresión:

$$\ln x = \ln x_0 + t$$

que representa la ecuación de una recta en coordenadas logarítmicas.

Si se define el tiempo de generación como el tiempo necesario para que la población en estudio se duplique, entonces se tiene que el tiempo de generación es:

$$t_g = 0.689/$$

Para el caso específico de cultivo líquido agitado, Koch en 1975 obtuvo la siguiente expresión:

$$W^{1/3} = W_0^{1/3} + (4\pi\rho/3)^{1/3}\Delta l t$$

En este caso se considera que solo el cortex de las pelotitas del hongo, de espesor Δ fijo y densidad ρ , crece en tres dimensiones a una tasa de extensión lineal (l). Esta relación indica que la raíz cúbica de la biomasa en peso (W) en un cultivo líquido agitado es directamente proporcional al tiempo de cultivo (t), al espesor de la zona de crecimiento constante y a la tasa de extensión lineal.

Por otra parte, considerando que los hongos filamentosos tienen una “unidad de crecimiento” que se duplica a una tasa constante, Trinci (1974), dedujo que las hifas individuales se extienden a una tasa constante, lineal, mientras que la totalidad del micelio crece de manera exponencial; es decir:

$$K_r = w$$

Lo cual indica que la tasa radial de crecimiento colonial (K_r) está en relación directa con la tasa específica de crecimiento (μ) y con la zona periférica de crecimiento (w), siempre y cuando esta última permanezca constante. Dado que es muy fácil determinar K_r , por medio de la medición del incremento radial de una colonia, se utiliza frecuentemente como una forma indirecta de estimar μ y sus variaciones; sin embargo para que esto sea válido, se debe tener especial cuidado en confirmar que bajo las condiciones de estudio w permanece constante.

Medición del crecimiento:

Hay muchas formas de medir el crecimiento de un organismo (por el incremento en masa, por la variación en la concentración de algún componente celular, por la producción de CO_2 , etc.). La elección del método depende en gran medida del objetivo de la medición. Para el caso de estudios relacionados con el cultivo de hongos, es de particular interés el estudio de la velocidad de colonización del sustrato, por lo que es frecuente el análisis del crecimiento micelial a través del incremento radial de la colonia. Esta es una técnica sumamente sencilla y ampliamente utilizada para determinar la influencia de la temperatura, del pH, o de la composición química del medio de cultivo, sobre el crecimiento; pero ha demostrado poca utilidad para hacer inferencias sobre la producción en cuerpos fructíferos y la productividad de los hongos, entre otras cosas (Brancato y Golding, 1953).

Esta determinación se puede hacer a través de la medición periódica del diámetro o radio de una colonia para después graficar los datos en función del tiempo y obtener la pendiente de la recta resultante. Una variación de este método es colocar en tubos estériles el sustrato inoculado y medir la extensión del crecimiento a intervalos periódicos.

Cuadro 2. Tasa radial de crecimiento de algunas especies de *Pleurotus* y hongos relacionados

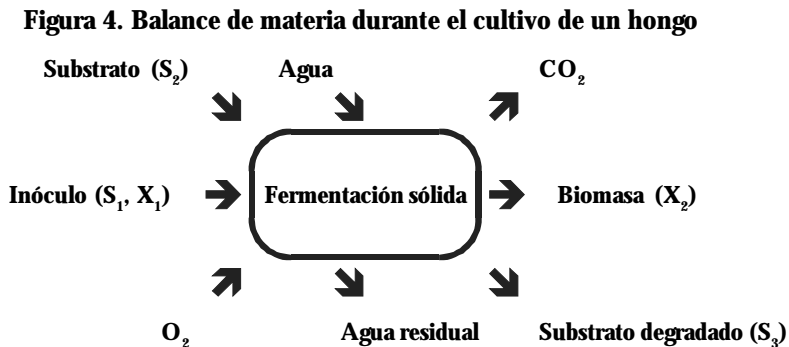
Hongo	Tasa Radial de Crecimiento K_r	Referencia
<i>P. ostreatus</i> ECS-0110	11 mm/día	Hernández <i>et al.</i> 1995
<i>P. djamor</i> ECS-0138	20.3 mm/día	Benítez <i>et al.</i> 1998
<i>P. djamor</i> ECS-0149	7.15 mm/día	Benítez <i>et al.</i> 1998
<i>Monilia</i> sp.	2.9 mm/h	López <i>et al.</i> 1996
<i>Trichoderma viridae</i>	0.5 mm/h	Guzmán <i>et al.</i> 1993

La fructificación

Cuando el micelio ha crecido suficientemente sobre el sustrato y las condiciones del medio ambiente lo permiten (temperatura, luz, humedad relativa, cantidad de oxígeno y gravedad), las hifas se agregan para formar cuerpos fructíferos, también denominados basidiomata, basidiocarpos o carpóforos, cuya función específica es producir y diseminar esporas. Los mecanismos que dirigen y regulan la formación de cuerpos fructíferos no son conocidos en la actualidad y resultan aún difíciles de explicar; sin embargo es claro que su desarrollo requiere de una modificación del comportamiento normal, invasivo del micelio vegetativo, por otro en el cual las hifas no tengan un crecimiento divergente, sino que converjan para formar un órgano diferenciado. (Moore, 1995).

Balance de materia

El balance de materia para el crecimiento de los hongos, puede ser delineado de la manera que se presenta en la figura 4.



Para la fase biótica: $X_1 + Y(S_1) + Y(S_2) = X_2$, en donde:

- S_1 = Substrato en el inóculo (g)
- S_2 = Substrato para fructificación (g)
- S_3 = Substrato degradado (g)
- X_1 = Biomasa del inóculo (g)
- X_2 = Biomasa producida (g)
- Y = Rendimiento

X_2 es el total de hongo producido como micelio (X_m) + los cuerpos fructíferos (X_3)

Como $S_1 \ll S_2$ y $X_1 \ll X_2$ el rendimiento del proceso puede considerarse como: $Y = X_2/S_2$

Sin embargo, para este caso especial de producción de carpóforos es más interesante estimar:

$$Y_1 = X_3/S_2$$

Que es la formula que se utiliza para calcular el rendimiento de un sistema de cultivo de hongos comestibles. Por otra parte, resulta de gran interés práctico la definición de los términos Eficiencia Biológica (EB) y Tasa de Producción (TP) (Royse 1985), que son: el peso fresco de carpóforos producidos/Peso seco del substrato utilizado y la EB diaria, o sea:

EB= (Peso de los cuerpos fructíferos frescos/ Peso seco del substrato) × 100 y

TP= EB/ días requeridos para cosecha

La fase de declinación

Esta fase se presenta cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina. En estas condiciones la tasa de crecimiento máxima no puede ser mantenida y empieza generalmente a disminuir de manera paulatina. La importancia de esta disminución depende de la importancia de los factores o nutrientes agotados o acumulados.

La declinación es una fase propicia para que aparezcan mutaciones celulares porque, sobretodo en cultivos puros, se disminuye la presión de selección. Dadas las condiciones adversas del medio durante la declinación, es relativamente frecuente que un organismo pierda algunas capacidades o modifique otras por mutación. Esto explica por qué la resiembra continua o sistemática de un organismo en un medio de cultivo, sobre todo sintético, puede conducir rápidamente al agotamiento de la cepa o a la pérdida de la misma.

La fase estacionaria y la muerte

La fase estacionaria es el punto en el cual el crecimiento cesa, aunque todavía prevalece un metabolismo celular de mantenimiento. Durante esta etapa aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo en esta fase es aún capaz de reiniciar crecimiento si es sembrado en un medio propicio, aunque tendrá un período de latencia más o menos largo según las condiciones. Durante la fase estacionaria empiezan a aparecer diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo.

FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y LA FRUCTIFICACIÓN. EL CASO DE *PLEUROTUS* SPP.

El desarrollo de los hongos se ve afectado por varios factores. A continuación se comentan los más importantes:

La temperatura

La temperatura afecta el metabolismo de las células. Influye tanto en la capacidad enzimática del organismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. La sensibilidad a la temperatura no solo varía entre cepas sino también para una misma cepa según su etapa de desarrollo. Así, es posible y aún frecuente que un hongo tenga una temperatura óptima de germinación y que ésta sea diferente de su temperatura óptima de crecimiento micelial o de su temperatura óptima de fructificación.

Pleurotus es un género de hongo cuyo micelio puede crecer en un rango amplio de temperaturas. Zadrazil (1974) reportó que las especies *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. cornucopiae*, crecían en un rango entre 0 y 35°C con temperaturas óptimas de 30°C para la primera y de 25°C para las dos últimas. Este mismo autor demostró que estas especies podían soportar 40°C durante 24 horas (pero no 72 h) y después reiniciar su crecimiento. Por regla general, las temperaturas óptimas para la fructificación de las especies de *Pleurotus* son ligeramente inferiores que las temperaturas óptimas para crecimiento micelial.

Los rangos de temperatura mencionados deben ser considerados solo como indicativos, ya que dentro de una misma especie puede haber grandes variaciones entre cepas. De hecho, actualmente es posible hacer mejoramiento genético para desarrollar cepas que crezcan a temperatura diferentes de la óptimas de sus progenitores (Labarère, 1993).

El pH

El potencial de hidrógeno del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque incide sobre el carácter iónico del medio e influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir, afecta directamente su metabolismo.

Si el pH del sustrato donde crece un hongo no es el adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimos, el crecimiento se verá afectado. Por otra parte, el valor del pH del medio es alterado por el crecimiento del hongo, por ejemplo, Rajarathnam y Bano (1989) comentan que las fuentes de nitrógeno producen cambios importantes en el valor del pH del medio, de tal manera que las sales de amonio ocasionan que el medio en el que crece una cepa de *Pleurotus* que degrada amonio se acidifique y que las sales de nitrato lo vuelvan alcalino.

Para el crecimiento de *Pleurotus* se han citado rangos de crecimiento entre 4 y 7 de pH. Con un óptimo entre 5 y 6. Este valor sin embargo suele variar entre cepas y especies. Así, Zadrazil (1974) cita que los sustratos ácidos (pH 4) inhiben el desarrollo de *P*

ostreatus y *P. eryngii* y que estos hongos encuentran un pH óptimo en un rango entre 5.5 y 6.5. Rajarathnam y Bano (1989), citan valores de 6.5-7.0 para especies como *P. djamor*; *P. pulmonarius*, y *P. eous*, mientras que Srivastava y Bano (1970), indican que *P. djamor* puede crecer entre valores de pH de 4 y 9 con un óptimo en 5.5

Dado que la mayoría de los contaminantes que se encuentran durante el proceso de cultivo son más sensibles a los valores altos de pH que las especies de *Pleurotus*, actualmente al preparar el substrato se prefieren valores más elevados que los señalados como óptimos. Esto deriva de los resultados obtenidos por diversos investigadores, entre ellos Stölzer y Grabbe (1991) por ejemplo, quienes demostraron que *Trichoderma hamatum* reduce notablemente su crecimiento a pH 7 y es totalmente inhibida a pH 8.5.

El substrato

La ecuación siguiente, definida por Monod y citada por Stafford (1986), relaciona el crecimiento celular en función de la concentración de un substrato limitante

$$= \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Para el caso de los hongos, dicha relación, válida dentro de ciertos límites, explica como dada la velocidad máxima de crecimiento de un hongo en un substrato, su velocidad puede variar de manera proporcional de acuerdo a la concentración de éste. Esta fórmula define a K_s como la constante de afinidad, la cual es un parámetro muy útil para hacer comparaciones entre varios hongos respecto de su afinidad por uno o varios substratos; o para conocer la relación específica de uno de ellos con diferentes substratos.

Un substrato es conveniente para el crecimiento de un hongo, si contiene todos los requerimientos nutritivos en cantidad suficiente para que éste sintetice sus metabolitos y tome de él la energía que requiere. Dado que no existen estudios que definan los requerimientos mínimos para el crecimiento en medio sólido y la fructificación de las especies de *Pleurotus*, los conocimientos que se tienen sobre este aspecto derivan de estudios en medio líquido o en substratos sólidos de composición compleja. En estos estudios se ha podido observar que los requerimientos pueden variar según los nutrientes presentes en el medio y que el tipo o la concentración óptima de un substrato varía si otros nutrimentos o factores (temperatura, pH) se encuentran en condiciones subóptimas.

En los capítulos VIII y IX se tratará a detalle la importancia del substrato, su preparación y suplementación, por lo que aquí solo se dan conceptos básicos sobre su importancia en el desarrollo de *Pleurotus* spp.

Carbono

El carbono es necesario para los hongos porque es la fuente directa de energía para su metabolismo; así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de la célula, este elemento

es el que requiere en mayores cantidades. El carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como polímeros, carbohidratos, lípidos, etc.

Polímeros: La mayoría de los basidiomicetos son considerados “degradadores de madera” porque son capaces de crecer sobre la biomasa proveniente de las plantas leñosas. Las especies de *Pleurotus* son consideradas de pudrición blanca porque son capaces de degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa. Platt *et al.* (1981) observaron que el contenido de lignina de rastrojo de algodón fue disminuido por *Pleurotus* sp. en un 70% en 21 días. Por su parte, Zadrazil (1974), observó que después de cosechar los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, las cantidades finales de holocelulosa, celulosa y lignina se reducían en un 80% y concluyó diciendo que todos los materiales que contengan celulosa y lignina (con excepción de los tóxicos y con metales pesados), pobres en nitrógeno pueden ser usados como substratos para *Pleurotus* spp.

Azúcares: Los carbohidratos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por las especies de *Pleurotus*. Según Raypeck (1977), La glucosa, la manosa y la galactosa son buenos substratos para esta especie, mientras que la xilosa y la arabinosa producen un crecimiento deficiente. Srivastava y Bano (1970), indican que *P. djamor* tiene buen crecimiento en presencia de manosa, fructosa y glucosa.

Lípidos: La adición de aceites vegetales tiene un efecto benéfico para el crecimiento micelial de *P. sapidus* y *P. ostreatus*. Según Kurtzman (1974 y 1976), los productos de la hidrólisis de aceites (glicerol, ácidos grasos y saponinas) deprimen el crecimiento, pero la adición de triglicéridos y metil ésteres de ácidos grasos generalmente promueven el crecimiento. El incremento en el crecimiento aumenta conforme aumenta el número de carbonos en los ácidos grasos C4-C14 y disminuye ligeramente entre C14 y C18. Al utilizar ácidos C18, el crecimiento aumenta con el grado de insaturación, siendo el ácido linoléico el mejor ácido de este grupo.

Nitrógeno

Los substratos sobre los que suelen fructificar las especies de *Pleurotus* pueden contener valores bajos de nitrógeno por lo que se ha llegado a pensar que este género es capaz de fijar nitrógeno atmosférico. Sin que esto haya sido demostrado, sí es notorio que la concentración en nitrógeno en el cuerpo fructífero en algunos casos es mayor que la del substrato sobre el cual crece. Las especies de *Pleurotus* tienen la capacidad de crecer sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno, como el nitrato de potasio o la urea, aunque se observa que prefieren las fuentes orgánicas para un crecimiento óptimo. Así, Hong en 1978, indicó que la peptona es un fuente de nitrógeno que da un rápido crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos, aunque la alanina, el ácido aspártico, la glicina y la serina, dan rendimientos pobres. Las fuentes inorgánicas agregadas a la peptona, como el sulfato y el tartrato de amonio, o varios amino ácidos como la D, L-alanina, la L-leucina, el ácido glutámico o la lisina producen incrementos en el rendimiento entre 10 y 25%. Más tarde, Khanna y Garcha (1985), encontraron que la peptona

beneficia el crecimiento de *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* y que los nitratos de sodio y potasio son una buena fuente para *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, y *P. sapidus*. Voltz (1972) determinó que el citrato de amonio era una buena fuente para *P. ostreatus* y Rajarathnam y Bano (1986) indicaron que los ácidos orgánicos son nutrientes que no confieren ninguna ventaja para la explotación industrial de las especies de *Pleurotus*.

La afinidad por las fuentes de suministro de nitrógeno varía entre las diferentes especies de este género, pero además varía para una cepa determinada según el sustrato sobre el que esta crece; por ejemplo, Manu-Tawiah y Martin (1988) encontraron que *P. ostreatus* alcanzaba un máximo rendimiento (60%) en cultivo líquido cuando usaron un hidrolizado de turba suplementado con extracto de levadura, sin embargo cuando utilizaron un medio sintético, la mejor fuente de nitrógeno fue el citrato de amonio (64%).

Es importante hacer notar que según el metabolismo de cada especie, y en función de la fuente de nitrógeno, el pH del sustrato puede variar durante el crecimiento del hongo, hasta hacerlo poco o nada propicio. Bajo estas circunstancias, un sustrato puede parecer inadecuado para el crecimiento, cuando en realidad es por consecuencia del pH del medio. Esto generalmente se presenta cuando un hongo crece en sales de amonio de un ácido inorgánico, ya que el medio se vuelve rápidamente ácido y puede alcanzar valores de 3 e inferiores. (Srivastava y Bano, 1970; Manu-Tawiah y Martin, 1988).

Relación C/N

Manu-Tawiah y Martin (1988), determinaron que la relación óptima para el crecimiento en medio líquido de *P. ostreatus* era 40:1. Por su parte, Hong en 1978, encontró que para la misma especie, una relación de 15.23 permitía una rápida formación de cuerpos fructíferos con bajos rendimientos, que una relación de 11.42 incrementaba los rendimientos pero que disminuía la formación de cuerpos fructíferos y que tomando en cuenta los dos aspectos (rendimiento y velocidad de formación), la relación óptima debía ser 30.46. Por su parte, Rajarathnam *et al.* (1986) encontraron que una alta relación C/N es necesaria para el crecimiento micelial de *P. djamor* mientras que una baja favorece el desarrollo de cuerpos fructíferos.

Minerales

Desde 1943 Treschow al trabajar con *Agaricus bisporus* llegó a la conclusión de que tanto este como otros hongos y levadura no son capaces de crecer en ausencia de calcio y que este mineral es requerido en mayores cantidades por sus efectos protectores y antagonistas con respecto de otros minerales como K o Mg. Estudios posteriores han confirmado esta aseveración. Así por ejemplo, Srivastava y Bano en 1970 obtuvieron los rendimientos más altos para el cultivo líquido de *Pleurotus djamor* cuando usaron concentraciones de 0.22, 0.28, 0.98 y 0.049 mg/l de fósforo, potasio, calcio y magnesio respectivamente. Por su parte, Manu-Tawiah y Martin (1987) llegaron a la conclusión de que *P. ostreatus* crece mejor cuando hay KH_2PO_4 presente en el medio y que sus requerimientos en magnesio son tan bajos que pudieron ser suministrados por el sustrato que

ellos utilizaron (turba hidrolizada). Por aparte, Kurtzman y Zadrazil reportaron que el cloruro de sodio no tiene efecto significativo sobre *P. ostreatus*, aunque sí un muy ligero efecto en el crecimiento de *P. sapidus*.

Vitaminas

Hashimoto y Takahashi (1976) indicaron que *P. ostreatus* requiere tiamina para su crecimiento en una concentración óptima de 100 mg/l y que cuando tal vitamina está presente, ninguna otra es necesaria. Hong (1978), indicó que la concentración de 50 mg/l provoca un excelente crecimiento tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos y que el ácido indolacético y la citosina causan en esta especie un mejor crecimiento micelial pero que no tienen influencia sobre el rendimiento. Por su parte Jandaik y Kapoor (1975), determinaron que para la especie *P. pulmonarius* la tiamina y la biotina son indispensables.

La humedad en el sustrato

El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo de los hongos porque afecta la disponibilidad de nutrientes. Así, los contenidos de humedad inferiores al 50% no serán propicias y una humedad superior al 80% tendrá un efecto negativo en el crecimiento de *Pleurotus* spp. El contenido óptimo de humedad depende no solo de la especie de hongo que se cultiva, sino también del tipo de sustrato utilizado. En efecto, cada sustrato tiene una capacidad de retención de agua diferente y esto hace que la humedad óptima para el crecimiento sea diferente; por ejemplo, Alba (1994) demostró que la capacidad de retención de la madera de cacao *Theobroma cacao* y del yaite *Glycine max* eran diferentes por lo que una misma cepa de *Cookeina sulcipes* crecía de manera óptima con humedades diferentes sobre cada uno de esos dos sustratos. Rajarathnam y Bano (1989) indicaron que las especies *P. cornucopiae*, *P. ostreatus* y *P. eryngii* tienen una relación óptima rastrojo de trigo: agua de 1:4.4.

El contenido de humedad no solo afecta la disponibilidad de nutrientes en el sustrato, sino también la disponibilidad de oxígeno. En efecto, el agua ocupa espacios que pueden ser ocupados por el aire. A niveles excesivos esto se vuelve una limitante para la respiración del hongo.

La humedad del aire

Este es un factor de suma importancia para la adecuada fructificación de las especies de *Pleurotus*. Dado que los cuerpos fructíferos están formados por un alto contenido de agua y su estructura hifal no les permite retener la humedad en condiciones adversas, un balance adecuado entre la humedad ambiental y el contenido de humedad del hongo es necesario. Debido a esto, la humedad relativa del ambiente donde crece el hongo debe ser suficiente para evitar que tanto el sustrato como los cuerpos fructíferos se deshidraten. En general, los hongos son muy susceptibles a las variaciones en la humedad relativa. Así por ejemplo, Cailleux *et al.* (1976), indicaron que la humedad adecuada para el desarrollo de *P. eryngii* era de 85-95%, mientras que Block *et al.* (1959) indicaron que la humedad óptima para la fructificación de *P. ostreatus* era de 85%.

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula afecta el crecimiento y la fructificación porque se relaciona con la accesibilidad a los nutrientes, al agua y al aire por parte de las hifas del hongo. Los tamaños de partícula muy pequeños dificultan la aireación necesaria para la respiración y los tamaños muy grandes son inadecuados porque dificultan la compactación del sustrato y el acceso del hongo a los nutrientes. Rajarathnam y Bano (1989), recomiendan tamaños de partícula de 2-3 cm cuando se usa rastrojo de arroz para el cultivo de especies de *Pleurotus*.

La aireación

El oxígeno es un elemento de gran importancia para el crecimiento de los basidiomicetos porque son organismos aerobios. Estos organismos presentan requerimientos de oxígeno diferentes según el estado fisiológico en que se encuentren. Para el caso de *Pleurotus* spp., se ha notado que la concentración alta en CO₂ estimula la germinación de las esporas y el crecimiento micelial pero inhibe la fructificación. Según Zadrazil, (1974), la estimulación varía según las especies; por ejemplo: *P. ostreatus* obtiene una máxima estimulación de su crecimiento micelial cuando el aire contiene 28% de CO₂, mientras que *P. eryngii* lo obtiene con 22%. Por su parte Kamra y Zadrazil (1986), señalaron que la pérdida de materia orgánica y la deslignificación del sustrato son mayores cuando se da en una atmósfera con 100% de oxígeno y que la concentración de CO₂ las influencia negativamente. Estos mismos autores señalaron que, durante su experimento en matraces, la formación de primordios se dio a los 8-10 días después de la inoculación solo cuando se mantuvo un flujo continuo de aire de 30 l/h; que cuando la aireación forzada se detuvo la fructificación se pospuso de 1 a dos días y que no se dio en absoluto cuando los matraces se ventilaban solo 2 veces al día. La fructificación suele darse en condiciones normales cuando se tiene un 20% de oxígeno y una concentración de CO₂ no mayor de 800 ppm en el ambiente que circunda al hongo.

La luz

Según Eger (1974), *P. ostreatus* no puede fructificar en oscuridad continua. Para poder hacerlo requiere ser expuesto a longitudes de onda inferiores a 600 nm, sin embargo la sensibilidad tanto de la cantidad como de la calidad de la luz depende de las especies. Esta misma autora indicó que la sensibilidad a la luz es máxima desde momentos previos hasta horas después de que el micelio ha colonizado el sustrato. Por su parte Kamra y Zadrazil (1986), encontraron que una exposición diaria de 20 minutos a la luz es suficiente para que *P. pulmonarius* fructifique.

REFERENCIAS

- Alba-Lara, S.E. 1995. Influencia de factores ambientales en el desarrollo micelial del Hongo *Cookeina sulcipes* a nivel laboratorio. Tesis licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas. UNACH. Tapachula, Chis. México.
- Bartnicki-García, S. 1997. El papel del spitzenkörper en el crecimiento de las hifas de los hongos. *Memorias del VI Congreso Nacional de Micología/IX Jornadas Científicas*. UNACH-ECOSUR. Tapachula, Chis. México 1-2.
- Bartnicki-García, S. F. Hergert y G. Gierz. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasm* 153: 46-57.
- Benítez-Camilo, F.A., G. Huerta-Palacios y J.E. Sánchez-Vázquez. 1998. Producción de 18 cepas de *Pleurotus djamor* del Soconusco, Chiapas. *Quehacer científico en Chiapas*. UNACH. 1(2): 25-36.
- Block, S.S., G. Tsao y L.H. Han 1959. Experiments on the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 4, 309
- Brancato, F. P., and N.S. Golding. 1953. The diameter of a mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45: 848-864.
- Cailleux, R., A. Diop y A. Macaya-Lizano. 1976. *Pleurotus ostreatus* et formes afines: Compartiment cultural. Influence des sources carbonées et azotées sur le développement mycelien et la fructification. *Mush. Sci.* (9)1,595.
- Chang, S.T., J.A. Buswell and S. Chiu. 1993. (Eds). *Mushroom Biology and Mushroom Products*. The Chinese University of Hong Kong. 369p.
- Eger, G., H. D. Gottwald y U. v Netzer. 1974. The action of light and other factors on sporophore initiation in *Pleurotus ostreatus*. In: K. Mori (ed). *Mush. Sc.* 9:575-583.
- Girbardt, M. 1957. Der spitzenkörper von polystictus versicolor (L.). *Planta* 50: 47-59.
- Girbardt, M. 1969. Die ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypen. *Protoplasma* 67:413-441.
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York.
- Gooday, G. W. 1995. Cell walls. In: N.A.R. Gow y G.M. Gadd (eds). *The Growing Fungi*. Chapman and Hall. 43-62.
- Gow, N.A.R. y G.M. Gad. 1995. *The growing fungi*. Chapman and Hall.
- Guzmán, G. 1989. El uso de los hongos en Mesoamérica. *Ciencia y Desarrollo*. 9:59: 17-27.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco y L. Guzmán. 1993. *El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales*. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hashimoto, K. y Z. Takahashi. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 9:1, 585-593.
- Hernández-Ibarra, H., J.E. Sánchez-Vázquez y L.A. Calvo-Bado 1995. Evaluación de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp. de la región de Tapachula. *Rev. Mex. Mic.* 9,29-38.
- Hong, J. S. 1978. Studies on the physicochemical properties and the cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Korean Agr. Chem. Soc.* 21:3, 150-184.
- Jandaik, C. L. y J.N. Kapoor. 1975. Nutritive value of mushroom *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Mush. J.* 36:408.
- Jennings, D.H. 1995. *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge University Press.
- Kamra, D.N. y F. Zadrazil. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit-

- body formation, lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. *Agr. wastes* 18: 1-17.
- Khanna, P y H. S. Garcha. 1985. Physiological studies on *Pleurotus* spp. I. Nitrogen utilization. *Mush. Newsl. Tropics*.5: 16.
- Koch, A. L. 1975. The kinetics fo mycelial growth. *J. Gen. Microbiol.* 89: 209-216.
- Kurtzman, R.H. 1974. The metabolism of fatty substances by the oyster mushroom. *Mush. Sc.* 9: 1,557-565.
- Labarère, J. 1993. Métodos de la genética aplicados a la obtención y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. *I jornadas técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha*. CIES. Motilla de Palancar (España) 151-164.
- Lilly, V.G. y H.L. Barnett. 1951. *Physiology of the Fungi*. Mc Graw Hill. 24-44.
- López-Franco, R. & C.E. Bracker. 1996. Diversity and dynamics of the spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma* 195:90-111.
- López, A., G. Huerta Palacios and J. E. Sánchez. 1996. Contamination encountered during various phases of cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Tropical Mexico. *In: Proceed. II. Int. Conf. on Mushroom Biology and Mushroom Products*. D. Royse (ed). Penn. St. Univ. USA. 495-502.
- Manu-Tawiah, W y A.M. Martin. 1987. *Pleurotus ostreatus* requirements for P, K, Mg and Mn in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 34:620-624.
- Manu-Tawiah, W y A.M. Martin. 1988. Nitrogen sources and the growth response of *Pleurotus ostreatus* mushroom mycelium *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* 21:2,194-199.
- Markham, P. 1995. Organelles of filamentous fungi. *In: N.A.R. Gow y G.M. Gadd (eds). The Growing Fungi*. Chapman and Hall. 75-98.
- Márquez-Rocha, F.J., G. K. Guillén-Navarro, J.E. Sánchez-Vázquez J.E y R. Vazquez-Duhalt. 1999. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Techniques* 13: 29-32.
- Martin, A. M. 1986. A review of fundamental process aspects for the production of mushroom mycelium *J. Food Process Engineering* 8,81-96.
- Moore, D. 1995. Tissue formation. *In: N.A.R. Gow y G.M. Gadd (eds). The Growing Fungi*. Chapman and Hall. 423-465.
- Pirt, S.J. 1966. A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *Proceed. Royal Soc. B166*, 369-373.
- Platt, M. W., I. Chet y Y. Henis. 1981. Lignocellulose degradation during growth of the mushroom *Pleurotus* sp. *florida* on cotton straw. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194
- Prosser, J.I. 1995. Kinetics of filamentous growth and branching. *In: N.A.R. Gow y G.M. Gadd (eds). The Growing Fungi*. Chapman and Hall. 301-318.
- Prosser, J. I. y Trincy, A.P.J. 1979. A model for hyphal growth and branching. *J. Gen. Microbiol.* 111: 153-164.
- Rajarithnam, S. y Z. Bano 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part 1B. Pathology, *in vitro* and *in vivo* growth requirements and world status. *C. R. C. Critical reviews in science and Nutrition* 26: 3, 243-311.
- Rajarithnam, S. y Z. Bano 1989. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: Commercial applications and implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28,1, 31-113.
- Rajarithnam, S., Z. Bano y M.V. Patwardhan. 1986. Nutrition of the mushroom *Pleurotus flabellatus* during its growth on paddy straw substrate. *J. Hort. Sc.* 61: 2,223-232.

- Raypeck, V. 1977. Chemical composition of hemicellulose as a factor participating in the substrate specificity of wood destroying fungi. *Wood Sci. Technol.* 11: 59
- 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.
- Sánchez, V.J.E. y L. Calvo B. 1994. Uso de inóculo líquido en la producción de *Pleurotus ostreatus*. *Resúmenes del 5 Congreso Nacional de Micología*. Soc. Mex. Mic. 27-30 de Nov. Guanajuato, Gto. P. 66.
- Sánchez, J. E. 1994. *Producción de hongos comestibles*. Centro de investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de las Casas. Mex. 90p.
- Srivastava, H. C. y Z. Bano. 1970. Nutrition requirements of *Pleurotus flabellatus*. *Appl. Microbiol.* 19, 166.
- Stölzer, S y K. Grabbe. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: M.J. Maher (ed). *Proceedings of the 13th Int. Cong. On the Science and Cultivation of Edible Fungi*. 1, 141-146. Balkema. Rotterdam.
- Stafford, K. 1986. Continuous fermentation. In: A. L. Demain y N.A. Solomon (eds) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. 137-140.
- Straatsma, G., G. Di Lena, T.W. Olijnsma, H.J.M Op den Camp y L.J.L.D. Van Griensven. 1993. Laboratory media for measuring growth parameters of *Agaricus bisporus* mycelium as influenced by *Scytalidium thermophilum*. *Cultivated Mushroom Research Newsletter* 1, 1-6.
- Treschow, C. 1944. Nutrition of the cultivated mushroom. Thesis. Royal Veterinary and Agricultural College. Copenhagen. 190 p.
- Trinci, A.P.J. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 57: 11-24.
- Trinci, A. P.J. 1971. Influence of the width of peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J. Gen. Microbiol.* 67, 325-344.
- Trinci, A. P. J. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branching initiation of fungal mycelia. *J. Gen. Microbiol.* 81: 225-236.
- Voltz, P.A. 1972. Nutritional studies on species and mutants of *Lepista*, *Cantharellus*, *Pleurotus* and *Volvariella*. *Mycopathologia et Mycologia applicata.* 48:175-185.
- Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *P. florida*, *P. cornucopiae* and *P. eryngii*. *Mush. Sc.* 9: 621-652.

IV Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas.

Leo Calvo-Bado

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	71
SISTEMÁTICA TRADICIONAL	72
Color y forma	72
Estudios de incompatibilidad genética	73
SISTEMÁTICA MOLECULAR	75
RESUMEN Y PERSPECTIVAS FUTURAS	77
REFERENCIAS	79

INTRODUCCIÓN

El género *Pleurotus* spp. se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm (hongo ostra), es una de las especies mayormente cultivadas (Chang, 1996); sin embargo, existen otras, denominadas “exóticas”, que son producidas en menor escala de manera local en diversos países. Buchanan (1993) reconoce un número mayor de 20 especies y entre ellas señala a *P. cornucopiae* (Paulet Pers.) Roland, *P. pulmonarius* (Fr.) Qué. y *P. eryngii* (DC Fr.), entre otras.

La taxonomía del género es muy compleja debido a un alto grado de variabilidad morfológica de los basidiocarpos, lo cual es atribuido principalmente a diversos factores ambientales. Debido a esta situación, una misma especie puede ser identificada bajo diferentes nombres. Otros factores que hacen compleja la taxonomía del género son la plasticidad fenética y la variabilidad genética. Un entendimiento de su taxonomía y la relación que guardan entre las diferentes especies de acuerdo con su distribución geográfica son los principales intereses científicos en futuros programas de mejoramiento genético y de preservación de germoplasma nativo, particularmente en regiones poco exploradas como el Trópico. Esta falta en el entendimiento taxonómico de las especies cultivadas de *Pleurotus* hace difícil la aplicación de la tecnología de mejoramiento genético y de cultivo en dichas especies. Una correcta identificación de la especie de interés evitará gastar tiempo en pruebas genéticas de incompatibilidad entre cepas o colecciones que no guardan ninguna relación genética.

Se han hecho enormes esfuerzos para clasificar las especies del género *Pleurotus* por medio de criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos (Romgnesi, 1969; Anderson *et al.*, 1973; Han *et al.*, 1974; Maning, 1977; Eger *et al.*, 1979; Hilber, 1982; Kulkarni *et al.*, 1987; May y Royses, 1988; Zervakis *et al.*, 1994; Iraçabal *et al.*, 1995). Sin embargo, aunque han generado valiosa información sobre la distribución taxonómica dentro del género, estos no han sido completamente satisfactorios y concluyentes.

En sistemática, dos términos-conceptos son de vital importancia para el entendimiento de la definición de especie y su relación con otros organismos. En este caso se particulariza con el ejemplo del género *Pleurotus*. Estos conceptos son: especie biológica y especie filogénica. La especie es la unidad fundamental de la clasificación biológica, sin embargo, la definición y delimitación de ésta puede ser más compleja (Carlile y Watkinson, 1994). Desde el punto de vista biológico-genético, los individuos de dos poblaciones de una especie son capaces de unirse y producir descendientes viables. Por muchos años se ha aceptado que una especie “cualitativamente” muestra similitudes genéticas entre individuos de dos poblaciones, los cuales son capaces de intercambiar, hibridar y evolucionar con un mismo patrón de conducta sexual. Por otra parte, el concepto de especie filogénica es más bien “cuantitativa” y delimita a dos organismos como una sola especie o grupo de especies únicamente basado en la homología de ciertas regiones de su ADN.

En las siguientes secciones se discutirán algunos conceptos en la sistemática tradicional y molecular en el género *Pleurotus* spp. con el fin de tener un mayor panorama de la distribución de las especies y la relación que tienen entre sí, particularmente de las especies cultivadas.

SISTEMATICA TRADICIONAL

El ser humano por naturaleza acostumbra a darle nombre a las cosas que habitan a su alrededor, basado en el color y la forma. De esta manera crea reglas para la identificación de éstas. En el caso de los hongos, la morfología de los cuerpos fructíferos (macro y microscópica) ha sido punto de referencia en la clasificación tradicional. A continuación se describen algunos rasgos característicos relevantes de las especies del género *Pleurotus* sin profundizar en alguna especie en particular. Dado que este capítulo pretende dar un panorama general de la situación actual en la sistemática del género, las claves taxonómicas para la identificación clásica pueden encontrarse en otros textos (Pilát, 1935; Singer, 1975; Corner, 1981; Hilber, 1982; Singer, 1986). Las figuras 1-3 muestran tres especies comestibles cultivadas.

Figura 1. Cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*



Color y forma

En México como en otros países de América Latina, las especies de *Pleurotus* son conocidas con nombres comunes o vernáculos según la región y el tipo de árbol o tronco en el que habitan (hongo de palo podrido, hongo de caahuate, hongo de huarumbo, hongo del izote, etcétera) (Calderón, 1987) (figura 1).

Singer (1975, 1986) dividió al género *Pleurotus* en cinco secciones, sin embargo la sección de *P. ostreatus* es muy controversial y aún ahora, muchas especies no han sido completamente definidas o identificadas (tabla 1). En general, *Pleurotus* spp. presenta

un sombrero o píleo liso convexo, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra o concha. Puede presentar escamas hacia el centro o en la base y los cuerpos fructíferos son por lo general concrecentes. El píleo puede medir entre 5 y 12 cm de diámetro. Su color es muy variable, negro violáceo, pardo ceniciento, gris, amarillo, blanco, rosa según la especie. Sus laminillas son muy decurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillas. El estípote es corto, excéntrico o lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del sombrero o píleo, algunas veces no se presenta. Generalmente mide alrededor de 2 cm de largo, 1-2 cm de grosor, y es blanquecino y de contexto blanco. Las esporas son de color lila o crema en masa, elipsoide con una talla promedio de 9.5×3.5 micras (Guzmán, 1990).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Pleurotus*

Reino	Fungi
División	Basidiomycotina
Clase	Homobasidiomicete
Subclase	Hymenomicete
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Pleurotus</i>

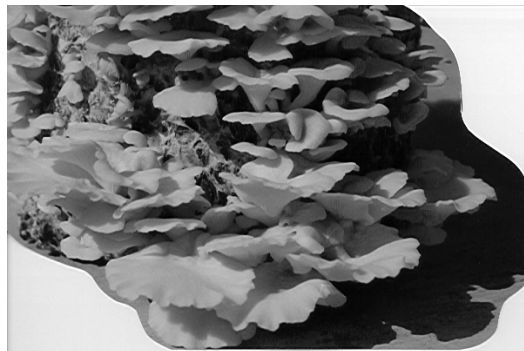
Estudios de incompatibilidad genética

Desde el punto de vista genético, *Pleurotus* spp. ofrece un excelente sistema para el análisis de especiación en basidiomicetos. Por lo consiguiente, y con el fin de proveer información acerca de la relación genética dentro y entre colecciones de diferentes regiones geográficas, se han llevado a cabo diversos estudios de incompatibilidad en el género, en especies tales como *P. ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm, *P. pulmonarius* (Fr.) Quél, *P. columbinus* (Quél. Apud Bres.) Quél, *P. sapidus* (Schulzer and Kalchbr.) Sacc. (Terakawa, 1960; Eugenio y Anderson, 1968; Anderson *et al.*, 1973; Manning, 1977, Eger, 1978; Eger y Leal-Lara, 1979; Anderson *et al.*, 1991; Zervakis y Balis, 1995). Estos estudios han demostrado la existencia de grupos de interesterilidad y grupos que aunque morfológicamente están localizados en diferente taxa, pueden o no pertenecer a una misma especie biológica. Dichos patrones de interesterilidad denominada especiación pueden ser observados como una demarcación café-obscura en la zona de unión entre dos homocariones. Este tipo de reacción puede ser interpretada como un proceso de especiación debido a un aislamiento geográfico. En un gran número de casos se pueden observar complejos de especies o poblaciones en proceso de especiación, tales como el complejo *Armillaria mellea* (Korhonen, 1978; Anderson y Ullrich, 1979), el grupo *Collybia drophila* (Vilgalys y Miller, 1983; Vilgalys y Miller, 1987), *Agaricus bitorquis* (Martínez-Carrera *et al.*, 1995), el grupo *Agaricus arverses* (Calvo-Bado *et al.*, en prensa) y en otras especies silvestres del género *Agaricus* (Anderson *et al.*, 1984).

Figura 2. *Pleurotus eryngii* cultivado sobre paja. Nótese el grosor y ubicación del estípite.



Figura 3. Basidiomas de *P. djamor*.



Hilber (1982) y Vilgalys *et al.* (1993) estudiaron la relación genética entre colecciones de dos regiones geográficas de América del Norte y de Europa. Sus estudios demostraron que aunque las colecciones fueron identificadas con nombres distintos, cuatro grupos de especies fueron delimitadas basados en el análisis de incompatibilidad. Análisis recientes han revelado la existencia de 15 grupos geográficos de especies en el género *Pleurotus* basado en estudios de incompatibilidad (Vilgalys *et al.*, 1996), sin embargo, estos grupos podrían ser ampliados o nuevos grupos podrían ser añadidos con las investigaciones actuales en diversos laboratorios. En la tabla 2 se muestran los grupos biológicos de las especies de *Pleurotus* y su distribución geográfica. Es interesante señalar que los grupos III *P. populinus*, VIII *P. levis*, y XI *P. agaves* son únicos y solo están presentes en América del Norte. Otros grupos como el grupo XII *P. abieticola*, XIII *P. brazil*, XIV *P. australis* y XV *P. purpureo-olivaceus* están presentes en Asia, América del Sur, Australia y Africa, respectivamente. De acuerdo a estas recientes observaciones el grupo V *P. djamor* es uno de los grupos mas cosmopolitas y es observado en todos los continentes.

Tabla 2. Grupos de incompatibilidad en *Pleurotus* spp. basado en el concepto de especies biológicas (Vilgalys *et al.*, 1996).

Grupo	Especie	Asia	América del norte	Europa	Australasia	África	América del Sur
I	<i>P. ostreatus</i>	v	v	v			
II	<i>P. pulmonarius</i>	v	v	v	v		
III	<i>P. populinus</i>		v				
IV	<i>P. cornucopiae</i>	v		v			
V	<i>P. djamor</i>	v	v	v	v	v	v
VI	<i>P. eryngii</i>	v		v			
VII	<i>P. cystidiosus</i>	v	v	v	v	v	
VIII	<i>P. levis</i>		v				
IX	<i>P. dryinus</i>		v	v			
X	<i>P. tuberregium</i>	v			v	v	
XI	<i>P. "agaves"</i>		v*				
XII	<i>P. "abieticola"</i>	v					
XIII	<i>P. "brazil"</i>						v
XIV	<i>P. australis</i>				v		
XV	<i>P. purpureo-olivaceus</i>					v	

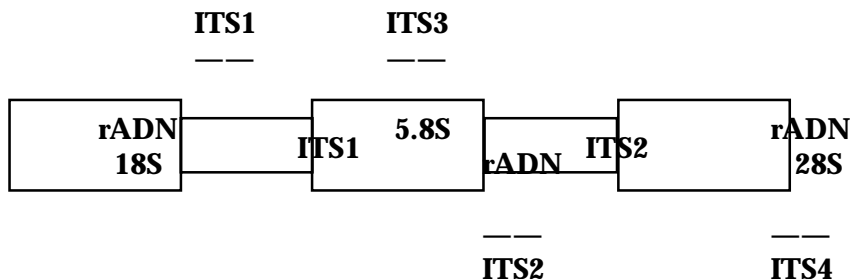
* Especie de *Pleurotus* colectada en México.

Petersen y Ridley (1996) mostraron que una colección de *Pleurotus* aislada en Nueva Zelanda fue sexualmente compatible a diferentes niveles con cinco especies diferentes (*P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. populinus*, *P. abieticola*, y *P. pulmonarius*). Esto indica claramente la falta de información de colecciones en regiones poco estudiadas y aún por encontrar, y que resta incluir en la base de datos moleculares de las actuales investigaciones en la sistemática de *Pleurotus* spp.

SISTEMÁTICA MOLECULAR

Hoy en día, los estudios moleculares han servido de guía para un mayor entendimiento de la relación que guardan las especies de hongos, los complejos de especies y sus estructuras en la población (Egger, 1992), mediante el uso de ADN mitocondrial (Jahnke *et al.*, 1987; Smith y Anderson, 1989; Smith *et al.*, 1990) y la homología en sus secuencias (Horgen *et al.*, 1984). De particular interés es una región del ADN ribosomal (rADN) denominada en inglés como Internal Transcribed Spacer region (ITS). Ésta es altamente polimórfica y ha sido usada ampliamente en estudios taxonómicos y filogenéticos en hongos con el fin de determinar relaciones entre especies (White *et al.*, 1990; Hibbett, 1992; Bridge y Arora, 1998). El ITS consiste de dos regiones variables localizadas dentro del rADN, entre las subunidades 18S rADN, 5.8S rADN, y 28S rADN altamente conservadas (figura 4).

Figura 4. Representación esquemática de la región del ITS del ribosoma nuclear, localización de los "primers" y dirección de síntesis.

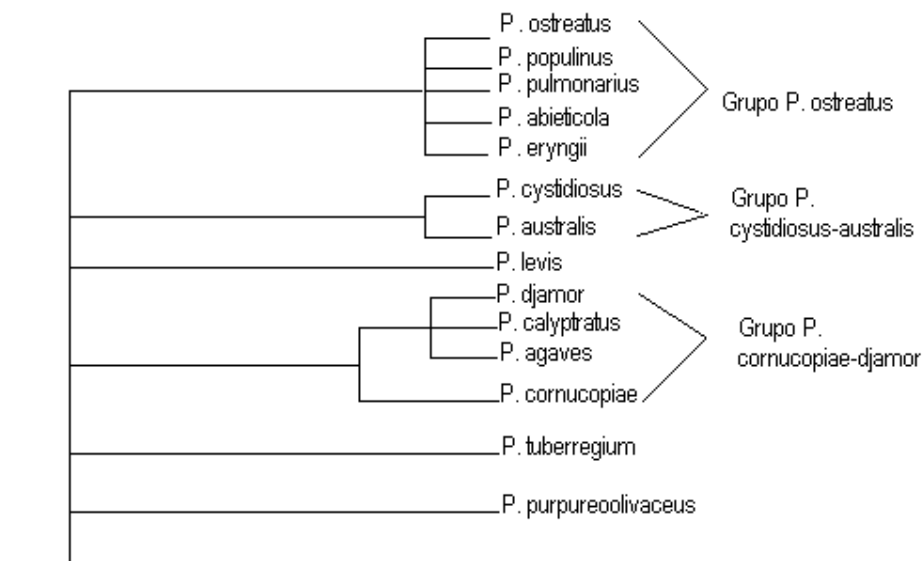


El análisis del ITS y de otras regiones del rADN ha sido llevado a cabo en diversos hongos comestibles como el grupo *Agaricus arvenses* (Calvo-Bado *et al.*, en prensa), *Auricularia* spp. (Berres *et al.*, 1995), *Armillaria* spp. (Chilliali *et al.*, 1998), *Ganoderma* spp. (Moncalvo, 1996) y *Lentinus-Lentinula* (Hibbett and Vilgalys, 1993; Nicholson *et al.*, 1995) y muy recientemente en *Pleurotus* spp. (Neda y Nakai, 1995; Vilgalys y Sun, 1994). Sin embargo, aun con estos estudios, la relación evolucionaria entre las especies de *Pleurotus* no está bien entendida, lo cual se refleja en su compleja taxonomía. Vilgalys y Sun (1994) demostraron la relación filogenética que existe en ocho grupos (I-VIII) de especies de *Pleurotus*. De este reporte, los grupos V y VII son comunes en México. Ellos corresponden a especies identificadas como *P. djamor*, *P. salmoneostramineus* y *P. salmonicolor* (grupo V). Estas especies son particularmente observadas en regiones tropicales y existe una estrecha relación filogenética entre colecciones de regiones asiáticas (Malasia). El grupo VII considera especies identificadas como *P. cystidiosus*, *P. abalonus* y *P. smithii* observadas en regiones de América del Norte y México.

Iraçabal *et al.* (1995) han reportado resultados similares a los obtenidos por Vilgalys y Sun (1994). Este estudio molecular basado en el análisis del polimorfismo de restricción del ADN ribosomal-RFLP (Random fragment length polymorphisms) de 29 colecciones de *Pleurotus* spp., mostró una gran variabilidad genética dentro de una misma especie lo cual se refleja en la variabilidad fenética. Ellos sugirieron que ciertos fragmentos de ADN denominados en biología molecular como marcadores moleculares correspondientes a ciertos grupo de especies podrían ser usados para la correcta identificación de estas especies de *Pleurotus*, pero además, el uso de secuencias específicas para cada especie (primers) y el uso de la tecnología de PCR (reacción de la polimerasa en cadena) en un futuro cercano permitirá la identificación correcta de las especies.

La figura 5 muestra la relación que muestran las especies de los principales grupos del hongo ostra basados en la secuenciación de genes del ARN ribosomal (Vilgalys 1997) y

Figura 5. Árbol filogenético que muestra las principales interrelaciones del grupo *P. ostreatus* (Vilgalys 1997).



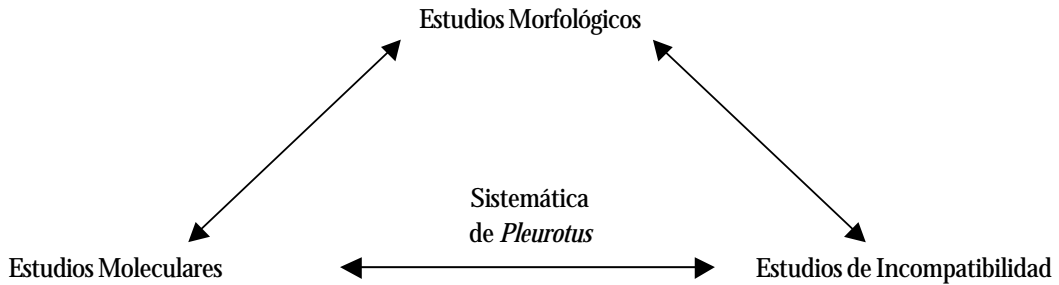
en el capítulo V (página 106) se observa la relación entre 16 aislamientos según los dominios variables mitocondriales V4, V6 y V9 (González y Labarère, 2000).

RESUMEN Y PERSPECTIVAS

El aislamiento geográfico es uno de los factores determinantes en la separación de grupos de especies biológicas en *Pleurotus*. Esto crea barreras que previenen la interacción en las poblaciones y da lugar al proceso denominado especiación. Los estudios de incompatibilidad combinados con los caracteres morfológicos son determinantes para la delimitación del concepto de especie biológica. Una estrecha interacción entre caracteres morfológicos, de crecimiento, de distribución geográfica y de hospedero son determinantes para la asignación de grupos de especies en las nuevas colecciones de *Pleurotus*. Los estudios morfológicos, de incompatibilidad y moleculares entre colecciones son los criterios importantes en la determinación y correcta interpretación de las especies en estudio (figura 6).

Con el avance tecnológico y el desarrollo de las herramientas moleculares, características tales como el color de la esporada, han quedado fuera de estudio y por lo tanto no son viables para usarlas como carácter taxonómico por sí solo. Un estudio integral de la sistemática del género *Pleurotus* spp. involucraría estudios de incompatibilidad y de variabilidad genética entre colecciones, ya que dos colecciones de hecho presentan variación (ADN fingerprinting) y no pueden interpretarse como especies diferentes.

Figura 6. Interacción de tres disciplinas en el entendimiento de la sistemática de *Pleurotus* spp.



De acuerdo con los resultados publicados en los últimos años, se observa una enorme falta de información en algunos especímenes colectados en países de América Latina por lo cual no están incluidos en los estudios de biodiversidad y especiación en *Pleurotus*. Esto incluye algunas colecciones de México y Brasil. Actualmente, un estudio sistemático mas amplio en selecciones del sur de México y de América Central está en proceso (Huerta G., *comm. pers.*), lo cual permitirá tener una panorama más amplio de la distribución de *Pleurotus* spp., particularmente del complejo cosmopolita de *P. djamor*.

REFERENCIAS

- Anderson, J.B., K. Korhonen y R. Ullrich. 1980. Relationships between European and North American biological species of *Armillaria mellea*. *Exp. Mycology* 4:87-95.
- Anderson, N., G.R. Furnier, A.S. Wang y J.W. Schwandt. 1991. The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. *Can. J. Bot.* 69:2187-2191.
- Anderson, N., S.S. Wang y J.W. Schwandt. 1973. The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia* 65:28-35.
- Berres, M.E., L.J. Szabo y D.J. McLaughlin. 1995. Phylogenetic relationships in Auriculariaceae basidiomycetes based on 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:821-840.
- Bridge, P.D. y D.K. Arora. 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. In: P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy, and R.P. Elander (eds). *Applications of PCR in Mycology*. CAB International, London, United Kingdom. 63-84.
- Buchanan, P. 1993. Identification, names and nomenclature of common edible mushrooms. In: S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu (eds). *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the First International Conference*. Hong Kong. 21-32.
- Calderón, V. 1987. El hongo de cazahuate: opción alimentaria. *Información Científica y Tecnológica* 9: 37-40.
- Carlile, M.J. y S. Watkinson. 1994. *The Fungi*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Chang, S.T. 1996. Mushroom research and development-equality and mutual benefit. In: D.J. Royle (ed). *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the Second International Conference*, University Park, Pennsylvania, USA. 1-10.
- Chilliali, M., H. Idder-Ighili, J.J. Guillaumin, C. Mohammed, B. Lung-Escarmant y B. Botton. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycol. Res.* 102:533-540.
- Corner, E. J. H. 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malasian species. *Beih. Nova Hedwigia* 69: 1-169.
- González, P. y Labarère. 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology* 146: 209-221.
- Eger, G. 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In: S. T. Chang and W. A. Hayes (eds). *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York, Academic Press. 497-519
- Eger, G., S.F. Li y H. Leal-Lara. 1979. Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia* 71: 577-588.
- Eger, K. N. 1992. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. In: G.C. Carroll and D.T. Wicklow (eds). *The fungal community-its organisation and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, New, York, U.S.A. 193-208
- Eugenio, C. P. y N.A. Anderson. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634.
- Guzmán, G. 1990. Identificación de los hongos: comestibles, venenosos y alucinantes. Editorial Limusa-Noriega, México.
- Han, Y. H., K.M. Chen y S. Cheng. 1974. Characteristics and cultivation of a new *Pleurotus* in Taiwan.

- Mush. Sc.* 9: 167-174.
- Hibbett, D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 33: 533-556.
- Hibbett, D.S. y R. Vilgalys. 1993. Phylogenetic relationship of the basidiomycete genus *Lentinus* inferred from molecular and morphological characters. *Syst. Bot.* 18: 409-433.
- Hilber, O. 1982. Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-Formenkomplexes. *Bibliotheca Mycologica* 87, J. Cramer: Vaduz.
- Hilber, O. 1989. Valid, invalid and confuseing taxa of the genus *Pleurotus*. *Mush. Sc.* 12: 241-248.
- Horgen, P.A., R. Arthur, O. Davy, A. Moum, F. Herr, N. Straus y J.B. Anderson. 1984. The nucleotide sequence homologies of unique DNAs of some cultivated and wild mushrooms. *Can. J. Microbiol.* 30: 587-593.
- Iraçabal, B., G. Zervakis y J. Labarère. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141: 1479-1490.
- Jahnke, K.I., Bahnweg, G., y Worrall, J.J. 1987. Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs. *Trans. British Mycol. Soc.* 88: 572-575.
- Korhonen, K. 1978. Interfertility and clonal size in the *Armillaria mellea* complex. *Karstenia* 18: 31-42.
- Kulkarni, R. K., C.D. Kamerath y K.L. Allred. 1987. Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by isozyme analysis. In: P. J. Wuest, D. J. Royle, and R. B. Beelman (eds). *Cultivating Edible Fungi-Developments in Crop Science* 10, 171-181. Elsevier, The Netherlands.
- Manning, D. L. 1977. Fruiting and mating compatibility studies in the *Pleurotus ostreatus-sapidus* complex. H. E. Bigelow and E. G. Simmons (eds). Second International Mycological Congress. Abstract p. 415. Tampa:IMC-2 Inc.
- Martínez-Carrera, D., J.F. Smith, M.P. Challen, T.J. Elliott y C.F. Thurston. 1995. Evolutionary trends in the *Agaricus bitorquis* complex and their relevance for breeding. *Mush. Sc.* 14:29-36.
- May, B. y D. Royle. 1988. Interspecific allozyme variation within the fungal genus *Pleurotus*. *Trans. British Mycol. Soc.* 90: 29-36.
- Moncalvo, J. M. 1996. A cladistic approach to biodiversity in the Ganodermataceae. In: D.J. Royle (ed). *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceeding of the Second International Conference*. University Park, Pennsylvania, U.S.A. 75-89.
- Neda, H. y T. Nakai. 1995. Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial sequence of 18SrDNA and ITS-1 regions. *Mush. Sc.* 14: 161-168.
- Nicholson, M. S., M.R. Thon y D.J. Royle. 1995. Phylogeny of *Lentinus* spp. based on restriction fragment length polymorphism analysis of internal transcribed spacers and intergenic regions of ribosomal DNA. *Mush. Sc.* 14:153-160.
- Petersen, R. H. y K.W. Hughes. 1993. Intercontinental interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on others species. *Sydowia* 45: 139-152.
- Petersen, R. H. y G. Ridley. 1996. A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. *Mycologia* 88: 198-207.
- Pilát, A. 1935. *Pleurotus* Fries. In: Atlas des Champignons de l'Europe. Bd. 2. Praha.
- Romagnesi, H. 1969. Sur les *Pleurotus* du groupe *ostreatus* (*Ostreomyces* Pilat). *Bulletin de la Société Mycologique de France* 85: 305-314.
- Singer, R. 1975. The Agaricales in modern taxonomy. Vaduz:J. Cramer.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smith, M. L. y J.B. Anderson. 1989. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs

- of *Armillaria*: identification of North American biological species. *Mycol. Res.* 93: 247-256.
- Smith, M. L., L. C. Duchesne, J.N. Bruhn y J.B. Anderson. 1990. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics* 126: 575-582.
- Terakawa, H. 1960. The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. *Scientific papers (Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo)* 10: 65-71.
- Vilgalys, R. 1991. Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. *Mycologia* 83: 758-773.
- Vilgalys, R. 1997. Biodiversity of the oyster mushroom *Pleurotus*. *Mush. News* 45:2,32-35
- Vilgalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceed. Nat. Acad. Sc. (USA)* 91:4599-4603.
- Vilgalys, R. y O. K. Miller, Jr. 1983. Biological species in the *Collybia dryophila* group in North America. *Mycologia* 75: 707-722.
- Vilgalys, R. y O. K. Miller, Jr. 1987. Mating relationship within the *Collybia dryophila* group in Europe. *Trans. British Mycol. Soc.* 89: 295-300.
- Vilgalys, R., J. M. Moncalvo, S.R. Liou y M. Volovsek. 1996. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus*. In: D.J. Royse (ed). *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the Second International Conference*. University Park, Pennsylvania, USA. 91-101.
- Vilgalys, R., A. Smith, B. L. Sun. y O.K. Miller. 1993. Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United State and adjacent Canada. *Can. J. Bot.* 71: 113-128.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. (eds). *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, U.S.A. 315-322.
- Zervakis, G. y C. Balis. 1995. Incompatibility alleles and mating behaviour between and within *Pleurotus* species. *Mush. Sc.* 14: 53-62.
- Zervakis, G. y J. Labarère. 1992. Taxonomic relationship within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138: 635-645.
- Zervakis, G., J. Sourdis, y C. Balis. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.

V La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp.

Jacques Labarère y Frédéric Bois

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	85
INTERÉS DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN <i>PLEUROTUS</i>	86
Alimentación humana	86
Alimentación de ganado	86
Control biológico	87
Degradación de productos	87
Potencial para usar los substratos agrícolas	87
CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	91
El tipo de incompatibilidad sexual (<i>mating-type</i>) de <i>Pleurotus</i> spp.	91
Colección de cepas	93
Obtención de homocariontes	94
A partir de esporas	94
A partir de protoplastos	95
A partir de micelio molido	96
Las distancias genéticas	96
Los cruzamientos	98
La mutagénesis	100
Los ensayos	101
RECURSOS GENÉTICOS DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	102
Caracterización del germoplasma	103
Caracterización morfológica y fisiológica	103
Caracterización isoenzimática	104
Caracterización por RFLP	104
Caracterización por RAPD	106
Caracterización por PCR	106
Almacenamiento del germoplasma	109
Agua destilada estéril	111
Subcultivo	111
Almacenamiento en aceite mineral	111

Bancos de datos	112
Bancos de recursos genéticos	112
DISCUSIÓN	115
AGRADECIMIENTOS	117
REFERENCIAS	118

INTRODUCCIÓN

Los recursos genéticos de los hongos tienen un alto interés en agronomía, para la alimentación humana y animal, pero también para el descubrimiento y producción de moléculas o compuestos con un valor agregado en la industria química y farmacéutica.

Los hongos son considerados como el segundo grupo más grande de organismos en la biosfera, después de los artrópodos. Basados en una relación estimada de especies de hongos a especies de plantas vasculares de 6:1, el número total de especies es estimado en alrededor de 1 500 000 en el mundo. Solamente el 5% de estas especies ha sido descrito y reportado (Hawksworth 1991, 1993). Además de las 300,000 taxa descritas (Rossman, 1994), hay cerca de 10,000 especies de macromicetos. De éstas, alrededor de 2,000 especies (en más de 30 géneros) son consideradas como comestibles. Sólo 40 son cultivadas y alrededor de 20 son cultivadas comercialmente (Buchanan, 1993).

En la actualidad la producción de hongos comestibles cultivados se lleva a cabo en más de 80 países, repartidos por la mayoría de zonas climáticas del mundo. Las diferentes especies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. colombinus*, *P. cornucopiae*) se encuentran en la segunda posición entre los hongos comestibles cultivados con el 24% de la producción mundial.

También en su papel de reciclador de materia orgánica, *Pleurotus* spp. juegan un papel importante para el medio ambiente, proveyendo material básico para el desarrollo de la agricultura y la alimentación. Son considerados como cultivos de ciclo corto capaces de transformar desechos en alimentos para humanos y para el ganado. Ellos pueden restaurar suelos contaminados y proteger el ambiente. Algunos pueden ser usados para el control biológico de patógenos. Algunos materiales biológicos también son requeridos por las industrias química y farmacéutica debido a la abundancia y amplio rango de sus productos metabólicos. Por lo tanto, ellos pueden ser tamizados para la producción de nuevos antibióticos, moléculas y compuestos útiles para mejorar la salud humana, y por su interés en la industria química (Labarère y Menini, 1998).

El incremento en el conocimiento de la diversidad y características de las especies de *Pleurotus* contribuirá directa e indirectamente a la realización del valor económico de la diversidad biológica de la tierra. Asimismo, fortalecerá la iniciativa de preservar nuestros recursos biológicos existentes.

La colecta de *Pleurotus* spp. involucra la prospección, el estudio, la conservación y el uso de cepas de este género con diferentes finalidades y objetivos en aspectos de investigación ambiental, agrícolas, bioquímico, farmacéuticos y taxonómica. Es importante que toda colección sea completada con bancos de datos que contengan el máximo de información sobre las cepas almacenadas. Un banco mundial de datos puede ser previsible bajo el apoyo de la *Global Network on Mushrooms under the aegis of FAO*.

Es importante crear bancos regionales de recursos genéticos de *Pleurotus* spp. en los cuales se almacenen micelios de cepas silvestres colectados de los biotipos más variados posibles y también colecciones de micelios homocariotes aislados de dichas cepas y que puedan ser utilizados en función de los programas de mejoramiento genético existentes.

INTERÉS DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN *PLEUROTUS*

Los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. presentan un gran interés para la agricultura y la economía, ya que se pueden desarrollar sobre una gran cantidad de substratos ligno-celulósicos útiles no sólo para la alimentación humana, sino también para otros aspectos como la alimentación animal, la medicina, la farmacia, la industria química, el control biológico, la descontaminación de suelos, etcétera.

Alimentación humana

El valor nutritivo de *Pleurotus* spp. ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. Sus proteínas, las cuales contienen todos los ácidos aminados, son de valor nutritivo más alto que las proteínas de plantas, con una calidad muy cercana a la proteína animal (Lelley, 1987). En adición a su valor como alimento rico en proteína, los hongos contienen carbohidratos, en particular carbohidratos poliméricos como el glucógeno y la quitina, y varios compuestos carbonados de bajo peso molecular como la glucosa, fructosa, galactosa, trealosa y muchos otros. Ellos son ricos en minerales como el potasio, el fósforo y el hierro. Contienen un amplio rango de vitaminas y son particularmente ricos en tiamina (B1), riboflavina (B2), así como en ácido pantoténico (B3), ácido ascórbico (C) biotina (H). La riqueza en fibra cruda debe ser igualmente mencionada.

Las setas también tienen propiedades terapéuticas. Por ejemplo, se ha demostrado que el consumo de basidiocarpos de *P. ostreatus*, que contiene varios tipos de estatinas, previene el incremento de colesterol (Bobek *et al.*, 1994; Gunde-Cimerman y Cimerman 1995).

Alimentación de ganado

La digestibilidad del rastrojo en rumiantes es bajo. Después de cultivar y cosechar los hongos, el substrato degradado tiene un mayor contenido proteico comparado con el substrato original, también tiene características mejoradas como acarreador para nutrientes líquidos y retiene mejor el agua que el rastrojo. Además, la lignina del desecho usado como substrato es degradada por el hongo y convertida en una sustancia más digerible y enriquecida, más conveniente para alimentación de ganado. El substrato degradado puede ser reciclado y su proteína recuperada para alimentación animal, siempre y cuando el substrato esté libre de patógenos y micotoxinas (Zadrazil, 1977, 1980, 1984; Rolz, 1984).

Las especies de *Pleurotus* son consideradas entre las más capaces para degradar la lignina. Después de cosechar los hongos, la celulosa y la lignina del substrato se reduce en un

80% (Zadrazil, 1974). Para mejorar su digestibilidad y valor como alimento animal, por medio del incremento de carbohidratos, la fermentación de rastrojo por *Pleurotus cornucopiae*, y *P. florida* se comparó con la obtenida con otros hongos; los mejores incrementos en digestibilidad fueron obtenidos durante la fermentación con las especies de *Pleurotus* y *Stropharia* (Zadrazil, 1977). Además del rastrojo, *Pleurotus* spp. crece bien en otros tipos de substratos lignocelulósicos convirtiendolos en substancias más digeribles, ricas en proteínas utilizables como alimento animal (Zadrazil 1984). La composta de rastrojo de trigo degradada por *Pleurotus* spp. puede ser usada directamente como alimento para búfalos (Bakshi *et al.*, 1985).

Control biológico

Los hongos que pudren la madera como *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. strigosus*, *P. subareolatus*, han sido descritos por atacar y consumir nemátodos, probablemente porque utilizan los nutrientes de su presa como suplemento, dados los bajos niveles de N disponible en la madera (Thorn y Barron, 1984).

Las especies de *Pleurotus* producen pequeñas gotitas de toxinas provenientes de sus glándulas secretoras espatuladas. Los nemátodos que tocan dichas gotas muestran una inmediata y drámatica respuesta y se vuelven más o menos inmóviles. Estimuladas por productos provenientes excretados por el huésped inmóvil, algunas hifas direccionales convergen en los orificios del cuerpo del nemátodo, lo colonizan y lo digieren (Barron y Thorn, 1987).

Degradación de productos

Los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar pesticidas altamente tóxicos y químicos xenobióticos. La habilidad de *P. ostreatus* para degradar el herbicida atrazina fue demostrada por Masaphy *et al.* en 1993. *P. ostreatus* es capaz de mineralizar el DDT, el cual es uno de los insecticidas más persistentes en el ambiente (Bumpus *et al.*, 1987; Higson, 1991) y de mineralizar una gran cantidad de hidrocarburos poliaromáticos como el fenantreno, más eficientemente que *Phanerochaete chrysosporium* (Bezalel *et al.*, 1996a, 1996b; Novotny *et al.*, 1999). Para sobrevivir en el suelo, el cual no es su hábitat natural, los hongos de pudrición blanca necesitan un substrato que contenga celulosa. Este importante aspecto de la bioremediación fue estudiado en *Pleurotus* spp. (Lang *et al.*, 1997).

Potencial para usar los substratos agrícolas

En muchos países, gran parte de la población trabaja en la agricultura, pero la mayoría no se alimenta de manera suficiente o tiene una situación nutricional inadecuada. Los productos cultivados más importantes son el trigo, el arroz, el mijo, el maíz, la caña de azúcar, las frutas, las hortalizas, el té, el cacao, el café, el tabaco, las plantas de aceite, el algodón y las plantas de fibras. Todos estos productos anualmente generan vastas cantidades de rastrojos, tallos, y desechos, de los cuales una porción es quemada para utilizar las cenizas como fertilizante en el campo y otra es incorporada al suelo para

enriquecerlo con materia orgánica; sin embargo, la mayor parte se deja podrir y no se usa en absoluto. El resultado final es que esas naciones agrícolas producen una enorme cantidad de materiales de desecho que permanecen sin uso, salvo raras excepciones.

Las paredes de las células de las plantas contienen grandes cantidades de compuestos de carbono de alto peso molecular, el más común es la celulosa. Entre los mamíferos, sólo los rumiantes pueden utilizar la celulosa, con la ayuda de los microorganismos simbióticos presentes en el tracto intestinal. Otro compuesto encontrado en cantidad considerable en la madera y en las plantas es la lignina, que es un complicado compuesto heterocíclico. Las moléculas de lignina están localizadas entre las moléculas de celulosa y esto hace las actividades de degradación considerablemente más difícil.

Un gran número de hongos comestibles tienen la habilidad de colonizar el rastrojo y degradar y utilizar la lignina, además de la hemicelulosa y la celulosa. La tasa de descomposición depende de la especie y de la temperatura. Estos tipos de hongos son considerados como agentes primarios de descomposición porque son capaces de utilizar los desechos de las plantas en su forma original sin que hayan sido sujetas a algún proceso de degradación bioquímica o microbiológica. Entre los agentes de descomposición primaria más efectivos existen hongos comestibles como las especies de *Pleurotus*.

El cultivo de especies de *Pleurotus* sobre desechos agrícolas es una buena alternativa para producir alimentos. Los hongos comestibles convierten los desechos agrícolas en alimentos, por lo que son una buena fuente de proteína barata. La mayoría pueden ser producidos en un corto periodo de tiempo a bajo costo y en áreas reducidas. Además, el desarrollo del cultivo de hongos a pequeña escala en países en desarrollo necesita una tecnología sencilla en condiciones poco sofisticadas. Después de cultivar y cosechar los hongos, la relación C/N del sustrato es disminuida y puede ser utilizado como abono para el suelo.

En proyectos rurales se pueden emplear métodos de bajo costo que requieren equipo simple. Algunos métodos pueden utilizar la mano de obra familiar, con lo cual se provee de ocupación a todos los miembros de la familia. La elección de la técnica para el cultivo de *Pleurotus* spp. depende de la disponibilidad de los sustratos. Se estima que de cada kilogramo en base seca de sustrato con celulosa y lignina es posible obtener un kilogramo de hongos frescos (Poppe y Hofte, 1995).

Pleurotus spp. crece en una gran variedad de sustratos. La elección del sustrato depende de su disponibilidad y costo. Por ejemplo, las especies de *Pleurotus* fueron cultivadas en diferentes tipos de aserrín, rastrojos y muchos otros desechos agrícolas y agroindustriales como el olote de maíz, los desechos de algodón, el bagazo de caña, los desechos del café, el papel periódico, cualquier parte de plantas o desechos (como las hojas, las flores, las pulpas o las cáscaras). Los sustratos pueden provenir de desechos de plantas, sin ser suplementados. En casi todos los casos, la eficiencia de estos sustratos

es considerablemente mejorada cuando se suplementa con materiales ricos en proteínas (salvado de trigo, arroz, maíz, soya, frijol, y varios más).

El tratamiento del sustrato puede ser más o menos sofisticado, según la energía disponible en el sitio de tratamiento. Algunos sustratos, como leños y tallos, pueden usarse sin tratamiento. Los sustratos pueden ser utilizados de varias formas: (i) simplemente remojados con agua hasta que alcancen un 70% de humedad, (ii) pasteurizados por algunos minutos por inmersión a 65-70°C, (iii) fermentado y después pasteurizado, (iv) esterilizado a 1.2 Atm. de presión durante una hora (Poppe y Hofte, 1995).

A continuación se señalan algunos ejemplos de materiales de desecho que pueden ser utilizados para el cultivo de *Pleurotus* spp. La mayoría de los ejemplos son citados de Poppe y Hofte (1995).

La pulpa de café: en México, *P. ostreatus* y *Lentinula edodes* fueron cultivados sobre pulpa de café (Soto Velazco 1986). En Cuba, las especies de *Pleurotus* fueron cultivadas sobre pulpa secada al sol, previa rehidratación y pasteurización (Bermudez *et al.*, 1994). También fue usada, mezclada con olote de maíz, para el cultivo de *Auricularia fuscusuccinea* (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995).

La mazorca de cacao, después de haber extraído las semillas (Sánchez Vázquez *et al.*, 1997), así como la cascarilla que rodea las semillas, y que se elimina al preparar el polvo de cacao y el chocolate.

El olote de maíz, generalmente molido después de secado, que también pueden ser usados sin moler para cultivar *Pleurotus* spp. Adicionalmente, el rastrojo de maíz, es decir, la planta entera seca, puede ser utilizada después de cosechar el maíz.

Los subproductos de la industria del mango y la del dátil han sido evaluados para el cultivo de *P. ostreatus*. Los rendimientos más altos en cuerpos fructíferos fueron obtenidos usando una mezcla de desechos de dátil o de mango y rastrojo de arroz en proporciones iguales (Jwanny *et al.*, 1995).

El germen de malta: en las malterías, la cebada remojada se pone a germinar; después de algunos días, la plumula es retirada porque no se usa en cervecería.

Desechos del lúpulo: tras haber sido usados para dar el sabor amargo a la cerveza, pueden ser aprovechados por el cultivador de hongos. Aun la planta completa de lúpulo puede ser utilizada a manera de rastrojo.

El procesado del aceite de oliva genera grandes cantidades de desechos de aceite y de sólidos (fragmentos de piel, pulpa y semillas) que pueden servir en el cultivo de *P. ostreatus* (Hennebert *et al.*, 1990). El raquis y el pericarpio del fruto de la palma produ-

cen abundantes desechos por la extracción de aceite en las áreas tropicales y subtropicales. La pulpa del fruto de la palma es sumergida durante 24 horas y ya sea pasteurizada a 70°C por 40 min o drenada directamente, puede ser utilizada. También puede ser suplementada con 10% de salvado de arroz o cascarilla de arroz; la adición de desechos de arroz incrementa el rendimiento de 5 al 10%. Los desechos del aceite de oliva fueron usados como nutrientes para cultivo sumergido de *Pleurotus* spp. y de *L. edodes* (Grapelli *et al.*, 1991).

El procesado de la caña de azúcar genera una gran cantidad de residuos. Se estima que 1,000 kg de caña de azúcar generan 94 kg de residuo en el campo más 82 kg de hojas y 231 Kg de bagazo. Las fibras remanentes después de la extracción del azúcar y otros desechos de este proceso generan más tipos de subproductos. Varias cepas de *Pleurotus* spp. pueden ser cultivadas sobre hojas de caña de azúcar (Mata y Gaitán-Hernández, 1995). *P. ostreatus* puede ser cultivado sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café y rastrojo de cebada (Martínez-Carrera *et al.*, 1990). *P. pulmonarius* ha sido cultivado sobre bagazo de caña de azúcar en el Congo (Baert, 1988). El bagazo de caña de azúcar tratado por fermentación sólida por *P. eryngii* mejora la digestibilidad del rastrojo y puede ser empleado para la alimentación animal (Zadrazil y Puniya, 1995).

Las ramas de Tabaco se usan para el cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Aslan Azizi *et al.*, 1990).

También los troncos y tocones de madera son interesantes para el cultivo de hongos que crecen sobre madera. Después de cortar los árboles, sus tocones pueden ser inoculados con saprófitos.

El rastrojo y las vainas de frijol. Las plantas cosechadas deben ser secadas por varias semanas al aire; todos los tipos de frijol pueden ser usados.

Una mezcla de tallos de yuca y flor de lucerna: en el Congo se usa una mezcla de este tipo para cultivar *Pleurotus* spp. (De La Bretesche, 1991); mientras que según Muller (1987), es posible cultivar *P. ostreatus* sobre *Cassia* como sustrato.

La planta de papiro crece como verdadera maleza en algunos suelos. Puede ser secada y molida. La cáscara de cacahuate, removida antes del prensado para la extracción de aceite, también resulta útil.

Es muy conocido que para la mayoría de *Pleurotus* spp. el rendimiento es mejorado cuando se usan aditivos que enriquecen el sustrato; por ejemplo:

- Los desechos de la semilla del algodón se usan para enriquecer los sustratos a base de rastrojo de arroz. Con ello se obtienen rendimientos más altos al cultivar las especies de *Pleurotus* (El-Kattan *et al.*, 1991).

- La plumas de pollo, la harina de plumas pueden ser utilizadas.
- El agua de remojo de maíz puede ser usada como un aditivo para *Pleurotus* spp.
- Los desechos de soya, después de extraer el aceite por presión, así como las semillas fracturadas son una fuente rica en proteínas. La harina de soya es usada como un aditivo eficiente para el cultivo de *P. ostreatus* (El-Kattan *et al.*, 1991).
- El salvado de trigo y otros tipos de salvado también suelen ser un buen suplemento.

CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *PLEUROTUS* SPP.

Para un eficiente cultivo de cepas de las especies del género *Pleurotus*, se consideran actividades previas de importancia básica: la selección de variedades adaptadas a diferentes substratos y condiciones de cultivo, la mejora genética y la preparación de la semilla.

La hibridación es el único medio controlable por medio del cual algunas características genéticas deseadas presentes en diferentes cepas pueden ser combinadas. Es el medio de obtener nuevas cepas y nuevas variedades con características mejoradas (rendimiento, calidad, sabor) y resulta conveniente para los materiales y climas en los que se piensa cultivar a bajo costo.

La creación varietal o mejora genética se hace por medio de cruzamientos que permiten obtener nuevos genotipos, entre los cuales será necesario escoger las nuevas variedades. Es la primera etapa de la fecundación, es decir, la fusión de dos individuos homocarióticos genéticamente compatibles (plasmogamia), la que se utiliza porque produce un micelio dicariótico capaz de diferenciarse y dar lugar a un basidiocarpo.

Para hibridar hongos comestibles cultivados se pueden usar varios métodos teóricos y prácticos. Para un eficiente programa de hibridación, se deben considerar muy cuidadosamente tres puntos: (i) la definición del objetivo, es decir, las características del hongo deseado; (ii) el uso de un método de cruzamiento adaptado al objetivo y a los hongos preexistentes para el programa de trabajo y (iii) un buen conocimiento del ciclo del vida del hongo usado y los puntos del ciclo de vida importantes para la diferenciación de los cuerpos fructíferos, los cuales son el producto comestible y comercial (Labarère, 1992, 1994).

El tipo de incompatibilidad sexual (*mating-type*) de *Pleurotus* spp.

Pleurotus spp. es un género heterotálico tetrapolar, es decir que la fecundación sólo puede tener lugar entre dos micelios homocarióticos de genotipos diferentes para dos genes: los genes de incompatibilidad sexual o de *tipo acoplamiento*. Los hongos heterotálicos se prestan bien a la mejora genética debido a que es fácil obtener micelios homocarióticos —por el sesgo o rodeo de las esporas— y, por lo tanto, es fácil dominar y controlar los cruzamientos que se deseen hacer con ellos.

En el caso de las especies de *Pleurotus*, la incompatibilidad sexual depende de dos genes o factores (*A* y *B*) poseedores cada uno de múltiples alelos. En el basidiocarpo, que es dicariótico, se forman esporas que poseen un sólo tipo de núcleo con un juego cromosómico (*n*). Al germinar, estas esporas dan lugar a un micelio primario u homocariótico, el cual puede ser propagado por multiplicación vegetativa. La fusión de dos micelios homocarióticos sexualmente compatibles; es decir, diferentes para los alelos de incompatibilidad, permite obtener un micelio dicariótico, que contendrá entonces dos tipos de núcleos haploides cada uno proveniente de uno de los dos parentales homocarióticos. Esta fusión corresponde a la primera etapa de la fecundación que es la plasmogamia.

La fecundación tiene lugar cuando los dos homocariontes confrontados poseen alelos diferentes para los dos genes de incompatibilidad sexual. El conocimiento del mating-type o genes de incompatibilidad es importante para los cruzamientos y para la diferenciación del cuerpo fructífero. Estos genes controlan la plasmogamia de las cepas híbridas y mantienen el estado dicariótico de los hongos.

La variabilidad de los genes de incompatibilidad sexual ha sido intensamente estudiada en los hongos, particularmente en los homobasidiomicetos, en donde el sistema de heterotalismo de alelos múltiples motiva a usar extra-cruzamientos en lugar de intra-cruzamientos. El multialelismo facilita el estudio del origen, la evolución y la estructura genética de los genes de incompatibilidad y puede ser una de las bases para identificar genéticamente diferentes asilamientos para mejoramiento genético o para separar micelios individuales dentro de una población natural (Noël *et al.*, 1991; Labarère *et al.*, 1991, Labarère, 1992).

Se han observado series extensivas de especificidad alélica natural para los factores *A* y *B* en muchas especies. Por ejemplo, en *P. ostreatus*, 17 alelos *A* y 20 alelos *B*, fueron identificados en 22 homocariones (Eugenio y Anderson, 1968). La observación de tal variabilidad dio lugar a muchas preguntas sobre el origen de los alelos de incompatibilidad, las cuales fueron después parcialmente explicadas por la estructura genética de los diferentes loci.

La estructura genética de los loci de incompatibilidad ha sido extensivamente estudiada para el basidiomiceto tetrapolar *Schizophyllum commune* (Raper, 1966). Papazian en 1951, reportó por primera vez la separación por recombinación de dos genes cercanamente ligados, designados α y β , para el factor *A*. Esto fue confirmado más tarde para los factores *A* y *B* (Raper *et al.*, 1958; Raper *et al.*, 1960). La misma estructura genética fue demostrada para el factor *B* de *P. ostreatus* (Eugenio y Anderson, 1968). Actualmente, se asume como válido el modelo estructural de dos genes para todos los hongos tetrapolares, y es usado para explicar el alto grado de variabilidad alélica que afecta a los factores *A* y *B*.

El micelio dicariótico constituye la semilla de los productores de hongos. Es más vigoroso que el micelio homocariótico y también puede ser objeto de una multiplicación

vegetativa que aprovechan los productores de semilla para multiplicar las variedades. Cuando este micelio se pone en condiciones favorables para la fructificación (substrato, temperatura, luminosidad, CO₂, humedad) puede dar lugar a un basidiocarpo, que es la estructura diferenciada que se comercializa. En este basidiocarpo, tiene lugar la segunda parte de la fecundación (cariogamia), precisamente en los basidios, y da lugar a un núcleo diploide (2n) que tras la meiosis genera los núcleos haploides (n) que van a constituir las esporas.

Colección de cepas

La primera etapa de todo programa de mejora genética consiste en realizar una vasta colección de individuos que van a constituir el banco de cepas. Esta colección puede comprender variedades mejoradas preexistentes. El porcentaje de una u otra categoría depende del estado general de las variedades industriales para la especie considerada.

En un primer momento, se determinan con mucho cuidado las características de cada variedad del banco de cepas. Se trata ante todo de características fenotípicas como: el aspecto, el color, las cualidades gustativas, el modo de crecimiento de los basidiocarpos, la adaptación a tal o cual tipo de substrato o condiciones de cultivo, el rendimiento, la precocidad, la aptitud a la cosecha mecánica, la tasa de desecho posterior a la cosecha, la resistencia a los parásitos. Dicha lista está lejos de ser limitada.

Paralelamente a la determinación de las características fenotípicas, se pueden desarrollar métodos complementarios que aporten referencias muy delicadas y que pueden hacer ganar un tiempo considerable. Se trata del cálculo de las distancias genéticas (o más exactamente fenéticas) entre las variedades colectadas. La distancia fenética se calcula a partir de marcadores moleculares bien ligados a la expresión del genoma (isoenzimas), o bien, más directamente a la estructura del genoma (por ejemplo los marcadores RFLP). Estos marcadores permiten también determinar fielmente el grado de diversidad de los genomas en el banco de cepas.

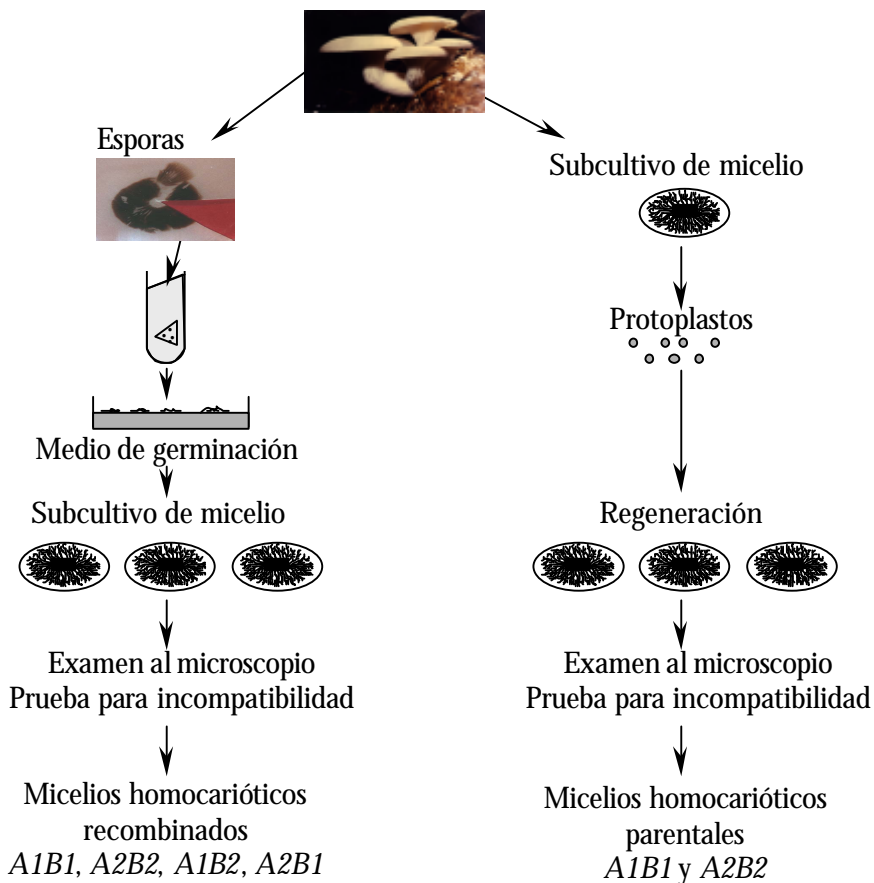
La determinación de las características fenotípicas y fenéticas es una etapa importante en todo programa de mejoramiento. Otra etapa igualmente indispensable es la que consiste en determinar los fines del programa de mejora y definir las características de las nuevas variedades que se quieren obtener. ¿Se quiere mejorar el rendimiento, la temperatura de crecimiento, el color, la adaptación a un substrato particular? Resulta especialmente importante definir bien estos criterios. Esto se hace a menudo en unión con los cultivadores, siendo más raro que intervengan los consumidores.

La definición de los fines por conseguir, junto con las características fenotípicas y fenéticas, permite establecer las planificaciones de los cruzamientos y los ensayos posteriores. Esto es necesario para limitar su número, ya que son muy costosos en tiempo y en mano de obra.

Obtención de homocariotes

Para realizar los cruzamientos es necesario obtener micelios homocarióticos a partir de variedades utilizadas como progenitores. Hay dos métodos viables que son utilizados: uno consiste en sembrar las esporas y hacerlas germinar, y el otro consiste en dedicariotizar las cepas, por fabricación de protoplastos o a partir de micelio molido (figura 1).

Figura 1. Método de obtención de micelios homocarióticos.



A partir de esporas

La obtención de esporas comienza con la fructificación de las cepas del banco de cepas. Cuando los basidiocarpos están maduros son escogidos y colocados encima de un papel filtro estéril durante 24 horas, bajo una campana de vidrio, con el fin de evitar la dispersión de las esporas y las contaminaciones. Las esporas se desprenden, caen y se depositan sobre el papel estéril, el cual puede ser conservado en refrigeración a 4°C en el caso de la mayoría de los hongos cultivados comestibles.

Para sembrar las esporas se muestrea un fragmento del papel filtro y se pone en un tubo de ensayo con una solución fisiológica que contiene un antibiótico. La agitación desengancha las esporas del papel y se obtiene una suspensión. De esta suspensión se toman partes alícuotas, que se colocan sobre un medio que contiene una alta concentración de agar, con el fin de permitir la manipulación de las esporas.

A continuación, las esporas son entresacadas de este medio una a una, bajo la lupa binocular, con la ayuda de una aguja de vidrio cuya extremidad está redondeada, y depositadas en el medio de germinación. Después de una incubación a temperatura adecuada, las esporas dan lugar a micelios homocarióticos, que son puestos como colección en tubos de ensayos. Estos micelios serán utilizados después para realizar los cruzamientos.

En ciertos casos, particularmente cuando el porcentaje de germinación es débil, las esporas pueden ser sembradas por dilución. Es decir, las suspensiones de esporas son extendidas directamente sobre el medio de germinación e incubadas. Los micelios son entonces muestreados desde el comienzo de la germinación y examinados. Es preciso comprobar cuidadosamente que el micelio retenido se obtuvo por la germinación de una sola espora, ya que frecuentemente se da la circunstancia de que las esporas se depositan por grupos y los micelios derivados de estos montones son heterocarióticos.

A partir de protoplastos

Las esporas surgen de la meiosis: la mezcla genética y las recombinaciones de los cromosomas parentales. La probabilidad de reencontrar los genotipos parentales en una espora es muy escasa por no decir nula. La descendencia, que constituyen las esporas, corresponderá por lo tanto al genotipo global parental pero con nuevas combinaciones genéticas.

Cuando se obtienen homocariotes por fabricación de protoplastos, la situación es diferente: en este caso los dos genotipos parentales son separados, sin que haya recombinación. Así, se obtienen directamente los genotipos de cada homocarión de la cepa dicariótica. En algunos casos concretos (cepas particularmente de gran calidad) esto puede constituir una ventaja, pero en muchos otros, la ausencia de mezclas y recombinaciones constituye un importante inconveniente.

La fabricación de protoplastos se hace incubando el micelio en una solución a base de enzimas capaces de degradar la pared del hongo. Cinco gramos de micelio (peso húmedo) son molidos por 30 segundos en un molino Polytron (eje tipo 10 TS). El producto se incuba enseguida en 50 ml de medio PDBM (caldo de papa dextrosa, Difco, Detroit, Michigan) se suplementa con manitol 160 g/l y con 10 g/l de Novozyme 234. La incubación se realiza durante 2 h a 32°C, bajo agitación lenta (75 rpm).

Los protoplastos son colectados enseguida por filtración a través de un nylon de malla de 60mm (Spectrum Inc., Los Angeles, Cal.). Los protoplastos del filtrado son lavados

dos veces en 10 ml de medio PDBM, después recuperados por centrifugación (700 rpm, 5 min) y puestos en suspensión en 500 ml de medio PDBM. Para regenerar, los protoplastos son esparcidos sobre medio PDBM con 15 g/l de agar noble, después incubados a 25°C durante 15 días. La tasa de regeneración obtenida es generalmente superior al 12.5 % (Ming *et al.*, 1992).

Debido a las perforaciones realizadas por el ataque enzimático, escapan porciones de protoplasma rodeadas de membrana plásmica, que encierran de nuevo en su interior uno o varios núcleos. Es necesario comprobar que el micelio regenerado es un micelio homocariótico, porque los protoplastos pueden contener dos núcleos complementarios.

A partir de micelio molido

También se pueden obtener homocariones a partir de la molienda del micelio. En este caso, el micelio es cultivado en medio líquido o en caja de Petri, colectado por filtración o con una escalpela, enseguida es molido en una solución isotónica (Leal-Lara, 1980). Para la regeneración se usa un medio particular que contiene moléculas que limitan la regeneración de colonias miceliales. La regeneración de colonias se hace sobre un medio que contiene sorbosa (20 g/l) o triton X100 (1ml/l).

En el caso de la sorbosa, el efecto antiinvasor es obtenido si no existe ninguna otra fuente de carbono (Awuah y Lorbeer, 1986). El medio usado en este caso se compone de sorbosa 20g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g/l, KH_2PO_4 0,46g/l, K_2HPO_4 0,5g/l, extracto de levadura 2g/l, Bactopeptona 2g/l, solidificado con agar noble 15 g/l, después esterilizado por autoclave durante 15 min a 120°C. Este medio corresponde al medio CYM (Raper y Hoffman, 1974), en el que la glucosa es remplazada por 20g/l de sorbosa. El tritón X100 es agregado al medio de cultivo antes de esterilización a una concentración de 1ml/l.

Una vez constituida la colección de homocariontes, es preciso determinar sus genotipos para la incompatibilidad sexual. Esto se lleva a cabo confrontando los micelios con patrones homocarióticos de genotipos conocidos —si es que se poseen—, o bien, confrontando los homocariontes entre ellos para repartirlos en grupos compatibles cuando no se poseen patrones.

Las distancias genéticas

Antes de realizar los cruzamientos puede ser útil calcular las distancias genéticas (o las distancias fenéticas) entre las diferentes cepas de la colección utilizada. Ellas permiten agrupar las cepas en categoría y disminuir considerablemente el número de cruzamientos, y por lo tanto el número de ensayos, que son particularmente costosos en tiempo y en trabajo en todo programa de mejoramiento genético.

Las distancias genéticas se pueden calcular con isoenzimas (Iraçabal y Labarère, 1993), con fragmentos de restricción (Iraçabal *et al.*, 1995) o con cualquier otro tipo de marcadores por análisis de los ADN nuclear y mitocondrial.

Las isoenzimas son polipéptidos que presentan la misma actividad enzimática, pero tienen diferente peso molecular y diferente punto isoeléctrico. Pueden ser fácilmente separadas por electroforesis y reveladas por medio de coloraciones específicas.

El estudio sistemático de las isoenzimas de especies de los géneros *Agaricus* y *Pleurotus* determinó cuáles eran las que presentaban mayor variabilidad y eran más fáciles de revelar en las pruebas de rutina. Se hizo seguimiento de seis actividades enzimáticas, tres oxidoreductasas (peroxidasas, toluidinofenol oxidasa y dopa-fenoloxidasas) dos hidrolasas (butirato esterasas y acetato esterasas) y una alcohol-dehidrogenasa (Iraçabal y Labarère, 1993).

Estas isoenzimas dan numerosos marcadores fenéticos que permiten realizar cartas de identidad específicas de cada variedad y determinar cuál es la distancia genética entre las variedades. También permiten caracterizar sin ambigüedad las diferentes variedades industriales, lo cual abre posibilidades de protección industrial.

Las isoenzimas dependen de la expresión del genoma, por lo que su estudio exige condiciones de cultivo extremadamente rigurosas para obtener resultados reproducibles. También se utiliza otra vía, que consiste en estudiar directamente la estructura del genoma sin depender de las condiciones de cultivo: se trata del análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP). El principio del análisis consiste en extraer el ADN de una variedad, fragmentarlo gracias a las enzimas de restricción (que actúan como cortadores reproducibles), separar estos fragmentos por electroforesis y finalmente revelar ciertos fragmentos por hibridación con una sonda radioactiva.

En este proceso es importante disponer de una buena sonda, que haga aparecer un polimorfismo con una intensidad radioactiva suficiente para que no haya ambigüedades de interpretación. Una sonda que da muy buenos resultados está constituida por una parte de la unidad del ADN ribosómico de *Pleurotus* spp. El análisis RFLP se lleva a cabo por la digestión, la electroforesis y las hibridaciones "southern" sobre muestras de ADN total provenientes de cada aislado por evaluar. El peso molecular del fragmento de restricción detectado es evaluado por interpolación gráfica usando una curva de regresión, establecida con el logaritmo de la migración contra el logaritmo del peso molecular de ADN digerido con *Hind* III (Iraçabal *et al.*, 1995).

Los estudios comparativos de las relaciones fenéticas entre cepas de *P. cornucopiae* establecidas por datos de RFLP fueron similares a la relación establecida con datos de isoenzimas, pero se demostró que el análisis por isoenzimas podía sobreestimar algunas diferencias genómicas débiles y conducir a distancias fenéticas más grandes que el análisis por RFLP. El uso de sondas de rADN o sondas al azar para RFLP por lo tanto, constituye un método confiable para caracterizar cepas y establecer relaciones fenéticas entre cepas.

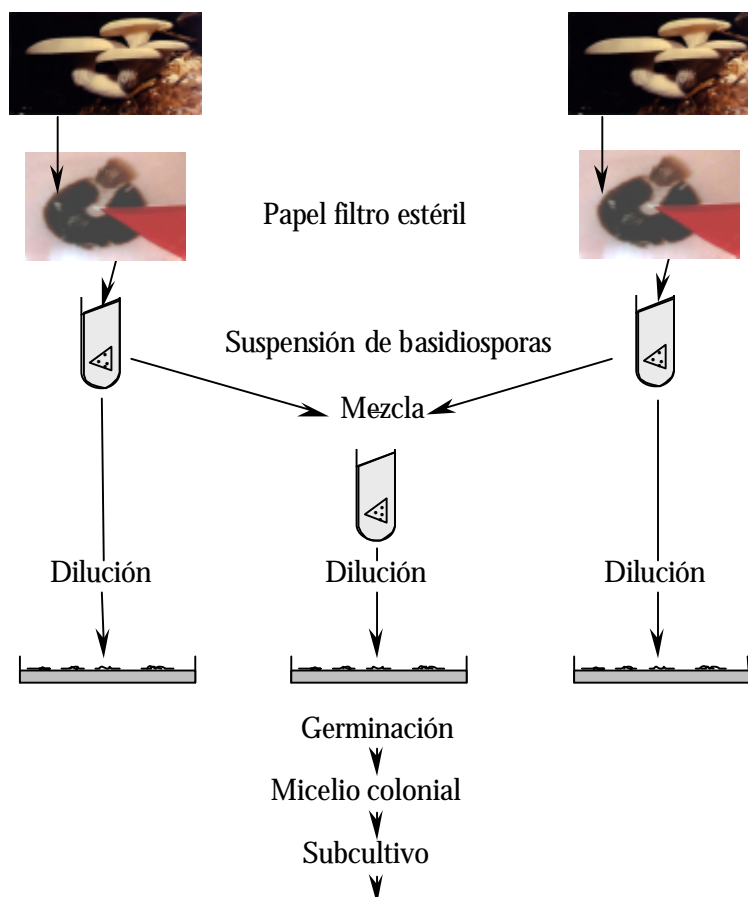
Para transformar los perfiles de RFLP o isoenzimáticos en análisis numérico, los fenotipos moleculares de cada aislado de *Pleurotus* spp. son codificados con ayuda de un sistema binario, en el cual la presencia ("1") y la ausencia ("0") del fragmento hibridado, en una posición particular en el autoradiograma, se anota para cada cepa. Todas las bandas son consideradas como fragmentos simples a menos que su grosor relativo sugiriera de otra manera. Las variaciones en la intensidad del teñido no son tomadas en cuenta para la construcción de la matriz. Las relaciones entre las cepas se calcula de acuerdo con los coeficientes de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973) y se definen como distancias fenéticas. La medida de la distancia entre aislamientos se basa en la proporción de desigualdades entre los fragmentos de ADN de acuerdo a: $F = 1 - [2 n_{xy} / (n_x + n_y)]$, donde n_{xy} es el número de fragmentos en común entre dos aislamientos y n_x , n_y son el número total de fragmentos desplegados por cada aislamiento (Nei y Li, 1979). Entonces, el valor medio se calcula para todas las endonucleasas probadas y se establece una matriz de distancias. Se debe notar que la presencia de inserciones o deleciones que produzcan mutaciones pueden afectar desproporcionadamente el análisis.

Los dendrogramas se construyen con una matriz de distancias por dos métodos para construir árboles filogenéticos. Uno es el UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic means clustering), el cual forma grupos por apareamientos sucesivos de fenotipos de pesos moleculares similares de acuerdo con la magnitud de sus distancias observadas (Sneath y Sokal, 1973). El paquete de software usado podría ser el programa NT-SYS (Sistema Taxonómico Numérico por Programas de Estadística Multivariada) sobre una computadora Nixdorf-Siemens/Modelo PCD-4H (Rohlf *et al.*, 1982). El otro puede ser el método de "juntar vecinos", el cual encuentra pares de fenotipos moleculares que minimizan el largo total de las ramas a cada etapa del agrupamiento de los fenotipos, empezando con un árbol en forma de estrella (Saitou y Nei, 1987). Los cálculos se pueden ejecutar con un programa de cómputo desarrollado por el Prof. J. Sourdis (Departamento de Genética de la Universidad Agrícola de Atenas, Iera Odos 75, 11855 Atenas, Grecia) con el mismo hardware. En razón del pequeño número de muestras, los valores de distancia deben ser considerados como estimaciones burdas, sin embargo, como el tamaño de las muestras es similar para todas las especies, el mismo grado de error debe aplicarse.

Los cruzamientos

Los cruzamientos, o para ser más exactos, las plasmogamias que conducen a la obtención de nuevos individuos dicarióticos, se hacen de dos maneras, dependiendo esencialmente de los objetivos que se desean alcanzar y también de los métodos de criba o tamizado que se posean para seleccionar las nuevas variedades. Estos cruzamientos se pueden hacer por el método denominado de los cruzamientos controlados, o bien por el de hibridaciones al azar (figura 2).

Figura 2. Diagrama del procedimiento para la hibridación al azar.



Cuando una variedad se obtiene por cruzamiento, suelen presentarse dos tipos de cruzamiento alternativos, según las características fenotípicas de la cepas de la colección: los cruzamientos pueden estar hechos entre dos micelios derivados de una misma cepa (cruzamientos intracepa) o entre micelios derivados de cepas diferentes (cruzamientos inter-cepas).

Los cruzamientos controlados consisten en fusionar homocariontes dos a dos en una caja de Petri. Después de la incubación se forma un micelio dicariótico sobre la línea de contacto, se examina al microscopio para ver la presencia de fibulas (signo de la dicarionización en el caso de la mayoría de los basidiomicetos, si bien no para los Agaricales), y se pasa a la colección. A partir de estos dicariontes se preparará la semilla que será utilizada para hacer los ensayos de fructificación.

Los cruzamientos por hibridaciones al azar consisten en mezclar suspensiones de esporas bastante concentradas y repartirlas directamente sobre un medio nutritivo (Valjalo y Labarère, 1989). Luego se muestrean los micelios provenientes de esta germinación. La mayoría son dicarióticos.

Los resultados de estos cruzamientos constituyen lo que se llama la generación F1. Los individuos F1 son comprobados y evaluados por sus cualidades culturales y agronómicas, y a continuación se seleccionan esporas a partir de estos individuos F1. Estas esporas se cruzan entre ellas y dan lugar a la generación F2, que será examinada según los mismos principios.

La mayoría de las variedades son procedentes de cruzamientos controlados o de hibridaciones al azar. Algunas otras provienen de mutagénesis seguidas de cruzamientos; sin embargo, algunas variedades pueden obtenerse directamente a partir de trasplantes de especímenes recogidos en la naturaleza; se trata, no obstante, de excepciones. En algunos otros casos provienen de trasplantes de basidiocarpos particulares que aparecen en algunos cultivos industriales cuando presentan características interesantes (color, tamaño, etcétera).

Una nueva vía en el conocimiento de los hongos comestibles cultivados concierne al estudio del ADN mitocondrial y su herencia. La composición mitocondrial de un hongo parece ser que tiene influencia sobre su fenotipo y quizás sobre su estabilidad.

Entre los organismos superiores, las mitocondrias son transmitidas en el curso de la primera etapa de la fecundación que es la plasmogamia. La clonación de los genomas mitocondriales y el desarrollo de sondas han permitido conocer la evidencia de tipos mitocondriales diferentes en el interior de una misma especie y estudiar, de este modo, la transmisión de las mitocondrias.

Investigaciones recientes han mostrado que entre los basidiomicetos cultivados, el dicarionte conserva el genotipo mitocondrial del homocarionte del cual se ha formado. Esto es cierto tanto en *P. ostreatus* (Matsumoto y Fukumasa-Nakai, 1996) como en otros hongos como *Agrocybe aegerita* (Barroso y Labarère, 1997). En las dos especies se encuentran mezclas de mitocondrias únicamente en la zona de contacto de los dos micelios. Este elemento es importante porque parece ser que la expresión de ciertos genes nucleicos depende del tipo mitocondrial que se desea tener en la variedad industrial.

La mutagénesis

En algunos casos particulares es necesario hacer mutagénesis. Estos son los casos donde el carácter que se investiga no existe en la especie que se quiere mejorar. Es preciso ser consciente de que una mutagénesis modifica siempre un gran número de genes, y que después hay por delante un trabajo muy largo de cruzamientos para eliminar las mutaciones indeseables.

Un ejemplo de variedades obtenidas por mutagénesis es el de las variedades de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* sin esporas. Entre estas especies no se encuentran en la naturaleza formas que no produzcan esporas, y ya se sabe que las esporas de *Pleurotus* spp., que se propagan abundantemente por las salas de cultivo, provocan alergias graves entre los cultivadores.

Para obtener variedades sin esporas era preciso, pues, realizar mutagénesis. Para ello, al micelio dicariótico (con el fin de seleccionar mutaciones dominantes) se le provocó una mutagénesis con rayos ultravioleta en ciertos casos, y con un agente mutágeno, la N-metil-N-Nitrosoguanidina, en otros. Después de la mutagénesis, los micelios se pusieron en cultivo, en recipientes con unos 500 g de sustrato, y después de la fructificación, los basidiocarpos fueron muestreados y seleccionados, y se midió la producción de esporas. De este modo, sobre una cantidad de 1,200 micelios de *P. ostreatus* estudiados, cuatro mutantes fueron los que no fabricaron esporas y 13 tuvieron una esporulación reducida en un factor de variación de 100 a 1000. En el caso de *P. pulmonarius*, sobre una cantidad de 1500 micelios, 14 mutantes presentaron una esporulación reducida en las mismas proporciones que para *P. ostreatus* (Imbernon y Labarère, 1989).

Estos mutantes tuvieron una morfología muy anormal y un rendimiento muy débil. Fue preciso, pues, ejercer sobre estas variedades un trabajo encaminado a restablecer el rendimiento y obtener una morfología normal. Como los cruzamientos no eran posibles, a la vista de la ausencia de esporas, nosotros utilizamos otra capacidad del micelio del hongo, conocida bajo el nombre de fenómeno de Buller, que hace que sea posible transferir por anastomosis el núcleo de un dicarionte al micelio de un homocarionte compatible. De esta manera, los núcleos de los dicariontes que llevan la mutación sin esporas son transferidos a los homocariontes silvestres, todo esto a través de varias generaciones. Este procedimiento ha permitido restablecer una morfología y un rendimiento normales, conservándose el carácter sin esporas.

Los ensayos

Los micelios dicarióticos obtenidos al final de los cruzamientos son utilizados para sembrar en los sustratos deseados, los cuales son cultivados en las condiciones de selección y criba determinadas de antemano al comienzo del programa de mejora genética.

Los ensayos se realizan, en general, en recipientes con un contenido de sustrato entre 0.25 kg y 1 kg, o con cantidades entre 2 y 3 kg. Después de la fructificación, los basidiocarpos obtenidos son muestreados y estudiados por sus características fenotípicas. Los micelios que proporcionan variedades que más se aproximan a los criterios que se consideran, son entonces conservados y eventualmente utilizados para un nuevo ciclo de cruzamientos. En general, las nuevas variedades son obtenidas después de uno o dos ciclos de cruzamientos.

RECURSOS GENÉTICOS DE *PLEUROTUS* SPP.

La colección y la caracterización de los recursos genéticos en las especies de *Pleurotus*, que se encuentran en la base de todo mejoramiento genético o de toda explotación industrial, comprenden cuatro tipos importantes: (i) la colecta de recursos genéticos, (ii) su caracterización morfológica, fisiológica y molecular, (iii) su almacenamiento con diferentes métodos de conservación y (iv) la realización de bancos de datos que puedan ser utilizados por la comunidad científica.

Métodos de colecta de germoplasma

Pleurotus spp., así como otros géneros de macromicetos, pueden ser aislados por medio de la colecta de sus estructuras reproductoras visibles, es decir, los cuerpos fructíferos. Estas estructuras son fuentes para el aislamiento de explantes de tejido o esporas sexuales. Muchos *Pleurotus* spp. fructifican esporádicamente, por esta razón el área que se va a inventariar debe ser muestreada en varias ocasiones durante el año de acuerdo con las condiciones estacionales. En este caso, el muestrear para obtener una máxima biodiversidad puede tomar varios años.

Los colectores deben ser entrenados para coleccionar cepas e impresión de esporas, tomar fotos, hacer notas sobre los especímenes frescos en el campo e identificar el hongo a nivel de género o especie. Los cuerpos fructíferos son necesarios para la identificación del hongo y su potencial aislamiento de basidiosporas o explantes de tejido.

Para obtener cultivos axénicos, varios tipos de medios pueden ser utilizados. Ellos contienen generalmente uno o varios antibióticos para eliminar las bacterias y un fungicida para impedir el crecimiento de otros hongos.

Un fragmento de basidiocarpo es depositado sobre medio nutritivo APD, suplementado después de esterilización por antibióticos (ampicilina 50 mg/l, estreptomcina 40 mg/l y cloramfenicol 20 mg/l) y por un fungicida como el carbendazime (1 mg/l), el benomyl (1mg/l) o el prochloraz (3,5 mg/l). Las soluciones madre, 1000 veces concentradas (ampicilina 50 mg/ml, estreptomcina 40 mg/ml, cloramfenicol 20 mg/ml, carbendazime 1mg/ml y de prochloraz 3,5 mg/ml) son preparadas en agua milliQ, esterilizadas por filtración 0,2 mM (Polylabo, Estrasburgo, Francia), después agregadas al medio APD (1ml/l), posteriormente esterilizada. La solución madre de benomyl (1mg/ml) se prepara en una solución de 50% de etanol 70° y 50% de acetona (v/v), después de esterilización se agrega al medio APD (1ml/l). El carbendazime y el benomyl son activos sobre los ascomicetos inhibiéndoles el conjunto de microtúbulos que forman la tubulina (Allen y Gottlieb, 1970), mientras que el prochloraz inhibe la biosíntesis de ergosterol (Trujillo *et al.*, 1987).

Una vez obtenidos los cultivos axénicos, muchos hongos pueden ser multiplicados, subcultivados y distribuidos, sirviendo como una fuente de germoplasma con poco gasto. Los aislamientos de *Pleurotus* spp. que son colectados en el campo deben ser cultiva-

dos en el laboratorio desde sus estructuras reproductivas sexuales y asexuales. Esto es necesario para caracterizarlos y probarlos para usos potenciales.

Caracterización del germoplasma

Mientras que una pequeña cantidad de especies de hongos comestibles provee de cepas industriales o semiindustriales susceptibles de ser cultivadas para propósitos alimenticios, un gran número de otras especies son utilizadas a nivel local ya sea por cultivo o colecta. Estas especies subcultivadas contribuyen más o menos a la alimentación familiar y a la seguridad alimentaria; el conocimiento referente a sus usos y manejo es frecuentemente localizado y especializado.

La biodiversidad es un recurso clave para el mejoramiento del cultivo de los hongos comestibles, por lo que para asegurar la biodiversidad de una especie y obtener información genética útil para futuros cruzamientos, es necesario usar marcadores neutros así como marcadores genéticos. Muchas especies de macromicetos tienen potencial para un uso más amplio y su promoción podría contribuir a la seguridad alimenticia y la diversificación agrícola. Las cepas de hongos deben ser caracterizadas con criterios morfológicos y fisiológicos como análisis de isoenzimas, RFLP o PCR. No se debe olvidar que, además del genoma nuclear, existe el genoma mitocondrial y que el análisis molecular puede involucrar estos dos tipos de genoma. Así, la heterogeneidad de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial ha sido usado en estudios taxonómicos y evolutivos de eucariotes. En los hongos, el análisis por RFLP del mtADN ha sido utilizado para estimar las relación entre cepas y especies (Gardes *et al.* 1991; Moulinier *et al.* 1992; para una revisión ver Barroso *et al.*, 1995).

Caracterización morfológica y fisiológica

La identificación de cepas y especies de hongos comestibles puede ser realizada por características morfológicas o microscópicas como el color, el tamaño y la forma del cuerpo fructífero, tamaño y forma de las esporas o características fisiológicas como la temperatura de fructificación o de crecimiento micelial. Pero la mayoría de los caracteres morfológicos dependen de las condiciones ambientales y es difícil identificar especies cercanas o especies aisladas de diferentes biotipos.

Una de las ventajas más grandes de la caracterización morfológica es su gran aplicabilidad a las colecciones extensivas conservadas en herbarios. Cuando las cepas son conservadas como micelio vivo, la caracterización morfológica de los hongos debe ser completada con técnicas moleculares adaptadas a taxonomía; particularmente los marcadores de ADN, los cuales tienen la ventaja de muestrear el genoma de manera selectiva o no selectiva y permitir la identificación sin tomar en cuenta la fisiología de los cultivos y la influencia del ambiente.

Una buena caracterización fisiológica del germoplasma colectado permite enseguida una mejor explotación de las cepas para el mejoramiento genético. Esta caracterización

fisiológica se realiza en función del futuro uso de los hongos. Por ejemplo: se evaluó el crecimiento micelial y la producción de basidiocarpos de cepas de *Pleurotus* spp. nativas de la región del Soconusco, en cultivo artificial sobre pulpa de café (Hernández-Ibarra *et al.*, 1995). Las características de estas cepas pueden servir de bases para programas de mejoramiento genético.

Caracterización isoenzimática

Estudios por medio de electroforesis enzimática han tratado de discernir entre las especies de *Pleurotus* (Magae *et al.* 1990; Iraçabal *et al.*, 1991; Zervakis y Labarère, 1992; Zervakis *et al.*, 1994). Además, los zymogramas, como patrones de RFLP, pueden considerarse como “tarjetas de identificación” utilizadas para el reconocimiento y protección industrial de cepas comerciales.

La variabilidad intraespecífica determinada por análisis de la actividad de varias isoenzimas fue realizada en *Agaricus bisporus* con el fin de obtener un panorama general de la factibilidad de usar marcadores de isoenzimas en estrategias de hibridación. La factibilidad de un marcador isoenzimático fue determinada por análisis del polimorfismo isoenzimático y por la variabilidad inter-cepas. Se demostró que la actividad de las enzimas que mostraban alta variabilidad inter-cepas podían ser retenidas para la estimación de relaciones fenéticas entre cepas para fines de establecer estrategias de hibridación (Labarère *et al.*, 1993).

Caracterización por RFLP

El análisis de los Fragmentos Largos de Restricción Polimórfica (RFLP) de ADN ribosómico nuclear provee información valiosa sobre la posición taxonómica de cepas colectadas y sus relaciones evolutivas, así como sobre su variabilidad fenética (Hillis y Dixon, 1991). Los RFLPs de rADN mitocondrial o nuclear han sido adoptados para el delineamiento de especies y el análisis filogenético entre géneros de hongos. Además, el uso de RFLPs en la sistemática de basidiomicetos ha demostrado la factibilidad de este enfoque para la elucidación de ambigüedades en los géneros *Agaricus* (Hintz *et al.* 1989), *Armillaria* (Anderson *et al.*, 1987), *Laccaria* (Gardes *et al.*, 1990) y *Pleurotus* (Vilgalys y Sun, 1994; Iraçabal *et al.*, 1995).

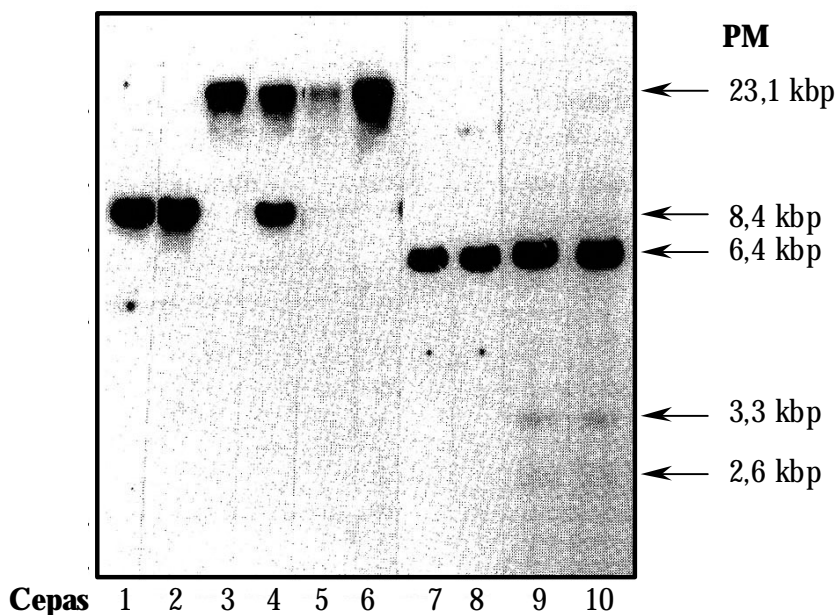
Para usar los RFLPs en sistemática, es necesario seleccionar sondas capaces de detectar variaciones fenéticas tanto en especies lejanas, como cercanas. En hongos, las unidades de rADN están repetidas, y por lo tanto son secuencias fácilmente detectables que muestran variabilidad a nivel de especie. (Walsh *et al.*, 1990; Kohn *et al.*, 1988) y al nivel de cepas (Specht *et al.*, 1984). Finalmente, las unidades de rADN parecen estar especialmente adecuadas como marcadores moleculares porque están compuestos de secuencias génicas conservadas y de secuencias variables intergénicas, las cuales evolucionan más rápidamente que muchas otras partes del genoma (Rogers *et al.*, 1989).

En el caso de las especies de *Pleurotus*, se puede mencionar que parte de la unidad de rADN nuclear de *P. cornucopiae*, incluyendo la mayor parte de secuencias intergénicas,

fue usado (figura 3) como sonda para hibridizar con ADN del taxa *Pleurotus*, digerido con endonucleasas de restricción (Iraçabal y Labarère, 1994). Esta sonda reveló un alto nivel de heterogeneidad del rADN entre y dentro de las especies. El análisis numérico de los resultados, realizado con el uso de dos diferentes métodos para construir árboles filogenéticos, distinguió claramente entre las especies definidas. Además, el análisis de rADN identificó fragmentos adecuados para identificación de especies y taxa relacionados.

Figura 3. Patrón RFLP típico producido por hibridación de ADN de *Pleurotus* spp. digerido por *Hind*III, con la sonda rDNA (según Iraçabal *et al.* 1995).

Cepas de *Pleurotus* utilizadas: 1: *P. cystidiosus* (Grecia, Salamina), 2: *P. cystidiosus* (EUA, Georgia), 3: *P. cornucopiae* (Alemania), 4: *P. cornucopiae* (Holanda), 5: *P. cornucopiae* (Francia), 6: *P. cornucopiae* (Francia, Dordogne), 7: *P. ostreatus* (España, Albadajito), 8: *P. ostreatus* (Francia, Gironde), 9: *P. ostreatus* (Grecia, Fthiotida), 10: *P. ostreatus* (Alemania). PM: Peso Molecular.



La sistemática basada en el análisis del polimorfismo del rADN concuerda con la sistemática basada en criterios morfológicos y fisiológicos, así como con métodos de incompatibilidad y bioquímicos. Da además, información adicional sobre la relación y posible origen de las especies individualmente. Además, la recuperación de fragmentos RFLP característicos de una especie o de especies relacionadas hace posible la distinción de taxa y de proveer marcadores moleculares eficientes para una identificación rápida de algunas especies dentro de un exámen de rutina (Iraçabal *et al.*, 1995).

Los RFLPs de ADN mitocondrial de 34 especies silvestres de *P. ostreatus* de Europa, Japón y Estados Unidos, mostraron considerable variación intra-específica, los cuales fueron asignados a 22 tipos diferentes. Las distancias genéticas y los dendrogramas mostraron que la variabilidad fenética inter-cepas estaba correlacionada con el origen geográfico de las cepas (Matsumoto y Fukumasa-Nakai, 1993).

Caracterización por RAPD

Los marcadores de Ampliación Polimórfica de ADN al Azar (RAPD) fueron usados para identificar cepas de *Lentinula edodes* (Sunagawa *et al.*, 1995). Se usaron primers sencillos de 10 bases para generar RAPD en *L. edodes*. La mayoría de los primers evidenciaron el polimorfismo en las 15 cepas estudiadas; los marcadores moleculares obtenidos por esta técnica pueden emplearse para estimar el polimorfismo intra-específico (Zang y Molina, 1995). La técnica RAPD fue usada para identificar cepas comerciales del hongo comestible *Agaricus bisporus* (Kush *et al.*, 1992).

Los Microsatélites Amplificados al Azar (RAMS) parecen ser altamente reproducibles y permiten la detección de polimorfismo inter e intra-específico en hongos (Hantula *et al.*, 1996).

Caracterización por PCR

Las investigaciones sobre PCR han estado principalmente enfocadas a la secuenciación nucleotídica de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) localizados entre el rADN nuclear 18S y el 28S, y han hecho posible determinar las relaciones filogenéticas entre especies de hongos del género *Ganoderma* (Molcalvo *et al.*, 1995). Más tarde, la región ITS1 fue utilizada para la taxonomía de varias especies de *Ganoderma* de Polonia (Sokol *et al.*, 1999). Las regiones ITS1 y ITS2 han sido usadas exitosamente para el análisis filogenético de las especies de los géneros *Tricholoma* y *Cortinarius* (Mankel *et al.*, 1999).

Se han usado primers que amplifican fragmentos específicos de genes de la subunidad grande del ARN ribosomal para caracterizar hongos secos obtenidos de herbarios (Bruns *et al.* 1990). Un fragmento de ADN de 370 bp de tamaño fue amplificado con buenos resultados usando PCR para identificar material viejo y seco de macromicetos (Wingfield y Wingfield, 1993).

En años recientes, las secuencias de genes mitocondriales se han empleado para fines taxonómicos y filogenéticos en varios organismos eucariotes. Finalmente, se han obtenido árboles consensados mediante el uso de la secuencia nucleotídica mitocondrial de las tres primeras subunidades de la citocroma C oxidasa (*Cox I a Cox III*) de varias especies de *Drosophila*, las cuales fueron similares a las establecidas con secuencias de los genes nucleares (Spicer, 1995).

En los hongos, un nuevo enfoque basado en amplificaciones por PCR y análisis de secuencia de los dominios variables de unidad pequeña del ADN del ribosoma mito-

condrial (SSU rDNA), fue desarrollado por González *et al.* (1997). El análisis de la secuencia de estos dominios en las especies de los géneros *Agrocybe* y *Pleurotus* parece conciliar resultados útiles en análisis taxonómicos y filogenéticos (González y Labarère, 1998, 2000) y para la identificación de micelio de hongos en ceparios y colecciones (figura 4 y 5).

Figura 4. A: Representación del gen de la subunidad pequeña del rARN mitocondrial de *Agrocybe aegerita* (según González *et al.*, 1998); B: Tamaño de las amplificaciones PCR y de los dominios variables V4, V6 y V9 en *Pleurotus ostreatus* (González y Labarère, 2000). Los dominios variables V4, V6 y V9 están representados en gris claro. Las posiciones de los oligonucleótidos que permiten amplificar los dominios variables en diferentes especies de basidiomicetos, se indican sobre la figura.

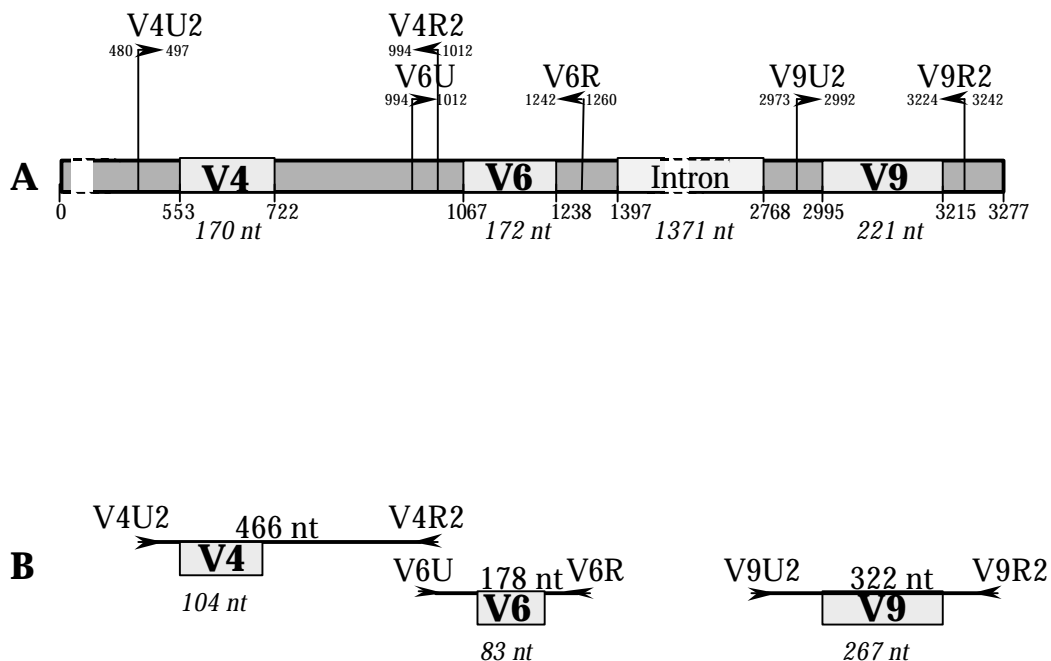
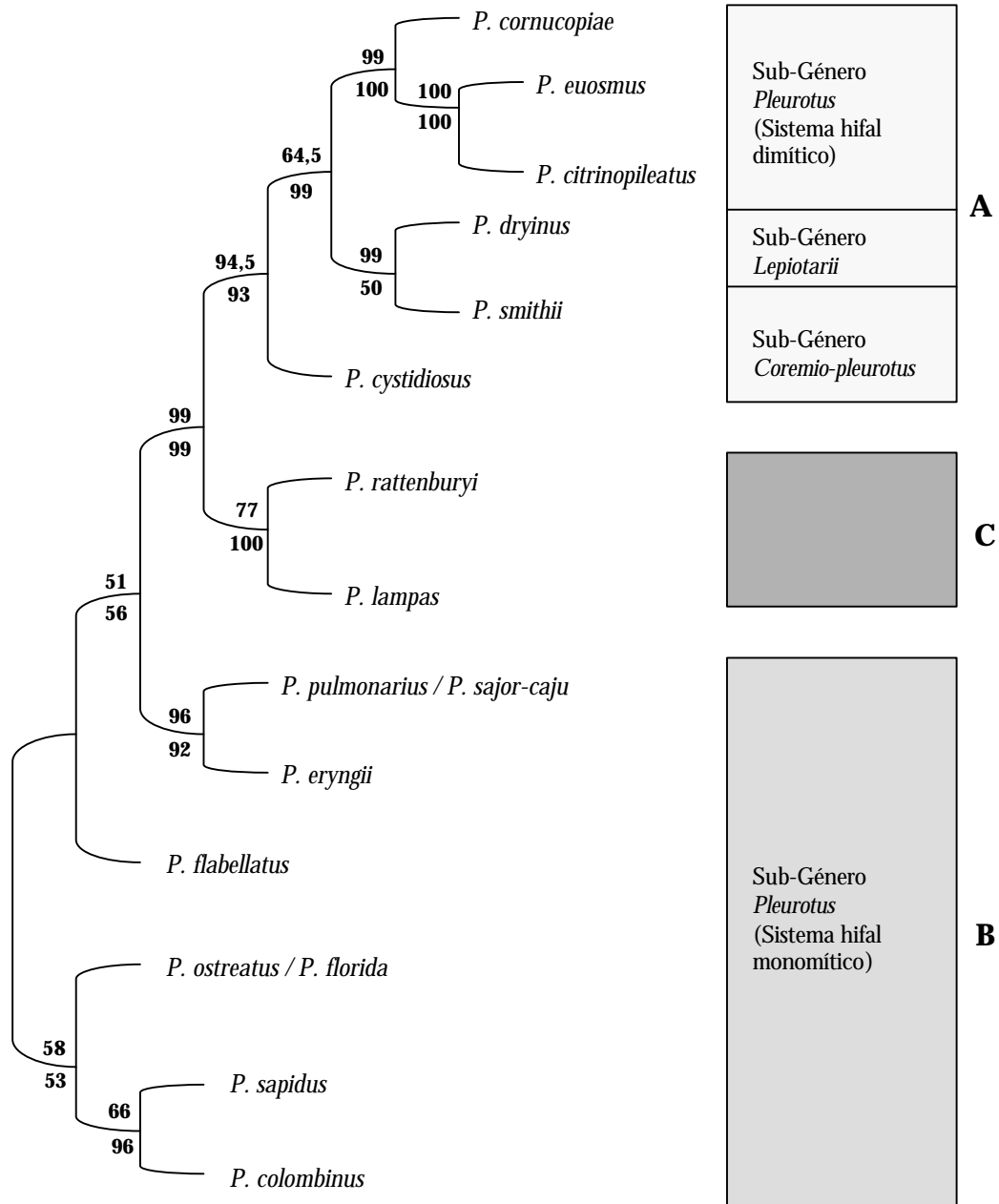


Figura 5. Relaciones entre 16 aislados de *Pleurotus* spp. basadas en las secuencias de los dominios variables mitocondriales V4, V6 y V9 (González y Labarère, 2000). Este árbol fue construido usando el método UPGMA. Los grupos y subgrupos fueron definidos según Singer (1986).



Para amplificar las regiones variables que contienen respectivamente los dominios variables V4, V6 y V9 de la SSU rADN mitocondrial, las reacciones de amplificación se llevan a cabo usando el par de primers siguiente:

V4U2: GTGCCAGAAGACTCGGTA y V4R2: TGCTCCGAGACCGACTAA
V6U: TTAGTCGGTCTCGGAGCA y V6R: TGACGACAGCCATGCAAC
V9U2: TGATGAACTAACCGTCTGT y V9R2: CAGTACAAGCTACCTTGC

Las reacciones de PCR contienen 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9], 0.1% Triton X-100, 0,2 mM de cada dNTPs, 2.5 mM MgCl₂ y 3-5 mL de ADN purificado en un volumen final de 25 ml. Después, se realizan 40 ciclos en un ciclador térmico PTC 100 (MJ Research) como sigue: El ADN es desnaturalizado por 30 s a 95°C, la hibridación de los primers se obtiene a temperatura correspondiente a T_m-2°C (por ejemplo, 54, 54 y 52°C para la amplificación de las regiones que cubren los dominios V4, V6 y V9, respectivamente) durante 30 s y un paso de alargamiento (elongación) es realizado por 30 s. Los productos de la PCR son entonces analizados en un gel de agarosa 1.5 % (p/v) o en un gel al 5% de poliácridamida para electroforesis teñidos con bromuro de etidio para poder ser observados.

La purificación de las amplificaciones de PCR se obtiene usando el kit de purificación Quiaquick PCR (QUIAGEN, USA). A un volumen de reacción de PCR, se agregan cinco volúmenes de amortiguador PB. La solución es aplicada a una columna Quiaquick y centrifugada (3,000×g, 1 min, 20°C). La columna es entonces lavada con 0.75 ml de amortiguador PE y centrifugada como se describió arriba, después secada con otro paso de centrifugación (10,000×g, 1 min, 20°C). Finalmente, el ADN es eluido con la adición de 40 ml de agua destilada estéril, incubada por 1 min a temperatura ambiente y recuperada por centrifugación (10,000×g, 1 min, 20°C). En estas condiciones, todo exceso de primer es eliminado y los productos de la amplificación PCR pueden ser usados en reacciones de secuenciación.

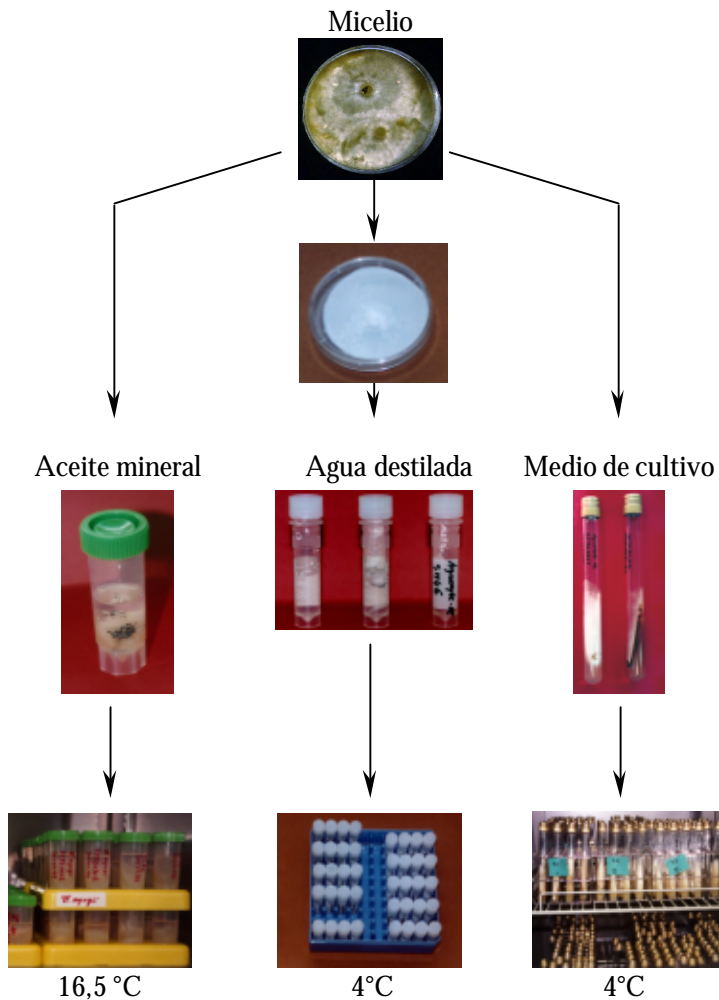
La secuenciación de productos de PCR se lleva a cabo usando el kit secuenciador ThermoSequenase (United States Biochemical, Cleveland, Ohio) según Sanger (1977) con [α -³³P] ddNTPs. Los primers V4U2, V6U y V9U2 fueron usados para secuenciar productos de PCR de los dominios variables V4, V6 y V9, respectivamente. Los productos de la secuenciación son analizados en un gel de 6% poliácridamida para electroforesis y revelados después de exposición a una película Kodak X-omat LS (Gonzalez y Labarère 1998).

Almacenamiento del germoplasma

En la literatura se han descrito varias técnicas para la conservación del germoplasma de hongos. Cuando se observa el equipo, la mano de obra y el mantenimiento, se concluye que las técnicas tienen un costo alto en la mayoría de los casos. Con el fin de establecer bancos de germoplasma en países en desarrollo, es necesario implementar el

uso de técnicas de bajo costo y evaluar su eficiencia en términos de la conservación del germoplasma (figura 6). Una descripción completa de los métodos para la conservación de germoplasma de hongos fue publicada por Smith y Onions (1994), por lo que nosotros sólo describiremos los métodos de bajo costo. El lector también puede referirse al capítulo VI de este manual, donde son tratados estos temas.

Figura 6. Tres formas de conservación de germoplasma de bajo costo.



De acuerdo con la especificidad del ciclo de vida de los hongos, de los cuales la mayor parte está constituida por estados dicarióticos cuyo genoma se conforma de dos tipos de núcleos haploides complementarios, la conservación de recursos genéticos necesita conservar la constitución genómica del estado dicariótico. Excepto la capa que porta las esporas (himenio), el basidiocarpo es dicariótico, mientras que la espora sexual es

producto de la meiosis, generalmente homocariótica y corresponde a genotipos recombinantes. La conservación del genotipo original necesita hacerse con micelio obtenido por subcultivo de la parte no fértil del basidiocarpo y no por germinación de esporas sexuales o vegetativas.

Agua destilada estéril

El método más simple es la conservación en agua destilada estéril. Las cepas se conservan en tubos pequeños de 2-10 ml con agua destilada estéril. Se depositan muestras dentro del agua, el tubo se cierra y se mantiene a 4°C o a temperatura ambiente si no se cuenta con un refrigerador. En este último caso, se recomienda especialmente depositar una gota de aceite mineral en la superficie del agua para evitar la evaporación.

Las muestras son pequeñas piezas de medio de cultivo invadidas por micelio o preferiblemente pequeñas piezas de papel filtro invadido por el micelio. Para preparar las muestras, las cepas se cultivan en papel filtro estéril o se depositan en una caja de Petri con un medio de cultivo o en agar agua según la cepa. Después del crecimiento del micelio, se corta el papel filtro en pequeños fragmentos (de 3×3 mm) y se depositan 3 - 5 fragmentos dentro del agua destilada. Este método es usado con éxito para conservar las especies de *Pleurotus* en el Laboratorio de Hongos Tropicales de ECOSUR (Dr. Sánchez Vázquez, México), especies de *Armillariella* en el INRA-Clermont Ferrand (Dr. J.-J. Guillaumin), especies de *Hebeloma* en la Universidad de Lyon (Prof. Debeau), o especies de *Agrocybe*, *Coprinus*, *Lentinula* y *Pleurotus* en el Laboratorio de Genética Molecular e Hibridación de Hongos Comestibles (Burdeos, Francia). En este laboratorio, las cepas se conservan en 1.8 ml en tubos de polipropileno de 48 mm de largo y 12 mm de diámetro. La eficiencia de esta técnica es verificada para las cepas de los géneros citados arriba por lo que necesita ser estudiada para las cepas de otros géneros y especies.

Subcultivo

El método más utilizado es la conservación en medio nutritivo en tubos de ensayo conservados a 4°C. La mayoría de las cepas de hongos pueden ser conservadas en medios simples como el agar de malta (AM) o el agar de papa y dextrosa (APD); algunas cepas necesitan ser conservadas en medios más complejos o medios naturales. La conservación se hace en tubos pyrex de 16×160 mm. Este método requiere de mucho trabajo para transferir regularmente las cepas. Las cepas del género *Pleurotus* spp. pueden ser mantenidas por años por este método, el periodo de conservación antes de una nueva transferencia es de 6 meses. La mayor desventaja debida a la frecuencia de las transferencias es el riesgo de contaminación y la selección de variaciones genéticas. Este método requiere equipo simple y es barato.

Almacenamiento en aceite mineral

Como en los métodos precedentes, el almacenamiento en aceite mineral no requiere equipo caro, además, en el caso particular de cepas de macromicetos parece ser ade-

cuado para largos períodos de tiempo (Kobayashi, 1984; Perrin, 1979). Las cepas se conservan en tubos de 30×90 mm. Son cultivadas sobre medio nutritivo sólido inclinado directamente en los tubos de almacenamiento. El micelio es incubado a 25°C, hasta que invade la superficie del medio. Enseguida se cubre con 15 ml de aceite mineral (esterilizado en autoclave). Los tapones, roscados, no deben estar totalmente cerrados para permitir la circulación de aire. Los tubos son conservados en un lugar climatizado a 16°C.

Bancos de datos

Una actividad importante, estrictamente relacionada con las colecciones de germoplasma de *Pleurotus* spp., es el desarrollo de bases de datos con el establecimiento de un acceso a internet para facilitar el intercambio de información.

Las bases de datos homogéneas pueden ser establecidas para tener un repertorio de cepas por nombres de especies o por alguna característica como el país de origen, el substrato original, el biotipo, la localidad, las aplicaciones, la producción de metabolitos o enzimas, las características genéticas y los caracteres moleculares. Las bases de datos también pueden contener las formulaciones de medios o substratos naturales para cultivar las cepas, la bibliografía sobre las cepas, las especies y el género, la localización de especies similares en otras colecciones de hongos en el mundo, etcétera (figura 7).

Las bases de datos de *Pleurotus* spp. no solamente listan las especies conservadas en la colección, sino que colectan, diseminan y facilitan el intercambio de información que las instituciones, investigadores y otras persona interesadas tienen sobre sus recursos genéticos, en particular en cuanto a la caracterización, el uso y las tecnologías relacionadas, además de que proveen una actualización sobre los datos estadísticos de colecciones y programas.





Se deben definir formatos comunes, de tal manera que todas las colecciones introduzcan los datos de sus hongos usando campos definidos. Los nombres de las especies deben ser revisados y homogeneizados por un comité científico.

Bancos de recursos genéticos

La conservación del germoplasma de *Pleurotus* spp. necesita el desarrollo de sistemas de conservación *ex situ* adaptados a las condiciones locales, y para mejorar la transferencia de tecnologías. Las colecciones de *Pleurotus* spp. requieren un planteamiento general de sus objetivos y del rango general de servicios que se proponen. Como todas las colecciones *ex situ*, los ceparios de hongos exigen trabajo intenso: acceso rutinario, conservación, mantenimiento, monitoreo de la viabilidad. La conservación y el manejo de una colección de hongos necesita conocimientos no solamente de los hongos mismos, sino también de su crecimiento, la caracterización, sus requerimientos para la conservación, las propiedades y las aplicaciones potenciales y la previsión de entrenamiento y servicio al cliente.

Figura 7. Ejemplo de ficha para describir cada cepa del Banco Mundial de Recursos genéticos de Hongos (Aquitaine, Francia).



Global Bank of Mushrooms Genetic Resources in Aquitaine (France)



 Búsqueda
  Ordenar
  Referencias
  Fotografías

Cepa Número ◆ ECS-0117
Localización ◆ ECOSUR GBMA Grecia Localización IV
Organismo ◆ *Pleurotus djamor*
 Basidiomicotina, homobasidiomicete, Agaricales, Tricholomataceae
Sinónimos ◆ *P. ostreatoroseus*
Nombre Común ◆ Hongo del laurel (Mexico)
Características ◆ Características

Medio de crecim. ◆ PDA, APDL
Temperatura Crec. ◆ 20-30°C
Cond. Fruct. ◆ 28 °C, 80 % h.r.

Historia ◆ Colector, descriptor, fechas de aislamiento y de transferencia a otras colecciones apellidos de las personas que han transferido
Conservación ◆ Agua estéril
Aislamiento ◆ Tejido
Substrato ◆ Substrato o huesped en que se aisló la cepa
Descripción ◆ Mating type, propiedades

Secuencias Nucleares  Secuencias Nucleares conocidas para la cepa y la especie
Secuencias Mt  Secuencia Mitocondriales conocidas para la cepa y la especie

Nivel de Bioseguridad  Enviado 

Las colecciones de *Pleurotus* spp. proveen una información básica sobre la diversidad, mediante la colección y cuidado del germoplasma y por las investigaciones sistemáticas de recursos genéticos silvestres. El material colectado de esta manera debiera ser depositado en instalaciones que tengan la capacidad de manejarlos en el país de origen. Cuando los grupos de investigación no tienen capacidad para mantener germoplasma de hongos, el germoplasma aislado debiera ser depositado en otro laboratorio que actúe como centro regional para proporcionar entrenamiento y recursos.

Con el fin de minimizar la posibilidad de pérdida de cepas, las colecciones deben buscar la manera de tener duplicados o al menos tener seguramente resguardadas las cepas más importantes en diferentes edificios o idealmente en sitios diferentes. En la medida de lo posible, cada cepa debe ser mantenida por al menos dos procedimientos.

El mantenimiento seguro de las colecciones supone la cooperación entre instituciones y el desarrollo de técnicas y métodos para la multiplicación del germoplasma existente, además del almacenamiento de duplicados de colecciones en otras partes. Con un sistema racional basado en la conservación adecuada, la caracterización y la cooperación, los costos podrían ser reducidos y el trabajo de conservación colocado a un nivel científico y financieramente sostenible en una fundación. Esto sería el trabajo de base para la utilización amplia de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp., para alimentación y la agricultura, en el contexto de una conservación efectiva. Para realizar tal sistema, las opciones de conservación deben estar disponibles, particularmente en los laboratorios que no tienen suficiente capacidad para asegurar la conservación cotidiana de recursos genéticos de hongos.

La mayoría de los micelios de los hongos declina su viabilidad en almacenamiento *ex situ*. Tanto los genes como los genotipos pueden perderse, aun bajo condiciones óptimas de almacenamiento, por lo que las muestras deben ser regeneradas constantemente. La buena planeación y la coordinación de la regeneración de las muestras minimizará la cantidad de material que se puede perder.

La caracterización y la evaluación del potencial del germoplasma de los hongos empezaría con la obtención de la información disponible y con un esfuerzo por juntar, pegar, computarizar y hacer disponible la información existente y contenida en notas y reportes. Al buscar esta base de datos, usualmente uno puede obtener una lista de los taxa de hongos que existen en un huésped en particular en un país. Los especialistas necesitarán el acceso a sistemas de computo para adicionar las identificaciones y localización de los especímenes y cultivos, así como tener acceso a fuentes de identificación.

Los genetistas y los cultivadores de hongos están interesados en tener un número manejable de genotipos que posean o tengan la posibilidad de aportar las características necesarias para sus programas de hibridación. La identificación de esas datos, mediante la caracterización y el establecimiento de colecciones principales, son medidas que motivan un uso más eficiente de las colecciones. Ampliar la base genética de los hongos puede contribuir a incrementar la estabilidad y el rendimiento.

Habría que desarrollar o establecer colecciones de hongos nacionales/regionales estructuradas en redes que incluyan a científicos de varias regiones. Asimismo, se deberían iniciar proyectos piloto, investigaciones y entrenamiento sobre colecta, técnicas de conservación, caracterización de cepas y especies de hongos comestibles y de otros relacionados. Esto aunado al establecimiento de base de datos de las cepas almacenadas. Por otra parte, los grupos de trabajo existentes tienen que promover la colaboración y la complementariedad entre genetistas, investigadores, cultivadores y bancos de genes. Es preciso que la conservación esté ligada al uso y la identificación para solventar las limitaciones actuales en el uso de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura.

Las redes deberían identificar oportunidades de mercado y desarrollar formas de apoyar la distribución de semilla a pequeña escala entre los productores, aprender de las experiencias de comunidades y empresas de producción de semilla a pequeña escala ya en desarrollo en algunos países. Esta cooperación desarrollaría métodos de procesamiento y de mercadotecnia, así como tecnologías de bajo costo para el almacenamiento de los hongos.

DISCUSIÓN

El cultivo de los hongos puede promover el uso más eficiente y el manejo de los recursos locales, su uso como fertilizantes orgánicos con o sin tratamiento del substrato degradado por los hongos. El cultivo de *Pleurotus* spp. tiene que ser adaptado a las condiciones locales y se deben desarrollar técnicas simples para cultivarlos a pequeña escala. El cultivo de hongos supone la existencia de programas de hibridación y de fabricación de semilla. Las estrategias para los cruzamientos deben desarrollar cepas específicas adaptadas a ambientes y substratos locales. Sería conveniente que las universidades locales aportaran apoyo logístico para realizar hibridaciones e impulsar el cultivo.

Para desarrollar y expandir la producción local viable de *Pleurotus* spp. es necesario hacer accesible el uso de nuevos hongos y variedades a los cultivadores. En tal situación, debe hacerse el estudio de las variaciones genéticas de aislamientos silvestres y el tamizado ("screening") de cepas que puedan ser usadas para programas de cruzamientos. Por el lado aplicado, las cepas de hongos han de ser seleccionadas por su potencial con base en criterios comerciales y por su habilidad para ayudar en la limpieza del ambiente. El uso de cepas silvestres tiene la gran ventaja de que son seleccionadas naturalmente y son altamente adaptadas a las condiciones ambientales locales.

La investigación en el desarrollo de métodos mejorados de conservación, en particular técnicas confiables de bajo costo adecuadas a las condiciones locales, es un punto importante. Las colectas sencillas en campo, de bajo costo, deberían ser promovidas por universidades y otras instituciones para fomentar la educación y el interés público.

La conservación del germoplasma de hongos debe ser promovido y fortalecido por cooperaciones intergubernamentales y regionales que tengan estructuras en el campo de los recursos genéticos, y fundando y financiando mecanismos para la implantación de bancos de genes regionales. De esta forma, será útil que los países designen puntos focales nacionales (Menini, 1998).

Las colecciones tiene que ser capaces de distribuir cepas listadas como disponibles. Los convenios para la distribución de cepas varían de acuerdo a las bases financieras y políticas de los propietarios legales de la colección. Las que tienen distribución restringida deben ser claramente especificadas.

Es preciso establecer relaciones sólidas entre científicos y usuarios de los recursos genéticos de los hongos (genetistas y cultivadores) para informar directamente y priorizar el proceso entero de conservación, incluyendo el inventario y la colecta. Además, se necesita desarrollar bases de datos.

La identificación correcta de las cepas confiere responsabilidad en las colecciones y demanda atención desde el primer momento. Cuando las cepas son recibidas ya con nombre, la persona que hace la identificación original debe ser anotada, y la colección debe confirmar la identificación. Uno de los mayores problemas de la ciencia de los germoplasma de hongos, el cual parece específico a los países con poca tradición micológica, es la caracterización apropiada y la posición taxonómica de cepas silvestres. Los especímenes difíciles o no descritos deben ser enviados a especialistas internacionales. La mayoría de las especies nativas de esos lugares han sido definidas por comparación y analogía de especies previamente descritas en países mejor estudiados, lo que conduce a diferentes ambigüedades. Es necesario desarrollar competencia tanto en taxonomía clásica, basada en descripciones morfológicas, como en técnicas de taxonomía molecular. La cooperación entre taxonomistas y biólogos moleculares es esencial para la identificación de los hongos. Una red organizada de especialistas de ambas ciencias podría convertirse en una fuerza eficiente para profundizar el conocimiento sistemático e impulsar la investigación y el entrenamiento de futuros especialistas.

Otro campo sobre la investigación en hongos se refiere a la identificación del valor potencial del germoplasma para uso directo por cultivadores en programas *in situ*, el incremento y el mejoramiento del uso de los recursos genéticos conservados para facilitar el progreso innovativo en cruzamientos mediante la identificación de cualidades útiles para introducirlas en programas de cruzamientos. Los usuarios deberían ser entrenados e involucrados en la colecta y la evaluación de germoplasma. Los programas de entrenamiento deben tomar en consideración la necesidad de personal entrenado para la ejecución de los procedimientos para la conservación de hongos y en los requerimientos específicos de las especies. El conocimiento local y la práctica jugarán un papel crucial en el manejo de recursos genéticos.

Se pueden establecer bases de datos homogéneas para mantener un repertorio de nombres de especies o de características como país de origen, substrato original o biotipo, la localización, las aplicaciones, los metabolitos o enzimas producidos, las características genéticas y moleculares. Las bases de datos también pueden contener la fórmula del medio o el substrato natural para cultivar las cepas, una bibliografía de las cepas, especies y géneros, así como la localización de las especies similares en las colecciones mundiales de hongos.

La producción exitosa de hongos requiere experiencia práctica y conocimiento científico. En este sentido, el establecimiento de centros de enseñanza sobre la ciencia y el cultivo de los hongos podría ser una manera de desarrollar programas amplios sobre

hongos en regiones relativamente grandes. Los cursos de capacitación tendrían que contener conceptos básicos sobre morfología de los hongos, preparación de sustratos, cosecha, plagas y enfermedades, etc.

La investigación en la ciencia de los hongos y el entrenamiento están fuertemente correlacionados. La investigación necesita realizarse para desarrollar conocimiento básico sobre *Pleurotus* spp., sobre los procedimientos para la conservación racional y la duplicación de especímenes, sobre las modalidades y las tecnologías para conservar genotipos, sobre la genética, los cruzamientos y el cultivo; así como sobre taxonomía clásica y la molecular. La investigación sobre las cepas del género *Pleurotus* spp. debe ser realizada en laboratorios especializados en el campo de la conservación y la caracterización de recursos genéticos y su uso en la alimentación y la agricultura.

Los grupos de trabajo deben promover la colaboración y la complementariedad entre genetistas, investigadores, cultivadores y bancos de genes. Resultaría útil que cada grupo incluyera tanto investigaciones básicas como aplicadas que se relacionen con actividades de entrenamiento. Debería tomarse en cuenta que en el ámbito regional, el usar tecnologías de bajo costo, adaptadas al clima, a los recursos agrícolas y a las condiciones económicas tienen que fortalecer el potencial de los hongos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado con recursos de la Comunidad Económica Europea (Fondos Europeos para el Desarrollo Regional), el Consejo Científico de la Universidad Victor Segalen Bordeaux 2, el Prefecto de la Región Aquitaine, el Prefecto de la Gironde (Fondos Nacionales de Arreglo y de Desarrollo del Territorio), el Consejo Regional de Aquitaine y el Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (INRA).

REFERENCIAS

- Allen, P.M. y D. Gottlieb. 1970. Mechanism of action of the fungicide Thiabendazole, 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole. *Appl. Microbiol.* 20: 919-926
- Anderson, J.B., D.M. Petsche y M.L. Smith. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 79: 69-76.
- Aslan-Azizi, K., T.R. Shamala y K.R. Streekantiah. 1990. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on certain agro-industrial wastes and utilization of the residues for cellulase and D-xylanase production. *Mush. J. Tropics* 10: 21-26.
- Auwah, R.T. y J.W. Lorbeer. 1986. A sorbose-based selective medium for enumerating propagules of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2 in organic soil. *Phytopathology* 76: 1202-1205
- Baert, W. 1988. Valorisation de la bagasse de canne à sucre par la production de *Pleurotus*. Mémoire de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (Belgium).
- Bakshi, M.P.S., V.K. Gupta y P.N. Langar. 1985. Acceptability and nutritive evaluation of *Pleurotus* harvested spent wheat straw in buffalos. *Agricultural Wastes* 13: 51-58.
- Barron, G.L. y R.G. Thorn. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can. J. Botany* 65: 774-778.
- Barroso, G. y J. Labarère. 1997. Genetic evidence of a non random sorting out of mitochondria in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 4686-4691.
- Barroso, G., S. Blésa y J. Labarère. 1995. Wide distribution of the mitochondrial genome rearrangements in wild strains of the cultivated basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 1187-1193.
- Bermudez, R.C., J.A. Traba, M.J. Verdecia y P.Gross. 1994. Produccion de *Pleurotus* sp. cfr. *florida* sobre residuales de la agroindustria cafetelera en Cuba. *Micol. Neotrop. Appl.* 7: 47-50.
- Bezalel, L., Y. Hadar y C.E. Cerniglia. 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 292-295.
- Bezalel, L., Y. Hadar, P.P. Fu, J.P. Freeman y C.E. Cerniglia. 1996b. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 2547-2553.
- Bobek, P., R. Ondreicka, J. Klvanova y L. Ozdin. 1994. Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) decrease serum and cholesterol and increases cholesterol 7 alpha-hydrolase fecal excretion of neutral sterols and bile hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research* 14: 1683-1688.
- Bruns, T.D., R. Fogel y J.W. Taylor. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium species. *Mycologia* 82: 175-184.
- Buchanan, P.K. (1993) Identification, names and nomenclature of common edible mushrooms. In: S.T. Chang, J.A. Buswell and S. Chiu (eds.) *Mushroom Biology and Mushroom Products* Chinese University Press, Hong Kong, pp. 21-32.
- Bumpus, J.A. y S.D. Aust. 1987. Biodegradation of DDT (1,1,1-Trichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl) Ethane) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 53: 2001-2008.
- De La Bretesche, C. 1991. Agricongo. A model for research and development. *The Courier* 125: 37-40.
- El-Kattan, M.H., S.A. Afify y Z.M.A. Aly. 1991. Evaluation of *Pleurotus sajor-caju* fungal pellets as food. *Mush. J. Tropics.* 11: 13-22.
- Eugenio, C.P. y N.A. Anderson. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634
- Gardes, M., A. Fortin, G.M. Mueller y B.R. Kropp. 1990. Restriction fragment length polymorphism in

- the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp: *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. *Phytopathology* 80: 1312-1317.
- Gardes, M., G.M. Mueller, A. Fortin y B.R. Kropp. 1991. Mitochondrial DNA polymorphism in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. *Mycol. Res.* 95: 206-216.
- Gonzalez, P., G. Barroso y J. Labarère. 1997. DNA sequence and secondary structure of the mitochondrial small subunit ribosomal coding region including a group IC-2 intron from the cultivated basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Gene* 184: 55-63.
- Gonzalez, P. y J. Labarère. 1998. Sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains highly species-specific variations within the genus *Agrocybe*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4149-4160.
- Gonzalez, P. y J. Labarère. 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology* 146: 209-221.
- Grapelli, A., W. Pietrosanti, L. Pasetti y A. Carilli. 1991. Metabolites production during the growth of *Lentinus* species on agricultural wastes. *Mush. Sc.* 13: 717-720.
- Gunde-Cimerman, N. y A. Cimerman. 1995. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase, Lovastatin. *Exp. Mycol.* 16:1-6.
- Hantula, J., M. Dusabenyagasani y R.C. Hamelin. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS), a novel method for characterizing genetic variations within fungi. *European Journal for Pathology* 26: 159-166.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. 1993. The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. In: S. Isaac, J.C. Frankland, R. Watling, and A.J.S. Whalley (eds.). *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 265-293.
- Hennebert, G.L., K. Tshinyangu, G. Van Nieuwenhuy Sen. y W. Baert. 1990. Potential for the cultivation of *Pleurotus* species in Central Africa: substrates, yield and nutritional quality. *Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve*.
- Hernandez-Ibarra, H., J.E. Sanchez-Vazquez y L. Calvo-Bado. 1995. Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp. De la región de Tapavhula, Chiapas, Mexico. *Rev. Mex. Mic.* 11: 29-38.
- Higson, F.K. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 122: 111-152.
- Hillis, D.M. y M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hintz, W.E., J.B. Anderson y P.A. Horgen. 1989. Relatedness of three species of *Agaricus* inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA. *Genome* 32: 173-178.
- Imbernon, M. y J. Labarère. 1989. Selection of sporeless or poorly-spored induced mutants from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*, and selective breeding. *Mush. Sc.* 12: 109-123.
- Iraçabal, B. y J. Labarère. 1993. Comparison of polymorphism and phenetic variability as determined by the study of hydrolases and oxidoreductases in two cultivated mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus cornucopiae*. *Exp. Mycol.* 17: 90-102.
- Iraçabal, B. y J. Labarère. 1994. Restriction site and length polymorphism of the rDNA unit in the

- cultivated basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 824-830.
- Iraçabal, B., P. Roux y J. Labarère. 1991. Study of enzyme polymorphism in *Agaricus* and *Pleurotus* species for characterization and genetic improvement. *Mush. Sc.* 13: 37-42.
- Iraçabal, B., G. Zervakis y J. Labarère. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus* : analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141: 1479-1490.
- Jwanny, E.W., M.M. Rashad y H.M. Abdu. 1995. Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50: 71-78.
- Kobayashi, T. 1984. Maintaining cultures of Basidiomycetes by mineral oil method. *Bulletin of the Forest and Forest Product Research Institute* 235: 141-147.
- Khush, R.S., E. Becker y M. Wash. 1992. DNA amplification polymorphism of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 2971-2977.
- Kohn, L.M., D.M. Petsche, S.R. Bailey, L.A. Novak y J.B. Anderson. 1988. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 78: 1047-1051.
- Labarère, J. 1992. Breeding of edible mushrooms. In: T. Quimio (ed.). *Development of Mushroom Cultivation Technology and its Utilisation*. Foreign Languages Publishing House, Pyongyang, Korea. pp. 92-104.
- Labarère, J. 1994. Metodos de la genetica aplicados a la obtencion y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. *Boletín de la Asociacion Española de Cultivadores de Champiñon* 22: 15-26 y 23: 8-16.
- Labarère, J. y G. Menini. 1998. Global policy profile related to the collection, characterization, conservation and utilization of mushroom genetic resources for food and agriculture. *Newsletter of the Global Network on Mushrooms* 2: 7-9.
- Labarère, J., T. Noel y T.D. Ho Huynh. 1991. Variability of the incompatibility alleles of the tetrapolar heterothallic basidiomycete *Agrocybe aegerita*: a survey of recent experiments. *Mush. Sc.* 13: 23-29.
- Labarère, J., T. Noel, B. Iraçabal. y H. Maleville. 1993. Breeding strategies and molecular biology in heterothallic basidiomycetes. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 31: 168-187.
- Lang, E., G. Eller y F. Zadrazil. 1997. Lignocellulose decomposition and production of lignolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microbial Ecology* 34: 1-10.
- Leal-Lara, H. 1980. Sporelessness in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dedicaryotisation method. Doctoral Dissertation, Phillipps Universitat, Marburg/Lahn, Germany.
- Lelley, J. 1987. Edible mushrooms as a weapon against starvation. *Mush. J. Tropics* 7: 135-140.
- Magae, Y., K. Haga, H. Taniguchi y T. Sasaki. 1990. Enzymes of strains of *Pleurotus* species (Basidiomycetes) compared by electrophoresis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 69-80.
- Mankel, A., G. Kost y E. Kothe. 1999. Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma*. *Microbiological Research* 153: 377-388.
- Martinez-Carrera, D., P. Morales y M. Sobal. 1990. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café y paja de cabada. *Micol. Neotrop. Apl.* 3: 49-52.
- Masaphy, S., D. Levanon, Y. Vaya y Y. Henis. 1993. Atrazine biodegradation by the fungus *Pleurotus pulmonarius*: N-dealkylation and propyl hydroxylation. *Appl. Env. Biotechnol.* 59: 4342-4346.
- Mata, G. y R. Gaitan-Hernandez. 1995. Cultivo de *Pleurotus* en hojas de caña de azucar. *Rev. Mex. Micol.* 11: 17-22.

- Matsumoto, T. y Y. Fukumasa-Nakai. 1993. Mitochondrial DNA polymorphism and inheritance in *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 31: 153-161.
- Matsumoto, T. y Y. Fukumasa-Nakai. 1996. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 30: 549-552.
- Menini, G. 1998. Issues for a global cooperative programme on identification, conservation, evaluation and utilization of mushroom genetic. *Newsletter of the Global Network on Mushrooms* 2: 4-6.
- Ming, P., K. Narendra y P. A. Lemke. 1992. Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. *Current Genetics* 25: 53-59.
- Molcalvo J. M., H. H. Wang y R. S. Hseu. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacer and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Moulinier, T., G. Barroso y J. Labarère. 1992. The mitochondrial genome of the basidiomycete *Agrocybe aegerita*: molecular cloning, physical mapping and genes location. *Current Genetics* 21: 499-505.
- Muller, J. 1987. Cultivation of the Oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* on Cassia substrate. *The Mushroom Journal* 176: 245-249.
- Nei, M. y M. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceed. Nat. Acad. Sc. USA* 76: 5269-5273.
- Noël, T., T.D. Ho Huynh y J. Labarère. 1991. Genetic variability of the wild incompatibility alleles of the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 745-751.
- Novotny, C., P. Erbanova, V. Sasek, A. Kubatova, T. Cajthmal, E. Lang, J. Krahl y F. Zadrzil. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10: 159-168.
- Papazian, H.P. 1951. The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 36: 441-459
- Perrin, P.W. 1979. Long term storage of cultures of wood inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia* 71: 867-869.
- Poppe, J.A. y M. Hofte. 1995. Twenty wastes for twenty cultivated mushrooms. *Mush. Sc.* 14 (1): 171-180.
- Raper, J.R. 1966. *Genetics of sexuality in higher fungi*. The Ronald Press Company, New York.
- Raper, J.R., M.G. Baxter y A.H. Ellingboe. 1960. The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: the A factor. *Proceed. Nat. Acad. Sc. USA* 46: 833-842
- Raper, J.R. y Hoffman. 1974. *Schizophyllum commune*. In: R.C. King (ed) *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, vol I: 597-626.
- Raper, J.R., G.S. Krongelb y M.G. Baxter. 1958. The number and distribution of incompatibility factors in *Schizophyllum*. *American Naturalist* 865: 221-232
- Rogers, S.O., S. Rehner, C. Bledsoe, G.J. Mueller y J.F. Ammirati. 1989. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations. *Can. J. Bot.* 67: 1235-1243.
- Rohlf, F. J., J. Kishpaugh y D. Kirk. 1982. *NT-SYS: Numerical taxonomy system using multivariate statistical programs*. *User Manual SUNNY at Stoney Brook*, New York.
- Rolz, C. 1984. Microbial biomass from renewables: a second review of alternatives. *Annual Reports Fermentation Processes* 7: 213-356.
- Rossmann, A.Y. 1994. A strategy for an all-taxa of fungal biodiversity. In: C.I. Peng and C.H. Chou (eds.), *Biodiversity and terrestrial ecosystems*. Institute of Botany, *Academy Sinica Monograph Series*, N° 14, pp. 169-194.

- Sagawa, I.M., M. Tanaka y Y. Nagata. 1992. Discrimination of mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 597-603.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sanchez-Vazquez, J.E., G. Huerta Palacios y L.A. Calvo Bado. 1995. Potential of *Auricularia* spp. in the recycling of agroindustrial waste products in the tropics. *Mush. Sc.* 14: 877-883.
- Sánchez-Vázquez, J.E., G. Huerta-Palacios y L.A. Calvo-Bado. 1997. The cultivation of edible fungi as a sustainable alternative in tropical regions. In: M. Palm and I. H. Chapela (eds). *Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Parkway Publishers Inc. Boone, North Carolina. 227-237.
- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceed. Nat. Acad. Sc. USA*, 74: 5463-5467.
- Singer, R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*, 4th edn. Koenigstein, Germany : Koeltz Scientific Books.
- Smith, D. y A.H.S. Onions. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. Second edition. IMI Technical Handbook. Wallingford, UK: CAB International.
- Sneath, P.H. y R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Sokol, S., M. Kaldorf y H. Bothe. 1999. Molecular characterization and taxonomic affinities of species of the white rot fungus *Ganoderma*. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 54: 314-318.
- Soto-Velazco, C. 1986. La producción de los hongos comestibles sobre la pulpa de café en la región de Xalapa-coatepec, Veracruz, durante 1985-1986. *Rev. Mex. Micol.* 2: 437-441.
- Specht, C.A., C.P. Novotny y R.C. Ullrich. 1984. Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune*. *Current Genetics* 8: 219-222.
- Spicer, G.S. 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J. Molec. Evol.* 41: 749-759
- Sunagawa, M., H. Neda y K. Miyazaki. 1995. Identification of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mush. Sc.* 14: 141-144.
- Thorn, R.G. y G.L. Barron. 1984. Carnivorous mushrooms. *Science* 224: 76-78.
- Trujillo, E.E., C.A. Cavin, M. Aragaki y M.A. Yoshimura. 1987. Ethanol potassium nitrate medium for enumerating *Rhizoctonia solani*-like fungi from soil. *Plant Disease* 71: 1098-1100
- Valjalo, J. y J. Labarère. 1989. Selection of new hybrids of *Agaricus edulis* (Syn. *A. bitorquis*) able to differentiate fruit bodies at 15°C. *Mush. Sc.* 12: 75-86.
- Vilgalys, R. y B.L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analyses of ribosomal DNA sequences. *Proceed. Nat. Acad. Sc. USA* 91: 4599-4603.
- Walsh, S.R.A., D. Tyrrell, R.A. Humber y J. Silver. 1990. DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms in the rDNA repeat unit of *Entomophaga*. *Exp. Mycol.* 14: 381-392.
- Wingfield, B.D. y M.J. Wingfield. 1993. The value of dried fungal cultures for taxonomic comparisons using PCR and RFLP analysis. *Mycotaxon* 46: 429-436.
- Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *P. florida*, *P. cornucopiae* and *P. enryngii*. *Mush. Sc.* 9: 653-667.
- Zadrazil, F. 1977. The conversion of straw into feed by basidiomycetes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 4: 273-281.

- Zadrazil, F. 1980. Conversion of different plant wastes into feed by basidiomycetes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9: 243-248.
- Zadrazil, F. 1984. Microbial conversion of lignocellulose into feeds. In: S. Sundtal and E. Owen (eds.). *Development in Animal and Veterinary Sciences*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Zadrazil, F. y A. K. Puniya. 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology* 54: 85-87.
- Zang, Y. y E.I. Molina. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiology Letters* 131: 17-20.
- Zervakis G. y J. Labarère. 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138: 635-645.
- Zervakis, G., J. Sourdis y C. Balis. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.

VI Una revisión de técnicas de mantenimiento de cepas, con énfasis en las que se adaptan a *Pleurotus* spp.

Vija Wilkinson y Daniel J. Royse

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	127
LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS	127
Cultivo del tejido	127
Cultivos multi y monospóricos	128
Descripción de la técnica para obtener cultivos de esporas	128
Fuentes de cultivos	129
Pruebas de validación de cultivos	129
TECNOLOGÍA DE MANTENIMIENTO	129
Transferencia de agar a agar	129
Tasa de crecimiento	132
Almacenamiento en papel filtro	134
Esporada	134
Agua destilada estéril	134
Almacenamiento con nitrógeno líquido	135
Sectorización y otras anormalidades	136
EL MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	136
Las precauciones	136
El personal	137
REFERENCIAS	139

INTRODUCCIÓN

La semilla de los hongos comestibles se prepara a partir de micelio propagado en granos de cereal esterilizado con vapor. Esta mezcla grano/micelio, también denominada inóculo, es utilizada para sembrar substratos para el cultivo de hongos. La totalidad de la semilla comercial se elabora con micelio proveniente de un cultivo almacenado, mas que de esporas, porque cada espora es capaz de producir una nueva cepa y sus características son impredecibles.

La conservación de las cepas que comercializa un laboratorio o utiliza una planta productora de *Pleurotus* spp. es una actividad cotidiana de suma importancia porque da el soporte elemental para producir una semilla de calidad de manera constante. Si la conservación falla, la calidad y la disponibilidad de las cepas se pone en entredicho. Esto puede dar lugar a gastos de recuperación innecesarios y elevados, o inclusive, puede conducir a la pérdida definitiva del organismo.

La conservación de cepas se refiere al mantenimiento en condiciones óptimas del material genético proveniente de clones silvestres, híbridos, cepas comerciales, o cualquier otro material valioso para la empresa. Requiere de una metodología confiable, sencilla y lo más barata posible que asegure, no solo la conservación de las características genéticas de las cepas, sino también su vitalidad.

Por esta situación, la técnica de conservación empleada debe estar establecida de manera perfectamente clara y definida para el laboratorio, para que no haya dudas ni errores, aún cuando el personal que se encargue de la conservación cambie.

LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS

Cultivo del tejido

El cultivo del tejido es una de las formas más simples de obtener un cultivo micelial. Un tejido cultivado es esencialmente un clon del hongo. Un *clon* se define como un duplicado idéntico de un organismo. Para obtener un clon, se procede de la siguiente manera:

Se escoge un cuerpo fructífero limpio, fresco, libre de contaminantes visibles y de la más alta calidad en cuanto a tamaño, color, forma o cualquier otra característica deseada. Se esteriliza la superficie del píleo o sombrero seleccionado con una solución al 10% de hipoclorito de sodio. Se rompe cuidadosamente el píleo para exponer el tejido interno, estéril del hongo (cuidando no tocarlo con las manos) (fig. 1). Después, con una ansa o pinza estéril y fría se toma una pequeña parte de tejido blanco, lo mas alejada posible de las láminas, y se coloca en un medio de cultivo en caja de petri. Esta operación se puede repetir varias veces para preparar varias placas en diferentes medios

a base de agar como APDL y APDL ácido. Después se incuban las placas por 1 o 2 semanas, durante las cuales se revisa frecuentemente el crecimiento para eliminar las placas que aparezcan contaminadas.

Si se usa un medio que contenga ácido se puede minimizar el riesgo de contaminación. Por ejemplo, el agar ácido de papa-dextrosa-levadura (APDL) contiene ácido láctico para bajar el pH e inhibir el crecimiento bacteriano. Si los cultivos en APDL están contaminados, los cultivos que crezcan en APDL ácido pueden servir como respaldo. Las placas deben ser revisadas diariamente para observar el crecimiento y la contaminación porque *Pleurotus* spp. crece rápido y, después de una semana el cultivo puede cubrir la placa. Una vez que los cultivos han crecido, se selecciona aquel que esté puro y tenga mejor apariencia. El cultivo seleccionado es transferido a un medio fresco para revisar el crecimiento micelial y confirmar que sea normal y puro.

Los cultivos deben ser entonces probados en una “siembra de validación”. Una siembra de validación involucra producir la semilla a partir del tejido y sembrarla en un sustrato para determinar la productividad y la calidad del hongo.

Cultivos multi y monospóricos

Los cultivos aislados de esporas difieren genéticamente del cultivo de tejidos. Los cultivos que se originan de esporas son desconfiables e impredecibles ya que las esporas cuando germinan resultan en muchas combinaciones genéticas diferentes. Estas combinaciones son deseables cuando se trata de desarrollar una nueva cepa, pero indeseables cuando se trata de mantener una cepa específica. No hay manera de predecir si el potencial productivo de un cultivo de esporas es similar al de sus progenitores, a menos que se prueben muchas líneas diferentes obtenidas por germinación de esporas. Cientos de cultivos deben ser probados antes de obtener uno con buen potencial productivo. Como resultado de esto, un laboratorio pequeño probablemente no usará la técnica del cultivo de esporas delineado aquí para obtener cultivos micelianos.

Las esporas de *Pleurotus* se encuentran sobre las basidias, en la parte final de las láminas del sombrero. Para coleccionar basidiosporas, se suspende el píleo sobre un pedazo de papel filtro estéril en una cámara para colección de esporas también estéril (fig. 2). Las basidiosporas caen de las láminas durante el transcurso del tiempo, dando lugar a una huella impresa en el papel filtro. La impresión puede entonces ser cortada en tiras con una tijera esterilizada con flama, colocada en viales de tapa-rosca y mantenida a 4°C por largo tiempo. Las esporas pueden ser colectadas en cualquier papel simplemente colocando el píleo (con las láminas hacia abajo) directamente sobre el papel, sin embargo es muy probable que las impresiones colectadas de esta manera se contaminen, por lo que es mejor suspender el píleo y aislarlo del ambiente.

Descripción de la técnica para obtener cultivos de esporas

Con una pinza esterilizada a la flama se coloca uno o dos pedazos de papel filtro cubierto

de esporas en un tubo con agua destilada estéril y se mezcla bien. El agua se vuelve ligeramente turbia por las esporas. Después, con una pipeta estéril se agrega 0.1 ml de la suspensión de esporas a varias cajas de Petri con el medio deseado y se distribuye la suspensión sobre la superficie del medio con una varilla de vidrio estéril y fría. Las placas se incuban a temperatura ambiente y se revisan diariamente con un estereoscopio. Las contaminadas se descartan. Si se desea micelio de una sola espora, con ayuda de un estereoscopio y una aguja se transfiere una sola espora germinada a medio fresco. Si se desea un cultivo multiespórico, se espera a que las esporas germinen y se entrecrucen para transferir después, a una nueva caja de petri o tubo, el área deseada.

Fuentes de cultivos

Existen en varias partes del mundo colecciones biológicas encargadas de la preservación de material genético de hongos así como laboratorios de investigación que conservan las cepas fúngicas que son de interés propio, o laboratorios productores de semilla comercial. En el apéndice A se presenta una lista con nombres y direcciones de algunos de ellos, que por su ubicación o importancia, pueden ser de utilidad para personas interesadas en Hispanoamérica. Entre las empresas citadas, hay algunas que solo cuentan con cepas puras de *Pleurotus* spp. para fines de investigación. Algunas otras tienen a disposición del público cepas de calidad comercial y algunos otros se dedican exclusivamente a proveer de semilla (entre ellas *Pleurotus* spp.) a productores.

Pruebas de validación de cultivos

No se conoce una prueba *in vitro* para determinar la productividad de un cultivo que ha sido almacenado. Por esta razón, y dado que una cepa puede perder una o varias características durante el almacenamiento, se debe efectuar una serie de pruebas de cultivo para determinar las características de la cepa recién recuperada. Estas pruebas involucran la preparación de la semilla con la consecuente evaluación de la producción y la obtención de datos como rendimiento, tamaño, color, forma, etc. Estas pruebas se hacen también de manera rutinaria durante el proceso de formación de una nueva variedad. En este caso, primero se realizan pruebas pequeñas y las líneas sobresalientes se propagan para pruebas más grandes con repeticiones. Todos los parámetros de crecimiento (substrato, temperatura, humedad, etc.) deben ser controlados tanto como sea posible para minimizar el riesgo de un impacto ambiental adverso en el cultivo. Cuando sea posible, una línea comercial debe ser incluida en la prueba para propósitos comparativos.

TECNOLOGÍA DE MANTENIMIENTO

Transferencia de agar a agar

Una vez que un cultivo es obtenido por el medio que sea, debe ser mantenido en un estado productivo. El mantenimiento del cultivo es un paso crítico para la producción consistente de semilla de calidad predecible.

La transferencia de agar a agar es el método más popular: La propagación vegetativa de un hongo no es complicada, pero requiere de mucho trabajo, especialmente si se tienen que conservar muchas cepas. Se usa una pequeña cantidad de micelio de un cultivo madre para inocular múltiples tubos inclinados de agar fresco (las cuales resultan ser los cultivos hijos). Estos cultivos se revisan después de incubarlos más o menos a 25°C por siete-diez días, para constatar que estén presentes las características expresadas en el cultivo madre. Un cultivo seleccionado entre estos se convierte entonces en el “nuevo” cultivo madre, el cual se refrigera a 4°C. Después de tres o cuatro meses este cultivo es transferido a tubos inclinados con medio recién preparado para repetir el ciclo.

En general, los cultivo de *Pleurotus* spp. mantenidos por este método se comportan bien en pruebas de producción. Se prefieren los tubos con tapa de rosca (la tapa no se cierra herméticamente para permitir el intercambio de aire). Los medios contenidos en caja de petri no se conservan tan bien en el refrigerador como los tubos. Esto es porque el medio en caja de petri se reseca muy rápidamente, además de que debido a la mayor superficie expuesta al aire, facilita las contaminaciones. Debido a la rápida tasa de crecimiento de *Pleurotus* spp. los cultivos deben ser observados muy de cerca para no permitir que sobrepasen el estado de madurez antes de ser almacenados. Dado que el micelio del hongo continuará creciendo en el refrigerador, se debe almacenar cuando aún tiene espacio para crecer dentro del tubo. Algunas líneas de *Pleurotus* spp. fructifican en el medio, por lo que deberán ser almacenadas antes de que alcancen esta etapa.

Es posible conservar una cepa por largo o corto tiempo por medio de la transferencia agar-agar. Al retirarla del almacenamiento, estará lista para preparar semilla inmediatamente, ya que este método no requiere tiempo para que la cepa se recupere del almacenamiento. Las piezas de agar se toman a aproximadamente 0.5 cm de distancia del trozo original. El tamaño del inóculo no debe exceder 9 mm² para minimizar la transferencia de productos acumulados en el agar viejo. La transferencia debe hacerse bajo un estricto programa y debe mantenerse un ambiente consistente para mantener una máxima calidad. Se deben hacer observaciones frecuentes de la morfología del cultivo micelial para detectar anomalías que se puedan presentar durante la incubación. Este método tiene dos inconvenientes: uno derivado del riesgo de contaminaciones durante las transferencias que son frecuentes, y dos, el riesgo de seleccionar mutantes, generalmente con capacidades disminuidas.

A continuación se mencionan, a manera de ejemplo, algunos de los medios de cultivo que se usan frecuentemente para la conservación y propagación de cepas de *Pleurotus* spp. Todas las formulaciones son para un litro.

a) *Agar Extracto de levadura-Glucosa (AELG)*

Extracto de levadura	5 g
Dextrosa anhidra	5 g
Agar	15 g

Mezcle todos los ingredientes en un matraz de 2 l y tápelo con papel aluminio. Esterilice 15 minutos a 121°C. Vacíe en placas cuando el medio esté a más o menos a 45°C.

b) Agar Extracto de Malta (AEM)

Este agar se vende ya preparado por algunas casas comerciales. El fabricante recomienda generalmente disolver 33.6 g en un litro de agua y esterilizarlo de la misma manera que en el caso anterior.

c) Agar de papa-dextrosa y levadura (APDL)

250 g de papas cortadas en piezas de 1.5 cm.

(No pele las papas, límpielas y córtele los ojos y las manchas)

Agar	20g
Dextrosa, Anhidra	10 g
Extracto de levadura	1.5 g

Enjuague y escurra las tiras de papa dos veces con agua. La primera con agua de la llave, la segunda con agua destilada. Cubra con 500 ml. de agua destilada. Coloque en un recipiente de un litro las papas y en otro el agar concentrado en la mitad del agua de su concentración final. Coloque ambos frascos en el autoclave y opere un pasado por vapor de 40 minutos. Después de completar el ciclo, el caldo de papas debe ser filtrado con una tela de gasa doble. Deseche las papas y si es necesario, afore el volumen del caldo caliente a 500 ml con agua destilada. Agregue la dextrosa y el extracto de levadura. Después combine el agar caliente con el caldo de papa y agite suavemente para formar 1 litro de APDL.

Para preparar medio en placas, esterilice el medio en autoclave durante 15 minutos a 121°C y vacíelo en placas estériles cuando el agar aún esté líquido (45°C).

Para preparar tubos inclinados, distribuya 14 ml. de líquido en tubos de 20×150 mm. y ciérrelos suavemente. Esterilice en autoclave por 15 minutos a 121°C. Al terminar, apriete las tapas de los tubos y colóquelos de manera inclinada hasta que solidifiquen.

El APDL ácido se prepara acidificando APDL (preparado como se señaló líneas arriba). Para ello, después de la esterilización en autoclave, se agrega estérilmente 1 ml. de ácido láctico al medio y se agita suavemente. Posteriormente se vacía a las placas.

d) Agar de Sabouraud dextrosa (SAB)

Peptona	10 g
Dextrosa anhidra	20 g
Agar	15 g

Se sigue el mismo procedimiento de preparación que en el inciso a).

Tasa de crecimiento

Las cepas de todos los hongos generalmente se comportan de diferente manera en cada medio de cultivo. De un medio a otro puede variar su morfología, su color, su tasa de crecimiento, etc. Por lo mismo, cuando se recibe una cepa nueva, se deben hacer ciertos estudios básicos de caracterización micelial y de conservación para saber como se comporta en cada medio y cuál es el método de conservación que mejor se adapta a ella. A manera de ejemplo, en la tabla 1 se presenta la tasa de extensión lineal de algunas cepas de *Pleurotus* spp. en varios medios de cultivo y las figuras 3 y 4 presentan la morfología colonial de algunas cepas de esta especie.

Tabla 1. Tasa de extensión lineal (mm/día) de 6 cepas de *Pleurotus* spp. sobre cuatro medios de cultivo en caja de Petri e incubados a 22°C.

Especies	Cepa	Medios ¹			
		AELG	AEM	APDL	ASAB
<i>P. djamor</i>	R 22	3.54 ab ²	0.84 cd	3.04 c	0.97 d
<i>P. eryngii</i>	WC 515	2.58 c	0.69 d	3.35 b	1.60 c
<i>P. pulmonarius</i>	WC 537	3.72 a	1.62 a	4.37 a	1.80 b
<i>P. cornucopiae</i>	WC 608	3.42 b	1.33 b	3.44 b	2.15 a
<i>P. ostreatus</i>	WC 814	2.85 c	0.97 c	2.14 d	0.83 d
<i>P. tuber-regium</i>	WC 823	1.40 d	1.06 c	1.27 e	0.53 e

¹ Abreviaciones de los medios con agar: AELG= Extracto de levadura glucosa; AEM= Extracto de malta; APDL= Papa dextrosa y levadura; ASAB= Sabouraud.

² Promedios seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba Student (P= 0.05).

Tabla 2. Comparación de la tasa de extensión lineal (mm/día) de la cepa *Pleurotus tuber-regium* WC 823¹ sobre cuatro medios en caja de Petri. Incubación 22 y 30°C.

Medio ³	Tasa de crecimiento	
	22°C (mm/d)	30 °C (mm/d)
AEL	1.40 a ²	4.94 a
AEM	1.06 b	2.47 b
APDL	1.27 a	5.01 a
ASAB	0.53 c	1.60 c

¹ Aislado de un esclerocio comestible en Nigeria.

² Promedios con letra diferente en la misma columna son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de student (P= 0.05).

³ Abreviaciones de los medios con agar: AGEL= Glucosa extracto de levadura; AEM = Extracto de malta; APDL= Papa dextrosa y levadura; SAB= Sabouraud.

Figura 1. Toma de tejido para cultivar un clon de *Pleurotus* spp.

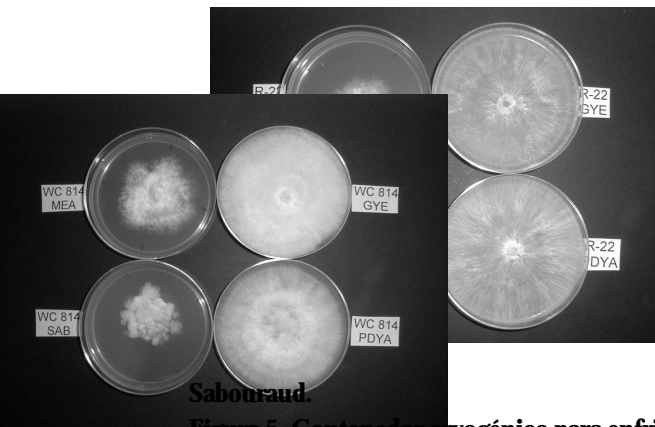


Figura 2. Forma de suspender un carpóforo para obtener su esporada.



Figura 3. Crecimiento de *P. djamon* R22 sobre cuatro medios de cultivo. MEA= Agar extracto de malta; PDYA= papa dextrosa y levadura; GYE= Glucosa levadura; SAB=

Figura 4. Crecimiento de *P. ostreatus* WC814 sobre cuatro medios de cultivo. Nomenclatura: misma que en figura 3.



Sabouraud.

Figura 5. Contenedor criogénico para enfriamiento controlado y viales criogénicos para almacenamiento en nitrógeno líquido.



Figura 6. Almacenamiento en nitrógeno líquido. implementos requeridos: termo, canastilla, cañas y viales.



Almacenamiento en papel filtro

Las especies de *Pleurotus* pertenecen al grupo de hongos degradadores de madera. Esta característica les permite crecer bien sobre celulosa, y por lo tanto sobre papel filtro. Para la conservación de cepas por este método, se cortan pequeñas piezas de papel filtro y se esterilizan por calor húmedo en una caja de petri. Cuando ya están frías, se inoculan con un pequeño fragmento de agar. La placa se coloca entonces en una bolsa de plástico, la cual se cierra sin sellarse para permitir el flujo de aire. La incubación se realiza a temperatura ambiente por una o dos semanas hasta que las tiras de papel estén colonizadas por el micelio. Después de la incubación, se colocan las tiras de papel en tubos roscados con agua destilada estéril. Cada tubo se cierra fuertemente, se identifica con una etiqueta que lleva el nombre de la cepa, un número y la fecha de siembra. Finalmente se deposita en un refrigerador a 4°C. Cuando se necesita un cultivo, una tira de papel es removida estérilmente del tubo y se coloca en otro tubo con medio inclinado o en una caja de petri y se pone a temperatura ambiente. Los cultivos pueden ser almacenados de esta manera por 1 o 2 años. Se debe tener mucho cuidado en evitar contaminaciones, para lo cual se recomienda observar frecuentemente la ausencia de turbidez y revisar el olor. Este es seguramente un método barato de almacenamiento que puede utilizar cualquier laboratorio.

Esporada

El almacenamiento de esporadas es usado en algunas ocasiones como un método de respaldo para el mantenimiento de cepas; por ejemplo cuando se piensa en la eventualidad de una degeneración de la cepa original. En estos casos, se procede de la siguiente manera: las tiras de papel filtro con la esporada (Ver párrafo “Cultivos multi y monospóricos”) se transfieren a cryoviales estériles, los cuales se etiquetan con un número y la fecha de acceso. Estos cryoviales se almacenan en un refrigerador a 4°C en gradillas de almacenamiento o en cajas. Las esporas permanecen viables por varios años.

Aunque el almacenamiento de esporadas es muy sencillo, no se recomienda para un laboratorio de producción de semilla porque las esporas dan origen a cepas diferentes de la cepa original. El uso de esporadas es muy útil para desarrollar nuevas cepa, sin embargo acarrea riesgos como: 1) Contaminación. En efecto, la esporada puede estar contaminada y no hay manera de predecirlo hasta que las esporas estén sembradas en agar, 2) Las cepas que se desarrollen requerirán una evaluación para determinar su viabilidad, y 3) La evaluación de las cepas obtenidas requerirá de un trabajo arduo y meticuloso.

Agua destilada estéril

El almacenamiento de cultivos fúngicos bajo agua ha sido usado como una técnica de mantenimiento por muchos años. Para esto se preparan piezas de micelio del hongo deseado y se sumergen en volúmenes de agua destilada estéril en tubos con tapa roscada. Jones *et al.* (1991) reportaron que muchos hongos pueden ser almacenados en agua

destilada estéril a temperatura ambiente por períodos de hasta 20 años sin pérdida de viabilidad o cambio en las características morfológicas. Este método de almacenamiento en cryoviales es uno de los más utilizados en ECOSUR con las cepas de *Pleurotus* spp.

El método involucra cultivar la cepa deseada sobre APDL hasta su madurez. Varios trozos de agar son colocados en el fondo de un cryovial de 2 mm y cubiertos con agua destilada estéril (aproximadamente 1.5 ml). El cryovial es tapado y etiquetado con un número de identificación y fechado para después ser almacenado verticalmente en cajas. Es aconsejable revisar los cryoviales después de una semana de almacenamiento para identificar cualquier signo de contaminación. La recuperación de la cepa se hace retirando asépticamente un trozo de agar del vial y colocándolo en un medio en placa. Este método es barato, relativamente fácil y requiere poco espacio para almacenamiento en refrigeración.

Almacenamiento con nitrógeno líquido

El almacenamiento de cepas en nitrógeno líquido es muy bueno, pero caro. Es el mejor método de almacenamiento a largo plazo porque el crecimiento micelial es completamente detenido a -196°C . Este método mantiene viable un cultivo madre por muchos años. Solamente los cultivos de más alta calidad se deben seleccionar para un almacenamiento a largo plazo. Desafortunadamente, este método es el más caro. Los costos iniciales por adquisición de equipo son altos y el nitrógeno líquido es un gasto constante cada mes. La unidad de almacenamiento de nitrógeno requiere un constante monitoreo para ver el nivel de nitrógeno en la cámara.

Este método involucra el llenado de un cryotubo (tubo especial diseñado para uso de nitrógeno líquido) con un cryoprotector y sumergir en él algunos trozos de agar o granos de semilla. Los cryotubos llenos son entonces colocados en una caja dividida o en una "caña" antes de almacenarlos en la cryo-unidad. El propósito del cryoprotector es minimizar el daño a las células durante el ciclo de enfriamiento y congelación. Hay muchos cryoprotectores, pero el más popular es el que se prepara con 10% de glicerol en agua. Se mezcla 1 ml de glicerol en 9 ml de agua destilada en un tubo con tapa de rosca y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C .

El enfriamiento inadecuado dañará el micelio de *Pleurotus* spp. y puede llegar a perderse la cepa. Para evitar esto, los cultivos deben ser enfriados cuidadosamente; es decir, antes de colocar los cryoviales en la unidad (termo) de nitrógeno líquido, se debe descender la temperatura de éstos a una velocidad controlada de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 4 horas (hasta alcanzar una temperatura de menos 70°C). Las unidades de enfriamiento lento de nitrógeno líquido son muy caras, por lo que una alternativa de bajo costo es usar un contenedor cryogénico de enfriamiento a tasa controlada (figura 5), los cuales están disponibles en los catálogos de proveedores científicos. Los cryoviales son colocados en un contenedor de enfriamiento que se suspende en alcohol isopropílico, y la unidad entera es colocada en un refrigerador a -70°C . La única propiedad que tiene el

alcohol isopropílico es que a -70°C desciende su temperatura a una tasa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, con lo cual se consigue la velocidad requerida de enfriamiento. Después de cuatro horas, los cryotubos congelados son almacenados en el termo de nitrógeno líquido (figura 6). Los cryotubos son etiquetados con un cryomarcador especial, porque de otra manera la etiqueta desaparecería al sumergirse en el nitrógeno líquido. Con este método de almacenamiento se requiere el mantenimiento de un registro y un inventario confiable para poder retirar del contenedor con rapidez cualquier cryovial cuando sea necesario.

Para recuperar una cepa, el cryotubo es sumergido en un baño maría a 37°C por uno o dos minutos. Una vez descongelado, el contenido del cryotubo es vaciado en una placa de APDL. Los trozos de agar son colocados en el centro de la placa con una aguja y la placa es inclinada para permitir que el cryoprotector escurra del micelio. La placa debe ser revisada uno o dos días después para verificar la pureza y la apariencia.

Cuando se usa nitrógeno líquido (-196°C), se debe seguir la técnica adecuada para evitar accidentes serios. Por ejemplo, si el nitrógeno escurre dentro de un cryotubo durante el almacenamiento, el vial puede explotar cuando se coloque en el agua para descongelarlo. Por esto, se deben usar guantes y una máscara protectora durante el llenado de la cámara o al extraer y descongelar los cryoviales.

Sectorización y otras anomalías

La sectorización es cualquier tipo de crecimiento micelial que difiere en apariencia, tasa de crecimiento, color u otra forma del aspecto típico de una cepa dada. La sectorización es frecuentemente observada como una zona más rápida de crecimiento cercana al borde de la colonia y que presenta un hábito de crecimiento diferente del resto de la colonia. Otras anomalías que pueden aparecer en un cultivo son esponjamiento, micelio aéreo, textura gruesa o elástica, cambios de color como oscurecimiento o ennegrecimiento del micelio, etc. La sectorización, o cualquier otro cambio en el crecimiento vegetativo, puede afectar la productividad de la cepa. Por lo tanto, es muy importante reconocer y evitar la propagación de micelio anormal en el agar y durante la producción de semilla.

EL MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Las precauciones

La sanidad en el laboratorio es de vital importancia en el mantenimiento de cepas. Los desinfectantes efectivos y recomendables para el área de inoculación son el etanol al 70% y el hipoclorito de sodio al 10%. Todas las superficies de trabajo y el interior de la cámara de transferencia o campana de flujo laminar debe ser limpiadas con uno de estos desinfectantes; sin embargo nunca use estos dos al mismo tiempo. En efecto, el manual CRC de seguridad en el laboratorio indica que el cloro nunca debe ser mezcla-

do con alcohol etílico al 70%.

La preparación de estos dos desinfectantes es muy sencilla. Para el etanol al 70%, mezcle 700 ml de alcohol etílico 190 proof con 300 ml de agua destilada. Se recomienda prepararlo de preferencia cada semana. En el caso del hipoclorito, mezcle 100 ml de cloro para uso casero con 900 ml de agua. Haga la solución fresca diariamente porque pierde efectividad rápidamente. El cloro se consigue en las tiendas de abarrotes bajo diferentes nombres comerciales como clorox, cloralex, etc. El ingrediente activo es 5.25% de hipoclorito de sodio.

Una lámpara de luz ultravioleta puede ser instalada en la campana de flujo laminar. Ella provee luz UV necesaria para descontaminar el área de trabajo y matar esporas y otros organismos. Se deben tener especial cuidado con estas lámparas y seguir las indicaciones del fabricante, ya que el uso inadecuado puede dañar la vista o la piel del técnico laboratorista. Estas lámparas pueden usarse junto con los desinfectantes, pero no los reemplazan. Nunca use la luz UV al momento de trabajar en una cámara de transferencia porque es muy dañina tanto para los hongos como para los humanos. Nunca deje cultivos dentro de la campana cuando esté saneando con luz UV.

Otras precauciones que se deben tomar en cuenta cuando se trabaja en la conservación de cepas son: El laboratorio debe estar físicamente separado y aislado de las áreas de producción. El aire debe ser filtrado y el filtro cambiado en base a un programa regular. La temperatura del aire debe estar controlado entre 22 y 24°C. Se sabe que *Pleurotus* spp. es capaz de tolerar temperaturas más altas, pero el laboratorio debe estar climatizado en lugares cálidos, principalmente porque el micelio puede dañarse si la temperatura excede 26°C o si cae bajo cero. El uso de higrotermógrafos es muy recomendable para monitorear la humedad y la temperatura del ambiente.

Las paredes de laboratorios recién construidos deben ser lavadas y pintadas con pintura anticorrosiva de buena calidad. Si existen ventanas, se debe tener cuidado de sellar cualquier espacio con hule espuma. No debe haber espacios o roturas que dejen pasar animales o contaminantes. Las ventanas no deben ser abiertas para airear el laboratorio y el uso de ventiladores no debiera ser permitido. Se prefieren los pisos de vinilo porque funcionan muy bien y son fáciles de limpiar. La limpieza de los pisos o cualquier otra acción que pueda crear polvo no debe ser realizada durante la transferencia de cultivos. Por otra parte, debe dejarse suficiente tiempo para que el polvo del aire se asiente antes de que los cultivos o la semilla se inocule. Es muy importante no exponer los cultivos de los hongos a los aromas de las pinturas, o productos de limpieza que pueden ser usados en las áreas cercanas al laboratorio. El micelio puede ser severamente dañado y aún degenerarse si se expone a sustancias químicas u olores tóxicos.

El personal

Es altamente aconsejable que el personal que trabaje en el laboratorio tenga conocimientos elementales de micología (o microbiología) y esté entrenado en el uso de la

técnica estéril porque el trabajo de conservación de cepas requiere concentración, atención a los detalles y una buena coordinación de ojos y manos.

El personal de laboratorio no debe trabajar o atravesar las áreas de producción antes de entrar al laboratorio. Si se necesita que los empleados del laboratorio trabajen en el área de producción, se deben tomar precauciones especiales. El trabajo de laboratorio debe ser realizado con ropa y zapatos limpios. Sin higiene adecuada y sentido común, seguramente que los contaminantes serán introducidos al laboratorio y a los cultivos. Las reglas de sanidad también se aplican al equipo y éste solo debe operar en lugares limpios.

Es mejor evitar problemas serios de contaminación porque es más fácil evitar la contaminación que eliminarla. El laboratorio de producción de semilla debe contar con equipo para uso exclusivo de esta área. No se debe introducir ni alimentos ni plantas al laboratorio porque pueden traer consigo moscas, hongos, bacterias, ácaros, etc. que pueden contaminar el laboratorio y los cultivos. Finalmente, el personal no debe fumar en el laboratorio porque el humo puede dañar los cultivos.

REFERENCIAS

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Burdsall, Jr., H.H., Dorworth, E.B. 1994. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*. 86: 275-280.
- Chalmers, W. 1993. Specialty mushrooms: mushroom spore culture. *Mushroom World*. (December) 49-51.
- Chalmers, W. 1993. Specialty mushrooms: mushroom tissue culture. *Mushroom World*. (September) 14-18.
- Furr, A. K. 1995. *CRC Handbook of Laboratory Safety*. CRC Press.
- Difco Manual Tenth Edition. 1985. Difco Laboratories. Detroit, Michigan, USA.
- Ellor, T. 1996. An overview of specialty mushroom culture storage and maintenance. *Mushroom World*. 7(2):12-20.
- Jones, R.J., Sizmur, K.J., Wildman, H.G. 1991. A miniaturised system for storage of fungal cultures in water. *Mycologist* 5:184-186.
- Jodon, M.H. and Royse, D.J. 1979. Care and handling of cultures of the cultivated mushroom. *Spec. Circ.* 258. Pennsylvania State University, College of Agriculture Extension Service, University Park, PA.
- Wuest, P.J., Wilkinson, V.L., 1995. Maintenance and evaluation of hybrid lines of *Agaricus bisporus*. *Mush. Sci.* 14: 627-633.
- Stamets, P. 1993. *Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press.

VII Preparación de la semilla.

Tricita H. Quimio

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	143
SUBSTRATOS PARA LA SEMILLA	143
RECIPIENTES PARA LA SEMILLA	144
PREPARACIÓN DE LA SEMILLA MADRE	145
Preparación del grano	145
Esterilización	146
Inoculación con cultivo micelial	146
Inoculación con inóculo líquido	151
Incubación	152
PREPARACIÓN DE LA SEMILLA SECUNDARIA EN GRANO (PARA SIEMBRA)	152
Preparación de la semilla de aserrín	152
Preparación del substrato de aserrín	153
Inoculación de la semilla de aserrín con grano primario	153
Incubación	153
ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA	154
Calidad de semilla	154
PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD POR MANEJO DE SEMILLA POR PRODUCTORES Y CULTIVADORES	155
REFERENCIAS	156

INTRODUCCIÓN

El término *semilla* o *blanco de hongo* se refiere en este caso al micelio del hongo utilizado para inocular un sustrato dado. Es el material empleado para sembrar cuando se cultivan hongos. Hay dos tipos de semilla: la semilla *madre*, *master* o *primaria* y la *secundaria* o semilla para siembra (figura 1). La semilla primaria, también conocida como *inóculo primario*, proviene directamente del micelio del hongo cultivado sobre un medio a base de agar, esto significa que para su preparación el sustrato empleado se inocula con un trozo de agar. El sustrato para producir la semilla secundaria, por el contrario, es inoculado con un primario de crecimiento activo. Muy frecuentemente, el sustrato utilizado para preparar los primarios son granos, mientras que para los secundarios se utilizan desechos agrícolas. Algunas veces el mismo material es usado como primario y secundario. Para evitar confusión entre unos y otros, se pueden utilizar diferentes tipos de recipientes, por ejemplo los primarios en botellas y los secundarios en bolsas de plástico termoresistentes.

La producción de semilla es una actividad compleja (Royse, 1997) y un negocio en sí. En muchos casos, una o dos grandes compañías productoras de semilla satisfacen las necesidades de los pequeños productores de un solo país. Esto es recomendable, porque los proveedores, en la medida de que se han especializado en producir semilla certificada, suministran a los cultivadores semilla de calidad. Cuando esto no es posible, pequeños productores de semilla pueden cubrir las necesidades de otros pequeños cultivadores de un área. Usualmente los productores grandes producen su propia semilla.

En el caso de los pequeños productores, la preparación de la semilla puede hacerse en su propia casa. Una pequeña habitación puede ser acondicionada de tal manera que la preparación permanezca independiente. Se deberán tomar todas las precauciones para mantener un ambiente higiénico. En muchos casos la inoculación se hace en la noche, cuando no hay mucho movimiento y no se tienen corrientes de aire dentro de la casa.

Sin embargo, es preferible que el productor de semilla tenga un entrenamiento formal sobre preparación de éstas antes de que inicie el negocio. Además, debe tener un área demostrativa o de evaluación, en donde la semilla sea valorada según sus características productivas.

SUBSTRATOS PARA LA SEMILLA

Comúnmente se utilizan granos de cereales para preparar semilla primaria o secundaria de cepas del género *Pleurotus* spp. Estos granos son trigo, centeno, mijo y sorgo (figura 2) (Stamets y Chilton, 1983). Algunas veces también se usan granos secos de maíz, pero deben ser molidos primero de una manera grosera, para que puedan ser más fácilmente esterilizados y el micelio del hongo los penetre sin inconvenientes.

Los granos deben estar libres de fungicidas. Se debe usar grano fresco y, en la medida de lo posible, de alta calidad porque los granos viejos contienen esporas de bacterias y hongos y obligan al productor a incrementar el tiempo de esterilización para matar los organismos contaminantes.

Se pueden utilizar diferentes tipos de sustrato para los primarios y para los secundarios, aunque el mismo tipo suele funcionar bien. En la mayoría de los laboratorios se usan granos de cereales para la elaboración de primarios, y desechos agrícolas, inclusive aserrín, para la preparación de secundarios. Algunos laboratorios usan palos de madera impregnados con solución nutritiva como primarios (Oei, 1991). El factor más importante a considerar en la elección del sustrato para la semilla, ya sea para primaria o secundaria, es la habilidad del micelio del hongo para crecer en él. La disponibilidad, el costo y la facilidad de preparación también deben ser considerados.

RECIPIENTES PARA LA SEMILLA

Los recipientes utilizados para la preparación de la semilla también pueden variar (figura 3). Deben tener una tapadera adecuada y ser resistentes al calor. En la mayoría de los casos se usan botellas, como las de leche, o frascos de vidrio de boca ancha. Las botellas de glucosa, que pueden ser obtenidas de manera gratuita en la mayoría de los hospitales, son ideales porque tienen tapones de hule con salidas de aire que pueden ser cerradas con algodón. Las botellas de dextrosa y las planas de whiskey, usadas comúnmente en las Filipinas (figura 4) son excelentes tanto para los primarios como para los secundarios porque la semilla se dispersa fácilmente de manera aséptica desde una abertura o boca pequeña. Ésta limita la exposición a contaminantes y puede ser completamente flameada por una lámpara de alcohol al inocular con agar, al inocular secundarios o cuando se inocula el sustrato definitivo.

También se pueden usar bolsas de polipropileno como recipientes. Se recomiendan para secundarios porque se transportan fácilmente. En algunas partes se pueden conseguir bolsas provistas de un parche filtro para intercambio gaseoso, que son fabricadas especialmente para productores de semilla. En este caso, la parte alta de la bolsa se dobla y se asegura con un clip o grapa antes de la esterilización, y se sella con máquina después de la inoculación. Las mismas bolsas que se usan para poner el sustrato definitivo para fructificación pueden ser usadas y arregladas con un *cuello* para sostener un tapón de algodón. Esto es más conveniente porque el tapón de algodón sirve como respiradero y es fácilmente removido y vuelto a su lugar durante la inoculación.

Los frascos de vidrio son reutilizables después de lavarlos, y como se indicó anteriormente, pueden ser flameados para prevenir contaminaciones tanto durante la siembra con agar, como en el sustrato definitivo. Sin embargo, tienen el inconveniente de que se pueden romper durante el transporte, por lo que requieren cuidado en el manejo. Las

bolsas de plástico, por su parte, son desechables, con lo que evitan el tiempo de lavado y son más fáciles de transportar. Debe observarse mucho cuidado y asepsia durante la inoculación porque no se puede utilizar una lámpara de alcohol para proteger la bolsa al abrirla.

El tamaño del recipiente depende de la preferencia del productor de semilla, así como de su disponibilidad. En la mayoría de los casos, se pueden usar frascos de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 y hasta 10 litros, o bolsas de plástico. Recipientes más grandes pueden ser difíciles de esterilizar, además de que existe el peligro de un pobre intercambio gaseoso que limite el crecimiento. El costo del recipiente debe ser considerado porque agrega costo a la semilla.

PREPARACIÓN DE LA SEMILLA MADRE

La semilla madre es usada para inocular los secundarios, que en su turno serán empleados como inóculo del substrato que producirá fructificaciones cosechables de *Pleurotus* spp. El substrato madre, por otra parte es inoculado con un trozo de agar con micelio proveniente de un cultivo en botella o en caja de petri.

Preparación del grano

Para preparar la semilla madre (figura 5), los granos (centeno, sorgo o arroz) son lavados abundantemente y después dejados en remojo toda la noche. Las semillas muertas y aquellas que flotan sobre el agua son removidas cuidadosamente. Al día siguiente, las semillas son lavadas nuevamente y hervidas en agua por lo menos 10-15 minutos hasta que se expandan sin romperse. El remojo puede ser suprimido, pero en este caso el tiempo de cocción será mayor. Cuando los granos se han hinchado y algunos empiezan a romperse son removidos del calor y distribuidos sobre hojas de papel periódico para eliminarle el exceso de humedad. Esto tomará alrededor de dos horas o menos si se usa un ventilador eléctrico.

Esta parte es muy crítica. Su ejecución correcta evita semillas demasiado secas o muy húmedas que afectarán el crecimiento micelial. Si los granos quedan muy secos, el crecimiento del micelio será muy lento. Si los granos tienen mucha agua, el crecimiento es también muy lento y finalmente se detendrá cuando el agua se acumule en el fondo. La humedad óptima para los granos es alrededor del 50%. Aunque hay formas muy precisas de determinar la humedad, el técnico debe aprender a medirla por experiencia, una manera sencilla de tener éxito en estos procedimientos es tomar un curso formal sobre producción de semilla.

Una vez que los granos tienen la humedad adecuada, se colocan en botellas a $\frac{3}{4}$ de su capacidad y se tapan con algodón. Se pueden usar cucharones o vasos estandarizados como medidas para ajustar un volumen determinado a cada frasco o botella. Algunos

productores cuentan con un aparato semiautomático que facilita el llenado rápido de los recipientes con semilla. Como se indicó antes, las bolsas de polipropileno pueden ser usadas y llenadas también a menos de $\frac{3}{4}$ de su volumen.

Esterilización

En este punto los frascos o bolsas llenos están listos para la esterilización en una autoclave u olla de presión (figura 6) a 121°C con 1.05 kg/cm² de presión (15 libras/pulg²). El tiempo de esterilización dependerá del tamaño del recipiente dentro de la olla. Para frascos de 0.5-1 litro dos horas de esterilización a 15 psi es suficiente. Los recipientes mayores (5-10 litros) pueden requerir hasta 4 horas de esterilización. Las botellas son enfriadas a temperatura ambiente antes de inocular con un trozo de agar micelio cada uno.

Las autoclaves y ollas de presión son generalmente importadas y distribuidas o vendidas por proveedores de laboratorios científicos. Aunque también pueden ser fabricados localmente y por lo tanto su costo será menor.

Inoculación con cultivo micelial

La inoculación se hace bajo completa asepsia, de manera similar a como se prepara el cultivo. Este paso puede hacerse dentro de una cámara de transferencia casera (figura 7a) cuando no se tienen muchos recursos, pero de preferencia dentro de una campana de flujo laminar (figura 7b) observando todas las precauciones de asepsia para evitar contaminaciones. La cámara asegura la transferencia o el aislamiento de cultivos puros y es usualmente fabricada de madera y vidrio, con dos orificios para permitir el libre acceso de las manos del operario.

El técnico, recién bañado, debe usar ropa limpia o bata de laboratorio. Debe lavar sus manos con alcohol al 70% y no debe hablar, ni silbar o cantar porque el aire que sale de la boca transportará bacterias o esporas que pueden contaminar el sustrato. Mejor aún si la persona que siembra usa una máscara o tapaboca y trabaja con la ayuda de una flama de lámpara de alcohol que le permita proteger el material cada vez que abra un recipiente para introducir o sacar el inóculo. Todas estas precauciones deben ser observadas, especialmente si se usa una cámara de transferencia casera en lugar de una campana sofisticada de flujo laminar.

El micelio que se inocula puede provenir de una caja de petri o de un bote plano de cultivo micelial (figura 8 a y b). Si el micelio crece sobre una caja de petri, se usa una navaja o bisturí para cortar el agar en pequeños cuadros o trozos y transferirlos a los granos estériles. Si se usan botellas planas en lugar de las cajas de petri (las cuales son muy caras), se prefiere una aguja larga y plana de laboratorio terminada en una curva en lugar del bisturí. Esta aguja puede hacerse en casa de manera sencilla, con un alambre eléctrico grueso cubierto de hule de la siguiente manera: a un fragmento de alambre de aproximadamente 30 cm de largo se le deja en un extremo la cubierta de hule que lo protege y en el otro se pela, se aplana y se le da forma con la ayuda de una flama.



Figura 1. La semilla madre (izquierda) inoculada con un trozo de micelio y la semilla para siembra (derecha) inoculada con semilla de grano.



Figura 2. Tipos de grano usados para preparar la semilla (de izquierda a derecha): trigo, arroz, sorgo.



Figura 4. Botellas planas de whisky y de glucosa usadas para prepara semilla de hongo.



recipientes y tamaños.

Figura 5. Pasos para la preparación de la semilla madre (de izquierda a derecha y de arriba a abajo): escurrido y aireado de los granos recién cocidos, embolsado, inoculación con un trozo de agar, incubación.

Figura 6. Esterilización con autoclave y con olla de presión.

Figura 7. Inoculación en una cámara de transferencia casera y en una campana de flujo laminar.

Figura 8. Cultivo micelial en caja de petri y en botellas planas.

Figura 9. Inoculación con micelio en la superficie y en los lados.



Figura 10. Pelotas de micelio cosechadas y listas para ser licuadas.

Figura 11. Crecimiento micelial en la superficie de medio líquido.

Figura 12. Semilla totalmente colonizada por el micelio del hongo.



Figura 13. Inoculación de grano con semilla de grano (de grano a grano).

Figura 15. Micelio en crecimiento sobre aserrín suplementado con diferentes materiales orgánicos (de arriba a abajo y de izquierda a derecha): pulpa de coco, harina de maíz, hoja de Leucaena, avena, salvado de arroz y aserrín solo.



Figura 16. Emboisado de la mezcla de aserrín.



Figura 17. Llenado de los frascos con aserrín antes de la esterilización.

Figura 18. Inculación de aserrín con semilla de grano.

Figura 19. Incubación de la semilla para siembra preparada con aserrín.

Figura 20. Semilla para siembra lista para uso.

Figura 21. Frascos con semilla contaminada.

Si lo que se inoculará son frascos, primeramente se aflojan las tapas para que sean fácilmente levantadas con una mano cuando el trozo de micelio esté listo para distribuirse en cada uno de ellos. Lo mismo se hace con tapones de algodón, los cuales deben ser sostenidos con el dedo meñique y no colocados sobre la superficie de la mesa durante la transferencia del inóculo.

Los trozos de micelio se dejan caer sobre la superficie del recipiente. Aunque algunos productores han desarrollado otra técnica, consistente en colocar el trozo en medio de la masa de granos mediante la inclinación ligera del recipiente durante la inoculación. Esto puede resultar en un crecimiento más rápido, pero para los principiantes poner el trozo en la superficie puede ser más fácil y puede evitar el ligero secado de la capa superior de granos, como sucede cuando se inocula en el centro (figura 9). Los trozos también pueden ser colocados a los lados, junto a la pared del recipiente. Esto permite al micelio alcanzar los granos más rápidamente que los ubicados en la superficie, porque ahí el micelio tiende a crecer de manera aérea antes de asentarse sobre los granos de sorgo. Esta situación permite una más rápida colonización y deja apreciar mejor el desarrollo del micelio, como se ve en la misma figura 9.

La manera de preparar la semilla es una cuestión de preferencia personal o institucional. Un gran productor de semilla en Estados Unidos usa el proceso a granel, en el cual los granos son esterilizados, enfriados e inoculados adentro de un mezclador rotativo; después, el lote de semilla es transferido asépticamente a bolsas estériles de polietileno que tienen un parche para respirar.

Inoculación con inóculo líquido

El proceso de inocular la semilla madre con cultivo líquido se asemeja a la tecnología usada en la industria cervecera para el cultivo de levadura (Stamets, 1993). Es también similar a la utilizada para el cultivo sumergido de micelio de hongo para alimento o para antibióticos (Robinson y Davidson, 1959). En estos métodos, se llenan los recipientes especiales para fermentación aerobia con un caldo azucarado u otro medio líquido, para luego ser inoculados con una pequeña parte de micelio de hongo. Después de varios días de incubación, se obtiene una abundante masa micelial.

Para usarse como semilla, la masa resultante se muele y se agrega a los granos de sorgo para la producción de primarios junto con el líquido en que creció. Cuando se siembra con inóculo líquido se observa un crecimiento más rápido porque éste se distribuye y dispersa mejor entre los granos. El tiempo de colonización puede disminuir aún más si los granos se agitan después de inoculados.

En resumen, el procedimiento involucra primero la preparación de un medio para cultivo líquido (preferiblemente en frascos de 1000-2000 ml). Puede ser el mismo que el usado para cultivo en placa, sin el agar. Después de la esterilización e inoculación con un trozo de agar, los frascos son incubados en un agitador por varios días, al final de los

cuales se producen unas pelotitas de micelio (figura 10). Si los frascos no se agitan, una capa de micelio se forma en la superficie del líquido. (figura 11). El micelio junto con el líquido es transferido asépticamente a una licuadora estéril, donde son licuados por 5-10 segundos hasta que el micelio es groseramente fragmentado. El líquido que resulta puede ser transferido a otro recipiente estéril que se usará para distribuirlo en pequeñas cantidades (alrededor de 30 ml por cada frasco de aproximadamente 1.9 litros de volumen con granos) para producir primarios.

El uso de inóculo líquido no es ampliamente utilizado hoy en día por la necesidad de una técnica completamente aséptica; sin embargo, puede generar crecimiento de una manera mucho más rápida que con el uso de inóculo de grano o de trozos de agar.

Incubación

Los frascos con grano inoculado se incuban a temperatura ambiente sin moverlos por cierto periodo de tiempo, según del tamaño del recipiente, hasta que el micelio blanco haya cubierto completamente todos los granos. Algunos productores de semilla agitan los frascos ya inoculados al menos cada tres o cuatro días para distribuir los granos y permitir una rápida ramificación del micelio en crecimiento. Cuando los granos ya han sido cubiertos por el micelio y están listos para la siembra, se agitan nuevamente para separarlos individualmente antes de vaciarlos en el siguiente recipiente.

Los granos sin agitar pueden ser totalmente colonizados por el micelio en 2-4 semanas después de la inoculación, según el tipo de recipiente (figura 12). A partir de entonces estarán listos, ya sea para ser inoculados en un secundario o para ser sembrados en el sustrato definitivo, como será descrito más adelante.

PREPARACIÓN DE LA SEMILLA SECUNDARIA EN GRANO (PARA SIEMBRA)

Los granos de sorgo pueden ser usados para producir semilla para siembra; sin embargo, como se mencionó anteriormente, el producto obtenido no será semilla madre o primaria porque los granos habrán sido inoculados con semilla primaria en lugar de hacerlo con un trozo de agar (figura 13). A esto se le denomina inoculación de grano a grano. El crecimiento micelial será definitivamente más rápido en grano secundario que en el primario, porque el micelio se habrá adaptado al sustrato después de haber crecido sobre el primario que se usó como inóculo (figura 14).

Preparación de la semilla de aserrín

La semilla de aserrín es particularmente útil cuando se usan recipientes más grandes, como columnas o camas de sustrato, puesto que el aserrín es más barato que cualquier grano. También puede ser usado para inocular bolsas de un kilogramo por medio de pinzas, con las cuales se toma una porción de aserrín colonizado de micelio o si es posible, puede ser distribuido y vaciado hacia el siguiente recipiente.

El aserrín solo no es un buen sustrato para cultivar micelio de cepas del género *Pleurotus* spp. Generalmente, para producir micelio en mayor cantidad y más rápidamente se agregan al aserrín diferentes suplementos. La figura 15 muestra que la pulpa de coco (después de que el agua de coco ha sido extraída), el harina de maíz, las hojas secas de ipil o guaje *Leucaena glauca*, el harina de avena o el salvado de arroz son buenos suplementos.

Preparación del sustrato de aserrín

Para preparar el aserrín que servirá como sustrato para la semilla madre (figura 16 y 17), se mezcla 20% de salvado de arroz u otro suplemento con aserrín seco y se agrega suficiente agua corriente a la mezcla para ajustar la humedad a 45-60% (de la misma manera que cuando se usan granos, la experiencia ayudará a determinar el contenido de humedad. En este caso, la humedad se determina apretando un puño de la mezcla: si no escurre agua entre los dedos y la forma de la mezcla permanece invariable después de aflojar los dedos, entonces contiene de 45-60% de humedad). Posteriormente, se llenan las bolsas de plástico resistentes al calor o las botellas con la mezcla de salvado de arroz-aserrín hasta 2/3 de la capacidad del recipiente y se golpean ligeramente para hacer la masa compacta. Se limpia la boca de la bolsa o recipiente y se tapa con algodón o, en el caso de frascos de boca ancha, se enrosca la tapa. Si se usan bolsas de plástico, se inserta un *cuello* en la parte superior de la bolsa para mantener un tapón de algodón. Después los recipientes se esterilizan a presión por dos horas, se dejan enfriar y se inoculan con grano primario.

Inoculación de la semilla de aserrín con grano primario

Para inocular el sustrato de aserrín que servirá para producir la semilla para siembra, se usa semilla primaria de crecimiento vigoroso, preferiblemente de botella o frasco. La inoculación debe hacerse ya sea en una cámara de transferencia o en una campana de flujo laminar, de manera totalmente aséptica y en la misma forma descrita para la siembra de los granos primarios. Los frascos se agitan y se abren al abrigo de una flama de alcohol, desde donde se vacía una pequeña cantidad de ellos sobre el aserrín estéril (figura 18). Si la semilla madre usada creció demasiado (tres o cuatro semanas) y es difícil de agitar, se usa una aguja o alambre largo estéril para separar los granos antes de la inoculación. Un bote de grano debe ser suficiente para inocular de 20 a 30 botes o bolsas de semilla de aserrín.

Incubación

Los frascos o bolsas inoculadas se incuban a la temperatura apropiada (20-30°C según la cepa de *Pleurotus* spp. empleada) (figura 19). Al contrario de los granos, la semilla de aserrín no se mueve durante todo el período de incubación, pero es regularmente inspeccionada para detectar signos de contaminación con hongos o bacterias. Si la contaminación es detectada, el material se desecha inmediatamente.

Algunos laboratorios usan pequeños palos de madera en botes grandes o frascos para preparar la semilla para siembra. Estos palos-semilla son particularmente útiles en el caso de la tecnología en bolsas de un kilo con aserrín usada en algunos países de Asia.

ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA

En el caso de la semilla primaria, el almacenamiento no es un gran problema porque la misma persona que la prepara la usará para sembrar semilla secundaria. Por lo tanto sabe bien cuánta semilla primaria necesita y cuándo precisará la secundaria. De esta manera, solo preparará la cantidad indispensable.

El problema es en el caso de la semilla para siembra, la cual se transporta a otros lugares cuando es solicitada por los cultivadores de hongos. Además de esto, el productor de semilla a veces produce más semilla de la que empleará. Por ambas situaciones, se hace necesario preservar o prolongar su viabilidad para evitar que se desperdicie.

La semilla, ya sea primaria o secundaria, debe usarse en su máxima vitalidad. En la medida en que la semilla envejece, la tasa de crecimiento del micelio disminuye. Esto es particularmente importante porque la semilla para siembra es utilizada para inocular substratos semiestériles, los cuales requerirán un rápido crecimiento del micelio para evitar las contaminaciones. Si el crecimiento del micelio es lento a causa de la edad o por otra razón, entonces, cualquier organismo presente en el substrato después de la pasteurización crecerá más rápido que la semilla y causará contaminación en el substrato final.

Una opción para disminuir la velocidad de crecimiento del micelio y su envejecimiento es la refrigeración. El micelio puede permanecer dentro de un refrigerador por varias semanas, con lo que se disminuye su crecimiento y por lo tanto la pérdida de vitalidad. El refrigerador deberá estar tan limpio como sea posible y su humedad relativa al mínimo para evitar la condensación dentro del recipiente que contiene la semilla. Antes de utilizarla, deberá permitirse que la semilla, ya sea primaria o secundaria, alcance la temperatura ambiente para que inicie su crecimiento inmediato en el siguiente substrato.

Cantidad de semilla

La cantidad de semilla utilizada no afecta directamente el rendimiento. Sin embargo, el uso de más semilla puede acelerar la colonización en el substrato. En el caso de bolsas con substratos para fructificación que hayan sido pasteurizados por vapor, el adicionar más semilla reducirá el efecto de organismos competidores aún presentes en el substrato. Entre más grande sea la cantidad de semilla, más rápida será la colonización. Como resultado de esto, el crecimiento de los organismos competidores que hayan sobrevivido al proceso de pasteurización se disminuye y el rendimiento será regular.

Para el cultivo de *Pleurotus* spp. una botella de semilla de grano o de aserrín secundario puede inocular 40 bolsas. Cada bolsa de mezcla u otro substrato deberá rendir al menos 200 gramos de hongos frescos (100% de eficiencia biológica, EB) en tres meses de producción.

PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD POR MANEJO DE SEMILLA
POR PRODUCTORES Y CULTIVADORES

La mayor fuente de contaminación para el micelio del hongo en crecimiento es el grano o el sustrato utilizado para preparar la semilla. Sin embargo, con equipo e instalaciones modernas para esterilizar y mantener las condiciones estériles es posible reducir la contaminación por hongos o bacterias hasta 0.1% o menos del número de unidades de semilla. El control de calidad en la elaboración de semilla consiste en la inspección constante para eliminar todas aquellas unidades visiblemente contaminadas o que exhiban diferencias inaceptables en apariencia o en crecimiento.

La semilla de hongo, ya sea preparada dentro de un proyecto familiar casero o en una escala industrial que usa equipo moderno, debe llegar en excelentes condiciones cuando se distribuye a los cultivadores (figura 20). El productor de semilla debe examinar su material en proceso constantemente y desechar bolsas o frascos contaminados (figura 21). Las semillas contaminadas son reconocidas por el diferente crecimiento pigmentado (usualmente verdáceo o negro) que aparece, ya sea en la parte superior o en todo el sustrato. La localización y la apariencia de estos crecimientos indeseables pueden indicar el origen de la contaminación.

Cuando se cultivan hongos a pequeña escala, no es necesario preparar su propia semilla. Generalmente es posible tener acceso a proveedores comerciales de semilla que pueden proveer de la cantidad necesaria. La semilla debe ser solicitada con anticipación para obtenerla en la edad adecuada.

Los productores de semilla deben tener una instalación de prueba donde puedan evaluar las características de producción de cada lote de semilla. Deben visitar a los cultivadores para observar sus problemas directamente, y así los derivados de la producción de semilla sean corregidos con rapidez.

La semilla contaminada, vieja, o sin crecimiento nunca debe ser vendida a los cultivadores, porque generalmente éstos confían en el productor de semilla y si no lo conocen pueden convertirse en víctimas de sus errores, incluyendo sobreproducción. Por lo mismo, ellos deben ser capaces de reconocer una buena semilla y, mejor aún, debieran preparar su propia semilla.

REFERENCIAS

- Oei, P 1991. *Manual on mushroom cultivation*. Tool Foundation, Amsterdam.
- Quimio, T. H., S.T. Chang and D.J. Royse. 1990. *Technical Guidelines for Mushroom Growing in the Tropics*. FAO. Rome.
- Robinson, R.F. y R. Davidson. 1959. The large scale growth of higher fungi. *Adv. in Appl. Microbiol. 1*: 261-278.
- Royse, D.J. 1997. Specialty mushrooms and their cultivation. *Hort. Rev. 19*: 59-97.
- Stamets, P. 1994. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press. Berkeley, CA, USA.
- Stamets, P. and J.S. Chilton. 1983. *The Mushroom Cultivator*. Agarikon Press. Washington, USA.

VIII La preparación del sustrato.

Miguel Ángel Muez Ororbía y José Pardo Núñez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	159
MATERIAS PRIMAS: ALGUNAS FUENTES DE APROVISIONAMIENTO, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CRITERIOS DE SELECCIÓN Y EVALUACIÓN	160
RECORRIDO HISTÓRICO POR LA UTILIZACIÓN EXPERIMENTAL DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS. ALGUNAS FORMULACIONES USUALES	166
MÉTODOS USADOS EN LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO	167
Operaciones preliminares de tipo general	170
<i>Pellets</i> de paja	172
Esterilización y semiesterilización térmica	172
Tratamiento con agua caliente.	
Cocido y lavado de paja	173
Pasteurización	174
Fermentación aerobia	175
Esterilización química	176
Fermentación en el medio natural	177
Fermentación anaerobia o <i>en frío</i>	179
REFERENCIAS	184

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Pleurotus* spp. se encuentran bien representados en la naturaleza y muy ampliamente distribuidos por grandes áreas del planeta a través de numerosas y variadas especies. Es típico de cada una de ellas presentar características propias de adaptabilidad a las fuentes nutritivas disponibles y a la climatología del lugar.

Las diferentes especies naturales de *Pleurotus* actúan principalmente como saprófitas al crecer y fructificar directamente sobre troncos de madera. La base de tal facilidad de desarrollo estriba en la capacidad oxidativa e hidrolítica que les confiere la secreción de un amplio espectro de enzimas, los cuales actúan con alta especificidad sobre las estructuras lignocelulósicas predominantes en esos medios (Rajaratnam y Bano, 1987).

Observada esta característica natural, y dada la abundancia de numerosas fuentes o recursos lignocelulósicos, en cierto momento resultó evidente plantearse la posibilidad de elaborar sustratos artificiales para obtener estos hongos fuera del entorno natural. Tales momentos ocurrieron hacia finales de los años cincuenta y a lo largo de la década de los sesenta cuando en algunos países centroeuropeos (Hungría, Checoslovaquia, Suiza, etc.) y asiáticos (India), así como en Norteamérica, comenzó a detectarse un interés incipiente por estos hongos. Al observarse que la demanda superaba las producciones aisladas que obtenían por entonces algunos aficionados, bien por vía natural o por cultivo artesanal sobre troncos de madera inoculados, comenzó a desarrollarse un notable interés científico por la obtención de sustratos artificiales a escala de laboratorio. De esta manera se continuó con los intentos muy aislados de las primeras décadas del siglo pasado.

Tras estas iniciativas, ya en la década de los setenta, el cultivo de *Pleurotus* spp. experimentó un notable impulso en los países pioneros y comenzó a expandirse a otros. En el transcurso de los últimos veinte años, la expansión e implantación de esta actividad no ha cesado de evolucionar a un ritmo importante de crecimiento permanente por todo el mundo. Como consecuencia de ello, el cultivo de los hongos *Pleurotus* spp. se ha encaramado con rapidez al tercer lugar de las cifras de producción mundial de hongos comestibles cultivados, tras el histórico *A. bisporus*, que cuenta con más de tres siglos de trayectoria productiva, y el shiitake.

Tal grado de expansión ha ido en paralelo a una activa labor de investigación en todas las ramas de esta especialidad, pero de manera singular en lo que respecta a la preparación de sustratos artificiales de cultivo. Si bien la investigación no ha propuesto todavía ese *mejor método* que garantice la obtención de un sustrato altamente selectivo y específico para el desarrollo del *Pleurotus* spp., hoy en día, aunque con diferente grado de seguridad, se dispone de más de media docena de técnicas de elaboración de sustratos. La elección de cualquiera de ellas puede obedecer a una serie de razones específicas para cada situación; aunque tal decisión se suele basar por lo general, en la

adaptabilidad de la técnica elegida a las pretensiones profesionales de la iniciativa, las que pueden ir desde aquellas de carácter artesanal o de proporciones modestas de producción hasta las que suponen planteamientos de gran envergadura industrial y comercial.

MATERIAS PRIMAS: ALGUNAS FUENTES DE APROVISIONAMIENTO, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CRITERIOS DE SELECCIÓN Y EVALUACIÓN

Numerosas actividades agrícolas, agroindustriales y forestales a lo largo y ancho de todo el mundo están basadas en el sistema de producción continua de cantidades ingentes de biomasa vegetal que es la fotosíntesis. Durante el desarrollo de las actividades productivas de la mayoría de los cultivos agrícolas, así como en las industrias basadas en algunos de esos cultivos, se generan de manera colateral grandes cantidades de materiales que, por lo general, tienen la consideración de subproductos de la actividad central y carecen de importancia económica. Dentro de la amplia gama de estos subproductos agrícolas o agroindustriales predominan los de naturaleza lignocelulósica.

Los materiales elegibles para ser utilizados en la preparación de substratos para cultivo de *Pleurotus* spp. deben poseer, de partida, el mayor y mejor número posible de propiedades positivas tales como:

- Buena disponibilidad en cantidad y continuidad
- Buen conocimiento de sus características físico-químicas
- Regularidad en su composición físico-química
- Precio ventajoso de adquisición
- Localización fácil y cercana
- Facilidad de transporte y manejo

A continuación se realiza un recorrido por las actividades agrícolas y agroindustriales más comunes por todo el mundo con el fin de destacar algunos de los materiales residuales más interesantes que generan. Se adjunta la composición físico-química elemental de cada uno de los materiales consignados con el fin de poder establecer una clasificación y unos criterios de evaluación sobre su naturaleza nutritiva potencial a la hora de emplearlos en la preparación de substratos

Se ha seguido la técnica analítica global Weende como conjunto de procedimientos que proporcionan porcentualmente los componentes generales de la materia seca: proteína, grasa, minerales y carbohidratos totales. Se menciona brevemente cada uno de los procedimientos, sin detallarlos, por ser bien conocidos: el porcentaje de *nitrógeno total*, por el método Kjeldahl (la expresión $N \times 6.25$ proporciona el tanto por ciento de proteína bruta); el porcentaje de *grasa bruta*, por el método de arrastre de la grasa con éter dietílico; el porcentaje de minerales o *cenizas brutas*, a través de la calcinación de

la muestra seca a 540°C; y, finalmente, los carbohidratos totales se determinan como dos fracciones: el porcentaje de *fibra bruta*, como la diferencia de pesos entre el residuo de muestra seca tras el tratamiento en caliente con ácidos y álcalis diluidos y el de su calcinación en relación a la materia seca original, y el *extracto libre de nitrógeno*, como el cálculo numérico que sumado a los porcentajes de las determinaciones anteriores, completa el cien por ciento de la materia seca. Se asume que la materia orgánica es la resultante de descontar a la materia seca el contenido de cenizas. Para obtener el cálculo de la relación C/N se ha aplicado la expresión $C (\%) = 0.58 \times \text{materia orgánica} (\%)$.

Los datos analíticos físico-químicos que se adjuntan han sido realizados en el CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, España) y reflejan los valores medios o más frecuentes que se han encontrado en los materiales analizados. Se toma en cuenta la mayor o menor variabilidad que puede darse en muchos casos según variedad, forma y condiciones de cultivo, manipulaciones posteriores, etc., las cifras que se aportan tienen una intención orientativa. Cuando los datos analíticos consignados proceden de otra fuente, se hace la cita correspondiente.

El principal grupo de materias primas de base o de volumen utilizados en la elaboración de sustratos para las diferentes especies de *Pleurotus* lo forman las pajas de cereales recogidas en los rastrojos tras el cosechado de los granos. Las pajas son un material de fácil disponibilidad en cualquier parte, dado que el cultivo de cereales está implantado por todo el mundo de manera generalizada. Son materias con un alto predominio de lignocelulosa y con un contenido en nitrógeno por debajo del 1%. Aunque suele ser corriente emplear la paja de cereales como ingrediente único o en mezclas de dos o más pajas diferentes, también suele ser habitual utilizar algún otro material orgánico de mayor contenido en nitrógeno como aditivo enriquecedor para elevar ligeramente el contenido global de nitrógeno y rebajar en parte la relación C/N. En la tabla 1 se adjunta la composición química de las principales pajas de cereales.

Tabla 1. Composición química de la paja de algunos cereales (% sms)

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Paja de trigo	93.4	0.47	1.4	38.9	50.1	6.6	115.2
Paja de cebada	94.4	0.46	1.6	41.8	49.8	5.6	119.0
Paja de centeno	96.0	0.56	1.7	42.8	48.1	4.0	99.4
Paja de avena	92.5	0.58	1.8	31.1	56.0	7.5	92.5
Paja de maíz	93.2	0.57	1.4	40.5	47.7	6.8	94.8
Zuro de maíz	95.9	0.78	0.8	30.3	59.9	4.1	71.3
Paja de arroz	84.3	0.69	1.9	35.7	42.4	15.7	70.8
Tallo de sorgo	93.1	1.11	2.6	33.6	49.9	6.9	48.6

sms: sobre materia seca.

Fuente: CIES.

Otro grupo interesante de materiales de base corresponde a los tallos, hojas o restos de cultivos de plantas destinadas a un uso o aprovechamiento industrial (algodón, colza, girasol, tabaco, lino, kenaf) o derivados de cultivos de algunos frutos (sarmiento de vid, raspón de uva, hojas de platanera). Los carrizos o juncos y el jacinto de agua, que crecen espontáneamente, así como los residuos de la caña de azúcar en el campo, proporcionan también buena materia para elaboración de substratos. Estos materiales presentan un alto predominio en lignocelulosa y un contenido en nitrógeno, en general, ligeramente superior a las pajas de cereales, lo que les hace también bastante aptos para ser empleados individualmente o en mezclas. En el caso concreto del residuo de caña de azúcar, con un bajo contenido de nitrógeno, es necesario algún tipo de suplemento enriquecedor. El precio de estos materiales suele ser muy bajo o incluso gratuito. La tabla 2 contiene la composición analítica de algunos de estos materiales.

Tabla 2. Composición química de algunos restos lignocelulósicos de cultivos para uso industrial o de plantas espontáneas (tallos, hojas, etcétera) (% , sms)

Material	Materia	N	Grasa	Fibra	Extracto	Cenizas	C/N
	orgánica	total	bruta	bruta	libre de N		
Paja de colza	96.1	0.73	—	52.3	—	3.9	76.3
Paja de soja (1)	94.3	0.72	1.2	46.3	42.2	5.7	76.0
Paja de lino (1)	92.4	1.24	3.5	45.8	35.5	7.6	43.2
Paja de algodón (1)	95.5	1.01	1.0	47.6	40.6	4.5	54.8
Residuo de caña de azúcar (2)	92.0	0.35	—	—	—	8.0	128.0
Carrizo o junco fresco (3)	88.1	1.24	2.8	38.8	38.8	11.9	41.2
Hojas de plátano (3)	92.4	2.37	3.1	21.4	53.1	7.6	22.6
Tallos de girasol	92.4	0.41	0.6	49.2	40.0	7.6	130.0
Vásillo de girasol	83.2	1.05	0.6	19.9	56.1	16.8	45.2
Hojas de tabaco	79.2	3.53	—	14.6	—	20.8	13.0
Kenaf	94.3	0.75	1.1	40.8	47.7	5.7	72.9
Jacinto de agua (4)	83.4	1.74	—	18.0	—	16.6	27.8
Sarmiento de vid	96.8	0.71	0.9	49.0	42.5	3.2	79.1
Raspón de uva	93.2	1.03	0.7	32.1	53.9	6.8	52.5

Fuente. CIES, excepto: (1) Stamets y Chilton, 1983; (2) Klibansky et al., 1993; (3) Piccioni, 1970 y (4) Sharma et al., 1996.

Un tercer grupo de materiales aprovechables en el cultivo de *Pleurotus* spp. lo constituyen varios subproductos derivados de algunas agroindustrias como las oleaginosas, las destilerías, las azucareras y otras más. Tales subproductos suelen ser cascarillas de semillas, harinas, tortas, orujos, pulpas o bagazos.

Las industrias extractivas de aceites de semillas oleaginosas proporcionan una serie de materiales muy variados. En los casos en que la industria realiza un descorticado previo de la semilla para mejorar el rendimiento en aceite, se proporcionan como subproductos las

cascarillas, los cuales son materiales de gran interés, solos o en combinación, como sustratos para *Pleurotus* spp. Destacan las de algodón, girasol y cacahuate, de precio muy moderado.

Tras la extracción por disolventes, los residuos de las semillas oleaginosas son harinas prácticamente agotadas de grasa (1-2%), en general muy ricas en proteínas (30-50%) y pobres en celulosa (5-15%). Cuando las semillas sufren un proceso de extracción a presión, se obtienen unas tortas oleaginosas con un contenido proteínico algo menor y un contenido en celulosa y grasa ligeramente mayor que las harinas. Tanto las harinas como las tortas son materiales muy cotizados en alimentación ganadera y, por ello de poco interés económico como ingredientes directos para sustratos de *Pleurotus* spp. Por esta razón no se han adjuntado datos analíticos detallados. Algunas de estas harinas (girasol, algodón, soja), aplicadas en polvo como suplemento a un sustrato (paja de arroz) tras la colonización del *Pleurotus* spp., han incrementado los rendimientos entre un 50 y 100% en comparación con el sustrato no suplementado (Bano *et al.*, 1993).

Mencionada aquí la práctica de la suplementación con materiales ricos en nitrógeno y carbohidratos sobre sustratos colonizados, hay que decir que tal práctica no está exenta de riesgos. Entre los más importantes están la posibilidad de favorecer el desarrollo de microorganismos competidores, así como la de ocasionar incrementos peligrosos de temperatura en el sustrato, no siempre fáciles de controlar si no se dispone de medios adecuados. Estos problemas disminuyen cuando la práctica de la suplementación se lleva a cabo con nutrientes de *liberación retrasada*, es decir, disponibles una vez que el micelio ha colonizado totalmente el sustrato. Con ellos se pueden lograr incrementos de rendimiento muy significativos (Royse y Schisler, 1987; Royse y Bahler, 1988).

Una notable singularidad en el aprovechamiento de harinas de semillas oleaginosas en sustratos de *Pleurotus* spp. es la pepita o semilla de uva. Esta semilla se obtiene cuando la industria de alcohol etílico de orujo de uva la separa de los hollejos y del raspón, una vez agotados tras la destilación. El precio de esta semilla es bastante asequible, y cuando se ha molido muy finamente proporciona una harina untuosa al tacto, con un contenido muy importante de grasa (11-15%, de la cual el 70% es ácido linoleico) y fibra (50-60%), y un interesante contenido en nitrógeno (1.9%). En España, Gurelan S.C. ha acreditado un buen funcionamiento de la combinación paja de trigo o cebada más harina *entera* de pepita de uva, y carbonato cálcico como neutralizante. Si se utiliza el material *agotado* de la industria extractiva de aceite, esta harina de pepita de uva es mucho más pobre en grasa (1-2%), pero interesante por su alto contenido en fibra (50%). Además, su precio de compra le hace muy económica.

Los residuos agroindustriales como la pulpa de café y los bagazos de maguey tequilero y caña de azúcar serán tratados en el apartado de fermentación en el medio natural.

Los residuos de algodón, cascarilla de arroz y los orujos de uva y de aceituna también poseen un notable interés, solos o en combinación, especialmente los primeros.

La tabla 3 muestra datos analíticos de varios de los materiales mencionados. En general, se caracterizan por poseer un contenido de nitrógeno superior a los grupos anteriores, entre 1-2%, una buena proporción de lignocelulosa, y un moderado pero interesante contenido en grasa, el cual es un principio nutritivo casi ausente en los otros grupos anteriores. Prácticamente todos ellos funcionan bien individualmente como substrato, especialmente en formato de envases pequeños.

Tabla 3. Composición química de algunos subproductos agroindustriales (% sms)

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Bagazo de caña de azúcar (1)	97.5	0.18	0.4	51.9	44.0	2.5	314.2
Pulpa de café	—	0.59	—	—	—	—	—
Magüey (2)	91.1	0.36	2.8	32.4	53.6	8.9	146.8
Residuo de algodón	86.9	1.29	1.5	52.8	24.5	13.1	39.1
Cáscara de semilla de algodón	97.0	1.00	3.1	47.0	40.6	3.0	55.7
Cáscara de cacao (3)	92.2	2.79	5.3	16.1	53.3	7.8	19.2
Cáscara de girasol	96.1	0.96	3.4	53.4	33.3	3.9	58.0
Cáscara de cacahuete (3)	92.4	2.44	9.7	26.3	41.2	7.6	22.0
Cascarilla de arroz (4)	82.5	0.63	1.3	48.1	29.2	17.5	75.9
Semilla de uva (harina íntegra)	96.9	1.92	13.2	58.9	12.8	3.1	29.3
Semilla de uva (harina desgrasada)	96.3	1.87	1.3	49.6	33.7	3.7	29.9
Orujo de uva (alcoholería) (hollejo + raspón)	93.2	1.93	4.9	26.7	49.5	6.8	28.0
Orujo de uva (alcoholería) (hollejo + raspón + semillas)	95.1	1.87	8.6	28.6	46.2	4.9	29.5
Orujillo de aceituna (agotado)	97.7	0.85	1.0	56.5	34.9	2.3	66.7
Orujillo de aceituna (no agotado)	93.2	1.06	6.9	47.6	32.1	6.8	51.0

Fuente: CIES, excepto: (1) Stamets y Chilton, 1983; (2) Flores, 1975; (3) Piccioni, 1970 y (4) González et al., 1987.

Los henos procedentes de praderas naturales o derivados de gramináceas (festuca, poa, vallico) o leguminosas (trébol, esparceta, alfalfa) son materiales que pueden ser empleados formando parte de mezclas pajosas. En aquellas latitudes donde estos materiales son abundantes y espontáneos representan una fuente muy interesante por aprovechar. En otras circunstancias pueden ser materiales un poco caros. La tabla 4 recoge sus características analíticas generales.

Las pajas de leguminosas (guisante, judías, veza, garbanzo, etc.) constituyen materiales de características bastante próximas a los henos anteriormente descritos. El aprovechamiento en ganadería hace que sus precios puedan resultar a veces un poco caros. La tabla 5 refleja la composición química de estas pajas.

Tabla 4. Composición química de algunos de los henos más comunes (% sms)

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Pradera natural	93.0	1.76	1.5	35.5	45.0	7.0	36.0
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	91.1	2.69	3.7	38.5	32.1	8.9	19.6
Festuca de los prados (<i>F. eliator</i>)	91.7	1.29	2.2	35.1	46.4	8.3	41.2
Fleo (<i>Phleum pratense</i>)	94.4	1.46	2.3	34.3	48.7	5.6	37.5
Gramma (<i>Dactylis glomerata</i>)	91.2	1.37	2.4	34.7	45.5	8.8	38.6
Poa de los prados (<i>Poa pratensis</i>)	92.8	2.11	2.8	28.1	48.7	7.2	25.5
Trébol rojo (<i>Trifolium incarnatum</i>)	91.3	2.36	2.8	32.0	41.7	8.7	22.4
Trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>)	91.3	2.74	4.1	28.0	42.1	8.7	19.3
Vallico (<i>Lolium perenne</i>)	91.5	1.60	2.7	30.5	48.8	8.5	33.2
Esparceta (pipirigallo) (<i>Onobrychis sativa</i>)	92.7	2.50	2.9	35.4	38.8	7.3	21.5

Fuente: Piccioni, 1970.

Tabla 5. Composición química de las pajas de leguminosas (% sms)

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Paja de guisantes (<i>Pisum sativum</i>)	94.4	1.55	2.0	47.2	35.6	5.6	35.3
Paja de haba (<i>Vicia faba</i>)	93.0	1.92	1.9	44.2	35.0	7.0	28.1
Paja de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	92.7	1.32	1.8	36.6	46.0	7.3	40.7
Paja de lenteja (<i>Lens esculenta</i>)	91.9	2.66	2.1	40.6	32.6	8.1	20.0
Paja de veza (<i>Vicia sativa</i>)	93.1	1.62	2.2	47.0	33.8	6.9	33.3
Paja de altramuz (<i>Lupinus spp.</i>)	95.3	1.23	1.6	49.3	36.8	4.7	44.9
Paja de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	94.5	1.54	2.0	48.5	34.5	5.5	35.6

Fuente: Piccioni, 1970.

La molinada industrial de los granos de cereales proporciona algunos subproductos como los salvados. Estos materiales son de notable interés para integrarse en cantidades discretas en ciertas formulaciones o mezclas de sustratos, porque las enriquecen ligeramente de nitrógeno y les aportan grasa y fibra. Es posible que el precio sea un inconveniente cuando se cotizan en alimentación animal. La tabla 6 adjunta la composición analítica de estos salvados.

Los serrines de árboles de madera *blanda* (álamo, chopo, sauce, tilo, abedul) o de madera *dura* (encina, haya, arce, fresno) suelen ser aprovechados para cultivo de *Pleurotus* spp. en algunas latitudes en los que éstos son de adquisición fácil y económica. Cuando la elaboración del sustrato se basa en la utilización de serrines, materiales muy pobres en nitrógeno y con una elevada relación C/N, es muy frecuente recurrir al uso de salvados de cereales (arroz, trigo, etc.) para equilibrar nutritivamente el sustrato.

Tabla 6. Composición química de algunos salvados de cereales (% , sms)

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Salvado de trigo	92.9	2.57	4.9	14.1	57.9	7.1	21.0
Salvado de centeno	94.6	2.69	4.3	7.4	66.1	5.4	20.4
Salvado de cebada	94.1	2.17	3.6	15.4	61.6	5.9	25.2
Salvado de avena	93.5	1.33	3.6	22.4	59.2	6.5	40.8
Salvado de arroz (entero)	88.5	2.32	18.3	11.8	43.9	11.5	22.1
Salvado de arroz (desgrasado)	87.8	3.17	3.0	13.1	51.9	12.2	16.1
Salvado de maíz	97.3	1.74	8.2	9.8	68.5	2.7	32.4

Fuente: Piccioni, 1970.

RECORRIDO HISTÓRICO POR LA UTILIZACIÓN EXPERIMENTAL DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS. ALGUNAS FORMULACIONES USUALES

El comienzo y posterior desarrollo del cultivo profesional de *Pleurotus* spp. se relaciona con una serie de trabajos experimentales sobre la utilización de diferentes materiales como sustratos de cultivo. Tales experiencias comenzaron a tener carta de continuidad a finales de la década de los cincuenta.

En la tabla 7 se expone una cronología bibliográfica de algunas de esas experiencias con el fin de presentar una idea de la diversidad y amplitud de materiales utilizables hoy en día en la elaboración de sustratos para cultivar *Pleurotus* spp. Para cada una de las citas, se hace referencia al nombre vigente de la especie de *Pleurotus* cultivada (entre paréntesis el nombre que menciona el trabajo citado), el tipo de sustrato utilizado, los rendimientos obtenidos y el autor o autores de la experiencia. Para expresar los rendimientos o productividad de un sustrato, el concepto más generalmente aceptado es la eficiencia biológica, que es la relación, en porcentaje, entre el peso fresco de hongos producidos y el peso seco de sustrato empleado. La calidad productiva de un sustrato se percibe como aceptable a partir de eficiencias biológicas de 50% (Patra y Pani, 1995).

En Europa, algunos de los principales países productores han desarrollado formulaciones estándar muy ligadas a los materiales propios de estas áreas, con destacado protagonismo de las pajas de trigo, cebada y maíz (cañas o zuros), ocasionalmente enriquecidos con algunas harinas protéicas (alfalfa, soja, plumas).

- En Italia, Ferri (1985) recomienda que el contenido de N del sustrato esté comprendido entre el 0.6 y 1.2% de la materia seca total, y expone una amplia muestra de combinaciones aplicadas al cultivo de *P. ostreatus*:

Paja de trigo (50%) + Zuro de maíz (50%)

Paja de trigo (60%) + Zuro de maíz (40%)

Paja de trigo (50%) + Zuro de maíz (40%) + Serrín de chopo (10%)
Paja de trigo (85%) + Cascarilla de arroz (15%)
Paja de trigo (90%) + Harina de soja (10%)
Paja de trigo (80-90%) + Harina de alfalfa (20-10%)
Paja de trigo (100%)
Zuro de maíz (100%)

- En Francia, Laborde (1989) propone la siguiente combinación para *P. ostreatus*:

Paja de cebada 250 kg
Yeso agrícola 25 kg
Harina de plumas (13 % N) 7.5 kg
Agua 718 L
Benlate 300 gr

- En Hungría, el uso de variedades híbridas de *Pleurotus* spp., da muy buen resultado con el siguiente sustrato:

Zuro de maíz (triturado, 1-2 cm)
Harina de plumas (0.5%)
Carbonato cálcico (1%)

- En Estados Unidos, los ingredientes básicos para sustratos de *Pleurotus* spp. son combinaciones de paja de trigo (70%) y zuro de maíz (30%) (Royse y Schisler, 1987), así como paja de trigo, cascarillas de semilla de algodón o mezclas de ambos (Royse, 1997).

MÉTODOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DEL SUBSTRATO

El sustrato para el cultivo del champiñón *A. bisporus* es un tipo especial de composta que se obtiene a través de un proceso fermentativo de materiales lignocelulósicos activado con fuente de nitrógeno que le proporciona al hongo una *selectividad química* (con contenidos finales de N= 2-3% y C/N= 16-19) y una *selectividad biológica* (con un contenido rico de una microflora de bacterias, actinomicetos y hongos termófilos).

Por analogía con este proceso, se ha intentado producir empíricamente sustratos para el cultivo de *Pleurotus* spp. utilizando el mismo procedimiento y las mismas materias primas. Aunque a veces ha funcionado, este sistema proporciona bastantes fracasos. En la actualidad se sigue estudiando para optimizarlo. Por ejemplo, Villa *et al.* (1999) lograron obtener eficiencias biológicas del 68-72% al preparar una mezcla 1:1 de olote de maíz y pulpa de café, a la cual adicionaron 2% de cal y sometieron a un composteo de siete días. Una mezcla adicional preparada por composteo también durante siete días y

que ha dado mejores resultados (EB= 125%) es la de paja 70% y pulpa de café 30% (G. Huerta. *Com Pers*). En ambos casos se agregó 2% de cal a la mezcla y se ajustó la humedad del sustrato a 70% al inicio del composteo.

A diferencia, de *A. bisporus*, las especies del género *Pleurotus* no exigen un sustrato con selectividad química, ya que puede crecer en medios nutritivos con una relación C/N comprendida en un rango amplio de valores de, al menos, entre 30 y 300. Sí necesita en cambio una selectividad biológica. La flora acompañante, cuando existe, debe ser protectora y no competidora de *Pleurotus* spp. (Muez, 1994).

Por todo lo indicado anteriormente, se comprende que con una relación C/N tan versátil, casi cualquier subproducto vegetal, o combinaciones de dos o más de ellos, es utilizable para el cultivo de *Pleurotus* spp.

A la vista de todo esto, la preparación de sustrato para cultivo de *Pleurotus* spp. se ha venido abordando desde muy diversos métodos en la no muy larga historia de esta especialidad. La elección de cualquiera de esos métodos suele estar relacionada, en principio, con los fines de la actividad, bien sean científicos o comerciales. Dentro de los fines comerciales, hay que considerar la dimensión de la iniciativa que se pretende, para lo cual se puede elegir desde procedimientos sencillos y económicos, de índole puramente manual o artesanal, hasta aquellos que pueden llegar a suponer unos niveles tecnológicos de cierta sofisticación y unas inversiones económicas elevadas.

Tabla 7. Algunos ejemplos de especies de *Pleurotus* y sustratos de cultivo, con expresión de su eficiencia biológica

Especie*	Sustrato	E.B (%)	Referencia
<i>P. ostreatus</i>	Serrín resinoso	37.0	Block <i>et al.</i> (1958)
	Harina de avena (5%)		
	Cascarilla de arroz	38.0	
<i>P. ostreatus</i>	Harina de avena (2%)		Kalberer (1974)
	Paja (93%)	113.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)	Hierba de pasto (harina) (7%)		Jandaik y Kapoor (1974)
	Hojas de platanera	123.2	
	Harina de avena (2%)		
	Hojas de platanera	114.0	
	Paja de arroz	89.0	
<i>P. ostreatus</i>	Harina de avena (2%)		Hashimoto y Takahasi (1974)
	Paja de arroz	86.8	
	Paja de arroz	79.2	
	Papel de periódico	75.2	
	Cascarilla de arroz	56.1	
	Serrín de pino (suplementados con salvado de arroz)	44.8	

Especie*	Sustrato	E.B (%)	Referencia
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Residuos de algodón	63.5	Leong (1982)
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Magüey tequilero (no fermentado)	65.0	Guzman-Dávalos <i>et al.</i> (1987)
<i>P. ostreatus</i>		60.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)	Paja de arroz	108.0	Madan <i>et al.</i> (1987)
	Paja de arroz (50 %)	105.0	
	Tallo de mora (50 %)		
	Tallo de mora	101.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)	Cascarilla de cacahuete	120.0	Bahukhandi y Munjal (1989)
<i>P. sapidus</i>		114.0	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)		100.0	
<i>P. ostreatus</i>		92.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)	Residuo de algodón	145.0	Kulkarni (1989)
<i>P. sapidus</i>		104.0	
<i>P. ostreatus</i>		97.0	
<i>P. citrinopileatus</i>		88.0	
<i>P. djamor</i> (<i>P. flabellatus</i>)		82.0	
<i>P. eous</i>		79.0	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Pulpa de café (5 días fermentada)	175.8	Martínez-Carrera (1989)
<i>P. ostreatus</i>		159.9	
<i>P. opuntiae</i>		143.8	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)		128.1	
<i>P. ostreatus</i>	Bagazo de caña de azúcar (50%)	96.9	Martínez-Carrera <i>et al.</i> (1990)
	Pulpa de café (50%)		
	Bagazo de caña de azúcar (50%)	66.0	
	Paja de cebada (50%)		
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Magüey tequilero (20 días fermentado)	84.0	Soto-Velazco <i>et al.</i> (1991)
<i>P. ostreatus</i>		78.0	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Bagazo de caña de azúcar (66.6%) (15 días fermentado)	105.0	Soto-Velazco <i>et al.</i> (1991)
	Espiga de maíz (33.3 %)		
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. ostreatus x</i>)	Jacinto de agua	60.0 125.7	Klibanski <i>et al.</i> (1993)

Especie*	Substrato	E.B (%)	Referencia
<i>P. pulmonarius</i> (híbrido)	Agroresiduos de caña de azúcar (50%) Jacinto de agua (50%)	103.3	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Agroresiduos de caña de azúcar Fibra de coco (33.3)	52.9 152.2	González <i>et al.</i> (1993)
	Pulpa de café (66.6 %) (mezcla 3 días fermentada)		
	Fibra de coco (50%) Pulpa de café (50%) (mezcla 5 días fermentada)	120.5	
	Fibra de coco (no fermentada)	88.6	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Pulpa de café	170.0	Bermúdez <i>et al.</i> (1994)
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Paja de arroz	84.6	Pani y Mohanty (1998)
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)		83.3	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Paja de arroz (50%) Jacinto de agua (50%)	80.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)		78.3	
<i>P. ostreatus</i> (<i>P. florida</i>)	Jacinto de agua	52.0	
<i>P. pulmonarius</i> (<i>P. sajor-caju</i>)		50.0	

* Nota: Los nombres entre paréntesis indican la especie originalmente citada en cada referencia.

Operaciones preliminares de tipo general

Independientemente del método que se elija para lograr una correcta preparación del sustrato, existen una serie de operaciones de pretratamiento que por lo general, suelen ser comunes a la mayoría de los métodos más empleados.

Al comienzo de la preparación del sustrato para cultivar *Pleurotus* spp. se requiere, por lo general, triturar, moler o picar las materias primas de base (pajas, hojas, henos, tallos). Algunos materiales de volumen procedentes de ciertas agroindustrias (pulpa de café, bagazo de maguey) necesitan ser fermentados previamente para homogeneizarlos, estabilizarlos y, en definitiva, hacerlos más manejables. En cambio, otros materiales (cascarillas de semillas, harinas) pueden ser directamente utilizados tras el suministro, sin necesidad de modificarlos físicamente.

La operación de troceado o picado resulta más eficaz, y se ejecuta con mayor rapidez, con los materiales *en seco*. Es altamente aconsejable que todas las materias primas se encuentren en buen estado. En este sentido, conviene, por ejemplo, desechar pacas de paja demasiado deteriorada, o aquellas que se hayan empacado a alta presión en condiciones húmedas. Otros materiales que estén parcialmente deteriorados o muy contaminados deben ser desechados igualmente. Cuanta más exigencia de calidad se dé en la selección de materias primas, menos problemas de microbiología patológica aparecerán posteriormente.

El tamaño de las partículas y el contenido de agua son dos decisiones primarias que debe tomar el operador, y de cuyo resultado depende el delicado equilibrio que hay que mantener con las tres fases, sólida, líquida y gaseosa, en todo el sustrato. Un tamaño de partículas de 2 a 5 cm y un contenido de humedad en torno al 70-75% son los valores más citados y los que proporcionan la mejor estabilidad y proporciones entre las tres fases comentadas. Además del tamaño recomendado, conviene que las partículas queden desgarradas longitudinalmente. Un tamaño de partícula mayor, sobre todo a partir de 15 cm, no facilitarán una buena integración del agua a añadir, mientras que, por el contrario, si las partículas son de un tamaño muy fino, se corre el riesgo de compactar de manera excesiva el sustrato.

Para tratar de humectar la paja correctamente existen varios sistemas, según el tamaño o tipo de explotación:

- Si la explotación es de tamaño pequeño, resulta eficaz efectuar una inmersión total de la paja en agua durante unas 48 horas, utilizando para ello recipientes de tamaño adecuado a la cantidad de material a manejar. El exceso de agua se drena, y con ello se arrastran algunos materiales solubles que normalmente favorecen el desarrollo de los organismos competidores más habituales.
- Para explotaciones de tamaño mediano o grande se puede optar por varias soluciones, entre otras, las siguientes:
 - * La paja picada se mezcla con agua dentro de un estanque o piscina de muy poca profundidad. Una pala puede ir pisando la paja repetidamente, dos o tres veces por día, para facilitar la absorción del agua. En 1-2 días la paja puede estar bien impregnada.
 - * La paja puede ser humectada utilizando una máquina de hidratación estática conectada a un molino picador. Una vez picada, la paja pasa del molino a un sistema de tornillos sin fin de la máquina hidratadora, y durante el recorrido por dichos tornillos tiene lugar la humectación.
 - * En algunas explotaciones modernas, la humectación de la paja picada se consigue con gran rapidez y eficacia utilizando maquinaria de hidratación al vacío, la cual puede desarrollar cierta energía mecánica para vencer la resistencia natural de las pajas al hidratado.

Pellets de paja

Este procedimiento, extraordinariamente simple, fue iniciado en España por Gurelan S.C. (Muez, 1994). La materia prima está compuesta por pequeños cilindros (2 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro) hechos a base de paja picada y molida, con una máquina granuladora. La confección del gránulo genera altas temperaturas sobre la paja en el momento de ser fuertemente comprimida, por lo que, de hecho, se produce una pasteurización. Un importante requisito de partida es que la paja utilizada para la elaboración del *pellet* sea seca y sana. La paja en forma granulada ocupa muy poco volumen, lo cual facilita su transporte en grandes cantidades.

El cultivador, una vez provisionado de estos *pellets*, tiene que confeccionarse el sustrato de cultivo a través de una hidratación adecuada de este material. Para ello se aconseja la utilización de recipientes amplios en los cuales se realizará el *amasado* de la paja. El tamaño manejable de una operación de este tipo es el empleo de 50 kg de *pellets* y 100 L de agua a la que previamente se le han añadido 3 gr de Benlate (50% de benomyl) con fines protectores contra contaminaciones fúngicas. Cuando la paja está hinchada, se envasa en sacos microperforados de unos 10-12 kg de peso, con una dosis de siembra de un 3% de micelio.

Una alternativa al procedimiento anterior es colocar los *pellets* en un recipiente o pila de plástico con el fondo perforado con agujeros de 3 a 5 mm de diámetro. Una vez colocados, se lleva a cabo el lavado de los *pellets* con agua en régimen continuo hasta que los líquidos salgan claros y limpios. Luego se escurre la masa hidratada y lavada, se prensa hasta dejarla con un contenido de humedad en torno al 70%, se siembra y se ensaca. La eliminación de materiales solubles arrastrados por el lavado disminuye considerablemente los riesgos de contaminación de competidores, de modo que si las operaciones se hacen con una higiene muy estricta podría evitarse el añadido final de fungicida a la masa. El inconveniente de esta variante es su alto consumo de agua, lo que la hace poco viable, a menos que se disponga de ella en suficiencia y a un precio razonablemente económico.

La sencillez de este procedimiento, de una alta componente manual, se presta bien para iniciativas de producción de pequeño o, a lo sumo, mediano tamaño. Aunque la selectividad a *Pleurotus* spp. no es del todo buena, el sustrato funciona, especialmente si la paja es de buena calidad. Como inconvenientes claros hay que citar el precio de los *pellets*, normalmente bastante alto, así como la posible adulteración y contaminación de dichos *pellets* si la empresa fabricante no ha hecho una selección escrupulosa de la calidad de las pajas empleadas. Durante las labores de preparado, siembra y envasado del sustrato es altamente aconsejable extremar los niveles de higiene y limpieza en el recinto, utillajes, etcétera, y emplazar estas operaciones en un área aislada y alejada de focos de contaminación.

Esterilización y semisterilización térmica

La esterilización es uno de los procedimientos que más temprano comenzaron a usarse en la preparación de sustratos para cultivo de *Pleurotus* spp. porque está ligado estrechamente a la investigación y experimentación en este campo.

El procedimiento consta preliminarmente de una preparación *en crudo* del material o mezcla seleccionados. El sustrato, convenientemente picado, hidratado y homogeneizado, se coloca en pequeños contenedores de polipropileno, quedando así dispuesto para que se le aplique el tratamiento térmico. El tratamiento de esterilización generalmente se lleva a cabo en un autoclave, con vapor a 121°C durante una hora o dos según el tamaño del contenedor. Concluida esta operación, y una vez que el material se ha enfriado, se debe realizar la siembra del micelio en condiciones muy asépticas, ya que en esos momentos el sustrato es muy susceptible a la contaminación.

Como se ha comentado, este procedimiento es típico y casi exclusivo de los trabajos de investigación. Resulta muy apto por ejemplo, para conocer de forma preliminar el comportamiento de sustratos a base de materiales (o mezclas) de cierto carácter novedoso, o para comprobar respuestas de diferentes cepas o variedades ensayadas. Comercialmente, la esterilización sólo es rentable en lugares donde estos preparados a pequeña escala se coticen a muy buen precio, a nivel de pequeño capricho gastronómico, o como regalo ornamental y condimentario como ocurre en China y Japón.

Se habla de semiesterilización cuando las temperaturas drásticas de esterilización se rebajan sensiblemente, situándose en niveles inferiores a los 100°C. Esta variante se aplica para cantidades de preparado que superen las dimensiones reducidas de trabajo del sistema de esterilización, ya que el sustrato puede ser alojado y tratado en masa, en el interior de cámaras de varias toneladas de capacidad. El margen de tratamiento de semiesterilización está comprendido aproximadamente entre 70 y 100°C. Si el tratamiento elegido está por la zona de los 70°C, la duración debe ser de 6 a 24 horas, y si las temperaturas que se aplican están por la cota superior (p.e. 95°C) basta con 1 o 2 horas (Ferri, 1985). La semiesterilización elimina los patógenos que puedan portar las materias primas del sustrato, pero no protege de contaminaciones eventuales posteriores. En la actualidad, es una práctica poco utilizada.

Tratamiento con agua caliente. Cocido y lavado de la paja

Es un procedimiento sencillo y práctico, descrito por Kurtzman (1979) de la siguiente manera:

La paja, convenientemente picada y preparada, se somete a un remojo en agua caliente y limpia, a 70-80°C, durante 15 minutos. Se debe realizar un par de lavados o aclarados más con agua caliente, hasta que los líquidos terminen saliendo claros. Este sistema es rápido. Humedece y pasteuriza al mismo tiempo y no necesita ni vapor ni ninguna otra manipulación por separado. Durante el remojado, la paja suele tomar 3-4 veces su peso en agua. Si se utiliza paja de arroz, el agua adquiere una tonalidad café. Los lavados arrastran grandes cantidades de materiales solubles que favorecen el desarrollo de microorganismos contaminantes. Este tipo de tratamiento, no solo pasteuriza la paja sino que elimina nutrientes que podrían perjudicar a *Pleurotus* spp. Una vez escurrida y enfriada a 25°C, la paja se siembra y se envasa. Si las operaciones

de lavado se hacen debidamente, se obtiene una buena selectividad y un rendimiento aceptable. Este es un procedimiento de producción de sustrato de alto consumo de agua y aplicable a niveles artesanales. Como consecuencia, puede resultar caro según las circunstancias.

Una variante de este principio es igualmente aplicable cuando el sustrato de base no sea la paja sino cualquier otro material que no precise o no se le quiera hacer un lavado de materiales solubles. El sustrato, con una estructura física previamente conseguida, se somete directamente a una inmersión en agua caliente. Las temperaturas que habitualmente se citan van desde mínimos de 60°C hasta máximos de 80°C, y los tiempos de tratamiento suelen oscilar entre 30 y 60 minutos. Es normal que a mayor temperatura de tratamiento se mantenga un menor tiempo y viceversa. El escurrido, enfriado, siembra y envasado del sustrato deben ser realizados con rapidez y en un ambiente de gran exigencia higiénica para evitar posibles contaminaciones.

Pasteurización

La pasteurización es uno de los procedimientos más usados y de los primeros que comenzaron a aplicarse con fines comerciales.

Tras las operaciones preliminares de preparado, el sustrato es alojado, en cajas o dispuesto en masa, dentro de una sala o cámara de *pasteurización* similar a las utilizadas en el tratamiento del compost para cultivo del champiñón. Dentro de esta cámara, el sustrato se somete a un tratamiento térmico aerobio con ayuda de vapor.

Las dimensiones más comunes de una cámara de pasteurización comercial suelen ser 3-5 m de ancho, 2.5-3 m de altura, y una longitud variada según el tamaño o las características de la explotación, usualmente entre 20 y 30 m. El espesor de la capa de sustrato en el llenado de la cámara suele ser de 1.5 a 2 m. El ventilador de la cámara debe ser de potencia elevada de modo que proporcione una presión de 90-180 mm de columna de agua y un caudal de servicio de, al menos, 100 m³/t/h durante el tratamiento térmico, y de 200 m³/t/h durante el enfriado (Ferri, 1985).

Los pioneros de este tipo de pasteurización, Zadrazil y Schneiderei (1972), prescribieron un tratamiento de 60 a 100°C durante unas horas. En general, el procedimiento de pasteurización en cámara que se viene llevando a cabo a nivel comercial suele mantener en la masa de sustrato unas temperaturas comprendidas entre 60 y 80°C durante unos tiempos que suelen variar entre 6 y 12 horas.

La pasteurización así realizada no proporciona una protección natural del sustrato contra las contaminaciones fúngicas, especialmente si se trata de *Trichoderma* spp. Por esta razón, en este procedimiento se ha ido imponiendo como complemento el uso de fungicidas para conseguir una cierta protección artificial. En los últimos tiempos ha sido práctica normal incorporar un fungicida (p.e., Benlate, en dosis de 150 g de producto comercial

por tonelada de sustrato), distribuido homogéneamente por la masa antes de comenzar el tratamiento de pasteurización.

Una variante de la técnica de pasteurización es un procedimiento xerotérmico (Lelley y Janssen, 1993), muy practicado en Hungría, que describimos brevemente a continuación: la paja, generalmente de trigo, bien troceada, se introduce en seco dentro de un pequeño túnel o cámara de tratamiento (no mayor de 25 m³). Dentro del túnel, el tratamiento térmico consiste en proporcionar unos 100°C a la masa de paja seca durante una hora. Acabado el tratamiento, la paja es conducida por medio de tornillos sin fin hacia el punto de siembra y envasado. Durante el recorrido, la paja es hidratada adecuadamente enfriándose al mismo tiempo. Este tratamiento no protege al sustrato contra el ataque de los competidores, por lo cual, durante el añadido del agua a la paja, se le aporta unas 100-200 ppm de benlate.

Fermentación aerobia

Es un procedimiento de preparación de sustrato que profundiza en el sistema anterior de la pasteurización simple. Trata de reforzar la escasa protección que posee frente a las contaminaciones sin necesidad de recurrir al uso de fungicidas. Este procedimiento supone la realización de dos etapas consecutivas: la pasteurización convencional y una fermentación termófila de acondicionamiento.

La intensidad de las temperaturas aplicadas en el sustrato y el tiempo de tratamiento en cada una de las etapas están bien lejos de la unanimidad. Debido a ello, esta técnica se aplica con diferentes variaciones: Ferri (1985) propone varios ciclos: a) subida de la temperatura de la masa, en 6-12 horas, hasta 60-65°C y mantenerla 24 horas, para continuar después con un rango de 50-55°C (48-72 h), y finalmente enfriar a lo largo de 6 horas; b) subida de la temperatura del sustrato hasta cerca de 70°C (2 h) y luego un mantenimiento de 55°C (72 horas), para terminar con un enfriamiento de una duración en torno a las 12 horas; y c) subida a 68-70°C y mantenimiento de este nivel térmico durante 12 horas, seguido de una reducción a 50-55°C (24 horas), y finalización del proceso con un enfriamiento hasta 25°C. Olivier *et al.* (1991) hablan de una pasteurización *larga* en la que el tratamiento de desinfección es de 60°C durante algunas horas, seguido de un mantenimiento posterior de 50°C durante varios días.

La base de la protección biológica del sustrato está en la conducción adecuada de una fermentación bacteriana tras la pasteurización. Los fundamentos de esta forma de operar se dieron a conocer por primera vez por medio de la técnica HTTV, registrada en Hungría en 1970 y patentada en Francia en 1971 (Heltay, 1986). Gyurko (1979) analizó y valoró microbiológicamente sustratos de *Pleurotus* spp. y señaló que la acción preservadora contra los mohos se desarrolla en el sustrato como consecuencia de la actividad de las bacterias termófilas, las cuales consumen carbohidratos fácilmente disponibles y producen, además, antibióticos contra tales mohos. Examinando la multiplicación de bacterias en diferentes capas del sustrato durante el tratamiento térmico, concluyó

que la multiplicación de bacterias termófilas, y por lo tanto su efecto protector, depende en gran manera del grado de aireación del sustrato. El mecanismo de la selectividad lo protagonizan bacterias del género *Bacillus* (*B. macerans*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. polymyxa*, etc.), particularmente activas y eficaces (Flick, 1982). Stanek y Bis'ko (1982) observaron que la adición de *B. macerans* a los sustratos antes de la fermentación da como resultado un descenso de la influencia negativa de mohos contaminantes (p.e. *Trichoderma* spp.) y un incremento de los rendimientos de *P. ostreatus* de 30-100%. Mas recientemente, Stölzer y Grabbe (1991) han vuelto a tratar los contenidos esenciales de la fermentación bacteriana como mecanismo para obtener la selectividad biológica de un sustrato. El principio del tratamiento del sustrato consiste en un control sofisticado de la sucesión microbiológica, de tal manera que la preparación del sustrato debe ser interrumpida, para proceder a sembrarlo, en el momento exacto en que se da una composición óptima de nutrientes para *Pleurotus* spp. Debido a la complejidad de los procesos bioquímicos implicados, los resultados que se obtienen, por ejemplo, con un tipo de pajas, no son extrapolables cuando se dispone de otras pajas diferentes u otros materiales.

En España, la aplicación de estos fundamentos por parte de Gurelan S.C. a un procesado específico de paja de trigo suplementada con harina de semilla de uva está dando muy buenos resultados en una planta de Cuenca que está produciendo 20.000 t/año de sustrato. El procedimiento, en la actualidad, está pendiente de patente.

Esterilización química

Es un procedimiento de protección del sustrato para *Pleurotus* spp. llevado a cabo a nivel experimental por Vijay y Sohi (1987), en la India. Se basa en la aplicación de algunos productos químicos de poder fungicida durante su preparación. La iniciativa pretendía estudiar el añadido de tales productos a la paja de trigo y ver su grado de eficacia en cuanto a la incidencia de los diferentes hongos parásitos y competidores más habituales, así como su efecto en el rendimiento de *P. pulmonarius*. Su objetivo final era obtener un procedimiento que pudiera sustituir adecuadamente al costoso, aparatoso y no siempre seguro sistema de tratamiento de pasteurización con vapor.

Los productos fungicidas ensayados fueron Bavistin (50% de carbendazima) y Formalina (35% de formaldehído), los cuales se aplicaron individualmente, a diferentes concentraciones, o combinados, también a diferentes concentraciones. En total se llevaron a cabo 13 ensayos incluyendo entre ellos dos controles con paja pasteurizada (80°C, 2 h) y no pasteurizada (remojada durante una noche en agua). En tres de esos ensayos se añadió Blitox (oxiclورو de cobre).

La paja de trigo fue puesta a remojo durante 18 horas en cada una de las soluciones de concentración programada. Tras el drenaje de exceso de solución, la paja fue sembrada con semilla en cantidad de 2% de su peso fresco. El envasado fue en sacos de polietileno perforado, quedándose ajustada la humedad en 75% para todos los tratamientos.

Tabla 8. Efecto del remojo de paja de trigo en algunas soluciones fungicidas sobre la calidad de la colonización y el rendimiento de *P. pulmonarius*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Calidad de la colonización	Días de entrada en producción	Eficiencia biológica(%)
Formalina	500	excelente	20	66.6
Bavistin	75			
Formalina	1,000	excelente	21	60.0
Bavistin	75			
Formalina	1,000	buena	21	53.28
Bavistin	50			
Blitox	100			

Se estudió y se valoró la microflora de todos los sustratos, así como el grado de calidad de la invasión del micelio, la precocidad o tiempo de entrada en producción y la eficiencia biológica. Los datos de rendimientos se registraron durante 30 días de periodo productivo.

En los 13 tratamientos ensayados, lógicamente hubo notables diferencias en cuanto a la incidencia de hongos parásitos y competidores así como de rendimientos, según los productos empleados y sus concentraciones.

Los mejores resultados prácticos se obtuvieron en tres casos en los que la eficiencia biológica superó el 50% y cuyos datos se presentan en la tabla 8.

Fermentación en el medio natural

Es un procedimiento de preparación de sustratos para cultivo de *Pleurotus* spp. específicamente desarrollado en algunos países del continente americano (como México, Cuba, Colombia) con el fin de aprovechar algunos subproductos agroindustriales de gran disponibilidad y que no se procesan con facilidad con otras técnicas conocidas.

La producción de café y del tequila, así como la obtención de azúcar de caña son, entre otros, algunos ejemplos destacados de agroindustrias que se establecen con gran frecuencia en varios países del área tropical y subtropical americana. Estas agroindustrias generan de forma colateral grandes cantidades de subproductos derivados del objetivo central de la actividad. Tales subproductos son, respectivamente, la pulpa de la cereza del café, el bagazo de maguey tequilero agotado y el bagazo de caña de azúcar agotado.

Puesto que estos materiales tienen, en general, pocas salidas de aprovechamiento para otros fines, y que en algunos casos su acumulación puede llegar a plantear problemas de carácter obstructivo o contaminante, a partir de los años ochenta, muchos investigadores del campo de los hongos comestibles cultivados de estos países, fijaron su atención en ellos para el cultivo de *Pleurotus* spp. El resultado de esos trabajos ha sido la puesta a punto de una serie de técnicas de procesamiento de estos materiales de gran interés práctico.

Las circunstancias comunes que tienen estos subproductos *en fresco* es que contienen cantidades apreciables de materiales fácilmente fermentescibles, susceptibles de contaminaciones bacterianas y fúngicas, y de invasiones de insectos, etcétera, así como que necesitan ser homogeneizados y estabilizados para un mejor manejo y aprovechamiento posterior. Para ser utilizados como substratos de *Pleurotus* spp., la solución general a estas cuestiones ha sido someterlos a un proceso previo de fermentación natural.

El proceso industrial de la obtención del grano de café genera como subproducto importantes cantidades de pulpa, en torno al 30% del peso seco del fruto. Dada la intensidad y la extensión de esta industria, millones de toneladas de este material quedan disponibles cada año. Dado que la pulpa de café es un material abundante, económico y de fácil disponibilidad en un buen número de países, creemos interesante transcribir los fundamentos de la preparación de substrato para *Pleurotus* spp., según propuesta de Martínez-Carrera (1989):

La pulpa fresca de café, inicialmente, debe ser drenada durante unas 4-8 horas. Finalizada esta etapa, existen dos caminos para su aprovechamiento como substrato de cultivo: comenzar un proceso de fermentación natural o proceder a secarla al sol para ser usada posteriormente.

El proceso de fermentación de la pulpa tras el drenaje comienza con un apilado del material en montones piramidales de 1-1.20 m de alto. Se debe cubrir el montón con una lámina de plástico para evitar pérdidas de agua y favorecer la fermentación. A través de este proceso se logra transformar y descomponer ciertas cantidades de azúcares libres, celulosa y hemicelulosa de la pulpa de café que de otra manera estarían fácilmente disponibles para ciertos mohos y bacterias. El contenido de humedad de la pulpa debe ser del 60-80%. Bajo estas condiciones, el montón alcanza temperaturas entre 50-60°C a los dos días de comenzar el proceso. El material se voltea al segundo o tercer día de haberse iniciado la fermentación aerobia. La razón de los volteos es evitar situaciones de fermentación anaerobia cuyos microorganismos consumirían grandes cantidades de azúcares que darían lugar a metabolitos secundarios, los cuales a su vez podrían resultar tóxicos para *Pleurotus* spp.

Durante la fermentación, el pH evoluciona desde un valor inicial de 6.0 hacia unas cifras finales ligeramente alcalinas (7.5). Este proceso de fermentación reduce sensiblemente el volumen de la pulpa de café y la transforma en un material física y químicamente homogéneo, con muy buena estructura y consistencia. A través de la actividad microbiana, además, la relación carbono/nitrógeno se convierte en adecuada para el desarrollo de *Pleurotus* spp. y la probabilidad de contaminaciones queda reducida. Con pulpa de café fermentada durante cinco días como substrato se lograron excelentes rendimientos con diferentes cepas de *Pleurotus* spp., especialmente destacables en el caso de *P. ostreatus*, con una eficiencia biológica media de 175%.

La variante de secado al sol y almacenado posterior de la pulpa de café está motivada por la disponibilidad variable y dispersa de este material en las regiones productoras. Además, la pulpa fresca sólo está disponible 5-6 meses al año. Por estos motivos, tras el drenaje, la pulpa de café puede ser secada al sol, de manera uniforme, durante un periodo de 4-6 días. Una vez seca, podría ser almacenada en sacos de plástico y usada incluso después de un año. No obstante, antes del almacenado debe quedar completamente libre de mohos para evitar posteriores contaminaciones. Al ser utilizada para la elaboración de sustrato, la pulpa desecada debe ser rehidratada por medio de una inmersión en agua. Tras esta operación, el material está apto para el tratamiento de pasteurización ya que no precisa una fermentación.

La pasteurización de la pulpa de café fermentada o rehidratada se hace por inmersión en agua caliente. Para ello se coloca la pulpa en el interior de recipientes cilíndricos de malla de alambre y se sumerge en agua a una temperatura en torno a los 70°C durante unos 15-30 minutos. Alguna variación en cuanto a tiempo y temperatura de pasteurización tiene poca influencia en el cultivo del hongo. No obstante se recomienda no descender de 70°C como temperatura de pasteurización, ni de 15 minutos como tiempo de tratamiento, ya que de lo contrario podría haber problemas posteriores de contaminación durante el cultivo. Las temperaturas más altas y los tiempos de tratamiento más largos son considerados un gasto energético innecesario. Tras la pasteurización se procede al drenaje de la pulpa durante unos 30-40 minutos hasta que su contenido en agua queda en torno al 70-80%. Una vez pasteurizada y drenada se deja enfriar sobre una mesa en el interior de la explotación. Cuando la temperatura ha descendido hasta los 28-30°C, el material está apto para ser sembrado y envasado, empleándose sacos de plástico de 50×70 cm con agujeros distribuidos al azar.

Basados en un tipo de premisas parecidas, Soto-Velazco *et al.* (1991) sometieron el bagazo de maguey tequilero a un proceso de fermentación natural de 40 días de duración con el material dispuesto en pilas de 1.5 m de ancho y 1 m de alto. Antes del apilado, la humedad se ajustó al 80% y el pH a 6 con añadido de caliza. La pila se cubrió con una lámina de plástico negro para evitar una evaporación excesiva y pérdidas de calor. Con el fin de garantizar la oxigenación de la pila el material se volteó cada tres días. A lo largo del proceso fermentativo se fueron apartando muestras para cultivar, concretamente los días 1, 5, 9, 11, 20, 30 y 40. Una vez finalizada esta etapa de fermentación natural, se llevó a cabo la pasteurización, la cual consistió en una inmersión en agua a 70°C durante 30 minutos. Tras el drenado y enfriado (30°C) sobre una mesa, el sustrato se sembró con 2 cepas de *P. ostreatus* y se envasó. Los mejores resultados de producción fueron 78% y 84% de eficiencia biológica, en ambos casos con sustrato fermentado 20 días. Guzmán-Dávalos y Soto-Velazco (1989) acreditaron un proceso fermentativo de 15 días para el caso del bagazo de caña de azúcar.

Fermentación anaerobia o *en frío*

La biotecnología popular ha venido utilizando las bacterias lácticas en diferentes procesos de conservación de alimentos humanos y animales tales como la producción de queso, embutidos, salazones, coles de Bruselas, yogur, kefir, ensilados, entre otros.

Lelley, en su libro *Hongos en mi propio jardín* (1985), aplica el *ensilado* bajo agua en la preparación de sustrato para cultivo de *Pleurotus* spp. con pacas de paja enteras, sumergiéndolas en agua durante dos semanas.

En España, Gurelan S.C. ha estudiado y desarrollado este método, económico y de baja tecnología, muy adecuado para un cultivo familiar de 300-500 kg/semana de *Pleurotus* spp.

En este sistema pueden ser seleccionados y utilizados, prácticamente la totalidad de los subproductos agrícolas y agroindustriales mencionados, solos o en mezclas, tales como: paja de cereales (trigo, cebada, centeno, maíz, arroz), paja de leguminosas, residuos de algodón (borra de fibra corta o cascarillas de semillas), orujo de uva, pulpa de café, hojas de platanera, bagazo de caña de azúcar enriquecido con melaza, y otros que sean abundantes y baratos.

Los materiales deben ser picados a tamaño fino, de 2 a 5 cm, y deben retener en torno al 70% de humedad. El contenido en nitrógeno puede estar comprendido entre 0.5 y 1.5%. Si el contenido es menor, los rendimientos pueden resultar escasos, y con un contenido mayor, la fermentación deriva en putrefacción.

La operación debe transcurrir dentro de un recipiente amplio de fermentación, que no sea de hierro u otro material atacable, con agua limpia no contaminada (un poco de cloro no perjudica), donde se sumerge el material (o mezcla) a tratar en proporciones de una parte de sustrato por 15-20 partes de agua.

El principio bioquímico de la operación se basa en que todos estos materiales al ser sumergidos en agua sufren una fermentación anaerobia por acción de las bacterias lácticas, principalmente *cocos*, presentes de forma natural. Entre 12 y 30°C, la fermentación comienza espontáneamente, y la acción metabólica de estas bacterias elimina los azúcares, impidiendo que posteriormente pueda tener lugar el desarrollo de los competidores de *Pleurotus* spp. (*Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., etcétera) y facilita la acción de los enzimas del hongo (celulasas, polifenoloxidasas y otros más) sobre el sustrato. Los ácidos orgánicos formados (láctico, butírico) también van acompañados de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

Es conveniente, casi necesario, añadir sacarosa (aproximadamente el 1% del peso de los materiales a fermentar) para estimular y mantener una fermentación vigorosa. Durante el proceso con paja de cereales picada finamente, el pH desciende paulatinamente desde el principio, hasta llegar a valores en torno a 4.5 en que tiende a estabilizarse. Una de las cuestiones centrales es que hay que *agotar* las sustancias fermentescibles antes de dar por finalizada la operación para evitar contaminaciones de hongos durante el periodo de incubación de *Pleurotus* spp. El final de la operación se detecta cuando se estabiliza el pH en 4.5 o incluso se advierte una ligera subida de 0.1 unidades.

A temperaturas por debajo de 12°C la fermentación va mal. Con las temperaturas más adecuadas para desarrollar el proceso, entre 20 y 30°C, la operación suele durar entre cinco y siete días. Durante los 3-4 primeros días el sustrato flota ya que, entre otros metabolitos, la fermentación produce anhídrido carbónico (CO₂). Conviene agitar el sustrato una o dos veces al día para mantenerlo sumergido, sin aire, pero sin presionar demasiado para que todas las partes del material se impregnen y se transformen bien. A partir del 4°-5° día de fermentación todo el material se ha hundido y comienza a acercarse el final de la operación, destacándose una película flotante de levaduras lácticas por el medio. Una prolongación anormal del proceso con el sustrato hundido desencadenaría cambios de otro signo, siendo el más destacable la subida del pH por acción de las levaduras lácticas al comenzar a consumir el ácido láctico producido durante la etapa anterior. No es conveniente desencadenar esa situación.

Terminado el proceso, es indispensable realizar un escurrido rápido y eficaz del sustrato para lo cual es muy aconsejable el uso de una prensa manual o mecánica. Si no se ejecuta bien esta operación, el micelio, tras la siembra, se *ahogar*ía y se contaminaría. Tras el escurrido, con una humedad final en torno al 70%, el sustrato debe ser sembrado lo antes posible, en sacos de polietileno transparente (mejor si son microperforados) y con agujeros de 15-20 mm de diámetro hechos previamente. Las dosis de inóculo de siembra puede ser el 2-3% del peso fresco de sustrato.

Se describe a continuación un ensayo a pequeña escala, con residuos vegetales tropicales de Cuba:

La mezcla se formó con los materiales (y sus proporciones en materia seca) siguientes:

- Bagazo de caña de azúcar (50 %)
- Tabaco en rama (50 %)
- Melaza de caña (15 % del peso de la materia seca de base)

La preparación preliminar de la fermentación fue de la manera siguiente:

- Se mezclaron cuidadosamente los ingredientes de base:
 - 1,500 gr de bagazo de caña
 - 1,500 gr de tabaco en rama
- Se introdujo esta mezcla en un recipiente grande y se cubrió con 60 L de agua a la que, previamente, se le había añadido 300 gr de melaza de caña (10%). En estas condiciones comenzó espontáneamente la fermentación.

La evolución del proceso fermentativo transcurrió de la siguiente forma:

Evolución del proceso fermentativo

<i>Día</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Azúcares (%)</i>	<i>Observaciones</i>
1	8.2	28		La mezcla flota
2	6.4	28		La mezcla flota
3	6.1	28		La mezcla flota
4	6.1	27		Casi todo el material, hundido
5	6.2	26	0	Todo el material, hundido. Se forma una película de levaduras. Se añade el resto de la melaza, 150 gr (5 %), disuelta en 0.5 L de agua
6	5.6	25	0	Todo el material continua hundido
7	5.3	24		El material, que continuó hundido, se terminó sacando del recipiente de fermentación y se prensó

A lo largo del proceso de cultivo, los datos de rendimientos que se obtuvieron y su evolución fueron los siguientes:

Rendimiento, en gramos de setas —pie cortado— (% eficiencia biológica)

<i>Día</i>	<i>Saco núm. 1 (1.35 kg m.s.)</i>	<i>Saco núm. 2 (1.35 kg m.s.)</i>
1 (siembra)		
20 (aparición carpóforos)		
25	610 (45.2)	
26		800 (59.3)
34	200 (14.8)	
45	250 (18.5)	
48		270 (20)
55	50 (3.7)	
Total:	1.110 gr (82.2 %)	1.070 gr (79.3 %)
Media: 1.090 gr. (80.75 %)		
(Eficiencia biológica= peso setas / peso seco substrato × 100)		

Partiendo de 3 kg de materia seca se obtuvieron 8.75 kg de substrato elaborado, con una humedad de 70%, por lo que la tasa de pérdidas fermentativas de la materia seca original de base fue del 12.5%.

Este substrato se sembró con el 3 % de semilla de *P. ostreatus* (H-9) y se empaquetó en sacos microperforados, obteniéndose dos sacos de 4.5 kg de materia fresca cada uno (1.35 kg de materia seca).

El proceso de incubación y fructificación se llevó a cabo en condiciones ambientales controladas según procedimientos conocidos (Zadrazil, 1978).

Si se controlan bien las temperaturas y el pH, no se necesita añadir fungicidas durante todo el proceso.

Hay que decir que las cepas subtropicales de *P. ostreatus* o *P. pulmonarius* dan resultados más seguros en este procedimiento que las híbridas europeas debido a su mayor producción de polifenoloxidasas y a su más rápido crecimiento o incubación. La protección de las bacterias lácticas dura una semana, al cabo de la cual el micelio de *Pleurotus* debe estar implantado en toda la masa de sustrato.

REFERENCIAS

- Bahukhandi, D. and R.L. Munjal. 1989. Cultivation of *Pleurotus* species on different agricultural residues. *Indian Phytopath.* 42 (4): 492-495.
- Bano, Z., M.N. Shashirekha, and S. Rajarathnam. 1993. Improvement of the bioconversión and biotransformation efficiencies of the oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) by supplementation of its rice straw substrate with oil seed cakes. *Enzyme Microb. Technol.* 15 (11): 985-989.
- Bermúdez, R.C., J.A. Traba, M.J. Verdecia, y P. Gross. 1994. Producción de *Pleurotus* sp. cfr. *florida* sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. *Micol. Neotrop. Apl.* 7: 47-50.
- Block, S.S., G. Tsao, and L. Han. 1958. Production of mushroom from sawdust. *J. Agric. Food Chem.* 6 (12): 923-927.
- Ferri, F. 1985. *I funghi*. Edagricole, Bologna.
- Flick, M. 1982. Biologie und Biotechnologie der Substratfermentation beim Austerpilz (*Pleurotus* spp.). *Der Champignon* 245: 29-30.
- Flores, J.A. 1975. *Bromatología animal*. Limusa, México.
- González, J., P. Alvira, y G. González. 1987. La cascarilla de arroz en la alimentación animal. II Composición químico-bromatológica. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 27 (1): 139-149.
- González, T.B., M.S. Domínguez, y S.A. Bautista. 1993. Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. *florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. *Rev. Mex. Mic.* 9: 13-18.
- Guzmán-Dávalos, L. y C. Soto-Velazco. 1989. El cultivo de hongos comestibles como una alternativa en el uso de los desechos industriales de Jalisco. *Tiempos de Ciencia* 15: 35-40. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal. México.
- Guzmán-Dávalos, L., D. Martínez, P. Morales, y C. Soto-Velazco. 1987. El cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*) sobre bagazo del maguey en la industria tequilera. *Rev. Mex. Mic.* 3: 47-49.
- Gyrko, P. 1979. Die Rolle der Bakterien bei der Vorverereitung des Substrates für *Pleurotus*-Anbau. *Mushroom Sci.* 10 (Part II): 31-36.
- Hashimoto, K. and Z. Takahashi. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 9 (Part I): 585-593.
- Heltay, I. 1986. Production du *Pleurotus ostreatus* en forme d'huître sur une grande échelle avec application de techniques modernes et d'un procédé biotechnologique. *Bull. FNSACC* 29: 875-886.
- Jandaik, C.L. and J.N. Kapoor. 1974. Studies on cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Mushroom Sci.* 9 (Part I): 667-672.
- Kalberer, P.P. 1974. The cultivation of *Pleurotus ostreatus*: experiments to elucidate the influence of different culture conditions on the crop yield. *Mushroom Sci.* 9 (Part I): 653-661.
- Klibansky, M.M., M. Mansur, I. Gutierrez, and L. Gonzalez. 1993. Production of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agrowastes. *Acta Biotechnol.* 13 (1): 71-78.
- Kulkarni, R.K. 1989. Cultivation of *Pleurotus* species on cotton waste. *Mushroom Sci.* 12 (Part II): 129-133.
- Kurtzman Jr., R.H. 1979. Metabolism and culture of *Pleurotus*, the oyster mushroom. *Taiwan Mushrooms* 3 (1): 1-13.
- Laborde, J. (1989). Technologie moderne de production des *Pleurotus*. *Mushroom Sci.* 12 (Part II): 135-155.
- Lelley, J. 1985. *Pilze aus dem eigenem Garten*. BLV Verlagsgesellschaft, München.
- Lelley, J. and A. Janssen. 1993. Productivity improvement of oyster mushroom substrate with a controlled release nutrient. *Mushroom News* 41 (2): 6-13.

- Leong, P.C. 1982. Cultivation of *Pleurotus* mushroom on cotton waste substrate in Singapore. p.: 349-361. In: Chang S.T. and Quimio, T.H. (eds.), *Tropical Mushrooms. Biological Nature and Cultivation Methods*. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Madan, M., P. Vasudevan, and S. Sharma. 1987. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different wastes. *Biological Wastes* 22: 241-250.
- Martínez-Carrera, D. 1989. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Sci.* 12 (Part. II): 169-178.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, y M. Sobal. 1990. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada. *Micol. Neotrop. Apl.* 3: 49-52.
- Muez, M.A. 1994. Bases para el cultivo de *Pleurotus*. p.: 129-141. En: *I Jornadas Técnicas del Champiñón y Otros Hongos Comestibles en Castilla-La Mancha*. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca.
- Olivier, J.M., J. Laborde, J. Guinberteau, N. Poitou, et G. Houdeau. 1991. *La culture des champignons*. Armand Colin, Paris.
- Pani, B.K. and A.K. Mohanty. 1998. Utilization of water hyacinth as an alternative substrate for oyster mushroom cultivation. *Crop Res.* 15 (2&3): 294-296.
- Patra, A.K. and B.K. Pani. 1995. Evaluation of banana leaf as a new alternate substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation. *J. Phyto. Res.* 8: 145-148.
- Piccioni, M. (1970). *Diccionario de alimentación animal*. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Rajarithman, S. and Z. Bano. 1987. *Pleurotus* mushrooms. Part. I.A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26 (2): 157-223.
- Royse, D.J. 1997. Specialty mushrooms and their cultivation. *Hort. Rev.* 19: 59-97.
- Royse, D.J. and B.D. Bahler. 1988. The effect of alfalfa hay and delayed release nutrient on biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju*. *Mushroom J. Tropics* 8: 59-65.
- Royse, D.J. and L.C. Schisler. 1987. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 191-194.
- Sharma, S.G., F. Mahnaz, and V.K. Sing. 1996. Biochemical changes during solid substrate fermentation of water hyacinth with *Pleurotus sajor-caju*. *Mushroom Res.* 5: 89-92.
- Soto-Velazco, C., L. Guzmán-Dávalos, and L. Villaseñor. 1991. Substrates for cultivation of *Pleurotus* in Mexico, I. tequila maguey bagasse. *Mushroom J. Tropics* 11: 29-33.
- Soto-Velazco, C., L. Guzmán-Dávalos, and C. Téllez. 1991. Substrates for cultivation *Pleurotus* in Mexico, II. sugarcane bagasse and corn stover. *Mushroom J. Tropics* 11: 34-37.
- Stamets, P. and J.S. Chilton. 1983. *The Mushroom Cultivator: a practical guide to growing mushroom at home*. Agarikon Press, Olympia, WA.
- Stanek, M. and N.A. Bis'ko. 1982. Regulation of microbiological processes in substrate for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Zahradnictvi* 3: 221-233.
- Stölzer, S. and K. Grabbe. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. *Mushroom Sci.* 13 (Part I): 141-146.
- Vijay, B. and H.S. Sohi. 1987. Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer on chemically sterilized wheat straw. *Mush. J. Tropics* 7: 67-75.
- Villa-Cruz, V., G. Huerta and J.E. Sánchez. 1999. Solid fermentation of a corn cob-coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 11:67-74.
- Zadrazil, F. 1987. Cultivation of *Pleurotus*. p.: 521-557. In: S.T. Chang, and W.A. Hayes (eds.), *The*

Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Academic, New York.

Zadrazil, F. and M. Schneiderei. 1972. Die Grundlagen für die Inkulturnahme einer bisher nicht kultivierten *Pleurotus*-Art. *Der Champignon* 135: 25-32.

IX El Cultivo de *Pleurotus* spp.

José Ernesto Sánchez y Daniel J. Royse

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	189
LA PASTEURIZACIÓN	189
La pasteurización con agua caliente	190
La pasteurización por vapor	191
El composteo	191
EL RECIPIENTE PARA EL SUBSTRATO	192
LA SIEMBRA	193
La semilla	193
La tasa de inoculación	194
El lugar para sembrar	195
LA INCUBACIÓN	195
CUIDADOS DURANTE LA SIEMBRA Y LA INCUBACIÓN	196
LA FRUCTIFICACIÓN	196
La fructificación bajo condiciones controladas	197
La temperatura	197
La humedad relativa	197
El riego	198
La ventilación	198
La luz	201
Fructificación a la intemperie	201
LA COSECHA	202
REFERENCIAS	203

INTODUCCIÓN

Para cultivar hongos del género *Pleurotus* spp. con fines comerciales se requiere en primer lugar seleccionar una cepa de buena calidad y productividad que esté bien adaptada a las condiciones ambientales del lugar, y que crezca muy bien en el substrato sobre el que se piensa cultivar. El substrato deberá estar preparado de tal manera que permita el crecimiento selectivo, rápido y robusto, de la cepa en cuestión; es decir, que facilite el desarrollo de *Pleurotus* spp. y retarde el de sus competidores. Esta selectividad del substrato se facilita al dejar accesible el complejo lignina-celulosa, y mantener un pH relativamente elevado, así como al mantener concentraciones bajas en azúcares solubles y sales de amonio (Stölzer y Grabbe, 1991).

Las especies de *Pleurotus* crecen de manera aceptable en diversos substratos lignocelulósicos, por lo que pudiera pensarse que una cepa dada crecerá bien en cualquier substrato posible. Esto no es cierto; existe una interrelación cepa-substrato que debe respetarse para obtener rendimientos óptimos. Cada cepa tiene sus capacidades y requerimientos propios por lo que una vez que se han definido los componentes óptimos del substrato, deben evitarse los cambios, a menos que hayan sido investigados previamente. Para más detalles sobre la preparación del substrato, ver el capítulo 8 de este libro.

Una acertada definición del binomio cepa-substrato influirá de manera determinante en las actividades desarrolladas durante el cultivo del hongo. Por ejemplo, las características fisicoquímicas del substrato (capacidad de retención de agua, tamaño de partícula, disipación de calor) influirán en la periodicidad de los riegos y en la ventilación. Un substrato selectivo permitirá una pasteurización menos rigurosa; por otra parte, la cepa elegida determinará los parámetros ambientales que deben existir en el cultivo (humedad, temperatura, etcétera).

El cultivo de *Pleurotus* spp. comprende las actividades de pasteurización del substrato, siembra, incubación, fructificación y cosecha, las cuales se describen a continuación. No está de más recalcar que mientras más cuidado se tenga al realizar estas actividades, mejores serán los rendimientos obtenidos, sobre todo cuando se piensa en un cultivo intensivo, porque en él suelen presentarse problemas derivados del volumen de producción, de la rutina y del monocultivo.

LA PASTEURIZACIÓN

La pasteurización es una actividad que tiene por función disminuir la cantidad de organismos, sobre todo nocivos, que pueden competir con el hongo en la utilización del espacio y de los nutrientes. Ésta es una actividad que prepara al substrato para una eficaz colonización por el hongo. La pasteurización puede darse por medio de un proceso de composteo durante la preparación del substrato, de fermentación, o mediante un

tratamiento químico o térmico, después de haber mezclado y homogenizado los ingredientes.

La pasteurización tiene como finalidad destruir insectos y microorganismos competidores de *Pleurotus* spp. (cuadro 1), pero al realizar esto, también provoca cambios bioquímicos en el sustrato que pueden afectar positiva o negativamente su calidad. En efecto, la idea de que mientras mayor sea la temperatura o el tiempo, mejor será el tratamiento, es errónea. Stölzer y Grabbe en 1991, sugirieron temperaturas de pasteurización de 65°C durante 20-24 horas. Ellos indicaron que las temperaturas inferiores a 55°C eran insuficientes para destruir otros organismos y que las temperaturas mayores de 85°C provocaban la ruptura parcial de puentes de hidrógeno del complejo lignina-celulosa y contribuían a la solubilización de azúcares simples. Estas condiciones predisponían al sustrato para una colonización mayor por hongos contaminantes.

En el caso del tratamiento térmico al sustrato, comercialmente existen dos posibilidades: con agua caliente o con vapor.

Cuadro 1. Temperatura y tiempo letal de diferentes organismos relacionados con el cultivo de hongos (extraído y adaptado de Overstijns, 1998)

<i>Organismo</i>	<i>Temp. (°C)</i>	<i>Tiempo (h)</i>
Mayoría de moscas; phoridos y sciaridos	55	5
Nemátodos	55	5
Mites	55	5
<i>Botryotrichum piluliferum</i> y <i>Sporotrichum</i> spp.	60	4
<i>Verticillium fungicola</i>	60	2
<i>Chaetomium olivaceum</i>	60	6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50	10 min
Esporas de <i>Agaricus bisporus</i>	65	72

La pasteurización con agua caliente

El método de pasteurización con agua caliente consiste en sumergir el sustrato en agua a 85°C durante un mínimo de 40 minutos (Guzmán *et al.*, 1995). Este tratamiento puede variar según la localidad, ya que la altura sobre el nivel del mar y las condiciones del lugar influyen en los parámetros de operación; por ejemplo, Bano *et al.* en 1979 en la India, al cultivar *P. djamor*; utilizaron un tratamiento de 10-15 minutos a 65±5°C y, posteriormente, inmersión dos horas en agua fría. Indicaron haber obtenido buenos rendimientos sólo cuando utilizaron altas tasas de inoculación (15%), mientras que cuando utilizaron tasas más bajas (2.5%), obtuvieron altos índices de contaminación y bajos rendimientos.

Al pasteurizar por inmersión en agua se debe sumergir el sustrato únicamente cuando el agua haya alcanzado la temperatura de pasteurización para provocar un choque térmico que difícilmente soportarán los organismos que se encuentren en el sustrato. Si

éste es sumergido antes de que el agua alcance dicha temperatura, muchos organismos termo-resistentes tendrán la posibilidad de adaptarse al incremento paulatino de la temperatura y en ese caso el tratamiento térmico no será eficaz.

La inmersión en agua debe hacerse acorde con el procedimiento y la materia prima que se emplea para preparar el substrato. Según Houdeau *et al.* (1991), el sumergir el substrato en agua puede tener diferentes consecuencias, según el material utilizado. Ellos indicaron que existe un efecto de lavado de nutrientes durante la inmersión que puede resultar negativo en rastrojos viejos por pérdida de nutrientes para *Pleurotus* spp., pero puede resultar benéfico en rastrojos recientes porque al disminuir el contenido de azúcares solubles previene el antagonismo de otros hongos y da mejores rendimientos.

La inmersión en agua caliente ha sido ampliamente recomendada y puede considerarse como la forma más sencilla de pasteurización, por los bajos costos de instalación y lo rudimentario que puede ser el acondicionamiento del método; sin embargo tiene sus limitaciones porque es ineficiente desde el punto de vista energético (lo que la hace operable sólo cuando se trabaja a muy pequeña escala) y produce aguas residuales altamente contaminantes (López *et al.*, 1995; Bello y Sánchez, 1996). Por otra parte, puede funcionar bien en lugares donde la humedad ambiental es baja y permite el escurrido rápido del agua excedente. Si la humedad relativa del lugar es alta, el control del contenido de agua en el substrato después de la pasteurización puede requerir mayor manipulación del substrato, lo que incrementa los riesgos de contaminación (López *et al.*, 1996).

La pasteurización por vapor

La pasteurización por vapor es un método que requiere más inversión que la inmersión en agua porque necesita al menos de un generador de vapor. Este método sin embargo ha ido ganando adeptos poco a poco porque se puede desarrollar también de manera relativamente rústica (figura 1) y es más rentable a mayor escala que la pasteurización en agua caliente.

El método utilizado actualmente es una adaptación del método que se usa para la pasteurización de suelo o de la cobertura para la producción de champiñones (Aldrich *et al.*, s/a; Bollen, 1969). Consiste en colocar el substrato, en un espesor de hasta 60 cm, dentro de una caja o recipiente cerrado que tiene el fondo perforado. Después se introduce en la parte alta de la caja una mezcla de vapor y aire a presión hasta que el substrato alcanza una temperatura de 65°C, los cuales se mantienen durante una hora. Al cabo de este tiempo se suprime el vapor y se deja la ventilación para que el substrato se enfríe. Las figuras 1-3 muestran diferentes sistemas de pasteurización por vapor.

El composteo

El composteo como tratamiento para la pasteurización del substrato se ha usado con éxito en el cultivo del champiñón. Para el caso de las especies de *Pleurotus*, estudios recientes en nuestro laboratorio indican que es posible obtener rendimientos aceptables si se prepa-

ran ciertas mezclas de materiales orgánicos con 2% de cal y se aplica un composteo de 2-3 días (procurando mantener temperaturas entre 50-60 °C). En efecto, Hernández *et al.*, 2001, demostraron que si se compostea una mezcla de paja 70% más pulpa de café 30%, también con 2% de cal. Se puede obtener una EB de alrededor de 100% en dos cosechas. Lo notable de este método es que la preparación del sustrato no requiere de uso de energía convencional (leña, gas, etcétera), durante la siembra no se exigen condiciones de asepsia rigurosas, se obtiene buena colonización por el hongo y una fructificación aceptable. Estudios en curso permitirán definir mejor esta técnica en cuanto al control del composteo, el empleo de una mayor diversidad de materiales, el uso de suplementos y el incremento en la productividad.

EL RECIPIENTE PARA EL SUBSTRATO

La forma y el tamaño del recipiente en el que se colocará el sustrato después de inoculado forma parte del paquete tecnológico que se aplica para cultivar un hongo y debe ser definido desde antes del inicio de operaciones de la empresa. Desde el punto de vista del hongo, los criterios técnicos que deben ser observados para definir el recipiente son: la facilidad de ventilación y de intercambio gaseoso, la facilidad de disipación de calor y el mantenimiento de la humedad en el sustrato. Dado que el tamaño del recipiente definirá el tamaño del lote o bloque sintético que se manejará, es probable que en la elección también se consideren criterios adicionales como la facilidad de manejo y de llenado, la facilidad para cosechar los hongos, así como la disponibilidad de materiales y el precio.

Es de hacer notar que dentro de ciertos límites, (4-20 kg) mientras mayor sea la cantidad de sustrato que se maneje por lote, los problemas de pérdida de humedad serán menores, aunque probablemente en la misma medida se incrementen los problemas de heterogeneidad en la humedad del tronco sintético y de disipación del calor producido dentro del sustrato. En este sentido, se requiere encontrar un equilibrio acorde con las condiciones del lugar de cultivo. En los lugares de clima cálido se recomiendan lotes menos voluminosos para que la temperatura en el centro del sustrato, durante el crecimiento del hongo no sea una limitante para la colonización.

Debido a los hábitos de crecimiento que presenta el género *Pleurotus* spp. en general, para su cultivo se utilizan recipientes que presentan una mayor superficie vertical que horizontal. Kurtzman en 1979 propuso un bastidor que podía ser construido de metal o madera y estaba rodeado de alambre en el siguiente rango de dimensiones: espesor 7-25 cm, altura de 60-120 cm y ancho de 60-120 cm. Este tipo de recipientes, aunque funcionales, son poco utilizados en la actualidad porque presentan cierta dificultad de manejo y requieren de una buena limpieza después de cada ciclo; a pesar de ello, recipientes de este tipo son utilizados por ejemplo en Cuba y en otras áreas donde es difícil conseguir bolsas de plástico.

El material más utilizado en la actualidad para el cultivo de hongos del género *Pleurotus* spp. es el plástico, principalmente polietileno, aunque existen otros materiales. La industria relacionada con el ramo ha desarrollado varios tipos de bolsa, inclusive esterilizables en autoclave, que permiten un mantenimiento de la humedad y del intercambio gaseoso, así como la esterilidad requerida por el hongo en el interior de la bolsa. Estas bolsas de tamaño variable, cuentan con la suficiente resistencia para contener hasta 25 kg de substrato húmedo cuando son colgadas. Lamentablemente, salvo en contadas excepciones, no son fácilmente accesibles en los países hispanoparlantes. En estos lugares, las bolsas de polietileno disponibles en el mercado y no fabricadas especialmente para el cultivo de hongos, suelen dar resultados aceptables, aunque la limitante para el tamaño del tronco sintético será el volumen y la resistencia de la bolsa que se emplee. Las dimensiones de las bolsas que se usan actualmente pueden ser de 40×60 cm o de 60×90 cm y con una resistencia de hasta 15 kg.

Se recomienda que al usar bolsas de polietileno, se hagan perforaciones de tal manera que solo el 2% de la superficie de la bolsa quede expuesta al aire. Esto evita la deshidratación del substrato y estimula la formación de carpóforos grandes. Para mantener la humedad del substrato, no se recomienda retirar totalmente la bolsa al término del crecimiento. Así mismo, en varios países se prefiere el uso de bolsas de polietileno negro porque al no permitir el paso de la luz hacia el substrato, se forman primordios únicamente en las áreas donde las perforaciones practicadas exponen el micelio al aire. Esto aparentemente mejora el rendimiento/calidad al limitar el número de primordios formados, ya que crecerán menos carpóforos pero más grandes. Dado que las bolsas de polietileno negro no permiten el control visual del crecimiento micelial durante la incubación, se aconseja que al menos un 5% del substrato sea embolsado en bolsas transparentes para poder observar el crecimiento de *Pleurotus* spp. y detectar de manera oportuna la presencia de contaminantes.

Oh *et al.* (2000) indican que en Corea el procedimiento tradicional de cultivo de *Pleurotus* spp. se basa en el uso de camas de cultivo similares a las usadas para el champiñón, con un ancho de 1-1.4 m y longitudes desde 1 hasta varios metros. Ellos indican que de esta manera pueden obtener rendimientos de 5.7 a 10.8 kg/m² de hongos.

LA SIEMBRA

La siembra se refiere a la mezcla homogénea en condiciones de asepsia del inóculo o semilla con el substrato. Para una siembra eficiente debe tomarse en cuenta, además de la cepa y del substrato, el estado fisiológico del organismo, la tasa de inoculación y una higiene rigurosa.

La semilla

El inóculo puede ser utilizado en tres formas: en grano, como substrato colonizado o en

inóculo líquido. Los tres tipos funcionan bien y es menester del productor definir cuál es el que le conviene más.

La semilla en grano es la más común en la actualidad porque permite obtener un micelio vigoroso, con buenos puntos de crecimiento por kilogramo de grano y tiene un precio accesible. La semilla en forma de substrato colonizado es menos frecuente, tal vez porque el micelio requiere más tiempo de preparación y puede resultar más difícil de distribuir en el substrato que se va a inocular, sin embargo es igualmente eficiente. El inóculo líquido es también eficaz, sin embargo en general sólo se emplea en empresas altamente tecnificadas. Para más detalles sobre la preparación de la semilla, consultar el capítulo 7.

La tasa de inoculación

La tasa de inoculación es la cantidad de semilla que se usa en función de la cantidad de substrato que se pretende inocular. En el caso de especies de *Pleurotus* se han usado tasas de inoculación que varían entre 0.8 y 15%. La definición de este valor depende de las características tanto de la cepa y del inóculo, como del substrato donde se siembra. Mientras más baja sea la tasa de inoculación, menor será el costo por compra de inóculo, pero mayor el tiempo requerido para que el hongo colonice el substrato. Además, a mayor tiempo de colonización mayor será el riesgo de contaminación.

Cuando se usa inóculo con grano, se prefiere grano reciente y pequeño para contar con mayor cantidad de puntos de crecimiento por unidad de volumen. Es posible utilizar tasas de inoculación de 0.6-0.8%; es decir, 600 gramos de semilla por cada 100 kg. de substrato, pero es necesario distribuir perfectamente la semilla dentro del substrato (lo que generalmente sólo se logra por métodos mecánicos) y contar con una cepa en buen estado fisiológico. Por otra parte, la incubación después de la siembra debe ser óptima.

Supóngase que un productor usa inóculo preparado con semilla de sorgo para sembrar pulpa de café con una tasa de inoculación de 0.6% (El sorgo rinde aproximadamente 25 mil granos/kg). A un kilogramo de pulpa, este productor aplicará entonces 6 gramos de semilla (alrededor de 150 granos o puntos de inoculación). Si se estima que esta cantidad de pulpa al 68% de humedad ocupa un volumen de 3500 cm³, el micelio presente en cada grano deberá colonizar un volumen de 23.3 cm³. Este volumen representa una esfera de 2.15 cm de radio, el cual en condiciones óptimas de crecimiento y considerando una cepa de *P. ostreatus* (ECS-0152, por ejemplo) con una velocidad de crecimiento sobre pulpa de café de 5.14 mm/día debería colonizar ese volumen en alrededor de 4.5 días.

En general, en la siembra comercial es común utilizar tasas de inoculación del 2-2.5%, lo que es rentable pero demuestra que la semilla no se distribuye de manera homogénea en el substrato y que el hongo no crece a su tasa óptima de crecimiento. En condiciones rurales y usando como semilla substrato colonizado, Bano *et al.* (1979) reportaron en la India buenos rendimientos al usar una tasa de inoculación del 15%.

Es necesario recalcar la importancia que reviste el estado fisiológico del hongo al momento de la siembra. Se prefiere un micelio fresco, activo, que se encuentre en fase exponencial de crecimiento para que después de la siembra, la fase de latencia sea mínima. La fase de latencia no es deseable en la planta productora porque alarga el proceso y eleva los costos de producción. La manera de disminuir su duración es usar semilla en buen estado y sembrar con cuidado para no maltratarla, así como distribuirla muy bien en todo el volumen que se va a inocular. Es importante también proporcionar al hongo el sustrato y el ambiente adecuado para su crecimiento.

El lugar para sembrar

Para realizar la siembra se recomienda acondicionar un lugar expuesto, fácil de limpiar, que tenga una temperatura agradable, y que esté aislado y sin corrientes de aire. La siembra se puede realizar manualmente en condiciones de asepsia rigurosa sobre una mesa adaptada para el caso (figura 4) o con un mezclador mecánico si se cuenta con el equipo. La semilla se agrega y distribuye de la manera más homogénea posible dentro del sustrato y, ya mezclados, ambos se colocan dentro de la bolsa o recipiente que se emplee para tal fin. Al realizar esto se debe tener especial cuidado en que el sustrato, después de pasteurizado, se encuentre a temperatura ambiente y que los granos de semilla queden colocados lo más equidistantes que se pueda para que el micelio de cada grano tenga que colonizar la mínima distancia posible.

Una vez terminada la siembra, se debe cerrar el recipiente para evitar contaminaciones y la pérdida de humedad del sustrato, así como para permitir que se incremente la concentración de CO₂ en el recipiente. Estas condiciones son necesarias para facilitar un rápido crecimiento y la colonización del sustrato por el hongo. Se recomienda que entre el sustrato y el nudo (si se usa bolsa) quede un espacio suficiente para permitir que cuando se haga el picado del plástico no se toque el sustrato. Al bloque hongo-sustrato así formado se le denomina *tronco sintético* o *pastel*.

LA INCUBACIÓN

La incubación es la etapa que permite la colonización del sustrato por el hongo, de preferencia a temperatura y humedad óptimas, y en la oscuridad. Durante esta etapa, se debe proporcionar al hongo una temperatura constante y acorde con sus requerimientos para que la colonización se lleve a cabo con la tasa de crecimiento más alta posible. La mayoría de las especies de *Pleurotus* tienen óptimos de crecimiento micelial entre 25-28°C, sin embargo la temperatura varía según las cepas. Por ejemplo, Kurtzman y Zadrazil, (1989) reportaron óptimos de 30°C para una cepa de *P. ostreatus*.

Durante la incubación, cuatro o cinco días después de haber efectuado la siembra, se hacen de 20 a 40 perforaciones perfectamente distribuidas (con una aguja o navaja estéril) en la parte superior de la bolsa de polietileno y de preferencia sin tocar al subs-

trato. Esto se hace porque inicialmente se requiere una concentración alta en CO₂ para estimular el crecimiento micelial (hasta niveles cercanos al 25%), pero pasados estos niveles, el CO₂ limita el desarrollo y es necesario facilitar el intercambio con aire fresco. Cuando se usan bolsas de 25 kg, cuatro o cinco días después de la siembra, además de las perforaciones mencionadas se hacen alrededor de 15 perforaciones (de 8-10 cm cada una) distribuidas en tres hileras a lo largo de la bolsa de sustrato. Por estas perforaciones brotarán más adelante los basidiomas. Las figuras 5-7 muestran diferentes salas de incubación y la figura 8 señala cómo se lleva a cabo el picado de bolsas. Resulta conveniente hacer notar que también es posible sembrar sobre bolsas ya perforadas de antemano. Esto disminuye el trabajo de picado. La decisión de cuando picar o perforar las bolsas depende de los niveles de contaminación que se tengan en proceso.

CUIDADOS DURANTE LA SIEMBRA Y LA INCUBACIÓN

Los cuidados que se deben tener en esta etapa del proceso están generalmente encaminados a disminuir la contaminación, la cual se presenta como resultado de una mala pasteurización o por descuidos en el manejo o en la siembra del material en proceso.

Para reducir al mínimo la contaminación, se debe poner especial interés en lo siguiente:

- 1) El local. Las contaminaciones pueden deberse a deficiencias en la asepsia de los locales de siembra/incubación o a orificios por donde pueden entrar el aire, los microbios, los insectos y otros animales. Los cuartos de siembra, incubación y fructificación deben ser frecuentemente lavados, limpiados, desinfectados con cloro, alcohol, benzal, etc. Para este fin se debe diseñar un programa de limpieza y asepsia que evite la proliferación o sobrevivencia de organismos nocivos.
- 2) El personal. Los niveles de contaminación disminuyen notablemente si el personal que está en contacto directo con el material en proceso se preocupa por mantener consigo mismo condiciones de limpieza y pulcritud inobjetables. El uso de ropa limpia, así como tapabocas y gorros al menos durante la siembra y el picado de bolsas es aconsejable.
- 3) Las actividades desarrolladas. Se debe tener especial esmero en trabajar en condiciones de asepsia rigurosa y asegurarse que los tratamientos de esterilización del grano para inóculo y la pasteurización del sustrato sean efectuados de manera conveniente. Asimismo, la perforación de las bolsas debe hacerse con utensilios estériles y de manera cuidadosa.

LA FRUCTIFICACIÓN

Después de la incubación, cuando el micelio ha colonizado el sustrato de tal manera que ya no se distingue el aspecto ni la coloración del sustrato inicial, sino que al

contrario éste se ve como una masa compacta de superficie homogénea blanco-algodonosa, se deben realizar ciertos ajustes ambientales para inducir al micelio a formar cuerpos fructíferos.

La fructificación se puede llevar a cabo en un área con condiciones controladas o, cuando las condiciones lo permiten, a la intemperie. A continuación se discuten ambas posibilidades.

La fructificación bajo condiciones controladas

La sala de fructificación debe ser un área amplia que mantenga condiciones estables de humedad, ventilación, temperatura e iluminación. Para la fructificación de las especies de *Pleurotus* se recomienda mantener estos parámetros dentro de los rangos que se mencionan en el cuadro 2

La fructificación puede llevarse a cabo en la misma sala utilizada para el crecimiento vegetativo (incubación) solo si es posible suministrar las condiciones de humedad, temperatura, luz y ventilación que requiere el hongo en esta etapa. De manera breve se revisa a continuación la importancia de dichos factores, que fueron también vistos en el capítulo 3.

La temperatura

La temperatura de fructificación varía con las especies y aún entre cepas; las cepas tropicales de *Pleurotus* spp. fructifican bien entre 20-28°C. Generalmente se observa que la temperatura óptima de fructificación es ligeramente mas baja que la óptima de crecimiento micelial. Es de hacer notar que la observancia de una temperatura adecuada para el desarrollo del hongo incide directamente en el rendimiento obtenido.

La humedad relativa

La humedad relativa es un factor sumamente importante en el desarrollo de un hongo. La literatura reporta valores entre 60-95% para la mayoría de las especies de *Pleurotus* (Chang y Hayes, 1978); sin embargo, para el caso específico de *P. ostreatus* se ha observado que una humedad de 85-90% es más adecuada. Es siempre recomendable guiarse por un higrómetro o por un higrómetrografo para saber cuando es necesario humedecer el ambiente. Una humedad inferior al 80% será negativa para la formación de los carpóforos.

El riego

Según Wuest (1982), el riego es un arte en el cual el cultivador debe saber cuándo, cuánto y de qué manera aplicarlo. Esta actividad es dirigida en cierta forma por el conocimiento, la experiencia y la sensibilidad del operario y es tan importante y tan delicada, que según el mismo autor, el agua y el riego son los factores que definen a un cultivador excelente de uno promedio. Generalmente es necesario aplicar riegos en el cuarto de fructificación en algunas horas del día para aumentar la humedad y evitar que el substrato se reseque. Los riegos pueden hacerse, según la necesidad,

Cuadro 2. Rango óptimo de los principales factores que afectan el crecimiento de las especies del género *Pleurotus*

<i>Parámetro</i>	<i>Rango</i>
Temperatura	20-26°C
Humedad relativa	85-90%
Humedad del sustrato	50-60%
Luz	suficiente para leer, al menos durante una hora diaria
Renovación de aire	6 veces el volumen de la sala/h

Fuente: Zadrazil, 1978 y 1989; Chang y Miles, 1989.

como pulverizaciones hacia el ambiente o directamente hacia el sustrato. En este último caso el flujo del agua debe ser suave, sin mucha presión y en forma de gotas muy pequeñas para no dañar los primordios o la superficie del sustrato. Se recomienda que el chorro de agua se aplique hacia arriba en forma de arco, para que las gotas se depositen sobre la superficie de manera suave justo en el momento de iniciar el descenso de dicho arco. La habilidad para tomar la decisión de cuando regar se adquiere con experiencia, ya que no hay manera de hacer una recomendación general. Se sugiere observar el aspecto de los hongos y del sustrato, tocarlos y sentir qué tan húmedos están. Los hongos no deben estar enjutos, resecos o amarillentos; tampoco excesivamente húmedos. Cuando las condiciones de humedad son satisfactorias, el incipiente píleo de los primordios o botones deberá presentar un aspecto suave, terso, carnoso, limpio y brillante, de lo contrario probablemente se requiera un riego. No se recomienda regar cuando los cuerpos fructíferos están ya formados porque se disminuye la calidad. En efecto, cuando se mojan demasiado, los cuerpos fructíferos presentan un aspecto blando, aguado y amarillento generalmente producido por contaminaciones bacterianas.

La ventilación

La renovación de aire en la sala de fructificación debe ser constante porque el incremento en la concentración de CO₂ afecta sensiblemente el desarrollo de las especies de *Pleurotus*. Dependiendo de la cepa, las concentraciones superiores a 700 ppm, pueden producir desde un ligero alargamiento del estípite, hasta la no formación del píleo y niveles superiores a 1,000 ppm pueden inhibir la fructificación. (Kurtzman y Zadrazil, 1989; Chang y Miles, 1989; Chang y Hayes, 1978). Una ventilación insuficiente propicia la acumulación de CO₂ y el exceso de ventilación puede producir resequeza del sustrato. Por lo mismo, es necesario encontrar un equilibrio que permita un desarrollo adecuado de los cuerpos fructíferos. Para ello se recomienda establecer un sistema de renovación de aire que sea barato y económico. Se puede disponer de ventiladores, extractores, ductos, una chimenea o combinaciones de éstos. La figura 9 muestra un ejemplo sencillo de cómo mejorar la ventilación y la humedad en un cuarto de fructificación mediante el uso de ductos de plástico y un grupo de humidificadores caseros. En



Figura 1. Sistema rústico de pasteurización con vapor en Lamphun, Tailandia. El vapor es producido con gas propano. Foto: cortesía de Ruth De León.



Figura 2. Caja metálica para la pasteurización del sustrato con vapor en Pennsylvania, EUA.



Figura 3. Sistema de pasteurización por vapor en la planta de San José (Zinacantán, Chis., México). El vapor es producido con un generador de leña.



Figura 4. Mesa utilizada para siembra.



Figura 5. Vista de una sala de incubación con bolsas de 20 kg. colgadas.



Figura 6. Vista de pasteles en incubación con anaqueles y bolsas de 4 kg.

Figura 7. Vista de una sala de incubación con bolsas de 20 Kg en bolsa negra y apilados en el suelo en grupos de 5, como es común en España y Francia.

Figura 8. Picado de bolsas.

Figura 9. Un sistema de ventilación y humidificación con ducto de plástico y humidificadores caseros.

Figura 10. Vista de una cueva de producción de la región de Cuenca, España.

Figura 11. Producción de *P. ostreatus* bajo la sombra de un cacaotal.

Figura 12. Aspecto de carpóros de *P. ostreatus* listos para ser cosechados.

el mercado existen equipos más sofisticados, de mayor precio, que permiten controlar estos dos factores de una manera muy precisa.

La luz

Ya en 1935 Kaufert mencionaba que el suministro de luz era necesario para promover la fructificación de *Pleurotus* spp., sin embargo las primeras recomendaciones sobre la cantidad de luz requerida dieron lugar a confusiones porque la fructificación depende de la naturaleza de la fuente luminosa. Se ha observado que la iluminación produce variaciones en la pigmentación de los carpóforos. Entre ciertos límites, mientras más luz incida sobre el píleo, más oscuro será éste. Asimismo, la pigmentación de una misma cepa varía si la luz que recibe el píleo es natural o artificial. Las especies de *Pleurotus* requieren luz de longitudes de onda corta (cargado hacia el color azul del espectro) y si ésta se proporciona con lámparas fluorescentes, se debe aportar una cantidad suficiente para leer material impreso (aproximadamente 150-200 lux). La luz del día suele ser suficiente para obtener buenas fructificaciones y no se ha demostrado que iluminar más tiempo permita mejor rendimiento.

Fructificación a la intemperie

En algunas temporadas del año, cuando las condiciones ambientales lo permiten, es posible acondicionar un lugar para hacer fructificar los hongos en la intemperie. El lugar puede acondicionarse dentro de una cueva o en lugares arbolados como un bosque o una huerta. Para ello se requiere que el lugar escogido mantenga lo más posible, condiciones estables y dentro de los rangos mencionados en el cuadro 2.

El hacer fructificar los hongos a la intemperie podría resultar una actividad semejante a la agricultura de temporal que se desarrolla para ciertos granos (como maíz y frijol). El agricultor espera a que se establezca la lluvia y que la luna dé punto para iniciar el ciclo. Para el caso de los hongos, este sistema es rentable, siempre y cuando el control de plagas sea económicamente eficaz.

Los pasos iniciales respecto de la preparación del inóculo, preparación del substrato e incubación no varían con respecto al método de cultivo en invernadero, sólo se prescinde de la sala de fructificación ya que los pasteles se ponen a fructificar directamente a la intemperie, en el lugar escogido y acondicionado de antemano.

Una experiencia muy ilustrativa de esto fue realizada por Sánchez *et al.* (1997). Estos autores determinaron que si un productor utilizaba la cáscara de cacao (que generalmente desechaba) para sembrar *P. ostreatus* y hacía fructificar este hongo aprovechando el microclima de su plantación, podía obtener utilidades adicionales y superiores a las generadas por la venta de su grano de cacao, que era el producto principal de su actividad (figura 11). Otro ejemplo digno de mencionar sobre fructificación a la intemperie puede ser observado en la figura 10, la cual muestra una cueva poco profunda acondicionada en un terreno semimontañoso por un cultivador en la región de Cuenca, en España para producir *P. ostreatus* con resultados excelentes.

LA COSECHA

En condiciones normales, dos o tres días después de haber puesto los pasteles bajo las condiciones ambientales necesarias para inducir la fructificación, empiezan a aparecer los primordios. De cuatro a seis días después, dichos primordios se han desarrollado normalmente, cubren la totalidad de la superficie del pastel y están en madurez comercial, listos para ser cosechados.

Para cosechar se debe observar que los carpóforos alcancen el mayor tamaño posible (figura 12). No se debe permitir que el borde del píleo se ponga totalmente plano o comience a enrizarse hacia arriba porque se demerita la calidad y se propicia la diseminación de esporas. La cosecha se hace cortando el estípite con un cuchillo, justo a la base del tallo, en la unión con el substrato; aunque en algunos lugares se prefiere tomar delicadamente los hongos con la mano, sin dañarlos y sin producir hoyos en el substrato.

REFERENCIAS

- Aldrich, R.A., P.J. Wuest, J.M. McCurdy. s/a. Treating soil, soil mixtures, or soil substitutes with aerated steam. Special Circular 182. The Pennsylvania State University, University Park. 14p.
- Bano, Z., S. Rajarathnam, y N. Nagaraja. 1979. Some aspects on the cultivation of *Pleurotus flabellatus* in India. *Mush. Sci.* 19, 597-608.
- Bello Mendoza, R. y J.E. Sánchez V. 1996. Anaerobic filter treatment of wastewater from mushroom cultivation upon coffee pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13:51-55.
- Bollen, G.J. 1969. The selective effect of heat treatment on the microflora of a greenhouse soil. *Neth. J. Plant Path.* 75:157-163.
- Chang S.T. y W.A. Hayes. 1978. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press. Orlando Fla. EUA.
- Chang S.T. y P.G. Miles. 1989. *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press. 238-275
- Guzmán, G., D. Salmones, C. Soto-Velázco, L. Guzmán Dávalos. 1993. *El cultivo de los hongos comestibles*. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 42-121
- Houdeau G., J.M. Olivier, S. Libmond y H. Bawadikji. 1991. Improvement of *Pleurotus* cultivation. *In: Mush. Sci.* 13: 549-554
- Kaufert, F. 1935. The production of asexual spores by *Pleurotus corticatus*. *Mycologia* 27: 333-340
- Kurtzman, Jr. R.H. 1979. A vertical tray system for the cultivation of edible fungi, *In: Mush. Sci.* 10: 429-436.
- Kurtzman R.H. y F. Zadrazil. 1989. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms. *In: S.T. Chang y T.H. Quimio (eds). Tropical Mushrooms. Biological Nature and Cultivation methods*. The Chinese Univ. Press. Hong Kong., 299-348
- López, A., G. Huerta Palacios and J. E. Sánchez. 1996. Contamination encountered during various phases of cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Tropical Mexico. *In: Proceed. II. Int. Conf. on Mushroom Biology and Mushroom Products*. D. Royse (ed). Penn. St. Univ. USA. 495-502
- López L, Z., J.E. Sánchez V. and R. Bello M. 1995. Quality of effluent water from the pasteurizing of coffee pulp. *In: Proceedings of the XVI International Conference on Coffee Science*. 7-14 April 1995. Int. Assoc. Coffe Sc. Kyoto, Japan.
- Oh, S.J., W.S. Kong, H.K. Kim, T.R. Fermor. 2000. Studies on the effect of vinyl covering on *Pleurotus* spp. Improved picking efficiency of *P. ostreatus* and *P. sajor-caju*. *Mush. Sc.* 15: 949-953.
- Overtijns, A. 1998. The conventional Phase II in trays or shelves. *Mush. J.* 584:15-21
- Sánchez Vázquez, J.E., G. Huerta Palacios and L.A. Calvo-Bado 1997. The cultivation of edible fungi as a sustainable alternative in tropical regions. *In: M. Palm and: I.H. Chapela (eds). Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Parkway Publishers Inc. Boone, North Carolina 227-237.
- Stölzer, S. and K. Grabbe. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. *In: Mush. Sci.* 13: 141-146.
- Villa-Cruz, V., G. Huerta and J.E. Sánchez. 1999. Solid fermentation of a corn cob-coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 11:67-74.
- Wuest P.J. 1982. How to manage the watering of a mushroom crop. *In: P.J. Wuest (ed). Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers*. The Pennsylvania State University, University Park. 99-104.

X Plagas y enfermedades del género *Pleurotus* spp.

Francisco J. Gea

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	207
LAS PLAGAS	208
Dípteros	208
Esciáridos	208
Fóridos	209
Cecidómidos	210
Colémbolos	211
Ácaros	211
LAS ENFERMEDADES	212
Hongos	212
Tela de araña	212
Mole seca	213
Hongos verdes	213
Otros hongos competidores	216
Bacterias	216
Mancha amarilla	216
Mancha parda	217
Otras bacteriosis	218
Virus	218
ANOMALÍA NO PARASITARIAS	219
Falta de luz	219
Exceso de CO ₂	220
Efectos de gases y plaguicidas	220
Otras alteraciones no parasitarias	220
MEDIDAS GENERALES DE HIGIENE	220
REFERENCIAS	222

INTRODUCCIÓN

El substrato utilizado para el cultivo de *Pleurotus* spp. no presenta, de forma natural, una microflora tan equilibrada como la que aparece en el caso del substrato para el champiñón, de manera que numerosos microorganismos pueden estar listos para establecerse y competir con *Pleurotus* spp. por el espacio y los nutrientes. Esta situación se puede intentar corregir proporcionando al substrato una buena selectividad biológica; es decir, una microflora capaz de proteger al micelio de *Pleurotus* spp. de otros organismos competidores. En este sentido, diversos autores han demostrado que la adición al proceso de fermentación aerobia de activadores preseleccionados puede ser interesante para realizar esta función. Éste es el caso de algunas cepas de *Bacillus subtilis* y de *B. pumilus*, que son capaces de suprimir los hongos competidores sin afectar al micelio de *Pleurotus* spp. (Stolzer y Grabbe, 1991), y también de la cepa P9 de *B. macerans*, que añadida a los substratos antes de su fermentación da como resultado una menor presencia de hongos contaminantes (por ejemplo *Trichoderma* spp.) y un incremento en la cosecha de *P. ostreatus* (Bis'ko y Bilay, 1995).

Aunque se pueda proporcionar cierta protección durante el proceso de elaboración del substrato, el cultivo de *Pleurotus* spp. está expuesto, como cualquier otro cultivo, a alteraciones que pueden ocasionar descensos en el rendimiento o bien deprecia la calidad comercial del producto. Estas alteraciones pueden ser debidas tanto a factores bióticos como abióticos, o a una combinación de ambos. Entre las causas bióticas se encuentran los insectos, los ácaros, los hongos, las bacterias y los virus. Entre los factores abióticos se hallan la temperatura, la luz, la concentración de anhídrido carbónico en el aire, la humedad relativa, y la presencia de productos químicos tóxicos en el substrato o en la atmósfera del local de cultivo. Todas estas anomalías pueden presentarse en cualquier fase del ciclo de cultivo, afectando de manera adversa la cosecha final. Por esto es aconsejable reconocerlas en un estadio temprano con el fin de limitar la extensión de los daños.

Los cultivos de setas (*Pleurotus* spp.) y de champiñón (*Agaricus bisporus* y *A. bitorquis*), comparten la mayoría de las plagas y enfermedades; es decir, los dípteros, los ácaros, las bacterias y gran parte de los hongos parásitos y competidores. Esta situación puede originar problemas adicionales en algunas regiones en las que las explotaciones de champiñón y de especies de *Pleurotus* se encuentran entremezcladas. Por ellos, ante un fuerte ataque de cualquier patógeno en champiñón, los cultivos más próximos de *Pleurotus* spp. se pueden ver afectados.

También es necesario tener en cuenta que el uso de productos químicos durante el ciclo de cultivo está limitado por la elevada susceptibilidad de las especies de *Pleurotus* cultivadas a los plaguicidas y desinfectantes en general, y por el riesgo de acumulación de residuos de estos productos en los cuerpos fructíferos. Por tanto, las medidas que mejor pueden ayudar a reducir la contaminación son la limpieza y la desinfección de los

locales de cultivo vacíos, la eliminación cuidadosa de los substratos agotados y de todas las posibles fuentes de contaminación (restos de cosecha, etcétera), una adecuada pasteurización, y el buen manejo del cultivo por parte del personal encargado.

LAS PLAGAS

Dípteros

Esciáridos

Al igual que ocurre en los cultivos de champiñón, se pueden encontrar principalmente dos especies: *Lycoriella auripila* y *L. mali*, que acuden al local de cultivo atraídas por el olor del substrato.

En líneas generales, los esciáridos adultos son pequeños dípteros con antenas largas. El macho presenta una genitalia protuberante, y mide alrededor de 2 mm, mientras que la hembra alcanza 3 mm (Wuest *et al.*, 1982). Los huevos son blancos, ovales. Las larvas son translúcidas, con cabeza negra y brillante, y miden entre 5-8 mm (Hussey y Gurney, 1968). Las pupas son blancas, de 2-2,5 mm de longitud. Su ciclo vital, según Snetsinger (1972), es de 28 días a 18°C, y de 21 días a 24°C.

Los daños causados se clasifican en dos grupos. Por un lado, los daños directos originados por las larvas, que se alimentan de micelio y destruyen las conexiones con los primordios, lo que afecta directamente al rendimiento, o también excavan galerías tanto en el pie como en el sombrero de los cuerpos fructíferos, depreciando la calidad comercial del producto. Por otro lado, se encuentran los daños indirectos ocasionados por los adultos, entre los que cabe destacar el importante papel que juegan como vectores de hongos (*Verticillium* spp. y *Trichoderma* spp.) y de ácaros pigmeofóridos fundamentalmente. No obstante, los daños pueden resultar modestos si se previene la entrada de esciáridos durante la siembra y el periodo de incubación. A lo largo del periodo de cosecha los daños suelen ser menores, ya que la temperatura de cultivo es sensiblemente más baja, entre 10-16°C, y el ciclo vital de los esciáridos se ralentiza; además, tienen más dificultad para sobrevivir en un substrato colonizado por el micelio.

Entre las medidas de tipo general que se pueden adoptar en las naves de cultivo de especies de *Pleurotus* con el fin de limitar la entrada de esciáridos (dípteros en general), se encuentran:

- La instalación de filtros antiesporas en las aberturas utilizadas para la ventilación del local, teniendo en cuenta que la colocación de estos elementos supone una pérdida de carga para los ventiladores.
- En caso de no colocar los citados filtros, la instalación de mallas antitrips, que deben de poseer una superficie filtrante cinco veces superior a la superficie de la abertura en la que se van a poner.

- La instalación de tubos de luz negra tanto en el interior de los locales de cultivo como en las zonas de paso o cancelas, ya que éstos atraen a los dípteros.
- La aplicación periódica del insecticida bendiocarb sobre la superficie situada alrededor del tubo de luz negra.

En el caso de que las medidas anteriores no sean suficientes y se recurra al uso de insecticidas químicos autorizados, hay que tener en cuenta que el diflubenzurón es efectivo, ya que actúa contra las larvas y reduce la oviposición y desarrollo de esciáridos. Sin embargo, la utilización de este producto en cultivos de *Pleurotus* spp. puede ocasionar una reducción significativa de la producción (Fleischer *et al.*, 1997).

En cultivos de *P. eryngii* se ha citado otro esciárido (*Bradysia paupera*), cuyas larvas se instalan en el compost, se nutren del micelio provocando su desaparición, y contribuyen a la difusión de *Trichoderma* spp. (Ferri, 1985).

Fóridos

Se trata fundamentalmente del género *Megaselia* (*M. halterata*, *M. nigra*). Los adultos tienen un tamaño de 2 a 3 mm, son de color negro y jorobados, con antenas muy pequeñas. Los fóridos acuden a los locales de cultivo atraídos por el olor del micelio en crecimiento activo, entran a través de las aberturas practicadas en las bolsas de polietileno, y ponen 20-30 huevos cerca de las aberturas. Los huevos son lisos y alargados, de color blanco sucio. Las larvas que emergen son de color blanco cremoso con cabeza puntiaguda, y miden alrededor de 4 mm. Se alimentan de micelio, dando lugar a una zona podrida de aspecto húmedo alrededor de las aberturas. Las pupas miden entre 2 y 3 mm de longitud. Inicialmente son de color blanco cremoso que vira a color pardo. Se caracterizan por la presencia de unos cuernos respiratorios típicos. Las moscas adulto eclosionan en 3-4 días y escapan a través de las aberturas. Los adultos pueden vivir durante ocho días, aunque la duración de su generación varía considerablemente con la temperatura (Krishnamoorthy *et al.*, 1991; Wetzal *et al.*, 1982).

Al igual que los esciáridos, causan daños directos e indirectos. Entre los primeros están los originados por las larvas, que se alimentan de micelio. Entre los daños indirectos destaca el papel que juegan como vector de otras plagas y enfermedades. Cuando la infestación se produce en los primeros estadios de la incubación, el substrato puede terminar completamente podrido. Se recomienda seguir las mismas medidas de tipo preventivo expuestas en el apartado anterior referido a los esciáridos.

En la India, Krishnamoorthy *et al.* (1991) hacen referencia a un fórido del género *Megaselia* spp. cuyas larvas se alimentan del micelio de *P. citrinopileatus* y *P. pulmonarius*, causando graves daños durante la fase de incubación. Johal y Disney (1994) describen una nueva especie de fórido, *M. pleurota* sobre *P. pulmonarius*; y Mohan *et al.* (1995), hacen lo propio con *M. tamilnaduensis*, cuyas larvas utilizan el micelio de *P. citrinopileatus* como alimento, ocasionando ligeras reducciones en la cosecha de basidiocarpos.

Cecidómidos

Dentro de esta familia de dípteros destacan los géneros *Heteropeza* spp. y *Mycophila* spp., que suelen ocasionar graves infestaciones durante el periodo de incubación de *Pleurotus* spp. (Ferri, 1985).

Los cecidómidos tienen dos modos de reproducción: uno de tipo sexual, en el que tras aparearse, la hembra pone huevos que eclosionan en larvas, éstas se desarrollan y mudan varias veces terminando en pupas, y posteriormente en adultos. El otro tipo de reproducción utiliza sólo formas inmaduras, y se denomina pedogénesis. En este caso, una larva madre produce larvas jóvenes en su interior, que aumentan en tamaño, y sin fertilización, terminan produciendo más larvas, lo que ocasiona un rápido incremento de formas larvarias que invaden el substrato en breve tiempo. Este modo de reproducción da lugar a una multiplicación de las poblaciones larvarias que puede ser muy espectacular. Ocasionalmente, pueden aparecer adultos. La pedogénesis está fuertemente influenciada por ciertos factores del medio, entre los que destaca la temperatura, la cual influye sobre el número de larvas hijas formadas y sobre la duración de una generación. La temperatura óptima para la especie *M. speyeri* se sitúa próxima a los 23°C, mientras que para *H. pygmaea* la gama de temperaturas es más favorable hacia los 29.5°C (Vedie, 1993).

El género *Heteropeza* (*H. pygmaea*) se caracteriza por la presencia de larvas blancas y hembras adultas de alrededor de 1.5 mm de longitud, mientras que el género *Mycophila* (*M. speyeri*) tiene larvas de color naranja intenso y hembras adultas de igual tamaño (Wetzel *et al.*, 1982). En ambos casos, las larvas miden entre 2 y 3 mm, y se alimentan a expensas del micelio, al que destruyen rápidamente tanto por la acción trófica como por la acción tóxica debido a los productos del metabolismo. En el curso de la incubación, las larvas de *Mycophila* spp. viven en el interior del saco y cuando hay un número elevado y los nutrientes comienzan a escasear se reúnen en torno de las aberturas de aireación formando masas móviles de color anaranjado. La infestación puede afectar incluso al cultivo en producción. En este caso, los basidiocarpos se desarrollan a duras penas, mientras que las larvas se reagrupan en la base del hongo donde se reproducen en gran número, causando un descenso en la calidad y en el peso del carpóforo.

Las causas que predisponen esta infestación hay que buscarlas en una pasteurización incorrecta del substrato, o en la falta de observancia de medidas estrictas de higiene, como pueden ser la rápida eliminación de todas las posibles fuentes de difusión y conservación (hongos y residuos de compost infestado) que pueden encontrarse en el área de la explotación. Para la lucha química se sugiere tratar el substrato en la planta de elaboración con diazinón (Ferri, 1985).

Cuando se cultiva *P. eryngii*, estos parásitos son particularmente dañinos porque su presencia es precoz y causa la total desaparición de la producción.

Colémbolos

Se trata de insectos sin alas, de 1-1.5 mm de largo, de color gris oscuro, que se mueven mediante saltos gracias a que poseen un órgano especial situado en la parte inferior terminal del abdomen. Generalmente pertenecen al género *Hypogastrura* spp. (Ferri, 1985).

Viven en el substrato y se nutren del tejido fúngico, al tiempo que excavan pequeñas galerías irregulares. También se encuentran con mucha frecuencia entre las láminas de los cuerpos fructíferos, provocando erosiones y perforaciones que dan un aspecto membranoso. Son favorecidos por un exceso de humedad del substrato y del aire, y son muy sensibles a temperaturas relativamente altas.

Sandhu y Arora (1994) se refieren a *Lepidocyrtus cyaneus*, como causante de serios daños en cultivos de *Pleurotus* spp. en India. Otro colémbolo, *Seira iricolor*, también causa daños a esporóforos, sobre todo en la base del estípite, llegando a detener el crecimiento de primordios jóvenes y proporcionando un aspecto seco con pequeños hoyos.

Los colémbolos entran en los cultivos generalmente con la materia orgánica. Las medidas que ayudan a minimizar su daño son: limpieza de la explotación, buena pasteurización del *compost* y el rociado de las áreas contaminadas, paredes, suelos y alrededores con piretrinas o malathion 0.05%.

Ácaros

A tenor de la literatura consultada, los ácaros no constituyen una plaga de importancia en el cultivo de las especies de *Pleurotus*. No obstante, hemos detectado recientemente la presencia del pigmeofórido *Bakerdania mesembrinae* (= *Pygmephorus mesembrinae*) en las aberturas practicadas en bolsas de substrato destinadas al cultivo de *P. ostreatus*. Aunque los daños observados no eran de consideración en el conjunto de la bolsa, se constató que en las aberturas en las que estaban presentes estos ácaros no aparecían indicios de fructificación de *Pleurotus* spp.

La importancia de *B. mesembrinae* viene dada por su papel como indicador de un proceso inadecuado de compostaje y por estar asociado a la presencia de *Trichoderma* spp. en el substrato. Esta estrecha relación entre el hongo y el ácaro se pone de manifiesto en que *Trichoderma* spp. es el alimento preferido de este ácaro (Fletcher *et al.*, 1989), y en que *B. mesembrinae* posee unas estructuras portadoras de esporas (esporoteca) que facilitan el transporte y diseminación de *Trichoderma* spp. (Terras y Hales, 1995). Se puede encontrar una amplia descripción de los principales caracteres identificativos de *B. mesembrinae* en Ferragut *et al.* (1997). Este ácaro también se ha encontrado asociado a cultivos de *P. eryngii* (De Lillo, 1997).

LAS ENFERMEDADES

Hongos

Tela de araña

Causada por *Cladobotryum dendroides*, forma conidial de *Hypomyces rosellus*, provoca en *Pleurotus* spp. una enfermedad análoga a la que ocasiona en el champiñón. Presenta micelio de color blanco y aspecto algodonoso que crece rápidamente sobre medio PDA y agar de malta, virando posteriormente a crema amarillenta y finalmente a color rosa o rojo carmín. Suele formar micelio aéreo con aglomeraciones miceliales. Conidióforos erectos, septados, con verticilos de 3-4 fiálides. Conidios cilíndricos de 20-32×7-13 mm, débilmente coloreados, con 1-3 septos. La descripción de los microesclerocios que forma *H. rosellus* aparece recogida en los trabajos de Gams y Hoozemans (1970) y Lane *et al.* (1991).

Inicialmente se manifiesta como un conjunto de filamentos blancos cortos, de aspecto floconoso y crecimiento rápido. Pasados uno o dos días, llega a formar masas algodonosas que recubren tanto el substrato como los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., en cualquier estadio de desarrollo, con lo que provoca así la marcescencia. Puede ser frecuente en la base de grupos numerosos de basidiocarpos donde provoca primero la pudrición del punto de unión al compost, y más tarde, la del resto del cuerpo fructífero. También se puede manifestar en el curso de la conservación y la comercialización, ya que pequeños puntos de infección pueden extenderse rápidamente en la superficie, recubriéndola de micelio, y haciendo que el producto no sea comercialmente válido.

La aparición de esta enfermedad es síntoma de medidas profilácticas insuficientes en la explotación. Los factores que predisponen su desarrollo son una elevada humedad relativa y una temperatura alta en la nave de cultivo, que eventualmente pueden estar asociadas a una insuficiente ventilación y a la presencia de superficies mojadas en los basidiocarpos. Su dispersión se produce principalmente por salpicaduras de agua, por corrientes de aire y por los recolectores.

Es necesario actuar rápidamente, ya que la abundante producción de esporas facilita la diseminación por el aire. Las primeras medidas a tomar para combatir la telaraña son la reducción de la temperatura y de la humedad del aire, junto con la eliminación de las partes anómalas detectadas. Esta enfermedad se puede controlar bien con fungicidas del grupo de los benzimidazoles, que conviene usar en tratamientos localizados cuando el brote es limitado.

También ocasiona pérdidas en cultivos de *P. eryngii*. En este caso, es generalmente transportada por la tierra de cobertura, en donde vive de forma saprófita sobre residuos vegetales muertos (Ferri, 1985). Otras especies de *Cladobotryum* encontradas en cultivos de *Pleurotus* spp. son: *C. mycophilum* (Eicker, 1995), y *C. asterophorum* y *C. varium* (Poppe *et al.*, 1985).

Mole seca

Verticillium fungicola es el agente causal de la enfermedad conocida como la mole seca en el champiñón, también origina una enfermedad similar en *Pleurotus* spp. (Marlowe y Romaine, 1982). Se describen dos síndromes distintos según el estado de desarrollo de los cuerpos fructíferos en el momento de la infección. Si ésta tiene lugar en el estado de primordio o botón, se desarrollan las típicas moles secas, es decir, masas amorfas de tejido del basidiocarpo. En estados más avanzados, se puede observar una trama gris de micelio y conidios cubriendo la superficie de los basidiomas infectados. En cambio, si la infección es posterior, los basidiocarpos muestran agrietamientos, hendiduras, curvaturas de los tejidos y áreas deprimidas, necróticas, de color pardo.

Este micoparásito forma colonias sobre medio agar-malta de color blanco a crema pálido, con forma redondeada y aspecto algodonoso o pulverulento. Presenta conidióforos erectos, con 1-10 verticilos sobre el eje principal, con 2-9 fiálides por verticilo, y una media de cinco. El tamaño medio de las fiálides es de 26×2 μ m. Conidios hialinos, de cilíndricos a elipsoidales, con un tamaño medio de 7.5×2.5 μ m. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa en 20°C, mientras que no crece a 27°C (Gea *et al.*, 1997).

En opinión de Marlowe y Romaine (1982), *V. fungicola* puede afectar tanto a cultivos de *Pleurotus* spp. como de champiñón, independientemente de la procedencia del patógeno, y reproduciendo en ambos hongos cultivados los síntomas típicos de la enfermedad.

Las esporas pueden ser diseminadas por el personal de la explotación, dípteros, y agua. Por tanto, es necesario eliminar los cuerpos fructíferos enfermos antes de proceder al riego o a la recolección y realizar un buen control de insectos.

El uso de fungicidas sólo puede ser recomendable para tratamientos muy localizados, realizados sobre substrato del cual no se vaya a proceder a la comercialización de la producción de *Pleurotus* spp. En este sentido, hay que tener en cuenta que *V. fungicola* es resistente al benomilo, carbendazima, clorotalonil e iprodiona, mientras que resulta moderadamente sensible al procloraz-carbendazima, y más sensible al procloraz-Mn (Gea *et al.*, 1996).

Hongos verdes

Esta denominación engloba a numerosos hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y *Penicillium* spp. fundamentalmente, que se caracterizan por tener en común la coloración verdosa de las fructificaciones conídicas, y por desarrollarse preferentemente en el substrato durante el curso de la incubación.

Trichoderma spp. A diferencia de la mayoría de hongos competidores, las especies de *Trichoderma* no dependen exclusivamente de los nutrientes solubles fácilmente disponibles, ya que también son capaces de descomponer la celulosa del substrato (Stolzer y Grabbe, 1991). Esta característica, junto con su capacidad para funcionar eficazmente

como saprofitos o parásitos y su elevada tasa de crecimiento, les convierte en los hongos más dañinos del cultivo de *Pleurotus* spp.

Las especies del género *Trichoderma* son formas conidiales del género *Hypocrea* spp. Entre las especies citadas en substrato de *Pleurotus* spp. se encuentran: *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. pseudokoningii*, etc. Recientemente, Royse *et al.* (1998) han encontrado la subespecie *Th4* de *T. harzianum* originando pérdidas superiores al 77% durante la producción de dos floradas de *P. ostreatus*. Esta subespecie es la causante de la epidemia de *Trichoderma* spp. aparecida en los cultivos de champiñón de Norteamérica. De todas ellas, Seaby (1996) proporciona una serie de características identificativas.

Trichoderma spp. invade rápidamente el substrato y obstaculiza el crecimiento del micelio de *Pleurotus* spp. mediante la producción de toxinas y antibióticos, al tiempo que ocasiona un descenso del nivel de pH hasta valores de 4-5, que son más favorables para su desarrollo. Inicialmente se puede observar en el substrato un moho de color blanco que vira a verde, adquiriendo posteriormente color gris verde-azulado debido a la abundante producción de conidios.

Los propágulos (conidios, clamidosporas o fragmentos de micelio) pueden ser esparcidos por corrientes de aire, aerosoles, insectos, ácaros, herramientas, ropas, etcétera. La infección del substrato tiene lugar generalmente en el curso de las operaciones de siembra y ensacado, sobre todo cuando no se observan escrupulosas normas de higiene. Los daños son proporcionales al número de sacos afectados y a la precocidad de la infección. Si la infección es temprana, el patógeno se multiplica rápidamente y coloniza una mayor cantidad de substrato, lo que conlleva una severa reducción de la cosecha. Por el contrario, con infecciones más tardías y ante un micelio de *Pleurotus* spp. vigoroso, el hongo verde no se manifiesta ni en la incubación ni durante la primera florada, aunque puede aparecer a continuación del primer flujo, cuando el micelio ha perdido vigor. Hay que tener en cuenta que los procesos de infección se pueden ver afectados por la temperatura interna del substrato, ya que se observa una correlación directa entre el desarrollo temprano de *Trichoderma* spp. y una temperatura excesiva durante la incubación que debilita al micelio de *Pleurotus* spp. (Poppe *et al.*, 1985; Olivier *et al.*, 1992; Eicker, 1995). El uso de aditivos en la siembra también puede acentuar el problema ya que suponen un aporte de hidratos de carbono fácilmente disponibles (azúcares solubles) y nitrógeno.

La preocupación por evitar la aparición de *Trichoderma* spp. también se refleja en los métodos empleados en la elaboración de los substratos de *Pleurotus* spp., de forma que se puede optar entre métodos con fundamentos distintos. Uno de ellos consiste en proporcionar una buena selectividad biológica, bien favoreciendo el desarrollo de bacterias termófilas, o bien mediante la adición al proceso de fermentación aerobia de activadores preseleccionados, como pueden ser: *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. macerans* (Stölzer y Grabbe, 1991; Bis'ko y Bilay, 1995). En otras ocasiones, se intenta proveer selectividad contra las especies de *Trichoderma* mediante el ajuste del pH del substrato a valores de 7.5 o

superiores, utilizando para ello caliza o procesos de fermentación cortos (Stölzer y Grabbe, 1991). Por último, otro método empleado se basa en la utilización de fungicidas para proteger el sustrato de hongos competidores. En este sentido, tanto Lelley y Niehrenheim (1991) como Olivier *et al.* (1991) opinan que los tratamientos fungicidas preventivos en el sustrato, antes de su pasteurización, suprimen dichos hongos e influyen positivamente en el crecimiento micelial de *Pleurotus* spp., incrementando la cosecha sin ocasionar deformaciones en los cuerpos fructíferos. Royse y Schisler (1987) también observaron un incremento en la cosecha tras la aplicación de benomilo en el sustrato remojado con agua y con suplementación. Normalmente, el benomilo es el fungicida más utilizado, el cual se mezcla con el sustrato o con el agua usada para humectar en una concentración que oscila entre 75 y 150 ppm. En sustratos tratados con más de 150 ppm se han encontrado anomalías en los cuerpos fructíferos formados (Rajarathnam y Bano, 1988). En definitiva, ninguno de estos métodos resuelve enteramente el problema, aunque sí ofrecen cierta protección.

Entre las muchas recomendaciones higiénicas y de control realizadas por diversos autores, cabe destacar:

- Usar filtros de esporas en la sala de inoculación.
- Evitar que penetre aire impulsado procedente de salas de cosecha a la sala de incubación.
- Limpiar y desinfectar con formol al 2% las superficies contaminadas.
- Eliminar rápidamente del área de la explotación todo sustrato infectado, ya que la abundante producción de esporas puede contaminar otros sustratos hasta entonces sanos.

Gliocladium spp. Se trata de otro hongo que colorea de verde las zonas de sustrato afectadas, que esporula abundantemente y que puede llegar a detener el crecimiento de las especies de *Pleurotus*. En algunas ocasiones se puede detectar en sustrato recién elaborado.

Fundamentalmente hay que hacer referencia a las infecciones de *Gliocladium deliquescens* sobre *P. pulmonarius*, el cual deja el sustrato flojo, suelto y desecho, hace desaparecer al micelio de este último, y produce decoloración y putrefacción en el basidiocarpo. También causa podredumbre parda en *P. ostreatus* y *P. eryngii* (Jandaik y Guleria, 1988; Quimio *et al.*, 1990). *G. virens* es otra especie que ocasiona síntomas idénticos a los descritos, y que también puede estar presente en el sustrato durante la incubación. Se ha encontrado sobre *P. pulmonarius*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, y *P. sapidus* (Quimio *et al.*, 1990).

Penicillium. Es un competidor por los nutrientes que puede infectar el sustrato durante la siembra. Su manifestación se ve favorecida por la aplicación de tratamientos térmicos insuficientes y por la falta de medidas higiénicas en las áreas de siembra y ensacado. Se ha detectado en sustrato recién elaborado y a lo largo de las fases de incubación y

fructificación. Suele aparecer en las aberturas de paquetes en los que se produce una condensación de la humedad, impidiendo así la fructificación normal de los basidiocarpos. También se manifiesta sobre los restos de carpóforos que permanecen en los sacos tras la recolección.

Jandaik *et al.* (1978) informaron de la infección de *P. cyclopium* sobre cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius*, ocasionando alrededor del 50-75% de pérdidas. El patógeno aparecía sobre los basidiocarpos poco después de que estos emergieran del sustrato. Los esporóforos quedaban cubiertos parcial o totalmente con esporas verde oscuras. Esta infección es favorecida por temperaturas de 24-26°C. Rajarathnam y Bano (1988) hacen referencia a *P. digitatum* como un hongo que crece directamente sobre la semilla y que ataca el sustrato durante la incubación.

Otros hongos competidores

Se trata de competidores secundarios que, en algunos casos, desempeñan un papel más importante como indicadores de la calidad del sustrato que como verdaderos antagonistas. Entre éstos se encuentra *Doratomyces* spp., el cual se ve favorecido por la presencia de carbohidratos y cuya aparición está asociada a problemas de sobrecalentamiento de los sustratos durante la incubación. El caso de *Mucor* spp. es parecido, ya que prevalece durante los meses de verano, cuando los rangos de temperaturas oscilan entre 25 y 35°C. Se manifiesta en el sustrato entre el segundo y cuarto día de la incubación, y produce abundantes esporangios negros. Puede ocasionar retrasos de tres a cuatro días en la fructificación.

También se pueden encontrar algunas especies de *Coprinus* (*C. cinereus*, *C. radiatus*) en sustratos suplementados con compuestos orgánicos ricos en nitrógeno, o en aquellos en que la permanencia de residuos amoniacales sea evidente.

Sclerotium rolfsii es un activo competidor en cultivos de *Pleurotus* spp. sobre paja de arroz que puede reducir considerablemente la cosecha. Se manifiesta a los 5-8 días de la siembra como una masa micelial blanca de aspecto lanudo. Produce esclerocios blancos que se vuelven pardo oscuros a los 3-4 días (Bano et al. 1981). Suele ser transportado por la paja de arroz utilizada en la elaboración del sustrato.

Otros hongos encontrados en sustrato de *Pleurotus* spp. son: *Badhamia affinis*, *Ceratiomyxa fruticolosa*, *Chaetomium globosum*, *Lilliputia rufula*, *Orbicula parietina*, *Fimetariella rabenhorstii*, *Iodophanus carneus*, *Peziza vesiculosa*, *Physarum*, *Oedocephalum*, *Stemonitis axifera*, *Stilbum*, entre otros.

Bacterias

Mancha amarilla

Pseudomonas agarici es un patógeno que origina la enfermedad conocida como *Drippy-gill* en *A. bisporus*, y la denominada *Yellow blotch* en *Pleurotus* spp. (Fermor, 1987). Esta

última enfermedad se caracteriza por la producción de manchas de distintos tamaños de color amarillo, beige o naranja, ocasionando a veces depresiones sobre la superficie de los primordios, que terminan poco desarrollados, de color amarillo a naranja y deformes. Cuando la humedad relativa es elevada, se pueden observar gotas de fluido amarillo claro que dan apariencia viscosa a los basidiocarpos. Cuando son infectados en fase de primordio dan lugar a basidiocarpos con estípites que tienden a curvarse cerca de la base, presentando una longitud desigual. El diámetro del pie es a veces reducido, produciendo una apariencia larga y delgada. En casos severos, los basidiomas además de deformes y de color amarillo brillante a naranja, son más frágiles de lo habitual, se pudren y huelen mal. Los cuerpos fructíferos que se desarrollan en floradas posteriores a la aparición de basidiocarpos sintomáticos, pueden ser asintomáticos, o bien, pueden ser tanto o más sintomáticos que sus predecesores (Bessette *et al.*, 1985).

Las colonias de *Ps. agarici* son de color beige, semiopacas, de 2 a 5 mm de diámetro, circulares, pulvinoladas y enteras. Otros caracteres identificativos del agente causal se pueden encontrar en Bessette *et al.* (1985).

Se aprecia una relación clara entre la humedad relativa y la formación y severidad de los síntomas, de forma que si la humedad se incrementa por encima del 95%, la tasa de formación de síntomas también se incrementa significativamente (Bessette *et al.*, 1985). En este sentido, Sharma y Jandaik (1995) afirman que en cultivos de *P. pulmonarius* una combinación de 24-28°C junto con más del 90% de humedad relativa resulta altamente beneficiosa para el desarrollo de la enfermedad.

No existe un medio de lucha química que garantice el control de la enfermedad, por tanto, es indispensable frenar toda condensación en la superficie de los basidiocarpos, asegurar la elaboración de un substrato bien fermentado y que los locales de cultivo mantengan temperaturas adecuadas estables, sobre todo durante el período de incubación.

Mancha parda

Pseudomonas tolaasii causa la enfermedad de la mancha bacteriana (*Brown blotch disease*) tanto en *A. bisporus* como en *Pleurotus* spp. (Fermor, 1987). Se caracteriza por ocasionar el pardeamiento de los primordios y manchas en los sombreros que pueden llegar a ser lesiones de color pardo, y a veces pardeamiento del micelio. Puede causar pérdidas significativas durante la primera florada, aunque a veces sólo aparece en la segunda. También se puede observar que en el mismo local de cultivo, bajo las mismas condiciones, se pueden encontrar bolsas totalmente afectadas y otras sanas, a veces próximas unas a otras.

Se puede esperar la aparición de estas bacterias debido a un inadecuado procedimiento de *peak-heating* durante la elaboración del substrato, o a diferentes factores ambientales que prevalecen durante el periodo de cultivo (Györfi, 1989). La humedad elevada, las temperaturas templadas y los vectores como las moscas son condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

La forma patógena de *Ps. tolaasii* se puede identificar *in vitro* gracias a la interacción específica que aparece entre *Ps. tolaasii* y *Ps. reactans*. Cuando estas dos bacterias crecen una junto a otra sobre medio King B o Pseudomonas Agar F, se puede ver un precipitado blanco. Esto se denomina *the white line test* (Wong y Preece, 1979). La reacción de la línea blanca es el resultado de una interacción específica entre un componente difusible producido por *Ps. reactans* (llamado WLIP) y la tolaasina, que es la toxina producida por *Ps. tolaasii*, responsable del daño causado por el patógeno en el champiñón (Soler-Rivas *et al.*, 1999).

Otras bacteriosis

Lelley y Niehrenheim (1991) y Gill (1995) citan a *Ps. fluorescens* como patógeno causante de las manchas bacterianas de *Pleurotus* spp., originando distorsiones en cuerpos fructíferos. Poppe *et al.* (1985) también nombran a *Ps. fluorescens* como agente causal de basidiocarpos con forma de puño durante la fructificación, en sustratos demasiado húmedos. Por otra parte, Mallesha y Shetty (1991) hacen referencia a *Ps. stutzeri* como causante de la enfermedad *Brown Spot*, la cual reduce drásticamente la cosecha.

Virus

La lista de especies de *Pleurotus* en las que se han detectado virus incluye: *P. abalonus*, *P. colombinus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, y *P. sapidus*. Se han observado tanto partículas virales esféricas de 20-32 nm de diámetro, como partículas baciliformes alargadas que miden hasta 600 nm de longitud (Rinker *et al.*, 1993). La observación de diversos tipos de partículas puede suponer la presencia de un complejo viral parecido al que se conoce en el caso de *A. bisporus* (Molin y Lapierre, 1989).

El efecto que tiene la virosis sobre la producción de *Pleurotus* spp. ha sido estudiado por Rinker *et al.* (1992), mediante la realización de ensayos con micelio sano y con micelio infectado de virus. La enfermedad se puede reconocer durante la preparación del micelio por sus efectos sobre la tasa de crecimiento y la morfología, ya que el micelio infectado tiene un crecimiento más lento, aspecto algodonoso y color de blanco-amarillento a grisáceo; mientras que el sano crece más rápido, está más unido a la superficie del medio de cultivo y el color es blanco.

Durante la fase de incubación el crecimiento micelial también es más lento en sustratos infectados con virus que en los no infectados. En el ámbito de primordios, el sustrato infectado produce masas esféricas de tejido blando de hasta 5 cm de diámetro que se colapsan fácilmente, sobre todo cuando la humedad relativa es elevada. En sustratos cuya superficie está más seca, los basidiocarpos se desarrollan normalmente, y no se observan masas de tejido parecidas a coliflores. Poppe *et al.* (1987) relacionan la aparición de coliflores de pequeño tamaño y de sombreros con márgenes dentados, con la presencia de partículas virales esféricas. Los síntomas de coliflores se incrementan por condiciones desfavorables para el cultivo, tales como una intensidad de luz demasiado baja, escaso suministro de aire, sobrecalentamiento del sustrato, o presencia de moscas y hongos (Rinker *et al.*, 1992).

Los cuerpos fructíferos procedentes de micelio infectado de virus no muestran alteraciones en su morfología y color, aunque el peso y el tamaño son menores que en los basidiocarpos crecidos a partir de micelio no infectado. Por tanto, se observa un descenso en la cosecha y un retraso en la recolección. Rinker *et al.* (1992, 1993) mencionan que en los cuerpos fructíferos sanos no encontraron dsRNA viral, mientras que sí lo aislaron en los presuntamente infectados de virus.

El principal medio de transmisión de virus en los hongos es a través de esporas o micelio infectado. Estos pueden infectar micelio sano a través de anastomosis de micelio no infectado y de hifas infectadas, ya que las partículas virales parecen ser capaces de pasar a través del septo doliporo, lo que pone en evidencia la translocación de virus en basidiomicetos (Pingyan *et al.*, 1990).

El control de la virosis se basa fundamentalmente en unas buenas prácticas higiénicas, entre las que cabe destacar: la reducción de la carga de esporas mediante la filtración del aire, una adecuada manipulación de la humedad relativa, la selección de variedades comerciales, la recolección de carpóforos inmaduros, un buen control de insectos y la acumulación de los materiales de cultivo agotados en lugar alejado de las explotaciones. Es muy aconsejable humedecer el substrato que se va a eliminar bien con agua o bien con una ligera solución de hipoclorito de sodio o formol, en orden a prevenir la dispersión de partes de micelio seco o de esporas (Poppe *et al.*, 1987). La rotación de variedades comerciales y de especies de *Pleurotus* es recomendable para cortar la ruta de transmisión de la enfermedad (Rinker *et al.*, 1992).

ANOMALÍAS NO PARASITARIAS

Falta de luz

Las especies de *Pleurotus* tienen fototropismo positivo, ya que la luz (intensidad luminosa, fotoperiodo y tipo de radiación) es uno de los factores necesarios para el desarrollo de los primordios. En condiciones de total oscuridad se diferencian escasos basidiocarpos que suelen ser deformes, arracimados, de forma coraloide, color blanco y sabor amargo, en los que no se distingue el pie y el sombrero. En condiciones de escasez de luz se asiste a la producción de cuerpos fructíferos con forma de corneta, sombrero muy reducido, y pie alargado y débil. Este efecto es más marcado cuanto menor es la intensidad luminosa, de forma que los carpóforos pálidos no pigmentados aparecen cuando la intensidad luminosa se sitúa por debajo de 300 Lux (Poppe *et al.*, 1985).

Un exceso de luz también es perjudicial ya que puede retardar la formación de primordios. Según la variedad de *Pleurotus*, cuando la intensidad de luz es superior a 2000 Lux, se puede inhibir la iniciación del fruto (Poppe *et al.*, 1985). Las radiaciones rojas son desfavorables para el desarrollo de los cuerpos fructíferos.

Exceso de CO₂

El aumento del contenido de CO₂ del aire hasta valores de 0.08% provoca una ralentización en el crecimiento de los cuerpos fructíferos, mientras que si el contenido de CO₂ asciende a 0.15-0.3% se puede producir una rápida mortandad de toda la producción (Ferri, 1985).

La falta de luz junto con una aireación insuficiente provoca la aparición de masas de tejido sin diferenciar con forma de coliflor, de las que raramente se desarrollan cuerpos fructíferos normales. Este síntoma, como ya se ha visto anteriormente, también puede estar ligado a la presencia de virus (Zadrazil, 1978).

Efectos de gases y plaguicidas

Algunas anomalías observadas como son los márgenes ondulados y la torsión del sombrero pueden estar causadas por el efecto fungitóxico de plaguicidas, ya que el tejido del basidiocarpo actúa como una esponja, absorbiendo muchos productos volátiles. Además de afectar la morfología de los cuerpos fructíferos, inciden en modo más o menos grave sobre la productividad.

También puede haber daños por gas de combustión, en los que se observa una hipertrofia del tejido del sombrero todavía no diferenciado, dando lugar a láminas y crestas más o menos irregulares.

Otras alteraciones no parasitarias

Poppe *et al.* (1985) señalan otras perturbaciones no infecciosas observadas en el substrato, entre las que se encuentran:

- El estrés térmico: un incremento demasiado elevado de temperatura puede conducir a un proceso en el que muera el micelio de *Pleurotus* spp., sobre todo entre 33-40°C, según la variedad cultivada. Temperaturas de 22 a 28°C, según de la variedad, pueden causar serios retrasos de fructificación e incluso la inhibición completa de la misma.
- El pH: el micelio de *Pleurotus* mostrará un bajo crecimiento y una incubación defectuosa si el pH es superior a 7.0 o inferior a 5.0.
- El contenido en agua: el substrato puede ser difícilmente degradado si el contenido en agua es inferior al 55%. Por encima del 70% la flora bacteriana es más activa, colonizando la película de agua de alrededor de cada paja, y dejando mínimas esperanzas al micelio de *Pleurotus* spp.

MEDIDAS GENERALES DE HIGIENE

En este apartado se sugieren diversas recomendaciones higiénicas de carácter preventivo, aplicables en el ámbito de la nave de cultivo, que se pueden tener en cuenta con el

fin de minimizar la aparición y dispersión de las plagas y enfermedades citadas. Aunque algunas de estas medidas ya se han comentado anteriormente, no dudamos en repetir-las, debido al efecto beneficioso que se desprende de su aplicación.

- Antes de iniciar el ciclo de cultivo, se recomienda limpiar y desinfectar concienzudamente las naves de cultivo.
- Usar filtros de esporas.
- Prevenir la entrada de insectos, cerrando puertas y ventanas, y colocando mallas antitrips.
- Iniciar la cosecha en las naves de cultivo no infectadas o más jóvenes y terminar en las más viejas.
- Eliminar los primordios no desarrollados del substrato.
- No tocar cuerpos fructíferos enfermos durante la recolección.
- Desinfectar los utensilios de recolección antes de volver usarlos. Se pueden utilizar soluciones de formol al 2% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Usar iluminación adecuada en las salas de fructificación.
- Al terminar la cosecha llevar el substrato agotado a vertederos autorizados, o bien tratarlo con vapor a 70°C durante 6-12 horas.

REFERENCIAS

- Bano, Z.S., S. Rajarathnam and M. Muthu. 1981. Use of ethyl formate in controlling the growth of *Sclerotium rolfsii* during the cultivation of *Pleurotus* species. *Mushroom Science* 11:541-549.
- Bessette, A.E., R.W. Kerrigan and D.C. Jordan. 1985. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 50(6):1535-1537.
- Bis'ko, N.A. and V.T. Bilay. 1995. Effects of *Bacillus macerans* Fr. on growth of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. In: T.J. Elliott (ed.), *Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.
- De Lillo, E. 1997. Osservazioni sulle preferenze alimentari di *Pediculaster mesembrinae* (Canestrini) (Acari: Siteroptidae). *Entomologica, Bari* 31:7-12.
- Eicker, A. 1995. The South African experience in growing *Pleurotus* spp. In: T.J. Elliott (ed.), *Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Fermor, T.R. 1987. Bacterial diseases of edible mushrooms and their control. *Cultivating Edible Fungi, Developments in Crop Science* 10:361-370.
- Ferragut, F., F.J. Gea y J.A. García-Morras. 1997. El ácaro del champiñón *Brennandania lambi* (Krczal) (Acari: Pygmephoridae): introducción en España, importancia económica y separación de especies afines. *Bol. San. Veg. Plagas* 23:301-311.
- Ferri, F. 1985. *I funghi*. Edagricole, Bologna.
- Fleischer, S.J., C.B.O. Keil and D.J. Royle. 1997. Diflubenzuron impacts on shiitake and *Pleurotus* production and *Lycoriella mali* oviposition and larval development. *Mushroom News* 45(4):12-19.
- Fletcher, J.T., P.F. White and R.H. Gaze. 1989. Mushrooms: Pest and disease control. Intercept, England.
- Gams, W. and A.C.M. Hoozemans. 1970. *Cladobotryum*-konidienformen von *Hypomyces*-arten. *Persoonia* 6:95-110.
- Gea, F.J., J.C. Tello and M. Honrubia. 1996. *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* 136:133-137.
- Gea, F.J., J.C. Tello y D. Díaz. 1997. Hifomicetos micoparásitos del champiñón cultivado [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach]. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 22:23-32.
- Gill, W.M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 33:34-55.
- Györfi, J. 1989. Present plant protection problems in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* and its hybrid strains) growing in Hungary. *Mushroom Science* 12:603-609.
- Hussey, N.W. and B. Gurney. 1968. Biology and control of the sciarid *Lycoriella auripila* Winn. (Diptera: Lycoriidae) in mushroom culture. *Ann. appl. Biol.* 62:395-403.
- Jandaik, C.L. and D.S. Guleria. 1988. Interaction of *Gliocladium deliquescens* and *Pleurotus sajor-caju* in vitro. *Mush. J. Tropics* 8:105-108.
- Jandaik, C.L., C.D. Thapa y S. Kumar. 1978. Studies on the control of *Penicillium cyclopium* Westling contamination during the cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer; efficacy of some fungicides. *Mushroom Journal* 63:88-90.
- Johal, K. and R.H.L. Disney. 1994. Phoridae (Diptera) as pests of cultivated oyster mushrooms (Agaricales: Pleurotaceae) in India. *Bull. Entomol. Res.* 84:247-254.
- Krishnamoorthy, A.S., T. Marimuthu, K. Sivaprakasam and R. Jeyarajan. 1991. Occurrence and damage caused by phorid fly on oyster mushroom. *Mush. J. Tropics* 11:23-27.
- Lane, C.R., R.C. Cooke and J.L. Burden. 1991. Ecophysiology of *Dactylium dendroides* – The causal agent of cobweb mould. In: M.J. Maher (ed.), *Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.

- Lelley, J. and U. Niehrenheim. 1991. Substrate treatment by fungicides in the oyster mushroom production. *In: M.J. Maher (ed.), Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Mallesha, B.C. and K.S. Shetty. 1991. Characterisation of *Pseudomonas stutzeri* causing brown spot disease of oyster mushroom. *Journal of Food Science and Technology* 28:187-188.
- Marlowe, A. and C.P. Romaine. 1982. Dry bubble of oyster mushroom caused by *Verticillium fungicola*. *Plant Disease* 66:859-860.
- Mohan, S., S. Mohan and R.H.L. Disney. 1995. A new species of scuttle fly (Diptera: Phoridae) that is a pest of oyster mushrooms (Agaricales: Pleurotaceae) in India. *Bull. Entomol. Res.* 85:515-518.
- Molin, G. et H.D. Lapierre. 1989. Characterisation du virus P V chez *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. et dans d'autres especes du genre *Pleurotus*. *Mushroom Science* 12:637-644.
- Olivier, J.M., G. Houdeau and P. Delpech. 1992. Diseases control and hygiene in *Pleurotus* and shiitake cultivation. *Mushroom World* 3(3):36-37.
- Olivier, J.M., J. Laborde, J. Guinberteau, N. Poitou et G. Houdeau. 1991. *La culture des champignons*. Armand Colin, Paris.
- Pingyan, L., L. Hongdi and C. Kaiying. 1990. Intracellular appearance, morphological features and properties of oyster mushroom virus. *Mycol. Res.* 94:529-537.
- Poppe, J., W. Welvaert and G. De Both. 1985. Diseases and their control-possibilities after ten years *Pleurotus* culture in Belgium. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 50(3b):1097-1108.
- Poppe, J., G. Samyn, W. Welvaert and F. Meulewaeter. 1987. Mycoviroses and their control in Belgian mushroom farms, especially on *Agaricus*, *Pleurotus* and *Lentinus*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 52(3a):1005-1013.
- Quimio, T.H., S.T. Chang and D.J. Roysse. 1990. Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. *FAO Plant Production and Protection* 106:1-155.
- Rajarithnam, S. and Z. Bano. 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part IB. Pathology. *In vitro* and *in vivo* growth requirements, and world status. C.R.C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26(3):243-311.
- Rinker, D.L., G. Alm and L.W. Stobbs. 1992. Virus disease in oyster mushrooms. *Mushroom World* 3(3):38-39.
- Rinker, D.L., L.W. Stobbs and G. Alm. 1993. Effect of virus disease on oyster mushroom production. *Micol. Neotrop. Apl.* 6:73-79.
- Roysse, D.J., M. Ospina-Giraldo, M.R. Thon, X. Chen and C.P. Romaine. 1998. Potential threat to *Pleurotus* spp. production from *Trichoderma harzianum* (Th4), cause of mushroom green mold of *Agaricus bisporus*. *Mushroom News* 46(2):20-24.
- Roysse, D.J. and L.C. Schisler. 1987. Effect of benomyl application and SpawnMate supplementation on yield and size of selected genotypes of *Pleurotus* spp. *Cultivating Edible Fungi, Developments in Crop Science* 10:109-115.
- Sandhu, G.S. and P.K. Arora. 1994. Insect pests of cultivated mushrooms in India their management and control. *In: M..C. Nair (ed.), Advances in mushroom biotechnology*. Scientific Publishers, Jodhpur.
- Seaby, D.A. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology* 45:905-912.
- Sharma, V.P. and C.L. Jandaik, 1995. Ecological relationships of yellow blotch of *Pleurotus sajor-caju* caused by *Pseudomonas agarici*. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.* 25(3):192-194.
- Snetsinger, R. 1972. Laboratory studies of mushroom-infesting arthropods. *Mushroom Science* 8:199-208.
- Soler-Rivas, C., N. Arpin, J.M. Olivier and H.J. Wichers. 1999. WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas*

- “reactans”, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Microbiology* 86:635-641.
- Stölzer, S. and K. Grabbe. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. *In*: M.J. Maher (ed.), *Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Terras, M.A. and D.F. Hales. 1995. Red pepper mites are vectors of *Trichoderma*. *In*: T.J. Elliott (ed.), *Science and cultivation of edible fungi*. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Vedie, R. 1993. Les cécidomyies et la culture du champignon de Paris. *Bull. F.N.S.A.C.C.* 57:24-33.
- Wetzel, H.A., P.J. Wuest, D.L. Rinker and R.J. Finley. 1982. Significant insect pests of the commercial mushroom. *In*: P.J. Wuest and G.D. Bengtson (eds.), *Penn State handbook for commercial mushroom growers*. The Pennsylvania State University.
- Wong, W.C. and T.F. Preece. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *Journal of Applied Bacteriology* 47:401-407.
- Wuest, P.J., R.J. Finley, D.L. Rinker, A. Napkil, D.J. Royse, R. Tetrault and R.J. Snetsinger. 1982. Organizing and using the Penn State IPM approach to mushroom pest management. *In*: P.J. Wuest and G.D. Bengtson (eds.), *Penn State handbook for commercial mushroom growers*. The Pennsylvania State University.
- Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. *In*: S.T. Chang and W.A. Hayes (eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, New York

XI Los criterios para el diseño y la distribución de una planta productora de *Pleurotus* spp.

José Ernesto Sánchez Vázquez

CONTENIDO

ANTECEDENTES	227
MERCADO: CAPACIDAD Y UBICACIÓN	227
Mercado	227
Capacidad de producción	228
Ubicación	228
DISTRIBUCIÓN DE PLANTA	229
El laboratorio	229
La central para la preparación del sustrato	232
La sala de cultivo	233
REFERENCIAS	236

ANTECEDENTES

El interés en detenerse a analizar el diseño de una planta productora de *Pleurotus* spp. o el rediseño de una unidad que ya está funcionando, es la optimización de la productividad y el rendimiento a través del uso inteligente de los recursos disponibles. Esta situación exige una reflexión metódica que permita definir la mejor fluidez de materiales en el proceso para que las demoras sean mínimas y se aproveche toda la capacidad, el espacio, la mano de obra y el equipo con que se cuenta o se piensa contar. Una buena distribución contribuye no sólo a mejorar el rendimiento y la calidad, sino también a mantener la higiene adecuada, que como se ha visto a lo largo de este libro, es una necesidad vital en el cultivo de los hongos.

El proceso de cultivo de los hongos comestibles abarca tres etapas bien definidas que son la producción de la semilla, la preparación del sustrato y el cultivo propiamente del hongo. Según los alcances de la empresa que se desee establecer, una sola empresa puede desarrollar una, dos o las tres actividades mencionadas. Esta decisión compete a la(s) persona(s) que desea(n) iniciar el negocio; aunque debido a la especialización del trabajo, la última alternativa se observa cada vez menos. Por ejemplo, en Europa no se encuentra en todo el continente una sola empresa que desarrolle las tres actividades en un mismo lugar. Es decir, hay centros que se ocupan y compiten por producir semilla de calidad, otros que preparan el sustrato y lo distribuyen ya inoculado, inclusive colonizado, al cultivador y por último, están los cultivadores, quienes adquieren el sustrato ya inoculado y lo mantienen en las condiciones adecuadas para realizar la fructificación, la cosecha y la venta de los hongos. Las tres actividades son rentables y pueden desarrollarse de manera independiente desde el punto de vista administrativo, profesional y económico, aunque son interactuantes e interdependientes en función de la demanda.

El diseño de la planta productora de hongos es de vital importancia para el futuro de la empresa. Aunque no asegura el éxito de la misma, los errores que se cometan en esta etapa pueden significar graves y constantes pérdidas más adelante durante el funcionamiento continuo. Por lo mismo es importante analizar detenidamente los diferentes aspectos que la definirán como actividad productiva. Este análisis debe no solamente determinar las mejores condiciones técnicas para su desarrollo, sino también definir su viabilidad. El cuadro 1 señala los principales beneficios de una buena distribución de planta.

MERCADO: CAPACIDAD Y UBICACIÓN

Mercado

La primera pregunta que se debe resolver cuando se planea producir hongos comestibles es qué se va a hacer con la producción una vez que la empresa esté funcionando. Si se piensa vender hacia el mercado, se deberá evaluar la magnitud de la demanda. Una auscultación del mercado deberá definir si existe una demanda insatisfecha, cuál es el

Cuadro 1. Beneficios de una buena distribución de planta

Disminuye el transporte de materiales
Evita demoras
Utiliza el espacio cúbico
Integra departamentos
Da seguridad a los trabajadores, al material y al producto
Permite cierto margen de flexibilidad
Permite la operación económica y eficiente de la empresa
Contribuye a la calidad del producto

precio de los productos similares (competidores), cuáles son las calidades y productos preferidos y cubiertos por la oferta, etcétera. La veracidad y oportunidad de esta información es fundamental para seguir adelante en el planteamiento de los objetivos del proyecto. El grupo o persona que invierte deberá definir qué porcentaje de la demanda piensa cubrir de acuerdo con su disponibilidad económica.

En algunas ocasiones se plantea el cultivo de hongos como una actividad social que aporte alimento para el autoconsumo de las familias de una comunidad. En este caso se debe considerar no solamente el tamaño de la comunidad que se verá beneficiada, sino también el hábito que tenga ésta por el consumo de hongos, así como la posibilidad de colocar en el mercado un eventual excedente de la producción.

Capacidad de producción

La capacidad de producción de la planta se define en función del mercado, es decir, de la magnitud de la oferta existente y de la demanda insatisfecha, así como de la disponibilidad de suministros. Con base en esto, el grupo o persona que invierte debe definir su capacidad de producción es decir, la parte de la demanda que pretende cubrir de acuerdo con sus limitaciones económicas, financieras y de otra índole.

Ubicación

La mejor ubicación para una planta productora de *Pleurotus* spp. será aquella en donde las condiciones climáticas imperantes sean lo más constantes y cercanas a los requerimientos ambientales del hongo. Sin embargo, éste no suele ser el único criterio que se toma en cuenta para elegir la ubicación de la planta. También influyen otros criterios como la distancia al mercado de consumo y hacia las materias primas, las disponibilidades de mano de obra y de servicios para la operación de la planta (luz, agua, carreteras, teléfono), la disponibilidad del terreno, etcétera. El peso que se debe dar a cada uno de estos criterios al momento de elegir el lugar depende de cada situación, por lo que no se pueden hacer generalizaciones; sin embargo, en el último de los casos, lo que se pretende es disminuir costos de operación. Para ello se debe preveer y racionalizar el gasto de energía. Esto es, se deben analizar las opciones existentes para minimizar el costo de producción, lo que implica minimizar gastos por climatización de áreas (costo de ener-

gía eléctrica y de gas, necesidades de calentamiento y enfriamiento), los gastos de transporte (de materias primas y de productos), los impuestos, entre otros.

DISTRIBUCIÓN DE PLANTA

Una distribución eficaz de la planta productiva buscará acortar las distancias entre puestos de trabajo para disminuir el transporte de materiales en proceso. Para esto se requiere un análisis riguroso del flujo de materiales. En el caso del cultivo de hongos, se deberá evitar que el flujo, la operación o el almacenamiento de materiales no estériles colinde con áreas de trabajo estéril, de material recién sembrado o con material en incubación. Esto no solo evitará contactos innecesarios entre los materiales sino que también disminuirá la posibilidad de que el personal que manipula los no estériles entre en contacto con los estériles y viceversa.

El laboratorio

Las necesidades para el establecimiento de un laboratorio de producción de semilla han sido delineadas en el capítulo 7. En él se ha visto que los requerimientos dependen de la capacidad de producción: un laboratorio pequeño puede acondicionarse en el interior de la casa de un productor, mientras que uno mayor deberá ocupar un local o edificio exprofeso. En ambos casos, laboratorio pequeño o grande, el acondicionamiento de las áreas y su distribución, es decir, la distancia entre los puestos de trabajo y la ubicación de una respecto a las otras serán de vital importancia para asegurar la continuidad de la producción y maximizar la eficiencia.

A manera de ejemplo se discute en las líneas siguientes el caso de un laboratorio industrial. Los conceptos externados también se aplican a casos más sencillos y laboratorios de tipo familiar, en los cuales sin gran infraestructura se tratarán de mantener las condiciones expuestas en el presente ejemplo. Para un buen funcionamiento, el laboratorio deberá contar al menos con las áreas que se indican en el cuadro 2 y con el material y equipo que se indica en el cuadro 3.

Cuadro 2. Áreas necesarias para el funcionamiento de un laboratorio de producción de semilla

Definición de áreas por actividad
Recepción y almacenamiento del grano y otras materias primas
Limpieza, humidificación y escurrido del grano
Mezclado de ingredientes
Embolsado y esterilización
Trabajo para la conservación de las cepas, la multiplicación del micelio y el control de calidad
Siembra
Incubación
Almacenamiento y empaque
Gestión administrativa

Cuadro 3. Material y equipo mínimo necesario para la implementación de un laboratorio de cultivo de *Pleurotus* spp.

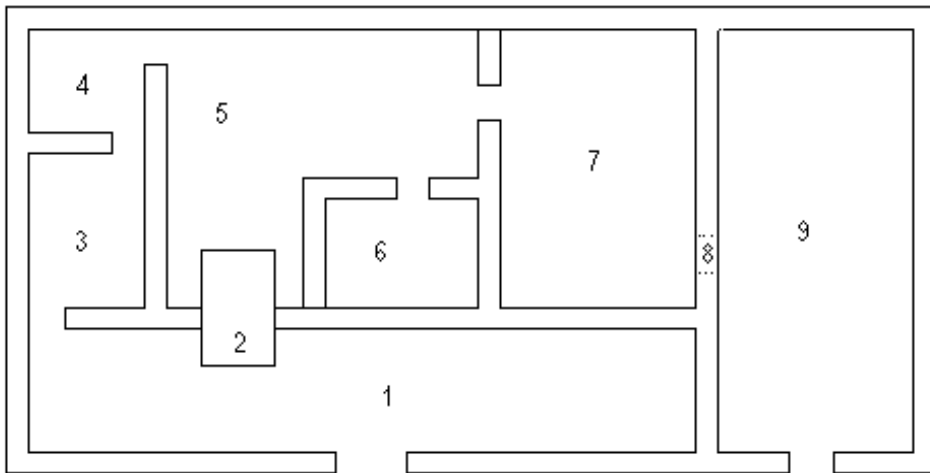
<i>Material o equipo</i>	<i>Función</i>
Balanza	Pesado del grano
Estufa	Cocción del grano (opcional)
Autoclave	Esterilización del grano y material
Cámara de transferencia o de flujo laminar	Siembra y transferencias en condiciones de esterilidad (recomendable)
Mechero	Mantenimiento de área estéril
Desecador	Producción de esporadas
Armario	Almacenamiento de materiales y enseres
Lavadero	Enjuague y lavado de materiales
Anaqueles	Resguardo de medios y cristalería
Matraces, cajas de petri, vasos de precipitado, y probeta, tubos	Preparación de medios de cultivo para la propagación y conservación de las cepas.
Microscopio	Control de calidad de las cepas (muy recomendable)
Refrigerador y termo para nitrógeno líquido	Conservación de material genético

Es conveniente insistir en que el éxito operativo de un laboratorio prevalece en una buena distribución física de las áreas y en la disposición del personal para respetar las normas de limpieza e higiene que se necesitan. Para mantener libres de gérmenes que puedan contaminar el material en proceso, se recomienda aislar totalmente las áreas de siembra e incubación. Esto permite controlar y restringir el paso de materiales y personas hasta un nivel absolutamente indispensable. Este aislamiento facilita el control del aire, el cual en el interior de estas áreas debe ser filtrado y debe contener el mínimo posible de partículas de polvo por pie³ (pp).

En la figura 1 se presenta un esquema del área de producción de un laboratorio de producción de semilla. Dentro de la figura, el número ubica el área de manejo no estéril del grano embolsado y no estéril. El número 2 representa una autoclave. En la medida de lo posible, se recomienda utilizar autoclaves de dos puertas en las cuales la puerta de entrada del material quede ubicada en la sala de preparación del grano no estéril (1) y la otra, la puerta de salida del material ya estéril, quede dentro de un cuarto con ambiente limpio (5) acondicionado para manejo y enfriamiento con asepsia rigurosa del material ya estéril. Este cuarto debe mantener un nivel de empolvamiento entre 1,000 y 3,000 partículas de polvo/pie³. Todo el material que entra al área 5 lo hace a través del autoclave, después de un ciclo de esterilización. El personal que ingresa a esta parte del laboratorio lo hace mediante un acceso aledaño (cuartos de vestir, núm. 3 y de amortiguamiento, núm. 4), intermedio entre el área estéril y el resto de la planta. Este acceso debe presentar un ambiente semiestéril y acondicionado para vestirse con uniformes blancos estériles y poder pasar al área 5. El área de siembra (6) es una zona totalmente

protegida y de acceso restringido con una tasa de empolvamiento mínima (100 pp) y que cuenta con una campana de flujo laminar para facilitar las transferencias de inóculo a la semilla estéril. El área de incubación (7) debe tener una tasa de empolvamiento no mayor de 1,000 pp y debe ser un área cerrada con comunicación hacia el área de empaque (9) a través de una ventana pequeña con cortina de hule (8), que cuente de preferencia con una lámpara UV (para esterilizar periódicamente la superficie) y que por efecto de la presurización imperante en el cuarto de incubación no dé lugar a la entrada de aire atmosférico no estéril.

Fig 1. Esquema de un laboratorio de producción de semilla de hongos comestibles
(Para explicación, ver cuadro 4 y texto.).



Cuadro 4. Áreas de trabajo de un laboratorio de producción de semilla

Área	Descripción	Tasa de Empolvamiento Máximo (pp) ¹	Presión (mca.) ²
1	Manejo de materia prima no estéril	1-3 × 10 ⁶	Atm.
2	Autoclave	-	-
3	Cambio de ropa del personal	100,000	2
4	Area de amortiguamiento	10 000	3
5	Area de manejo y enfriado de material estéril	1000-3000	4.5
6	Siembra	100	6
7	Incubación	1000	4.5
8	Ventana para salida de material colonizado	-	-
9	Embalaje y embarque	< 10 ⁶	Atm

¹pp: partículas de polvo/pie³

²mca.: milímetros columna de agua de presión ambiental en el área referida.

Atm: Presión atmosférica

Para impedir que el aire no esté en contacto con el material estéril o ya sembrado, debe existir un gradiente de presión entre las diferentes áreas: La presión más alta (alrededor de 6 mm columna de agua o mca), se ejerce en el cuarto de siembra, disminuye en la sala de incubación y en el cuarto enfriado del material (alrededor de 4.5 mca). En el cuarto de vestir hay una presión menor que en las áreas anteriores pero mayor que la presión atmosférica (entre 2-3 mca). Esta presión es ejercida por un manejador de aire compuesto por un ventilador centrífugo y una unidad condensadora de potencia adecuada (según las dimensiones). Está provisto además en cada salida por filtros estériles y prefiltros para proporcionar la tasa de empolvamiento que se indica líneas arriba y se resume en la figura 1 y en el cuadro 4.

Es posible hacer funcionar un laboratorio de manera eficiente en condiciones más rústicas que las aquí descritas, sin considerar tasas de empolvamiento ni gradientes de presión. La decisión de cuándo se debe cambiar de un sistema rústico a un sistema más sofisticado se tomará en función del volumen de producción, del nivel de contaminación existente y de la capacidad de inversión. Es claro que si se extreman las precauciones en el acondicionamiento del ambiente del laboratorio como aquí se describe y se trabaja adecuadamente, el nivel de contaminación puede ser insignificante o aun nulo.

La central para la preparación del sustrato

La distribución de las áreas de trabajo de una central para la preparación del sustrato dependen del proceso y de los materiales que se empleen. Los siguientes párrafos darán algunos lineamientos generales, sin embargo, cada caso debe ser analizado por separado en la medida del proceso que se utilice. En el capítulo 8 se hace una discusión amplia sobre los diferentes tipos de materiales y de los procedimientos que se pueden emplear para preparar el sustrato. El lector deberá referirse a dicho capítulo para una mayor precisión sobre el tema.

Cuadro 5. Áreas necesarias para el funcionamiento de una central para la preparación de sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp.

Definición de áreas por actividad

Recepción y almacenamiento de materiales
Preparación de materiales (picado, molido, etcétera)
Mezclado de ingredientes y composteo
Pasteurización
Siembra y embolsado
Incubación del sustrato inoculado
Expedición de producto terminado

Las centrales de preparación del sustrato cuentan con áreas cubiertas y con áreas al aire libre. Las áreas a la intemperie son en general utilizadas para la preparación del material que se va a compostear y para el mismo composteo. Dado que esta etapa del proceso puede producir olores desagradables, potencialmente causantes de problemas en zonas

urbanas, cada vez se emplea menos, sobre todo en el caso de *Pleurotus* spp., donde hasta ahora el sustrato puede prepararse sin fermentación. En el caso de requerirse un proceso de composteo (Guzmán Dávalos *et al.*, 1987; Villa-Cruz *et al.*, 1999), se recomiendan los procesos *in door* porque permiten controlar el proceso y la emanación de olores, aunque implican una mayor inversión. El cuadro 5 hace un recuento de las áreas que se requieren para preparar el sustrato y el cuadro 6 enlista el material y equipo mínimo indispensable para una central de composteo.

Cuadro 6. Material y equipo mínimo necesario para el establecimiento de una central de producción de sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp.

<i>Material o equipo</i>	<i>Función</i>
Picadora o molino	Disminuir y homogeneizar el tamaño de partícula de la materia prima
Báscula	Pesado de materiales
Palas/revolvedoras	Remoción y mezclado de materiales
Generador de vapor	Producción de vapor para pasteurizar el sustrato
Carretillas o bandas transportadoras	Transporte de materiales en proceso
Mesa para siembra o sembradora.	Siembra del sustrato.
Refrigerador	Almacenamiento de la semilla

La sala de cultivo

El cultivo de *Pleurotus* spp. suele llevarse a cabo en un lugar fresco y ventilado con el menor cambio posible de temperatura entre el día y la noche. Los pasteles ya inoculados pueden colocarse sobre el suelo, colgarse del techo, insertarse en estacas metálicas o ponerse sobre anaqueles, según el sistema de incubación elegido (Ver figura 2 de este capítulo y figuras 5, 6 y 7 del capítulo 9).

Las dimensiones de las salas de fructificación son muy variables. Van desde los $2 \times 2 \times 2$ m³ con sólo unos cuantos pasteles en el suelo, hasta aquellas que tienen 6-10 m de ancho por 15-20 m de largo y 3-5 m de altura, con pasteles en anaqueles. Las paredes de estos espacios pueden ser lisas, sin ventanas, lo importante en todos los casos es conseguir una eficiente ventilación y una temperatura y humedad estables en todas las áreas del lugar. Un medio barato de propiciar la renovación de aire en la sala es mediante la instalación de una o varias chimeneas en el extremo opuesto al de la puerta de entrada. Otra forma es mediante la instalación de un ventilador que inyecte aire húmedo, acoplado a un ducto central que lo distribuya en toda la sala. Un medio que puede funcionar a pequeña escala es la instalación de varios humidificadores en la sala en congruencia con un ventilador acoplado a un tubo central que inyecte aire del exterior (ver figura 9, capítulo 9).

El cuadro 7 enlista el material y equipo mínimo necesario para el desarrollo de una sala de cultivo. En todo caso, es conveniente mencionar las recomendaciones de Lomax (1992) y Wuest *et al.* (1970) sobre las funciones que se deben considerar al implantar

una unidad de ventilación en una planta productora de hongos, según las cuales la ventilación debe proveer:

- 1) Capacidad de aire suficiente para mantener la temperatura y los niveles de oxígeno que requiere el hongo durante el crecimiento y la fructificación.
- 2) Un amplio rango de capacidades de mezclado de aire para proveer un óptimo desarrollo en cada fase.
- 3) Distribución uniforme del aire.
- 4) Humedad relativa suficiente para minimizar el secado del sustrato.
- 5) Presión positiva en los cuartos de producción e incubación.
- 6) Un 95% de eficiencia en la remoción de partículas mayores de 1 micra presente en el aire que entra en el área de producción.

En todo momento, el mantenimiento de la humedad se apoya con riegos hacia el suelo y las paredes e inclusive con remojos del sustrato. Por esta razón debe haber acceso fácil a tomas de agua en la sala de fructificación, así como un buen drenaje, además de que las paredes y el piso deben ser lisos para permitir una limpieza enérgica que evite la proliferación de mohos. No se recomiendan ventanas para evitar la entrada de insectos, otros animales y polvo. En las figuras 2 y 3, se presentan dos prototipos de sala de fructificación, y en la figura 10 del capítulo IX se observa el interior de una cueva rústica.

Cuando se necesita equipo especializado para el mantenimiento de las condiciones ambientales óptimas dentro de la sala de fructificación, se recomienda que el aire fresco y la humedad se introduzcan y distribuyan por la parte superior y la extracción del aire viciado (con CO₂) se haga por la parte inferior de la nave. Con esto se aprovecha la gravedad, ya que la humedad y el bióxido de carbono, al ser más pesados que el aire, tienden a depositarse en el suelo. Esto facilita la circulación y permite una mejor distribución de aire húmedo y oxigenado.

Cuadro 7. Material y equipo mínimo necesario para el desarrollo de una sala de cultivo de *Pleurotus*spp.

<i>Material o equipo</i>	<i>Función</i>
Sistema de ventilación-humidificación	Mantener la humedad y renovar el aire en la sala de cultivo
Higrotermógrafo	Medir la humedad del aire en la sala de cultivo
Anaqueles (opcional)	Aprovechar el espacio cúbico durante el desarrollo y la fructificación del hongo. Según el sistema de cultivo empleado pueden no ser necesarios
Canastas	Recoger los hongos cosechados
Llaves de sifón y manguera	Regar el sustrato y la sala de fructificación
Trampas para insectos	Disminuir la incidencia de insectos
Termómetro	Determinar la temperatura tanto dentro del sustrato como del aire en la sala de cultivo
Refrigerador	Conservar los hongos cosechados
Bomba portátil	Para riego y control de insectos (opcional)

Figura 2. Ejemplo de nave para el cultivo de *Pleurotus* spp. (Zadrazil y Kurtzman, 1989).

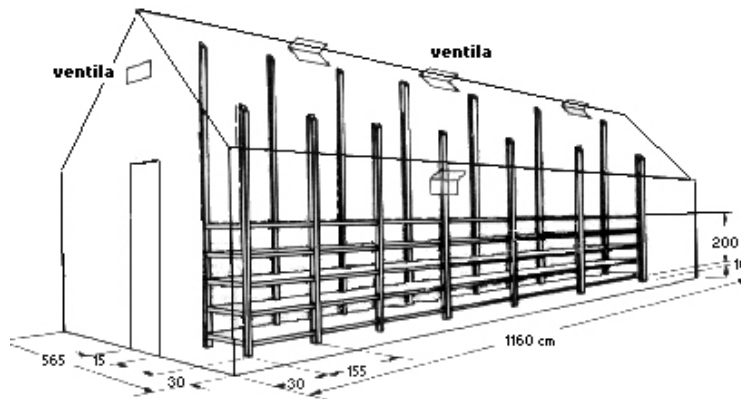
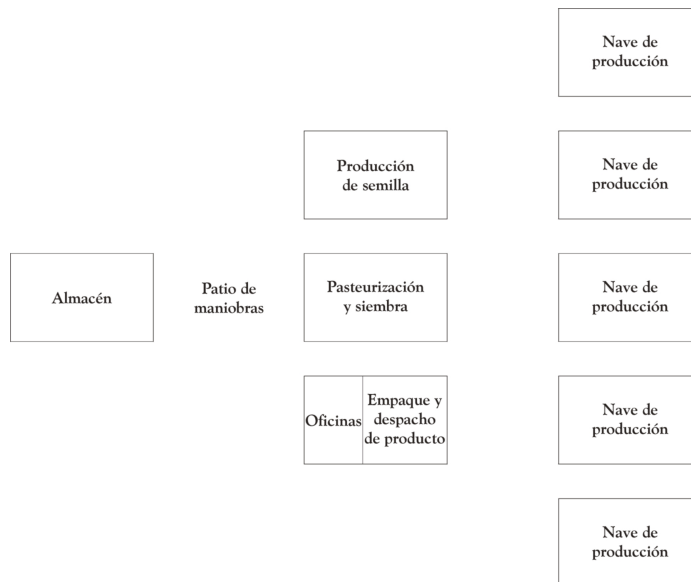


Figura 3. Distribución de una planta productora de hongos comestibles.



La figura 3 presenta la distribución esquemática de las áreas necesarias para producir *Pleurotus* spp. Las dimensiones de las áreas son variables, según la capacidad de producción. Este esquema muestra una distribución que permite el uso eficiente del espacio para optimizar el flujo de materiales. Es de observarse que el esquema contempla cinco naves de fructificación, lo cual facilita la producción continua a lo largo del año. El ciclo de producción puede tardar cinco semanas, incluyendo uno o dos días para limpieza y desinfección después de cada ciclo de cosecha. Cada semana se llena una nave y también se vacía una.

REFERENCIAS

- Guzmán-Dávalos L., D. Martínez-Carrera y C. Soto-Velazco. 1987. El cultivo de hongos comestibles *Pleurotus* sobre el bagazo del maguey de la industria tequilera. *Rev. Mex. Mic.* 3, 47-49.
- Lomax, K.M. 1992. Air movement inside a mushroom house. *Mush. News* 40(1);11-13.
- Villa-Cruz, V., G. Huerta and J.E. Sánchez. 1999. Solid fermentation of a corn cob- coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 12:67-74
- Wuest, P.L.C. Schisler y M.E. Schoeder. 1970. A unitized forced-air ventilation system for mushroom growing. Progress Report No. 302. The Pennsylvania State University. University Park. 11p.
- Zadrazil, F. y R.H. Kurtzman. 1989. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: S.T. Chang & T.H. Quimio (eds) *Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods*. The Chinese University Press. 294-295

XII Factores que afectan la vida de anaquel de los hongos comestibles frescos

R.C. Anantheswaran & S. Roy

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	239
COLOR DE LOS HONGOS	239
Evaluación del consumidor	239
Mecanismo de obscurecimiento	240
PÉRDIDA DE AGUA	241
MADURACIÓN	242
Mecanismo	242
Evaluación del consumidor	244
MÉTODOS PARA PROLONGAR LA VIDA DE ANAQUEL	
DE LOS HONGOS FRESCOS	244
Tratamientos antes de la cosecha	244
Tratamientos poscosecha	245
Almacenamiento a baja temperatura	245
Secado	246
Irradiación	246
Lavado	247
Cortado del estípite	248
Empaques con atmósfera controlada y modificada	248
Concentración gaseosa y vida de anaquel	249
Riesgos potenciales de EAM	250
Empaques con humedad modificada	251
Formas para reducir la humedad en el empaque	251
REFERENCIAS	253

INTRODUCCION

La preferencia de los consumidores por los hongos frescos cultivados va en aumento cada día y por lo mismo se ha desarrollado mucha investigación sobre la conservación y manejo poscosecha de ellos, particularmente de *Agaricus bisporus*. Esta situación ha redundado en una abundante literatura sobre dicho género, que lamentablemente no se ha extendido para el caso de *Pleurotus* spp., el cual es el segundo género en importancia mundial. Una de las formas de salvar tal inconveniente es consultar la literatura sobre *A. bisporus* y aplicarla cuidadosamente al caso de *Pleurotus* spp. Por lo mismo, el presente capítulo resume la literatura general sobre los tratamientos que afectan la vida de anaquel de los hongos frescos, esperando que las ideas y las experiencias aquí externadas sean de utilidad para su aplicación directa en la conservación de *Pleurotus* spp., o sirvan como antecedentes para investigaciones más enfocadas a este género.

Los hongos comestibles frescos son productos altamente perecederos, que por sus características poscosecha se consideran dentro del mismo grupo que las frutas frescas y las legumbres. Estos productos cobran cada día más interés en cuanto a su preparación y manejo debido a su consumo creciente (Huxsoll *et al.*, 1989), aunque tienen problemas para conservarse en fresco. A 11°C y 90% de humedad relativa los hongos de la especie *Agaricus* spp. son vendibles sólo durante tres a cinco días, mientras que a 13 °C, este periodo se reduce a menos de tres días (Gormley, 1975a). El deterioro se observa por un marcado oscurecimiento en el color, la abertura del píleo y la exposición de las láminas oscurecidas, así como por un alargamiento del tallo y un endurecimiento de los tejidos (Beelman, 1987). *Pleurotus* spp. difiere en morfología y en textura de *Agaricus* spp. y es muy sensible al manejo poscosecha. Tiene una vida de anaquel muy breve, ya que se limita a 12 horas a 21-25 °C por su alta actividad metabólica (Bano y Rajaratnam, 1988).

Los consumidores juzgan la calidad de los hongos frescos de acuerdo con el grado de frescura, limpieza y blancura (Barendse, 1984). Otros factores como pérdida de agua y carga bacteriana también contribuyen indirectamente a los atributos mencionados (Ajlouni, 1991). Una lista de atributos y su importancia relativa en la vida de anaquel de hongos del genero *Agaricus* spp., desarrollada por MacCanna y Gormley (1968), se muestra en la tabla 1. *Pleurotus* spp. difiere morfológicamente de *Agaricus* spp. y el grado de blancura, de textura y la naturaleza del cuerpo fructífero han sido consideradas como las características más importantes que definen su espectro cualitativo.

COLOR DE LOS HONGOS

Evaluación del consumidor

La blancura es uno de los factores más importantes de la calidad asociada a los hongos (MacCanna y Gormley, 1968; Gormley, 1975a; Lopez-Briones *et al.*, 1992), por lo que generalmente el hongo más blanco adquiere el precio más alto (Gormley, 1975a; Burton,

Tabla 1. Espectro cualitativo de hongos comestibles frescos (*Agaricus* spp.)

<i>Factor</i>	<i>Énfasis del consumidor*</i>	<i>Momento del énfasis</i>
Blancura	3	Punto de venta
Libre de enfermedades visibles	3	Punto de venta
Grado de madurez	3	Punto de venta
Sabor	3	Al consumirlos
Aroma	3	Al consumirlos
Rigidez	3	Al consumirlos
Limpieza	3	Punto de venta
Tamaño y forma	2	Punto de venta
Valor Nutritivo	1	—
Retención de peso	De interés para el detallista	—

*3= Muy importante; 2= menos importante; 1= no importante

1986). En un intento por cuantificar la aceptación del color de los hongos, Gormley (1975a) los dividió en 6 categorías de blanco basándose en un colorímetro Hunter. Pidió a cinco personas con experiencia en la mercadotecnia de los hongos que describieran el color blanco en cada categoría. Las diferentes categorías así obtenidas se describen en la tabla 2 (Gormley, 1975a). Gormley (1975b) también reportó que en la práctica los mayoristas prefieren no comprar hongos con un valor $L < 80$. Una gran proporción de hongos que se venden en el mostrador tienen valores L en un rango de 69-79.

Tabla 2. Categorías del color blanco en los hongos comestibles.

<i>Categoría</i>	<i>Valores L Hunter</i>	<i>Descripción por parte del Panel</i>
1	> 93	Excelente
2	90-93	Muy bueno
3	86-89	Bueno
4	80-85	Aceptable
5	69-79	Pobre
6	< 69	Muy pobre

Mecanismo de oscurecimiento

El deterioro del color en los hongos es causado por: 1) Oscurecimiento enzimático (Hughes, 1959), 2) Manchas bacterianas (Tolaas, 1915; Gandy, 1967; Guthrie, 1984; Kramer, 1986). Una de las enzimas más importantes responsables del deterioro poscosecha del color es la monofenol oxigenasa (EC 1.14.18.1), comúnmente conocida como tirosinasa, fenolasa o fenol oxidasa (Hammond y Wood, 1985). La tirosinasa cataliza la hidroxilación de monofenoles a difenoles. Éstos y los difenoles nativos continúan las reacciones típicas del oscurecimiento enzimático para formar quinonas, las cuales se polimerizan para formar el compuesto oscuro conocido como melanina. Durante el desarrollo normal, las enzimas y sus sustratos se mantienen aparte entre sí por las membranas internas de la célula (Nichols,

1985). Como resultado del manejo o el envejecimiento natural, las enzimas y sus substratos se ponen en contacto, o la enzima se activa, con lo que se da paso a las reacciones de oscurecimiento. (Gormley, 1975a). Por lo tanto, el oscurecimiento es un signo de envejecimiento o de contacto-manejo, pero no necesariamente un indicador de aceptabilidad o de olores indeseables. Las reacciones de oscurecimiento ocurren tanto interna como externamente; sin embargo son más severas en la superficie (Burton, 1986).

El desarrollo de manchas amarillo pálidas en los hongos que luego se vuelven oscuras fue descrito por Tolaas (1915) como causadas por una bacteria similar a *Pseudomonas fluorescence*. Paine (1919) encontró el mismo microorganismo en un brote de esta enfermedad cerca de Londres y propuso como nombre para el patógeno *Pseudomonas tolaasii*. Las manchas son de color castaño oscuro, ligeramente hundidas y de un brillo sedoso (Gandy, 1985). El tejido del hongo es afectado a una profundidad de 1-3mm (Watson y Gulliver, 1981). De acuerdo con Nair y Faby (1973), la presencia de humedad libre en el píleo del hongo permite a los patógenos multiplicarse y producir toxinas que inducen los síntomas de la enfermedad en el hongo. La toxina de *P. tolaasi*, tolaasina, es un lipodepsipéptido (PM = 1985) que consiste de 18 residuos aminoácidos con un grupo ácido β -octanoico en la terminal N (Brodey *et al.*, 1991).

PÉRDIDA DE AGUA

Las especies de *Pleurotus* pertenecen a la clase Basidiomicetes (Singer, 1986). Los miembros de esta clase de organismos carecen de una estructura epidérmica especializada y están protegidos únicamente por una capa epitelial. Esta falta de protección propicia una pérdida rápida de humedad y el deterioro rápido de la calidad (Porrit, 1974). San Antonio y Flegg (1964) reportaron que la pérdida de agua de los hongos en crecimiento es similar a la pérdida por evaporación en una superficie acuosa. Estos investigadores encontraron que en condiciones normales de cultivo, la tasa de transpiración en un esporóforo de *Agaricus sp.* varió de menos de 1 ml por día (diámetro de píleo de 20 mm) a 2-4 ml/día (diámetro de 60 mm). Nichols (1985) consideró que los hongos cosechados transpiran a la misma tasa que los cuerpos fructíferos no cosechados. Por el contrario, Schutte (1956) encontró que la tasa de transpiración de esporóforos cortados disminuyó con la edad y planteó una relación entre la transpiración y las propiedades del protoplasma de organismos vivos. Cho *et al.* (1981) observaron que la pérdida de agua es afectada por el estado de desarrollo del hongo. La tasa de transpiración fue baja durante la etapa de botón y aumentó durante la maduración hasta que el sombrero se abrió y las láminas se desarrollaron completamente. La tasa mayor de respiración, durante las últimas etapas, está probablemente más relacionada con el incremento de la superficie del esporóforo (según el desarrollo del sombrero) que con cualquier otro cambio en éste. Así como con otros productos hortícolas, la humedad relativa, la temperatura del ambiente, el movimiento del aire y la presión atmosférica afectan la tasa de pérdida de agua en los hongos (Fockens y Meffert, 1972).

De acuerdo con Fockens y Meffert (1972), los hongos tienen una superficie húmeda, es decir, la superficie está cubierta de una capa delgada de agua o aire saturado con vapor de agua. Patel *et al.* (1988) midieron los coeficientes de transpiración (transpiration rate constants) de hongos almacenados por un periodo de ocho días a 5.8°, 9.5° y 14.6°C a humedades relativas de aproximadamente 100%, 97%, 94% y 91%. A 14.6°C había un decremento inicial en el coeficiente de transpiración, seguido de un incremento gradual en el tiempo, particularmente a humedad alta (97%). El coeficiente de transpiración no cambió significativamente a temperaturas más bajas de almacenamiento (5.8° y 9.5°C). Patel *et al.* (1988) encontraron una alta correlación entre coeficiente de transpiración y crecimiento microbiano sobre la superficie de los hongos (a 14.6°C) y concluyeron que el aumento en la tasa de transpiración era debido probablemente a la actividad microbiana.

La pérdida de agua es un factor importante en el deterioro de los hongos comestibles y es parcialmente responsable de su endurecimiento durante el almacenamiento poscosecha (Nichols, 1971). Gormley y MacCanna (1967) encontraron que los hongos cubiertos con una película de cloruro de polivinilo (PVC) perdieron agua a una tasa mucho más baja que los hongos no cubiertos. El uso de películas de plástico para aumentar la vida de anaquel de los hongos por medio del retraso en la pérdida de agua también ha sido reportada por otros autores (Nichols y Hammond, 1973a, 1973b; Hobson y Burton, 1989).

MADURACIÓN

Mecanismo

El desarrollo y la maduración de *Agaricus bisporus* pueden ser divididos en dos fases. La etapa temprana de crecimiento está caracterizada por una elongación lenta, rápida división celular y la diferenciación del estípite, el sombrero y las láminas. La fase última de crecimiento está marcada por una rápida elongación del estípite, expansión del sombrero y las esporas y por la maduración de las esporas y su descarga (Gwen y Wu, 1972; Ajlouni, 1991). El desarrollo y la esporulación del esporóforo cosechado es similar al observado por el hongo sin cosechar durante su última fase (Hammond y Nichols, 1975). Parece haber un movimiento de sustrato desde el estípite hacia las láminas. Murr y Morris (1975) observaron que las tasas de crecimiento del sombrero y el estípite parecen ser paralelas y que ambas cesan de crecer aproximadamente al mismo tiempo. Con el fin de compensar la exclusión del sustrato exógeno de la cama o tronco sintético (que contiene carbono y nitrógeno), el hongo cosechado inicia una adaptación fisiológica y utiliza sustrato endógeno para soportar el desarrollo poscosecha. Como resultado de esto, el tamaño final de los hongos cosechados es considerablemente más pequeño que el de hongos no cortados (Nichols, 1985).

Uryama (1956) y Hagimoto y Konishi (1959, 1960) reportaron la existencia de un “factor” producido en las láminas de los hongos que promueve la elongación del estípite,

Tabla 3. Clasificación de los estadios de desarrollo del esporóforo

<i>Estadio</i>	<i>Diámetro aproximado del píleo (mm)</i>	<i>Descripción</i>
a) Hammond y Nichols (1975)		
1	< 5	“Primordio”-velo no diferenciado
2	20-30	“botón”-velo visible e intacto
3	30-40	“Sombrero cerrado”-velo alargado
4	30-40	“Cup”-velo empezando a rasgarse
5	30-50	“Cup”-velo rasgado
6	40-60	“Plano”-Superficie superior del píleo convexa
7	50-70	“Plano”-Superficie de las láminas curvadas hacia arriba
b) Guthrie (1984) modificado de Schmidt (1977)		
1		Velo intacto y duro
2		Velo intacto y extendido
3		Velo parcialmente roto (< mitad)
4		Velo parcialmente roto (> mitad)
5		Velo completamente roto
6		Píleo abierto y láminas bien expuestas
7		Píleo abierto y superficie de las láminas plana.

pero hasta ahora, dicho factor no ha sido identificado. Gruen (1963) reportó que uno o más factores de crecimiento sintetizados en las láminas eran responsables de la regulación del crecimiento del estípite y expansión del píleo. Konishi (1967) sugirió que algunos aminoácidos presentes en extractos etanólicos de las láminas eran responsables de la elongación del tejido. Recientemente un compuesto fue aislado e identificado como ácido 10-oxo-trans-8-decenoico (AOD) el cual es producido de manera concurrente con el mayor componente del aroma de los hongos 1-octene-3-ol, y fue encontrado como estimulante del crecimiento micelial y de la elongación del estípite de *Agaricus bisporus* (Mau *et al.*, 1992).

Los efectos del bióxido de carbono en el crecimiento del cuerpo fructífero son similares en cierta manera a los estimulantes presentes en el tejido de las láminas mencionados anteriormente (Hammond y Wood, 1985). Tschierpe (1959) demostró que un contenido de 0.3 a 0.5% de CO₂ en el aire arriba del suelo de cobertura alarga el estípite de los hongos. Niveles más altos de CO₂ hasta el 5% en volumen causan un alargamiento excesivo del estípite acompañado de un pobre desarrollo del píleo. Las concentraciones de CO₂ mayores que las condiciones ambientales promueven el desarrollo del estípite, mientras que a niveles más altos (> 10%) el crecimiento del estípite se retrasa. El

mismo autor indicó que el desarrollo del píleo es suprimido generalmente por concentraciones de CO₂ arriba de 5% (Nichols, 1985).

Evaluación del consumidor

Ryall y Lipton (1979) reportaron que para el caso de *A. bisporus* los hongos de alta calidad deben tener velos cerrados y que las láminas no deben ser visibles. Una escala subjetiva con siete estados de madurez fue desarrollada por Hammond y Nichols (1975) (tabla 3a). Schmidt (1977) también desarrolló una escala simplificada para la determinación del grado de madurez de los hongos, la cual fue modificada después por Guthrie (1984) (tabla 3b).

MÉTODOS PARA PROLONGAR LA VIDA DE ANAQUEL DE LOS HONGOS FRESCOS

Tratamientos antes de la cosecha

El deterioro de los hongos durante el almacenamiento está directamente relacionado con las condiciones durante el cultivo. La naturaleza del cultivo de los hongos influye en la carga bacteriana postcosecha sobre los mismos (Beelman *et al.*, 1989). Fordyce (1968) sugirió una limpieza adecuada antes de la cosecha para problemas de enfermedades y para disminuir el deterioro en el mercado. Ayers y Lambert (1955) fueron los primeros en tratar de controlar las manchas bacterianas causadas por *P. tolaasii* usando agua clorada. Desde entonces varios investigadores han usado cloro u oxina, una forma registrada de bioxido de cloro estable, para reducir cargas bacterianas iniciales sobre los hongos (Nair y Fatly, 1972; Royse y Wuest; 1980, Guthrie, 1984; Beelman *et al.*, 1989).

Okereke *et al.* (1987) estudiaron los efectos producidos al disminuir las temperaturas de cultivo y agregar cal (CaCO₃) a la tierra de cobertura sobre el rendimiento, firmeza y vida de anaquel. Los hongos que crecieron a baja temperatura (11-13°C) tuvieron mayor firmeza y más calcio que los que crecieron a 17-19°C. Sin embargo, los primeros tuvieron menos rendimiento y se desarrollaron más rápido durante el almacenamiento postcosecha. El rendimiento, el tamaño, la textura y la vida de anaquel no fueron afectados por la adición de calcio a la tierra de cobertura ni por la temperatura.

Se ha reportado que la adición de cloruro de sodio a la tierra de cobertura mejora la calidad de los hongos al prevenir ciertas enfermedades, sin embargo, afecta su desarrollo (Flegg, 1956). Este autor realizó experimentos con sales solubles como sulfato de sodio, potasio y amonio, cloruro de sodio, potasio, magnesio y calcio, nitrato de calcio y fosfato dibásico de sodio, y encontró que la adición de sales solubles a la tierra de cobertura retrasó la fructificación, disminuyó el número de hongos formados, aumentó el peso promedio por hongo y disminuyó el rendimiento total. Todo probablemente debido al estrés osmótico en la tierra de cobertura.

Beelman *et al.* (1986) y Barden (1987) también reportaron una reducción de la población bacteriana inicial asociada con hongos recién cosechados (*Agaricus bisporus*) y

aumentaron la vida de anaquel cuando aumentaron 0.5% de cloruro de calcio al agua de riego. Subsecuentemente, Solomon *et al.* (1991) usaron 0.25% de cloruro de calcio, 50 ppm de oxina, o una combinación de ambos agentes en el agua de irrigación para investigar sus efectos en la producción, carga microbiana, color y tasa de senescencia de variedades blancas e híbridas blancas de esta especie. Cuando se agregaron individualmente al agua de riego, ambos, oxina y cloruro de calcio redujeron la cuenta de bacterias. La oxina redujo la tasa postcosecha de senescencia pero no afectó significativamente el color. Por otra parte, el cloruro de calcio redujo el oscurecimiento pero pareció incrementar la senescencia. El tratamiento combinado produjo los hongos con la mejor vida de anaquel. Algunos experimentos llevados a cabo recientemente a escala comercial usando cepas híbridas *off-white* han mostrado que 0.3% de cloruro de calcio agregado durante todos los riegos posteriores a la aparición de primordios y hasta la segunda cosecha reducen significativamente la mancha bacteriana, mejoran la calidad y la vida de anaquel y no reducen el rendimiento (Beelman *et al.*, 1992; Miklus, 1993). También se ha demostrado que el riego con cloruro de calcio permite resistir al oscurecimiento durante el almacenamiento poscosecha de *Agaricus bisporus* después de un daño en la piel del hongo, lo cual sugiere que los tratamientos con calcio mejoran la integridad de la célula (Kukura *et al.*, 1998; Kukura y Beelman, 1998). No se conoce si estos tratamientos pueden mejorar la calidad de las especies de *Pleurotus*.

Tratamientos poscosecha

La vida de anaquel de los hongos frescos depende en gran medida de la tasa de respiración, por lo que el mantenimiento de la calidad involucra retrasar la respiración y otros procesos metabólicos (Sveine *et al.*, 1967). El retraso poscosecha de los procesos metabólicos puede ser realizado por bajas temperaturas de almacenamiento (Dredge, 1964; Sveine *et al.*, 1967; Cameron y Chapell, 1970) y por cambio en el microambiente gaseoso de los hongos (Nichols y Hammond, 1973a; Burton *et al.*, 1987). Otros métodos incluyen la irradiación (Kovacs y Vas, 1974; Kramer, 1986; Ajlouni, 1991) y el lavado con soluciones de sulfito (Hughes, 1959; Beelman *et al.*, 1988). Recientemente, Ajlouni (1991) demostró que cortando el estípite del hongo a 5 mm del sombrero inmediatamente después de la cosecha también mejora la vida de anaquel de los hongos.

Almacenamiento a baja temperatura:

La temperatura tiene un efecto marcado sobre la tasa de deterioro de los hongos. Tomkins (1966) estudió el comportamiento de lotes de hongos almacenados a 0, 3, 7, 12 y 18°C y encontró que los consumidores juzgaron como aceptables aquellos que habían sido almacenados hasta 17-20 días a 0°C o 2-3 días a 18°C (tabla 4).

Sveine *et al.* (1967) reportaron que para el almacenamiento de hongos del género *Agaricus* spp. sin empaque, la temperatura óptima es 0°C, pero no registraron ningún daño cuando se almacenaron a -0.5°C. Algunos cultivadores han observado que los hongos que han sido conservados en frío (<0°C) se deterioran rápidamente cuando son llevados a temperatura normal (Tomkins, 1966). Sin embargo Cameron y Chappell (1970) indica-

Tabla 4. Relación entre temperatura y vida de anaquel en hongos del género *Agaricus* spp.

<i>Temperatura (oC)</i>	<i>Almacenamiento (días)</i>
18	2-3
12	3-5
7	7-10
3	10-15
0	17-20

ron que los hongos en tamaño de botón pueden ser almacenados a estas temperaturas sin problemas por periodos de hasta siete días con una subsecuente vida de anaquel (a temperatura ambiente) de 2-3 días.

Bohling y Hansen (1989) encontraron que la forma más efectiva de reducir la actividad metabólica y aumentar la vida de anaquel de las setas *Pleurotus* spp. es bajando la temperatura. El enfriar de 15 °C a 3.5 °C redujo la actividad metabólica a un tercio y aumentó la vida de anaquel hasta una semana. Vidas más prolongadas a temperaturas más altas fueron observadas cuando la atmósfera dentro del empaque fue modificada.

Secado:

El secado de los hongos es comúnmente utilizado como una técnica de conservación cuando el mercado es muy lejano y cuando los hongos son utilizados como ingredientes en otros productos procesados. Los hongos pueden ser liofilizados sin perder la mayoría de sus atributos cualitativos (Kompany y Rene, 1995), pero éste en un proceso muy caro. El secado con aire es otra alternativa. Se recomienda que los hongos no sean blanqueados, porque el blanqueado tiende a oscurecerlos durante el secado (Komanowsky *et al.*, 1970; Riva *et al.*, 1991). También los hongos necesitan ser cuidadosamente manejados antes del secado para prevenir cualquier daño y subsecuente oscurecimiento. Las temperaturas de secado alrededor de 100-110°F (37.8-43.3°C) en la primera etapa son seguidas por 170-180° F (76.7-82.2 °C) en la segunda etapa para obtener un color óptimo. El contenido final de humedad no debe ser abajo de 4% porque tiende a endurecer los hongos y resultan con un sabor pobre.

Irradiación:

Staden (1967) observó que la abertura del pileo y el alargamiento del estípite era inhibido por 200 Krad de irradiación gama. Desde entonces, otros investigadores incluyendo Casalina (1971), Langerak (1972), Yamaguchi y Campbell (1973), Wahid y Kovacs (1980), Kramer (1986), y recientemente Ajlouni (1991) han confirmado que las irradiaciones reducen el crecimiento post cosecha de los hongos. Wong y Preece (1982), Guthrie (1984) y Kramer (1986) observaron que los hongos irradiados tenían una coloración más blanca que los hongos no irradiados. Se ha reportado que el retraso en el fenómeno de oscurecimiento es debido a la destrucción de microbios.

Ajlouni (1991) externó la hipótesis de que el retraso en la maduración de los hongos debe también suprimir reacciones de oscurecimiento. La enzima tirosinasa, la cual activa las reacciones de oscurecimiento está presente generalmente en una forma latente en hongos inmaduros y es activada durante la maduración de los hongos (Yamaguchi *et al.*, 1969).

Los hongos irradiados han demostrado tener tasas de respiración más altas que los no irradiados a 12°C en 24 horas de almacenamiento. Sin embargo, se observa una disminución constante en la tasa de respiración de hongos irradiados después de 24 horas de almacenamiento (Ajlouni, 1991). Por su parte, los hongos no irradiados mostraron un incremento casi climatérico de la tasa de respiración durante los primeros cinco días de almacenamiento. Debido a esto, Ajlouni (1991) sugirió que probablemente la irradiación inhibe la maduración de los hongos al suprimir su aparente comportamiento climatérico.

Un estudio en frutas y vegetales demostró que el uso de irradiaciones en productos con envolturas plásticas no es aconsejable porque los residuos de monómeros no polimerizados de hidrocarburos están presentes en el plástico y continuamente se difunden fuera del empaque (Wang *et al.*, 1980). Algunos de estos monómeros han sido reportados como cancerígenos en animales de laboratorio y la irradiación puede causar un incremento en la permeabilidad del plástico resultando en un incremento en la difusión de estos monómeros y en la contaminación del alimento (Shirazi, 1989). Además, un gran número de consumidores aún cree que los alimentos irradiados son un peligro para la salud. Por lo tanto, esta técnica no es comercialmente viable hasta que los alimentos irradiados sean más populares entre los consumidores.

Lavado:

El lavado ha sido estudiado como un medio para mejorar la calidad y la apariencia de los hongos del género *Agaricus* spp. por más de tres décadas (Guthrie, 1984). Numerosos agentes químicos han sido evaluados como aditivos de lavado, tales como agentes reductores (bisulfito de sodio, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácido erytórico), detergentes, citrato de sodio, dextrosa, ácido cítrico, agentes quelantes (EDTA, ácido aceto-acético, molibdatos), ácidos orgánicos, cloro, tioles y retardadores de crecimiento (ácido succínico-l-l-dimetil-hidruro, N⁶-benciladenina, 2-cloro-etil-trimetil-cloruro de amonio) (McConnell, 1991). Burton (1989) reportó que en Estados Unidos hasta 1986, los hongos fueron lavados con soluciones de metabisulfito de sodio, algunas veces junto con cloruro de sodio o ácido cítrico. Este procedimiento remueve tierra de cobertura, inhibe el crecimiento microbiano y actúa reduciendo las reacciones de oscurecimiento. Guthrie (1984) demostró que mayores concentraciones de cloruro de calcio en las soluciones de lavado retardaban el crecimiento de bacterias, mejoraban el color de los hongos y disminuían la senescencia. Más recientemente, McConnell (1991) usó con éxito soluciones de lavado que contenían una combinación de EDTA y H₂O₂ para mejorar el color, reducir la incidencia de manchas púrpura

ras y retardar el decaimiento de los hongos durante un almacenamiento a 12°C. A pesar de todos estos avances, aparentemente el lavado parece no ser una alternativa para el caso del género *Pleurotus* spp.

Cortado del estípite:

El cortado del estípite de los hongos a 5 mm del sombrero inmediatamente después de la cosecha ha provocado un mejor color y una abertura más lenta del estípite cuando se le compara con hongos con un estípite normal (35 mm) (Ajlouni 1991). Este autor consideró que reducir el tamaño del estípite contribuía a quitar sustancias o enzimas estimulantes de la senescencia y, por lo tanto, a aumentar la vida de anaquel. Anteriormente, Minamide *et al.* (1985) también habían observado que al cortar el estípite del hongo nameko (*Pholiota nameko*) se reducía la tasa de alargamiento del estípite y de abertura del sombrero. Sin embargo, el cortado aceleraba el oscurecimiento así como el ablandamiento del esporóforo durante un almacenamiento a 20°C. En ambos trabajos Minamide *et al.* (1985) y Ajlouni (1991) encontraron que el cortado de los estípites aumentaba la tasa de respiración de los hongos. La relación directa entre tasa de respiración y vida de anaquel en hongos es contraria a lo que se observa en la mayoría de frutas y legumbres. Sin embargo, puesto que las láminas respiran más rápido que el estípite, el incremento en la tasa de respiración de hongos cortados puede ser debida a un incremento en la relación láminas:estípite.

Empaques con atmósfera controlada y modificada

El uso de concentraciones de O₂ menores que la atmosférica para retardar el metabolismo y aumentar la vida en almacenamiento de productos frescos fue inicialmente reportada por Kidd y West (1932). El efecto de controlar la atmósfera durante el almacenamiento para retardar la tasa de respiración y el deterioro fue reportado pocos años más tarde (Mihara *et al.*, 1936). Sin embargo, el almacenamiento con atmósfera controlada en almacenes convencionales es de poca utilidad para productos de corta duración como los hongos. Debido a esto, los empaques con atmósfera modificada (EAM), primeramente utilizados por P. Mercellin en Francia (Smock, 1979), son una alternativa viable.

Los EAM involucran el empaqueo, de productos frescos que respiran, con una película polimérica permeable al gas para obtener un cambio autogenerado en la composición gaseosa en el interior del empaque. Kidd y West (1932) reportaron que la tasa de respiración es proporcional a la concentración de O₂ en el ambiente.

Al principio, la concentración de O₂ en el empaque es igual a su concentración afuera del empaque. La respiración del producto ocasiona un gradiente el cual conduce a un flujo de O₂ que se difunde hacia el empaque. Primero, la tasa de respiración es mayor que el flujo total de oxígeno adentro del empaque. Con el agotamiento del oxígeno dentro del paquete, la tasa de respiración del producto es disminuida progresivamente. Por otro lado, el ingreso de oxígeno es progresivamente mayor debido a un gradiente más alto de concentración. Después de un cierto tiempo se alcanza un equilibrio cuan-

do la cantidad de oxígeno consumido por el producto iguala la cantidad de oxígeno que se difunde a través del plástico. La composición gaseosa deseada en el empaque se obtiene al seleccionar el polímero plástico que cuenta con propiedades de difusión deseadas, la cantidad de producto dentro del empaque, el volumen de éste y el espesor del plástico. El mejoramiento en la longevidad de diferentes frutas y legumbres y las limitaciones de esta técnica han sido descritas por Kader *et al.* (1989).

Concentración gaseosa y vida de anaquel

Gormley y MacCanna (1967) reportaron que la vida de anaquel de los hongos puede ser aumentada si se les cubre con una película de cloruro de polivinilo (PVC). Ellos atribuyeron estos beneficios a la conservación del agua, pero también aludieron la atmósfera artificial que deben causar los cambios químicos en los hongos. Al mismo tiempo, Sveine *et al.* (1967) encontraron que una alta concentración de CO₂, una baja concentración de O₂ o una baja temperatura inhiben la abertura del sombrero en los hongos. Nichols y Hammond (1973a) observaron que los hongos en EAM tienen la menor pérdida de peso y el mejor color cuando el equilibrio adentro del empaque es 2% en la concentración de O₂ y 10 a 12% la de CO₂ a 18°C. Ellos también reportaron que la tasa de respiración de hongos preempacados fue considerablemente menor que los que respiraron en el ambiente y encontraron una alta correlación entre tasa de respiración y deterioro en el color de los hongos (Nichols y Hammond, 1975). Murr y Morris (1974) almacenaron *A. bisporus* en atmósfera controlada y observaron que 0% O₂ redujo la decoloración y la actividad o-difenol oxidasa (o-DPO) hasta por siete días. Niveles de O₂ arriba de 0% tuvieron poco o ningún efecto en reducir las decoloración y la actividad o-DPO. Las concentraciones de CO₂ arriba de 5% parecieron incrementar el descoloramiento de la superficie. Subsecuentemente, los mismos autores reportaron que 0% O₂ retardaba la expansión del pileo y el crecimiento del estípite, mientras que 5% O₂ promovió la expansión del pileo y el crecimiento del estípite después de siete días de almacenamiento a 10°C (Murr y Morris, 1975). La concentración de CO₂ a 5% mostró estimular el alargamiento del estípite pero suprimió el crecimiento del sombrero. Burton *et al.* (1987) estudiaron la vida de anaquel de hongos empacados en películas relativamente impermeables con ventanas microporosas. Ellos observaron una reducción progresiva del desarrollo de los hongos con la disminución de la concentración de O₂ de cerca de 14 a 4% y aumento en la concentración de CO₂ de cerca de 7 a 20% en el empaque dentro de 72 horas de almacenamiento. Lopez-Briones *et al.* (1992) estudiaron el almacenamiento de hongos en atmósfera controlada y recomendaron que la atmósfera de almacenamiento debe contener de 2.5 a 5% CO₂ y de 5 a 10% O₂; sin embargo ellos reportaron que el efecto del O₂ era menos importante que el del CO₂. Recientemente Beit-Halachmy y Mannheim (1992) observaron que los EAM tienen un efecto benéfico en la apariencia de los hongos e infirieron que esto podría ser debido a una inhibición del crecimiento microbiano ya que los EAM no afectaron la respiración de los hongos en su estudio. Roy *et al.* (1995a) encontraron una composición interna óptima del 6% O₂ para reducir el desarrollo del sombrero durante el almacenamiento de hongos frescos en EAM.

Rajaratnam *et al.* (1993) reportaron una tasa alta de respiración durante el almacenamiento de *Pleurotus djamor* y que la tasa de respiración declinó rápidamente. Hubo un decremento de la concentración de carbohidratos solubles y de agua a temperatura ambiente. Asimismo hubo un incremento en las actividades de las enzimas O-difenoloxidasas y proteasas, una disminución de fenoles totales y un aumento en aminoácidos libres. El grado de decoloración y la dureza aumentaron con el tiempo de almacenamiento. Los hongos frescos empacados en bolsas de polietileno tuvieron una vida de anaquel de hasta seis días y una concentración de bióxido de carbono de 9%. Aun un solo agujero de alfiler en la bolsa (el cual resultó en mayores concentraciones de oxígeno dentro de la bolsa) disminuyó la vida de anaquel a menos de un día.

Bohling y Hansen (1989) encontraron que bajando la concentración de oxígeno a 2% e incrementando la concentración de bióxido de carbono a 10% aumentaba la vida de anaquel de setas frescas hasta siete días a una temperatura de almacenamiento de 8°C. Una mejora similar en la vida de anaquel fue observada cuando la concentración de bióxido de carbono fue aumentada a 20-39%. Cuando estos hongos fueron removidos de las atmósferas controladas y almacenados al aire ambiente, tuvieron una vida adicional de dos días.

Henze (1989) encontró que adicionalmente al enfriado hasta 1°C, mayores concentraciones de CO₂ mejoraban las cualidades sensoriales de los hongos del género *Pleurotus* spp. En efecto, los hongos almacenados al aire a 1°C tuvieron una vida de anaquel de menos de siete días, mientras que los hongos almacenados en 30% de CO₂ y 1% O₂ tuvieron una vida de anaquel de hasta dos semanas.

Riesgos potenciales de EAM

En 1973, se detectó la presencia de la toxina de *Clostridium botulinum* en hongos envasados comercialmente (Sugiyama y Yang, 1975). El desarrollo de la toxina en hongos envasados hizo presumir que los hongos que se cosecharon podían venir contaminados con *C. botulinum*. Por otra parte, aunque en un estudio realizado en Holanda (Notermans *et al.*, 1989), *C. botulinum* no fue detectada en hongos frescos del comercio (< 1 espora /100 g peso fresco), la alta tasa de respiración de los hongos (alrededor de 500 mg CO₂/peso fresco⁻¹hr⁻¹ al aire ambiente, Burton y Twyning, 1989), además de una baja permeabilidad de O₂ en las películas plásticas poliméricas disponibles y utilizadas para envolver hongos, resultan en una muy baja concentración de O₂ en el empaque. Este bajo contenido interno de O₂ aumenta la probabilidad de una condición suficientemente anaerobia adentro del tejido del hongo y es considerado potencialmente riesgoso para el desarrollo de la toxina.

Los hongos inoculados con un gran número de esporas de tipo A o B de *C. botulinum* y sellados en charolas con una envoltura de PVC (con una fase de equilibrio abajo de 2%) demostraron ser capaces de desarrollar la toxina aun cuando los hongos parecían aceptables (Sugiyama y Yang, 1975). Sin embargo, la toxina detectable en su estudio no fue producida a menos que una gran cantidad de esporas (104 esporas/hongo) fueran

inoculadas en los hongos. Hauschild *et al.* (1975) encontraron que el número de esporas viables en los hongos frescos comerciales, naturalmente contaminados, era muy bajo (< 41 esporas por 100 g). Kautter *et al.* (1978) también indicaron que la posibilidad de botulismo resultado de hongos envueltos en PVC parece ser mínimo. Basado en la recomendación de 1978 de la Agencia de las Drogas y los Alimentos (FDA por sus siglas en inglés), es una práctica común hacer dos perforaciones de 1/8 de pulgada a las bolsas de película de PVC usadas para empacar hongos con el fin de prevenir que el ambiente interior de la bolsa se vuelva anaerobio (Herr, 1991).

Empaques con humedad modificada

En un estudio sobre la calidad poscosecha de hongos almacenados en EAM, se observó una condensación de agua dentro del empaque (Burton *et al.*, 1987). Las películas plásticas poliméricas comercialmente disponibles tienen una tasa de transmisión de vapor húmedo notablemente más baja que la tasa de transmisión de O₂ o CO₂. Puesto que los hongos tienen cerca del 90% de agua al momento de la cosecha (Nichols, 1985) y tienen muy pocas o ninguna forma de prevenir la pérdida de agua de su tejido hacia el aire (Flegg y Wood, 1985), la humedad interna del empaque alcanza su saturación muy pronto después del empacado. El agua condensada no sólo propicia el crecimiento microbiano, sino que afecta la estética del empaque. Fisiológicamente, los productos responden de manera diferente a las condiciones de humedad relativa alta. Esto se debe en parte a sus diferentes coeficientes de transpiración (Lentz y van den Berg, 1973) y en parte por sus diferentes “potenciales de agua” (actividad del agua) (Cook y Papendick, 1978). Por otra parte, humedades relativas extremadamente bajas pueden causar estrés y encogimiento del producto fresco. Gormley y MacCanna (1967) encontraron que los hongos almacenados al aire ambiente eran más duros y tenían una mayor tasa de oscurecimiento cuando se les comparaba con hongos almacenados en envolturas de plástico. Estos investigadores no reportaron las condiciones de humedad relativa de la cámara de almacenamiento. Un déficit alto de presión de vapor puede causar una excesiva pérdida de agua, lo que conduce al endurecimiento del hongo durante el almacenamiento poscosecha (Nichols, 1971).

Formas para reducir la humedad interna en el empaque

Una forma de disminuir la humedad es haciendo perforaciones en las bolsas de película plástica usadas como empaque. Sin embargo, aún un número pequeño de perforaciones puede conducir a la posibilidad de alterar las condiciones de EAM dentro del empaque. Algunos investigadores han usado desecantes como el cloruro de calcio para prevenir el incremento en humedad relativa en empaques que contienen frutas y legumbres (Eaves, 1960; Scott *et al.*, 1964). La humedad relativa al equilibrio sobre una solución saturada de cloruro de calcio se encuentra dentro de un rango de 31-40% a temperaturas entre 5 y 25 °C. Por lo mismo, existe la posibilidad de sobre secar el producto dentro del empaque si se usa cloruro de calcio.

Shirazi (1989) usó diferentes absorbentes de humedad para bajar la humedad relativa de empaques que contenían tomates verdes, sin embargo con compuestos como el sorbitol,

xilitol, NaCl y KCl pudo alcanzar un alto equilibrio de humedad dentro del paquete sin que hubiera sobre secamiento de los tomates. Esta clase de compuestos sigue una isoterma de absorción de Tipo I y absorbe relativamente poca humedad hasta que la humedad se acerca a valores altos (alrededor del 70% en el caso de la sacarosa). A altas humedades relativas, estos compuestos absorben incrementos mayores de vapor de agua. La mayoría de los alimentos como los cereales siguen una curva en forma de sigma, que representa a las isotermas de Tipo II. El Tipo III es típica de agentes como el cloruro de calcio, el cual absorbe una gran cantidad de agua a equilibrios bajos de humedad relativa.

Roy *et al.* (1995b) estudiaron el empaqueo de hongos por humedad modificada y determinaron una humedad óptima superficial de 90% para un color óptimo. Ellos usaron una técnica NIR para determinar el contenido de humedad superficial (Roy *et al.*, 1993). Si se reduce la concentración de O₂ además de bajar la humedad se puede aumentar la vida de anaquel de los hongos (Roy *et al.*, 1996). El uso de absorbentes comerciales de humedad como el barro o la sílica gel ofrecen un potencial para comercializar hongos con empaques con humedad modificada (Anantheswaran y Sunkara, 1996).

Para prevenir la condensación de agua en empaques con hongos, Nichols y Hammond (1973b) usaron con mucho éxito charolas hechas con materiales con diferentes capacidades de absorción de agua como fibra comprimida y cartón. Burton *et al.* (1987) trataron de reducir la condensación de agua en EAM usando placas absorbentes.

REFERENCIAS

- Ajlouni, S. O. 1991. Quality characteristics of two type hybrids of the cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) and the improvement of their shelf life using stipe trimming and gamma irradiation. Ph.D. Dissertation, Pennsylvania State University. 142pp.
- Anantheswaran, R. C. and R. Sunkara. 1996. Use of commercial moisture absorbers to increase the shelf life of fresh mushrooms. *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the second International Conference*. Pennsylvania State University. 563-568.
- Ayers, T. T. and E. B. Lambert. 1955. Controlling mushroom disease with chlorinated water. *Plant Dis. Rep.* 39:829-836.
- Bano, Z. and Rajaratnam. 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 27(2):87-158.
- Barden, C. L. 1987. The effect of calcium chloride added to the irrigation water on the shelf life and quality of harvested mushrooms (*Agaricus bisporus*). M. S. Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, PA. 74pp.
- Barden, C. L., R.B. Beelman, C.E. Bartley and C. Schisler. 1990. The effect of calcium chloride added to irrigation water on quality and shelf life of harvested mushrooms. *J. Food Protect.* 43:759-762.
- Barendse, H. 1984. Attitude to mushrooms revealed in bureau survey. Supplement to *Fruit Trades Journal*. November 9, ii.
- Beelman, R. B. 1987. Factors influencing postharvest quality and shelf life of fresh mushrooms. *Mush. News.* 35(7):12-16,18.
- Beelman, R. B., J. Quinn, A. Okereke, L.C. Schisler, H.R. Muthersbaugh and K. Evensen. 1986. Effect of peat casing layer and the addition of calcium chloride to watering treatments on quality and shelf life of fresh mushrooms. In: *Developments in Crop Science 10*. Cultivating Edible Fungi. Elsevier Publ. Co., Amsterdam. p271-282.
- Beelman, R. B., C.L. Garden and C.G. Edwards. 1988. Total sulfur dioxide residuals in fresh mushrooms washed in sulfite solutions. *J. Food Protection.* 51:903-905.
- Beelman, R. B., B.D. Guthrie and D.J. Royle. 1989. Influence of bacterial populations on the post-harvest deterioration of fresh mushrooms. *Mush. Sci.* 11(2):655-665.
- Beelman, R. B., C.L. Bartley, J.L. Mau, M.B. Miklus, J.M. Solomon, D.J. Royle, J.R. Winner and H.R. Muthersbaugh. 1992. Irrigation water treatments to improve quality and shelf life of *Agaricus* mushrooms. *Mush. News.* 40:18-23.
- Beit-Halachmy, I. and C.H. Mannheim. 1992. Is modified atmosphere packaging beneficial for fresh mushrooms? *Leb. Wiss. U. Technol.* 25(5):426-432.
- Bohling, H. and H. Hansen. 1989. Studies on metabolic activity of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* JACQ). *Acta Horticulturae* 258:573-577.
- Brodey, C. L., P.B. Rainey, M. Tester and K. Johnstone. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Molecular PlantMicrobe Interactions.* 4(4):407-411.
- Burton, K. S. 1986. Quality- investigations into mushroom browning. *Mush. J.* 158:68-70.
- Burton, K. S. 1989. The quality and storage life of *Agaricus bisporus*. *Mush. Science.* 12(1):287-293.
- Burton, K. S., C.E. Frost and R. Nichols. 1987. A combination of plastic permeable film system for

- controlling post-harvest mushroom quality. *Biotechnology letters*. 9(8):529-534.
- Burton, K. S. and R. V. Twynning. 1989. Extending mushroom storage-life by combining modified atmosphere packaging and cooling. *Acta Horticulturae*. 258:565-571.
- Casalina, S. L. 1971. Irradiating mushrooms and their growing soil. U.S. Patent 3,527,645-Sept. 8, 1970. *Nucl. Sci. Abstr.* 25:8821.
- Cameron, I. F. B., and D.J. Chapell. 1970. The refrigeration storage of mushrooms before marketing. *MGA. Bull.* 246:274-275.
- Cho, K. Y., K.H. Yung and S.T. Chang. 1981. Preservation of cultivated mushrooms. In: S. T. Chang and T. H. Quimio, (eds). *Tropical Mushrooms, Biological Nature and Cultivation Methods*. The Chinese University Press, Hong Kong. pp 63-86.
- Cook, R. J. and R.I. Papendick. 1978. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. *HortScience* 13(5):559-564.
- Dredge, M. A. L. A. 1964. Prolongation of the shelf life of mushrooms by cold storage. *MGA. Bull.* 172:146,149,150.
- Eaves, C.A. 1960. A modified atmosphere system for packages of stored fruit. *J. Hort. Sci.* 35(2):110-117.
- Elliot, T. J. 1985. The general biology of the mushroom. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer and D. A. Wood, (eds.) *The Biology and the Technology of the Cultivated Mushrooms*. John Wiley & Sons, Ltd., UK. pp 9-22.
- Fiddler, J. C. and C.J. North. 1971. The effects of conditions of storage on respiration of apples. V. The relationship between temperature, rate of respiration and the composition of the internal atmosphere of the fruit. *J. Hort. Sci.* 42:189-206.
- Flegg, P. B. 1956. Some aspects of the casing layer in relation to the fruiting of the cultivated mushroom. *Glasshouse Crop Res. Inst. Ann. Rep.* 93-105.
- Flegg, P. B. 1985. Crop productivity. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer and D. A. Wood, (eds). *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*. pp 179-193.
- Flegg, P. B. and D. A. Wood. 1985. Growth and fruiting. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer, and D. A. Wood, (eds). *The Biology and Technology of the cultivated mushrooms*. pp 141-177.
- Fockens, F. H. and H. F. Th. Meffert. 1972. Biophysical properties of horticultural products as related to loss of moisture during cooling down. *J. Sci. Fd. Agric.* 23:285-298.
- Fordyce, C. 1968. Microorganisms associated with market deterioration of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*. *Plant Dis. Rep.* 52:712-714.
- Gandy, D. G. 1985. Bacterial and fungal diseases. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer, and D. A. Wood, (eds). *The Biology and Technology of the cultivated mushrooms*. pp 261-277.
- Gormley, R. 1975a. Chill storage of mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* 26:401-411.
- Gormley, T. R. 1975b. Vacuum cooling and mushroom whiteness. *Mush. J.* 24:84, 86.
- Gormley, T. R. and C. MacCanna. 1967. Prepackaging and shelf life of mushrooms. *Irish J. Agric. Res.* 6(2):255-265.
- Guthrie, B. D. 1984. Studies on the control of bacterial deterioration of fresh, washed mushrooms (*Agaricus bisporus/ brunescens*). M.S. Thesis, The Pennsylvania State University. 158pp.
- Gruen, H. E. 1963. Endogenous growth regulation in carpophores of *Agaricus bisporus*. *Plant Physiology*. 38:652-666.
- Gruen, H. E. and S. Wu. 1972. Promotion of stipe elongation in isolated *Flammulina velutipes* fruit bodies by carbohydrates, natural extract and amino acids. *Can. J. Bot.* 50(4):803-818.

- Hagimoto, H. and M. Konishi. 1959. Studies on the growth of fruitbodies of fungi. I. Existence of a hormone active to the growth of fruitbody in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Bot. Magazine* 72:359-366. (Tokyo).
- Hagimoto, H. and M. Konishi. 1960. Studies on the growth of fruitbody. II. Activity and stability of the growth hormone in the fruitbody of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Bot. Magazine* 73 :283-287. (Tokyo).
- Hammond, J. B. W. and R. Nichols. 1975. Changes in respiration and soluble carbohydrates during the post-harvest storage of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Sci. Food Agric.* 26:835-842.
- Hammond, J. B. W. and D.A. Wood. 1985. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer and D. A. Wood (eds.). *The Biology and Technology of Cultivated Mushrooms*. John Wiley & Sons, Ltd., UK. pp 63-80.
- Hauschild, A. H. W., B.J. Aris and R. Hilsheimer. 1975. *Clostridium botulinum* in marinated products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 8:84-87.
- Henze, J. 1989. Storage and transport of *Pleurotus* mushrooms in atmospheres with high CO₂ concentrations. *Acta Horticulturae* 258:579-584.
- Herr, B. 1991. Overwrap films: More than just a dust cover. *Mush. News.* 39(7):24-26.
- Hobson, G. and K.S. Burton. 1989. The application of the plastic film technology to the preservation of fresh horticultural produce. *Professional hors.* 3:20-23.
- Hughes, D. H. 1959. Mushroom discoloration research at the University of Delaware. *Mush. Sci* 4:447-448.
- Huxsoll, C. C., H.R. Bolin and A.D. King, Jr. 1989. Physico-Chemical changes and treatments for lightly processed fruits and vegetables. In: J. J. Jen (ed.) *Quality Factors of Fruits and Vegetables*. ACS Symposium Series 405:Chemistry and Technology) 410 pp. American Chemical Society, Washington D.C.
- Kader, A. A., D. Zagory and E.L. Kerbel. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Fd. Sc. Nutri.* 28(1):1-30.
- Kautter, D. A., T. Lilly Jr. and R. Lynt. 1978. Evaluation of the botulinum hazard in fresh mushrooms wrapped in commercial polyvinylchloride film. *J. Food Prot.* 41(2):120-121.
- Kidd, F. and C. West. 1932. Gas storage of tomatoes. Report of the Food Investigation Board, London. 209-211.
- Komanowsky, M., F.B. Talley and R.K. Eskew. 1970. Air drying of cultivated mushrooms. *Food Technol.* 24(9):1020-1024.
- Kompany, E. and Rene, F. 1995. A note on the freeze drying conditions for improved aroma retention in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Lebens-Wiss. Technol.* 28(2):238.
- Konishi, M. 1967. Growth promoting effect of certain amino acids on the *Agaricus* fruitbody. *Mush. Sci.* 6:121-134.
- Kovacs, E. and K. Vas. 1974. Effect of ionizing radiation on post-harvest ripening processes of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*), with special reference to the rate of respiration and of ethylene production. *Acta Alimentaria* 3(1):19-25.
- Kramer, E. M. 1986. Evaluation of gamma irradiation for extension of the shelf life of fresh packaged mushrooms. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Kukura, J. L. and R.B. Beelman. 1998. Calcium chloride improves mushroom color and shelf life by reducing effects of bruising. *Mush. News* 46(9):6-10.
- Kukura, J. L., R.B. Beelman, M. Peiffer and R. Walsh. 1998. Calcium chloride added to irrigation water

- of mushrooms (*Agaricus bisporus*) reduces postharvest browning. *J. Food Sci.* 63(3):454-457.
- Langerak, D. Is. 1972. The influence of irradiation and packing on the keeping quality of fresh mushrooms. *Mush. Sci.* 8:221-230.
- Lentz, C. P and L. van den Berg. 1973. Factors affecting temperature, relative humidity and moisture loss in fresh fruit and vegetable storage. In: *Relative humidity and the storage of fresh fruits and vegetables-Recent research results and developments*. Semiannual Meeting, ASHRAE, New York, 1974:5-12.
- Lopez-Briones, G., P. Varoquax, Y. Chambroy, J. Bouquant, G. Bureau and B. Pascat. 1992. Storage of common mushroom under controlled atmospheres. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27:493-505.
- MacCanna, C. and T.R. Gormley. 1968. Quality assessment of mushrooms: relationship between moisture loss, color and toughness of harvested cultivated mushrooms. *Mush. Sci.* 7:485-492.
- Marcellin, P. 1974. Conservation de legumes en atmosphere controlée dans des sacs en polyethylene avec fenetre d'elastomere de silicone. *Acta Hort.* 38:33-51.
- Mau, J. L., R.B. Beelman and G.R. Ziegler. 1992. Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on growth of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry.* 31(12):4059-4064.
- McConnell, A. L. 1991. Evaluation of wash treatments for the improvement of quality and shelf life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). M. S. Thesis. The Pennsylvania State University, University Park, PA. 111pp.
- Mihara, T., T. Nagano and S. Kato. 1936. Experiments dealing with the utilization of dry-ice in the marketing of fresh "Matsudake", or Japanese mushrooms. *Proceedings of the 7th International Congress of Refrigeration* 4:141-148.
- Miklus, M. B. 1993. Studies on the role of calcium added to irrigation water on quality of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, PA. 81pp.
- Minamide, T., T. Iwata and H. Okino. 1985. The effect of stipe end cutting on freshness and composition of harvested nameko (*Pholiota nameko*) mushrooms. *J. of Japanese Society of Food Sci. Technol.* 32(6):413-418.
- Murr, D. P. and L.L. Morris. 1974. Influence of O₂ and CO₂ on o-diphenol oxidase activity in mushrooms. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99:155-158.
- Murr, D. P. and L.L. Morris. 1975. Effect of storage atmosphere on post harvest growth of mushrooms. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100:298-301.
- Nair, N. G. and P.C. Fahy. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* 35:439-442.
- Nair, N. G. and P.C. Fahy. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:509-512.
- Nichols, R. 1971. *A review of the factors affecting the deterioration of mushrooms*. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 174 pp.
- Nichols, R. 1985. Post-harvest physiology and storage. In: P. B. Flegg, D. M. Spencer and D. A. Wood, (eds.) *The Biology and the Technology of the Cultivated Mushrooms*. John Wiley & Sons, Ltd., UK. pp 195-210.
- Nichols, R. and J.B.W. Hammond. 1973a. Storage of mushrooms in pre-packs: the effect of changes in carbon dioxide and oxygen on quality. *J. Sci. Food Agric.* 24:1371-1381.
- Nichols, R. and J.B.W. Hammond. 1973b. Observations of the effect of punnet type on the quality of pre-packed mushrooms. *Mush. J.* 3:106-109.
- Nichols, R. and J.B.W. Hammond. 1974. Investigation on storage of prepacked mushrooms. *Mush. J.*

24:1-7.

- Nichols, R. and J.B.W. Hammond. 1975. The relationship between respiration, atmosphere and quality in intact and perforated mushroom pre-packs. *J. Fd Technol.* 10:427-435.
- Nichols, R. and J.B.W. Hammond. 1976. Storage of *Agaricus edulis* (syn. *A. bitorquis*) sporophores in prepacks. *Mush. J.* 45:1-3.
- Notermans, S., J. Dufrenne and J.P.G. Gerrits. 1989. A natural occurrence of *Clostridium botulinum* on fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Food Protection* 52:733-736.
- Okereke, A., R.B. Beelman, J.J. Quinn and L.C. Schisler. 1987. Influence of reduced cropping temperature and addition of chalk to the casing layer on yield, quality and shelf life of fresh mushrooms. In: P. J. Wuest, D. J. Royse and R. B. Beelman, (eds.) *Development in Crop Science 10*, Cultivating Edible Fungi. Elsevier Publ. Co. Amsterdam. pp 259-264.
- Paine, S.G. 1919. Studies in bacteriosis. II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Applied Biol.* 5:206-219.
- Patel, P.N., T.K. Pai and S.K. Sastry. 1988. Effects of temperature, relative humidity and storage time on the transpiration coefficients of selected perishables. *ASHRAE Trans.* 94(1):1563-1587.
- Porrit, S.W. 1974. *Commercial Storage of Fruits and Vegetables*. Canada Dept. of Agriculture, Ottawa. Publication 1532.
- Rajaratnam, S., Z. Bano and M.V. Patwardhan. 1983. Post-harvest physiology and storage of the white oyster mushroom *Pleurotus flabellatus*. *J. Fd. Technol.* 18:153-162.
- Riva, M., A. Schiraldi and L.F. Cesare. 1991. Drying of *Agaricus bisporus* mushrooms by microwave-hot air combination. *Lebens-Wiss. Technol.* 24(6):479.
- Roy, S., R.C. Anantheswaran, J. Shenk, M.O. Westerhaus and R.B. Beelman. 1993. Determination of moisture content of mushrooms using vis-NIR spectroscopy. *J. Sci. Fd. Agric.* 63:355-360.
- Roy, S., R.C. Anantheswaran and R.B. Beelman. 1995a. Fresh mushroom quality as affected by modified atmosphere packaging. *J. Fd. Sci.* 60:334-340.
- Roy, S., R.C. Anantheswaran and R.B. Beelman. 1995b. Sorbitol increases the shelf life of fresh mushrooms stored in conventional packages. *J. Fd. Sci.* 60:1254-1259
- Roy, S., R.C. Anantheswaran and R.B. Beelman. 1996. Modified atmosphere and modified humidity packaging of fresh mushrooms. *J. Fd. Sci.* 61:391-397.
- Royse, D.J. and L.C. Schisler. 1980. Mushrooms: Their consumption, production and culture development. *Interdisciplinary Sci. Review.* 5(4):324-332.
- Royse, D.J. and P.J. Wuest. 1980. Mushroom brown blotch: effects of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. *Phytopathology* 70:902-905.
- Ryall, A.L. and W.J. Lipton. 1979. *Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables. Vol. I. Vegetables and Melons.* (2nd ed.) Westport, Connecticut: AVI. 587pp.
- San Antonio, J.P. and P.B. Flegg. 1964. Transpiration from the sporophore of *Agaricus bisporus* 'white'. *Amer. J. Bot.* 51:1129-1132.
- Schmidt, C.E. 1977. Postharvest quality changes in two off-white strains of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, PA. 77 pp.
- Schutte, K.H. 1956. Translocation in fungi. *New Phytologist* 55:164-182.
- Scott, K.J., E.G. Hall, E.A. Roberts and R.B. Wills. 1964. Some effects of the composition of the storage atmosphere on the behavior of apples stored in polyethylene film bags. *Australian J. Exper. Agr. Animal Husb.* 4:253-259.

- Shirazi, A. 1989. Modified humidity packaging of fresh produce. Ph.D. Dissertation. Michigan State University. 110 pp.
- Sinden, J.W. 1980. Strain adaptability. *Mush. News*. 28:18-32.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smock, R.M. 1979. Controlled atmosphere storage of fruits. *Hortic. Rev.* 1:301-336.
- Solomon, J.M., R.B. Beelman and C.E. Bartley. 1991. Addition of calcium chloride and stabilized chlorine dioxide to irrigation water to improve quality and shelf life of *Agaricus bisporus*. *Mush. Sci.* 13:695-701.
- Solomos, T. 1985. Interactions between oxygen levels, rate of respiration and gas diffusion in five apple varieties. In: S.M. Blankenship (ed). Controlled Atmospheres for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities. pp 10-19.
- Staden, O.L. 1967. Radiation preservation of fresh mushrooms. *Mush. Sci.* 6:457-461.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E.A. 1963. *The microbial world* (2nd. ed.). PrenticeHall, Inc. Englewood Cliffs, NJ. 753 pp.
- Sugiyama, H. and K.H. Yang. 1975. Growth potential of *Clostridium botulinum* in fresh mushrooms packaged in semipermeable plastic film. *Appl. Microbiol.* 30:962-969.
- Sveine, E., A. Klougart and C.R. Rasmussen. 1967. Ways of prolonging the shelf-life of fresh mushrooms. *Mush. Sci.* 6:463-474.
- Tolaas, A.G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54.
- Tomkins, R.G. 1966. The storage of mushrooms. *MGA Bulletin*. 202:534-541.
- Tschierpe, H.J. 1959. Der Einfluss von Kohlendioxyd auf die Fruchtkörperbildung und die Fruchtkörperform des Kulturchampignons. *Mush. Sci.* 4:235-250.
- Uryama, T. 1956. Das Wuchshormon des Fruchtkörpers von *Agaricus campestris* L. (vorläufige Mitteilung). *Botanical Magazine* 69:298-299. Tokyo.
- Wahid, M. and E. Kovacs. 1980. Shelf life extension of mushrooms (*Agaricus bisporus*) by gamma irradiation. *Acta Alimentaria* 9:357.
- Wang, F.H.L., J.L. Duda and J.S. Vrentas. 1980. Analysis of impurity migration in plastic containers. *Polymer Engineering and Science*. 20(2):120-127.
- Wong, W.C. and T.F. Preece. 1982. Pseudomonas tolaasii in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops. Number of the bacterium and symptom development on mushrooms grown in environments after artificial inoculation. *J. Appl. Bact.* 53:87-96.
- Wuest, P.J., M.D. Duffy and D.J. Royle. 1990. *Six Steps to Mushroom Farming*. Special Circular No. 268. College of Agriculture, Extension Service, Penn. State Univ., University Park, PA.
- Yamaguchi, M., P.M. Hwang and J.D. Campbell. 1969. Latent o-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Can. J. Biochem.* 48:198-202.
- Yamaguchi, M. and J.D. Campbell. 1973. Gamma-irradiation of mushrooms and its effect on active and latent forms of o-diphenol oxidase. *Radiat. Bot.* 13:55-58.

XIII Aspectos ambientales en el cultivo de hongos.

Dan Levanon y Ofer Danai

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	261
SUBSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PLEUROTUS</i> SPP.	261
Criterios analíticos para seleccionar el sustrato	261
Reciclamiento de los desechos orgánicos a través de la producción de <i>Pleurotus</i>	262
CONSIDERACIONES AMBIENTALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS	262
Colección del sustrato, transporte, almacenamiento y proceso	262
Daño posible al ambiente por la producción de hongos comestibles	264
Daño potencial a los trabajadores por alergias a esporas	265
USO DEL SUBSTRATO DEGRADADO POR LOS HONGOS (SDH)	266
Uso de SDH de especies de <i>Pleurotus</i> como alimeto para rumiantes	266
Potencial de especies del género <i>Pleurotus</i> en la biodegradación de contaminantes ambientales	268
Usos adicionales	268
Observaciones finales	269
REFERENCIAS	271

INTRODUCCIÓN

La industria cultivadora de hongos es identificada generalmente como problemática desde el punto de vista de la calidad ambiental. Esta actitud se debe principalmente a que en el proceso se usan estiércoles, se opera con áreas de composteo a cielo abierto y se tiene poco control en el manejo del substrato degradado por los hongos (SDH). Estas operaciones son causantes potenciales de perjuicios ambientales como malos olores, contaminación de agua y proliferación de moscas y otras plagas.

En años recientes, la producción mundial de hongos comestibles se ha incrementado rápidamente (Royle, 1997). Uno de los géneros más sobresalientes es *Pleurotus* spp., el cual se cultiva en muchos países, especialmente en las naciones en desarrollo. Aunque los substratos utilizados para el cultivo de las variedades de *Pleurotus* spp. no incluyen estiércoles —y por lo tanto se tiene menos riesgos que con el cultivo de otras especies—, se deben considerar cuidadosamente los aspectos ambientales de esta actividad productiva para evitar problemas de diversa índole. El incremento en la producción de hongos se lleva a cabo algunas veces cerca de espacios urbanos donde se ubican los centros de consumo. En tales áreas las precauciones ambientales son muy importantes porque la creciente densidad poblacional y las condiciones insalubres vuelven a algunas zonas particularmente sensibles a la calidad ambiental y a los peligros de salud pública.

Este capítulo trata ciertos aspectos de la interacción entre el cultivo de *Pleurotus* spp. y el mantenimiento de la calidad ambiental.

SUBSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE *PLEUROTUS* SPP.

Criterios analíticos para seleccionar el substrato

Puesto que las variedades en consideración son degradadoras de madera, los substratos tienen un alto contenido de lignocelulosa. Los materiales lignocelulósicos son los desechos orgánicos más comunes de las industrias relacionadas con el bosque (madera, papel, etcétera), agricultura y jardinería. Con el fin de hacer uso de estos desechos y otros subproductos similares para el cultivo de hongos, se debe determinar su compatibilidad con los requerimientos nutricionales del hongo.

Actualmente se han definido los parámetros y estándares químicos, físicos y biológicos que facilitan el estudio de substratos potenciales para el cultivo de *Pleurotus* spp. En nuestro trabajo sobre la posibilidad de usar rastrojo de algodón como substrato, adaptamos métodos empleados para el análisis químico de la alimentación para rumiantes (Silanikove y Levanon, 1986, 1987). Usando estos métodos analíticos monitoreamos la humedad, conductividad eléctrica (CE) y valor del pH del substrato fresco, así como el contenido de cenizas, nitrógeno, lignina, celulosa y hemicelulosa en la materia seca. Estos parámetros fueron registrados en varias etapas del ciclo de crecimiento del hongo

sobre rastrojo de algodón (Silanikove *et al.*, 1988) y se determinaron los valores óptimos para cada uno de ellos con base en el rendimiento. Los ensayos biológicos para la definición del substrato óptimo incluyeron el registro de la tasa de crecimiento en el material lignocelulósico, medido en relación con el diámetro colonial y la calidad, observada en términos de grosor de la biomasa micelial. De acuerdo con nuestra experiencia, la colonización rápida y completa del substrato por el micelio es un requisito clave para obtener buen rendimiento. Aunque tal observación se basa en parte en una escala subjetiva de la biomasa, agrega un componente importante a la medida de la compatibilidad hongo/substrato. Tal análisis de rutina es conducido en la búsqueda de diferentes desechos orgánicos en distintos países para determinar la factibilidad de producir variedades de *Pleurotus* (Levanon y Danai, 1998).

Los parámetros anteriores nos guiaron en nuestros esfuerzos por identificar el substrato más adecuado para el cultivo de *Pleurotus* spp., asumiendo que un análisis preciso puede brindar datos sobre los cuales basarse para preparar el substrato que provee al hongo de sus requerimientos.

Reciclamiento de los desechos orgánicos a través de la producción de *Pleurotus*

Las consideraciones ambientales deben tomar en cuenta el ciclo entero de cultivo y de utilización del substrato. Solamente un esquema de producción basado en este criterio puede asegurar que el producto será el resultado de un sistema ambientalmente amigable. Este ciclo involucra la colección, transporte, almacenamiento y procesamiento de los desechos usados para el substrato, la siembra, el cultivo y la cosecha de los hongos y la eliminación del SDH. Cuando todas estas etapas son realizadas adecuadamente, la actividad no solamente será ambientalmente sana sino mas bien ambientalmente benéfica. Ofrecemos como un ejemplo, el uso de rastrojo de algodón para el cultivo de *Pleurotus* spp. (Levanon *et al.* 1988). El rastrojo de algodón es un desecho problemático del cultivo del algodón debido a su alto contenido de lignina y al hecho de que puede acarrear plagas de una estación a otra. Usualmente se pica e incorpora al suelo o en algunos países se quema, con lo que causa contaminación ambiental. Nosotros desarrollamos su aprovechamiento como un substrato económicamente viable para la producción de este hongo. El SDH puede ser usado como alimentación nutritiva para rumiantes (vacas, ovejas y cabras) y su estiércol a la vez puede proveer abono orgánico para uso en agricultura. Los detalles de este esquema se presentan en los párrafos siguientes.

CONSIDERACIONES AMBIENTALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS

Colección del substrato, transporte, almacenamiento y proceso

Todos estos pasos son esenciales en el manejo del substrato para el cultivo del hongo. De acuerdo con nuestra experiencia, la maquinaria estándar para el acopio de granos puede ser adaptada fácilmente para coleccionar el rastrojo de algodón que se usará en la preparación del substrato. Al tratar de encontrar la mejor manera de recogerlo tuvimos

que sortear varias dificultades: a) El periodo de colecta deber ser bastante corto debido a la necesidad de voltear el suelo lo más pronto posible antes de que inicie la lluvia. b) El rastrojo de algodón en el norte de Israel contiene 60% de humedad y no puede ser dejado en el campo después de cortarlo porque empieza a descomponerse de manera inmediata. c) La maquinaria que se usa normalmente para picar los tallos antes de incorporarlos al suelo no los colecta.

El último problema fue resuelto empleando una cosechadora de forraje, la cual corta, pica y carga el forraje en un remolque o camioneta. Aquí es donde se tuvieron que hacer adaptaciones a la maquinaria porque los tallos de algodón contienen mucho más lignina que el forraje. Por ejemplo, son más leñosos y por lo tanto más difíciles de cortar y picar. Sin embargo, el uso de esta maquinaria después de las adaptaciones proporcionó un método muy eficiente y rápido de colectar y transportar los tallos. Los cultivadores con los que trabajamos quedaron muy satisfechos con la operación porque se dejó el campo limpio de materiales que se degradan lentamente y que además contienen plagas (como el picudo o el gusano del algodonoero) que exigen un barbecho más eficiente que el normal.

El transporte puede ser caro por la alta relación volumen/peso del material, por lo que se recomienda el picado y la compactación antes del traslado. Se debe tener cuidado de evitar la dispersión del material cubriendo la carga para minimizar pérdidas y para no dejar basura en los caminos. Además de las muy obvias razones para mantener las carreteras limpias, está el problema de la diseminación de patógenos de plantas. Como resultado de esto, muchos países tienen enérgicas leyes que controlan el transporte de dichos materiales. Estos aspectos deben ser tomados en cuenta como parte de la planeación de la producción de una planta de cultivo de hongos comestibles ambientalmente amigable.

El almacenamiento también es un aspecto importante del ciclo de producción. Las unidades de producción de hongos planean su trabajo durante todo el año para asegurar el suministro continuo de hongos al mercado. Aunque la materia prima para el sustrato de *Pleurotus* spp. es estacional, las instalaciones para el almacenamiento deben ser esencialmente concebidas para el mantenimiento de un suministro de sustrato durante todo el año. Para minimizar las pérdidas por fermentación se debe mantener el material en lugares sombreados y climas secos. Puesto que el algodón contiene 60% de humedad, es imposible almacenarlo tal cual. El secado involucraría el uso de secadoras especiales y resultaría caro. Después de considerar otras posibilidades, nosotros hicimos una prueba de ensilado (Silanikove y Levanon, 1986, 1987). Los resultados fueron muy prometedores: encontramos que compactando la pila y cubriéndola con hoja de PVC se creaban condiciones anaerobias que permitían disminuir el pH como en el ensilado de cereales verdes forrajeros (por ejemplo maíz o trigo). EL rastrojo de algodón picado fue conservado por ensilado en condiciones apropiadas por más de un año para usarlo como sustrato.

El escalamiento del proceso se logró almacenando el rastrojo de algodón en instalaciones originalmente construidas para el ensilado de cereales (Silanikove *et al.*, 1988). De esta manera, el producto ensilado fue usado con éxito como sustrato para el cultivo comercial de *Pleurotus* spp. y de *Lentinula edodes* (Levanon *et al.*, 1993).

Aunque esto es solo un ejemplo del manejo del sustrato, contiene todos los aspectos que deben tomarse en cuenta para el desarrollo exitoso del cultivo de *Pleurotus* spp.

Daño posible al ambiente por la producción de hongos comestibles

Las instalaciones para compostear son conocidas por causar problemas ambientales. La emisión hacia el aire de compuestos volátiles y los efluentes residuales del composteo son los principales factores que requieren atención. La contaminación del aire, el agua y el suelo por desechos agrícolas e industriales causan creciente preocupación y dan lugar a una acelerada legislación ambiental. En países industriales densamente poblados, las actividades de composteo están estrictamente reguladas y el composteo en interiores o *in door* se está volviendo una obligación, ya que representa una última solución al problema de los olores, especialmente cerca de áreas pobladas.

Esta situación afecta principalmente el composteo para la producción de *Agaricus* spp. Los productores de composta para este hongo se ven forzados a invertir en instalaciones en interiores de este tipo para cumplir con las nuevas regulaciones ambientales.

El procesamiento del sustrato para *Pleurotus* spp. no puede ser considerado como un composteo, pero su producción incluye etapas que causan olores, especialmente cuando no son realizados cuidadosamente: a) Algunas veces la etapa de humedecimiento y mezclado se prolonga por algunos días y el sustrato inicia un proceso de fermentación. Aun cuando esto es sólo por un corto tiempo (2-4 días), puede causar la emisión de olores como resultado de las condiciones anaerobias de la pila. Para minimizar este problema, se recomienda aerear la pila por volteo, o con aireación forzada, así como aerear el agua de remojo. b) Los malos olores son ocasionados a veces durante el periodo de pasteurización, antes de la inoculación, especialmente cuando ésta se hace con vapor y airación forzada. El uso de túneles modernos de pasteurización disminuye dicho fenómeno, porque contienen sistemas de circulación de aire y filtros químicos y biológicos contra malos olores.

Los pasos posteriores del cultivo de *Pleurotus* spp. son menos problemáticos para el ambiente; pero aun así, la planta productora debe mantener estrictas condiciones de higiene y debe evitar la diseminación de desechos del sustrato de los hongos o de cualquier otro material proveniente del cultivo hacia las instalaciones mismas o hacia las áreas circunvecinas. Los patógenos de *Pleurotus* spp., especialmente hongos y moscas se acumulan y multiplican en tales áreas, por lo que las medidas que aseguren la adecuada disposición de los desechos deben ser parte ordinaria de los reglamentos ambientales. Por otra parte, el seguimiento de estos reglamentos es necesario para lograr una produc-

ción de hongos exitosa con un daño mínimo al rendimiento o la calidad, mientras que al mismo tiempo se minimiza el daño a los alrededores por moscas, mosquitos, roedores y otras plagas y patógenos provenientes de este sistema.

Daño potencial a los trabajadores por alergias a esporas

La “fiebre del heno” es un fenómeno bien conocido que causa una reacción alérgica debida a la presencia de substratos como el heno o el rastrojo (entre algunas otras causas). Existe también otra enfermedad, conocida como el mal del granjero (“farmer’s lang” en inglés) que se presenta entre los trabajadores, principalmente durante la cosecha del heno o los cereales y rastrojos. En ambos casos, la causa principal está relacionada con la diseminación de grandes cantidades de esporas de hongos, y de actinomicetos especialmente, del material vegetal hacia el aire. Actualmente, la única manera efectiva de evitar esta enfermedad, en personas que son sensibles, es mantenerlas alejadas tanto como sea posible, de las actividades de cosecha.

Durante el cultivo de *Pleurotus* spp. los trabajadores se exponen a alergias similares, en este caso por esporas del mismo *Pleurotus* spp. Puesto que la morfología de los hongos de este género es tal que el himenio no se encuentra cubierto por un velo (al contrario de otros hongos como *A. bisporus*), las esporas se diseminan rápidamente en el aire. Debido a ello, el aire en los cuartos de crecimiento se carga de esporas, específicamente durante los últimos días de desarrollo del cuerpo fructífero.

La sensibilidad de los trabajadores expuestos a estas esporas varía y es impredecible antes de una primera exposición. Algunos desarrollan una reacción alérgica casi inmediata, mientras que otros la desarrollan solo de manera gradual, después de cierto número de exposiciones. En este caso, los síntomas alérgicos generalmente crecen si la exposición se prolonga. Por otro lado, algunos trabajadores son casi inmunes a la alergia y no desarrollan ningún tipo de síntoma.

Nosotros hemos tenido la oportunidad de observar este fenómeno durante las primeras etapas de operación de varias plantas cultivadoras de *Pleurotus* spp. Debido a ello, hemos podido estudiar el impacto de la exposición de esporas a grupos nuevos de trabajadores. Este estudio fue conducido en cooperación con el Departamento de Pulmones del Hospital Local (Rivka Ziv Hospital, Tsfat). El estudio mostró un constante incremento en la incidencia y severidad de las reacciones alérgicas de los trabajadores a las exposiciones continuas de las esporas del hongo.

Esta situación hizo necesario el uso rutinario de máscaras contra polvo fino en cada actividad en los cuartos de crecimiento, las cuales minimizaron la exposición a las esporas y eliminaron casi completamente las reacciones alérgicas. El sistema de ventilación de los cuartos de crecimiento debió adaptarse para reducir la circulación de esporas. Se usó una criba fina para cubrir la entrada de aire recirculado en los cuartos de crecimiento. La criba debía limpiarse regularmente y cambiarse con frecuencia para asegurar

su funcionamiento adecuado. Por otra parte, de este estudio surgió la recomendación de que es preferible cosechar siempre los hongos antes de que suelten las esporas.

En años recientes, se han hecho esfuerzos para desarrollar cepas de *Pleurotus* spp. con esporulación reducida. La eventual hibridación de cepas sin esporas es la última solución al problema de las alergias.

USO DEL SUBSTRATO DEGRADADO POR LOS HONGOS (SDH)

Uso de SDH de especies de *Pleurotus* como alimento para rumiantes

El uso de desechos lignocelulósicos para alimentación animal está limitado por la baja digestibilidad de estos en el rumen. Esto es porque las moléculas de lignina cubren los polisacáridos (especialmente celulosa) y los protegen de la degradación por las enzimas de la microflora del rumen. Por lo mismo, aunque muchos subproductos agrícolas (rastros, hojas y otros) contienen significantes cantidades de polisacáridos, casi no están disponibles para los rumiantes sin deslignificación previa. Esto puede hacerse por medios físicos, químicos o biológicos (Zadrazil, 1998). Todos los tratamientos son efectivos para reducir la lignina selectivamente, y por lo mismo, para aumentar la digestibilidad de la celulosa remanente; el factor limitante es el costo del tratamiento, el cual usualmente es más alto que el precio del material tratado.

Los hongos del género *Pleurotus* pueden utilizar un amplio rango de materiales lignocelulósicos para su crecimiento, así como también pueden crecer en un amplio rango de temperaturas y pueden por lo tanto ser utilizados para el propósito de reciclaje. Este hongo utiliza la lignocelulosa durante sus primeras etapas de crecimiento y después degrada selectivamente la lignina (Kerem y Hadar, 1992). En nuestro estudio sobre el cultivo de *Pleurotus* spp. en una mezcla de rastrojos de trigo y de algodón, encontramos que el decremento en el contenido de lignocelulosa puede alcanzar el 36% durante el periodo de crecimiento del hongo (50-60 días) (Levanon *et al.*, 1993).

Hadar *et al.* en 1993 demostraron mediante estudios *in vitro* que si el rastrojo de algodón se somete a más de 60 días de crecimiento con *Pleurotus* spp. puede obtenerse un incremento del 20 al 41% en la digestibilidad del substrato. A pesar de ello, los intentos para desarrollar una técnica que use *Pleurotus* spp. como agente biológico para convertir el rastrojo en un alimento nutritivo para ganado (a través de la degradación de la lignina), no han sido económicamente exitosos. Esto se explica principalmente por la aún baja digestibilidad del producto obtenido, la cual no garantiza el costo del tratamiento. Por el contrario, la combinación de cultivar *Pleurotus* spp. por sus hongos y luego utilizar su SDH para alimentación animal parece prometedora (Levanon *et al.*, 1988). En este caso, el SDH tiene un valor nutritivo comparable al heno de cereales. Una desventaja de este procedimiento es la humedad del SDH (60-70%), que es mayor que la del heno e involucra costos de transporte más altos y la necesidad de un proceso de

conservación para evitar la contaminación y la pudrición. Otra desventaja resulta ser el alto contenido de cenizas (12-20% en peso seco), la cual limita la proporción del SDH que puede ser incluida en la dieta alimenticia.

Como ventaja comparativa se puede decir que el SDH tiene un alto contenido de proteína (8-10% materia seca). De hecho los aminoácidos constituyentes de estas proteínas sugieren que durante el crecimiento del hongo tiene lugar una fijación de nitrógeno mineral porque el contenido de nitrógeno del hongo es superior al de los substratos en los que crece (Hadar *et al.* 1993). Otra ventaja es el hecho de que puesto que la producción de hongos se efectúa durante todo el año, el aprovisionamiento de SDH para alimento animal no está sujeto a limitaciones estacionales.

Hadar *et al.* (1993) demostraron que el SDH procedente del cultivo de *Pleurotus* spp. sobre una mezcla de rastrojos de algodón y trigo (RAT) puede reemplazar 30% del alimento diario para ovejas y vaquillas. Este procedimiento ha sido adoptado por varios ganaderos en Israel, a pesar del hecho de que se practica un esquema muy intensivo de alimentación y que el alto contenido de cenizas del SDH pone limitaciones al uso de mayores proporciones de este en el alimento. En esquemas alimenticios menos intensivos, se espera que una mayor proporción de SDH pueda ser usado para satisfacer las necesidades alimenticias de los animales. En el caso de SDH almacenado, si se usa mezclado con granos triturados de cebada en el ensilado también puede reemplazar el 30% de los requerimientos nutritivos de ganado vacuno (Danai, comunicación personal).

El uso de SDH de *Pleurotus* spp. como alimento animal requiere un cierto número de atenciones: 1) Se debe tener mucho cuidado en evitar la presencia de agentes contaminantes en el SDH (el cultivo correcto del hongo evitará la contaminación con plagas, como moscas o mohos, asegurando un SDH limpio). 2) Las bolsas de plástico y otros implementos del cultivo de hongos deben ser eliminados del SDH para evitar daños al ganado. 3) La proporción de SDH en la alimentación debe incrementarse gradualmente hasta que se alcance el óptimo. Tal proceso da tiempo a la microflora del rumen para adaptarse a este material alimenticio poco usual. Un aumento gradual del SDH en la dieta asegura un uso durante un periodo prolongado.

Si el suministro de SDH es mayor que las necesidades inmediatas para la dieta de los animales, puede conservarse por ensilaje. Se recomienda agregar forraje cerealero como trigo, cebada o maíz, por ejemplo, para asegurar un ensilaje adecuado. En el caso de que el pH del ensilado no disminuya abajo de 5.0 espontáneamente, se puede usar un agente comercial para la reducción de pH.

En visitas a Hungría y Eslovenia observamos el uso de SDH como inóculo en la producción de alimento animal. Puesto que el inóculo es uno de los componentes caros del cultivo de *Pleurotus* spp. este uso representa un considerable ahorro. En el caso observado, el SDH fue mezclado en aproximadamente proporciones iguales con desechos orgá-

nicos (olote de maíz, aserrín hojas, etc) y cubierto con polietileno negro para evitar la luz e incrementar la concentración de CO₂. El sustrato estaba listo para usarse como alimento animal después de 4-6 semanas. El principal problema en este procedimiento parece ser el alto riesgo de contaminación por mohos.

Potencial de especies del género *Pleurotus* en la biodegradación de contaminantes ambientales

Los hongos de pudrición blanca tienen la habilidad de degradar compuestos xenobióticos, los cuales son químicos organo-sintéticos usados en la industria, la agricultura, el transporte y el hogar. Entre estos compuestos se encuentran plaguicidas tóxicos y otros productos que ponen en peligro la salud humana y la calidad ambiental. La contaminación del agua, el aire, y el suelo por dichos químicos es uno de los retos más comunes para la estabilidad del ambiente. Las enzimas exocelulares no específicas, que permiten a los hongos de pudrición blanca degradar sus sustratos, especialmente lignina, son también capaces de degradar o transformar contaminantes organosintéticos (Reddy, 1995). Masaphy *et al.* en 1993 estudiaron la habilidad de *Pleurotus* spp. para degradar plaguicidas en fermentación en estado líquido y sólido. Ellos demostraron que en cultivo líquido *P. pulmonarius* transformaba y detoxificaba herbicidas del grupo de la triazine. Estos herbicidas son los más comúnmente utilizados y por lo tanto sus residuos contaminan fuentes de agua en todo el mundo. Otros estudios sobre la fermentación en estado sólido de rastrojo de algodón por *Pleurotus* spp. demostraron el potencial que representa el uso de esta habilidad para la filtración biológica del agua (Masaphy *et al.*, 1996a, b). Los sustratos lignocelulósicos tienen la particularidad de adsorber los plaguicidas, y esta capacidad se potencia porque el hongo degrada parcialmente estos compuestos. Después, el hongo transforma y degrada el plaguicida que fue adsorbido por el sustrato. Esta combinación puede ser usada con SDH para el desarrollo de biofiltros para el tratamiento del aire, el agua y el suelo contaminados. La adición de sustrato fresco al hongo le permite crecer y continuar su actividad degradadora. La existencia de micelio activo es crucial para la continuación de esta actividad, mientras que la adición de sustrato lignocelulósico fresco induce una continuada actividad lignocelulolítica por el hongo (Masaphy y Levanon, 1992). La necesidad de sistemas económicos de filtración para reducir la contaminación ambiental está en aumento constante y el SDH de especies de *Pleurotus* reciclado ofrece un potencial promisorio para este propósito.

Usos adicionales

Un número de opciones fueron mencionadas en un simposio sobre los usos beneficios del SDH derivado del cultivo de *Agaricus* spp. (Levanon *et al.*, 1994), las cuales incluyeron las siguientes:

- Como un mejorador orgánico para macetas, por ejemplo como sustituto de turba. La demanda de tal material aumenta en proporción al uso creciente de medios específicos en agricultura, como puede ser en la horticultura. El SDH es usado para este propósito de manera creciente.

- Como un abono orgánico en agricultura y horticultura.
- Como un componente primario para la reconstrucción de pantanos. Estos pantanos han sido diseñados para remediar el agua efluente del drenado de minas. El contenido orgánico de los SDH sirve como soporte para el desarrollo de flora y fauna en el pantano pero también absorbe metales pesados del agua contaminada.
- Como un estabilizador orgánico de suelo en sitios severamente perturbados. Esto incluye minas abandonadas, sitios de excavación, laterales de carreteras, especialmente en áreas montañosas y espacios verdes urbanos multiusos.

En visitas a plantas de *Pleurotus* spp. en Italia observamos que el SDH se usa en el composteo de desechos agrícolas tanto como agente para dar volumen (bulking) con desechos orgánicos municipales y aguas de drenaje, como para sustrato en vermicomposteo. Este último es un proceso en el cual el sustrato orgánico sirve como nutriente especial para lombrices del suelo. El sustrato transformado en vermicomposta también es considerado como un aditivo de alta calidad para el cultivo de plantas ornamentales.

Puesto que la producción de *Pleurotus* spp. en Europa y EUA es baja, comparada con la de *A. bisporus*, se produce menos SDH y la presión ambiental por hacer uso del SDH de *Pleurotus* spp. es coincidentalmente reducida. Sin embargo, encontrar usos positivos, como los mencionados anteriormente o algunos adicionales, es esencial dondequiera que se cultive o planea cultivar *Pleurotus* spp. Una vez que tales usos están identificados, el SDH puede ser utilizado sanamente para dejar por lo general un margen muy superior al costo de desecharlo.

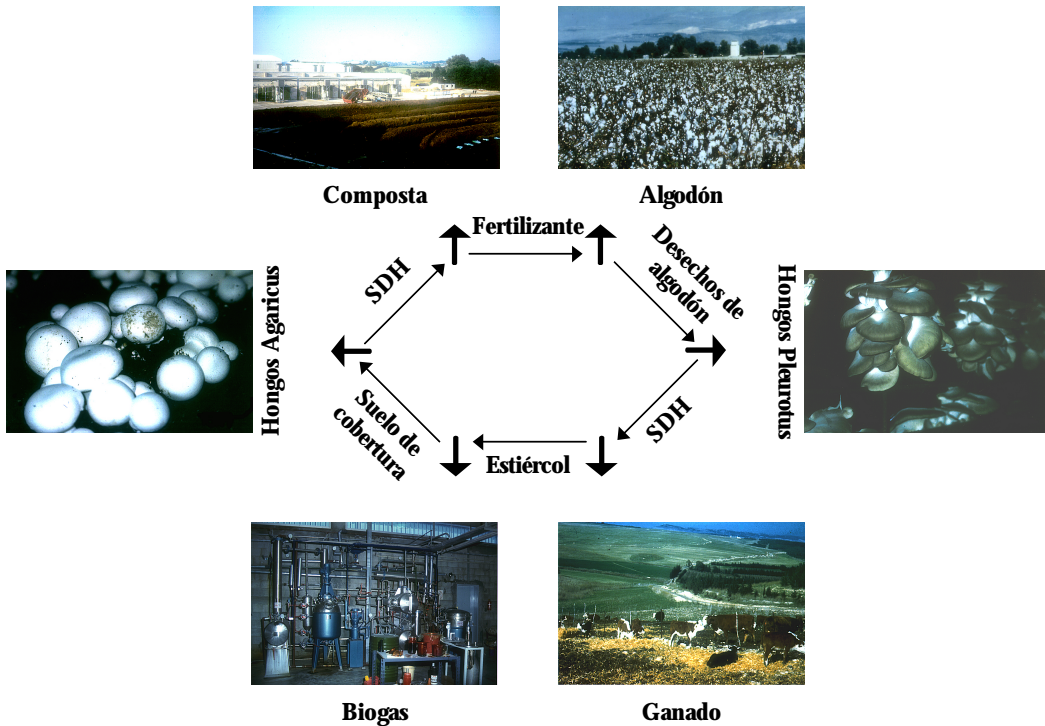
Observaciones finales

En el cultivo moderno de hongos, las consideraciones ambientales son una parte integral del plan de producción. El concepto básico de agricultura sustentable implica el reciclado de materiales, lo cual significa que hay un uso potencial para cada subproducto, por lo que cada uno de estos es considerado como sustrato potencial en lugar de un producto de desecho. Esto también significa que un ambiente sano y limpio no es menos importante que los altos rendimientos y la buena calidad del producto. Es mejor iniciar el programa de reciclado de manera voluntaria que verse forzado a hacerlo por la legislación ambiental: Un programa planeado de manera integral puede ser más barato y más eficiente que una adición posplaneada. En el largo término, tal enfoque incrementará la productividad y los beneficios.

Como un ejemplo de un plan de reciclado en la producción de hongos, ofrecemos nuestra experiencia con el cultivo combinado de *A. bisporus* y *Pleurotus* spp. Este proceso está basado en la cosecha y en las instalaciones agroindustriales en el norte de Israel (figura 1, de acuerdo con Levanon y Danai, 1998).

Este esquema sigue las condiciones específicas del norte de Israel, pero el concepto general es claro: Los desechos en cada etapa representan el sustrato para la etapa

Figura 1. Representación esquemática del reciclado en el cultivo de *Pleurotus* y *Agaricus*.



siguiente y la producción de *Pleurotus* spp. está basada en el uso de rastrojo de algodón como sustrato. El SDH es usado como alimento para ganado y el estiércol de los alimentaderos es usado para generar biogás para energía. La fase sólida del efluente del digestor (llamada *cabutz*) se separa de la fase líquida, y es usada como suelo de cobertura en el cultivo de *A. bisporus*. A su turno, el SDH de esta etapa es recompostado y usado como abono en el campo, para el algodón, y por lo tanto cierra el ciclo. Como se ha demostrado, los productos son sacados del sistema y los subproductos continúan fluyendo hasta que el ciclo se completa. Los ciclos de producción por cada unidad de cultivo pueden ser planeados en base a este ejemplo, de acuerdo a condiciones locales. Tales planes deben ser continuamente ajustados de acuerdo a cambios en el mercado, en el ambiente y por otras circunstancias locales como el costo de la mano de obra, etc. Este procedimiento significa un esfuerzo continuo para encontrar los sustratos más factibles y baratos, así como la seguridad de los canales de reciclaje para los sustratos degradados y los subproductos.

REFERENCIAS

- Hadar, Y., Z. Kerem, B. Gorodecki. 1993. Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus*. *J. Biotechnol.* 6:320-328.
- Levanon, D. and O. Danai. 1995. Chemical, physical and microbiological considerations in recycling spent mushroom substrates. *Compost Sci. & Util.* 3:72-80.
- Levanon, D. and O. Danai. 1998. Selection of substrates for mushroom cultivation and spawn production. *FAO Global Network on Mushrooms, Newsletter No.2.*
- Levanon, D., O. Danai and N. Silanikove. 1989. Cotton straw silage as substrate for *Pleurotus* spp. cultivation. *Mush. Sci.* 12:81-90.
- Levanon, D., Y. Hadar and P.J. Wuest. 1994. Nature and use of spent mushroom substrate. *Compost Sci. & Util.* 2(3):22-23.
- Levanon, D., N. Rothschild, O. Danai and S. Masaphy. 1993. Bulk treatment of substrate for cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) on straw. *Biores. Technol.* 45:63-64.
- Masaphy, S. and D. Levanon. 1992. The effect of lignocellulose on ligno-cellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:828-832.
- Masaphy, S., Y. Henis and D. Levanon. 1996a. Degradation of atrazine by the ligninocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Bioresource Technol.* 56:207-214.
- Masaphy, S., Y. Henis and D. Levanon. 1996b. Manganese enhanced bio-transformation of atrazine by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3587-3593.
- Masaphy, S., D. Levanon, J. Vaya and Y. Henis. 1993. Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(hydroxyisopropyl) amino-1,3,5-triazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4342-4346.
- Reddy, C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:320-328.
- Royse, D.J. 1997. Speciality mushrooms and their cultivation. *Hort. Rev.* 19:59-97.
- Silanikove, N. and D. Levanon. 1986. Cotton straw: Composition, variability and effect of anaerobic preservation. *Biomass* 9:101-112.
- Silanikove, N. and D. Levanon. 1987. Interrelationships between acidic and alkali treatments of cotton and wheat straw and fiber chemical properties. *J. Sci. Food Agric.* 38:117-124.
- Silanikove, N., O. Danai and D. Levanon. 1988. Composted cotton straw silage as a substrate for *Pleurotus* spp. cultivation. *Biol. Wastes* 25:219-226.
- Zadrazil, F. 1998. Is the conversion of lignocellulose into feed using white-rot fungi realizable? *FAO Global Network on Mushrooms, Newsletter No.2.*

XIV Aspectos económicos de la producción de *Pleurotus* spp.

R. N. Verma

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	275
ECONOMÍA DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA	275
Capital de inversión	276
Costo de producción	276
Costo total	276
Egresos / recuperación	276
Análisis económico	277
Eficiencia económica	277
EFICIENCIA EN EL COSTO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS	278
Inversión, costos y retorno	278
Plantas del sur de la India	279
Plantas de NABARD (India). Especificaciones	280
Plantas en NEH India	282
Plantas basadas en la pulpa de café en México	282
Pequeñas plantas de Filipinas	283
Plantas de Hiratake en el Japón	283
ECONOMÍAS DEL MANEJO POSCOSECHA	284
Inversión y costos	284
Mercado fresco	284
Conservación	285
Valor agregado	286
ECONOMÍA DE MERCADO	287
Costo a nivel del productor	287
Costo al nivel intermediario	287
Limitaciones del mercado	288
REFERENCIAS	290

INTRODUCCION

La estimación del costo de producción y la rentabilidad del cultivo del hongo ostra puede hacerse por medio del cálculo de los gastos en las tres etapas de su producción: Producción de semilla, Preparación del sustrato y cultivo, así como en el manejo pos-cosecha y mercadeo. Según la situación prevaleciente, un cultivador puede comprar semilla o sustrato de otra empresa y solamente ocuparse del cultivo y del mercadeo o puede establecer una empresa integrada que tenga todas las facilidades necesarias para producir semilla y sustrato, cultivar, procesar y vender los hongos. Según el caso, la inversión y los gastos de establecimiento de la empresa (infraestructura, equipo, maquinaria), así como los costos fijos y variables diferirán en los dos casos. Los costos fijos incluyen: sueldos; gasto administrativo; 1/4 del capital de trabajo; depreciación de la infraestructura, equipo y maquinaria por el tiempo; interés sobre el capital prestado. Por otra parte, los costos variables incluyen los costos del sustrato, semilla, material de empaque, mano de obra, agua, electricidad y otros gastos incurridos de naturaleza similar, así como el interés de mantener el capital trabajando. Es obvio que el costo variable es determinado por la cantidad de inversión hecha, o en otras palabras, por la magnitud de la capacidad instalada y las capacidades técnicas de la empresa. En razón de las posibles variaciones en estos aspectos, la inversión, los costos y la economía general de cada paso se mencionan a continuación de manera separada.

ECONOMÍA DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA

La preparación o la disponibilidad de la semilla es el factor más crítico en la producción del hongo ostra. La producción de semilla pura y de calidad es un proceso de alta tecnología y debe recibir el máximo de atención, puesto que puede convertirse en un factor limitante de cualquier esfuerzo de producción. Por lo tanto, cualquier aventura comercial debe preferir tener sus propias instalaciones para producción para que el ciclo de crecimiento y los compromisos del mercado puedan ser mantenidos de manera armónica y los suministros sean cumplidos de la manera comprometida. La dependencia de otro laboratorio de semilla trae riesgos de no disponibilidad en momentos cruciales, falta de seguridad en la cantidad/calidad, costos más altos, los cuales incrementan los costos de insumos, deterioro/daño de la semilla durante el tránsito desde el laboratorio, etcétera.

Para la producción de semilla de calidad, se requiere un laboratorio equipado y operado por técnicos bien entrenados y trabajadores calificados. Esto significa inversión, pero vale la pena, ya que con un poco más de gasto, puede ser autosostenible, por medio de 1) la producción de cantidades extras de semilla a cultivadores pequeños, 2) la producción de cultivos puros de varios hongos para venta a otros laboratorios y 3) la producción de rhizobium y otros cultivos de hongos/bacterias que se están volviendo populares como biofertilizantes o agentes de control biológico en una diversidad de cultivos agronómicos.

A continuación se presenta la inversión estimada para el establecimiento de un laboratorio con capacidad para la producción de alrededor de 25,000 kg (35,000 l) de semilla de grano por año, así como sus costos de producción. Es necesario recalcar que estos datos pueden variar de un lugar a otro según los precios/salarios locales, y otros factores.

Capital de inversión

Producto:	Semilla de hongo ostra
Capacidad instalada:	25,000 kg (35 000 l) por año

Costo en dólares de EU

1) Terreno y desarrollo del sitio	2,000.00
2) Obra civil, área 186 m ²	13,000.00
3) Equipo, maquinaria e instalaciones	10,000.00
4) Equipo de oficina	250.00
5) Gastos preoperativos	2,000.00
6) Gastos de entrenamiento y consultoría	750.00
7) Capital de trabajo (25%)	2,250.00
Total en dólares	30,250.00

Nota: Equivalencia de 1 dólar EU: 10 pesos mexicanos.

Costo de producción

A) Costo variable (en dólares de EU)

Materias primas, incluso granos, algodón, botellas, bolsas, vidriería, químicos, etc.	2,500.00
Costo de energía	2,500.00
Salarios y pago de técnicos	4,000.00
Interés del capital de trabajo (12.5%)	281.25
Total en dólares	9,280.00

B) Costos fijos (en dólares de EU)

Depreciación de edificio (5%)	650.00
Depreciación de equipo (10%)	1,025.00
Interés sobre el capital fijado (15%)	4,540.00
Total en dólares	6,215.00

Costo total (en dólares de EU)

C) Costo total (25,000 kg de semilla) (A+ B)	15,500.00
D) Costo unitario de un kg de semilla	0.62

Egresos / Recuperación (en dólares de EU)

Ingreso bruto (US 1.50/ kg de semilla)	37,500.00
Recuperación sobre costos variables	28,220.00
Ganancia neta	22,000.00

Análisis económico

El costo y el beneficio de cada kilogramo de semilla producida en tal unidad de producción puede ser indicado como sigue:

Costo (en dólares de EU)	
Costo variable total por kilogramo de semilla	0.37
Costo fijo por kilogramo de semilla	0.25
Costo total por un kilogramo de semilla	0.62

Beneficio (en dólares de EU)	
Ingreso bruto	1.50
Ingreso sobre costo variable	1.13
Beneficio neto	0.88

Eficiencia económica (en dólares de EU)

Relación egresos/ingresos	2.42
Relación bruta (costos totales/ingreso bruto)	0.41
Coefficiente de rotación del capital (ingresos brutos/costos fijos)	1.24
Relación de operación	0.24
Tasa de retorno sobre el capital (beneficio neto/capital fijo)	0.72

El análisis de la eficiencia económica de la unidad propuesta indica que cada dólar invertido como costo total de la unidad producirá un ingreso bruto de 2.42 dólares y 0.41 se requerirán para ser invertidos para tener un beneficio bruto de 1.50 dólares por producción de semilla. Por lo tanto, a partir del coeficiente de rotación del capital, se puede inferir que por cada dólar de capital invertido puede generarse un ingreso bruto de 1.24 dólares. De manera similar, el coeficiente de operación de 0.24 indica que un ingreso bruto de 1.5 dólares puede ser ganado si se invierte sólo 0.24 dólares como costo variable total. Finalmente, la tasa de retorno sobre el capital de la unidad bajo referencia también indica una situación favorable puesto que implica que cada dólar de capital invertido puede generar una ganancia neta de 0.72 dólares por cada kilogramo de semilla producida en la unidad.

En los cálculos dados arriba se usaron conceptos establecidos de costos y retorno, es decir 1) costos fijos: por ejemplo gastos de capital al establecer el laboratorio de semilla que incluyen equipos e instalaciones, y gastos previos al establecimiento como capacitación, consultoría, entre otros. Además del 25% de capital de trabajo, y 2) costo total de producción, lo que incluye costos variables en insumos y materia prima más salarios y sueldos de los trabajadores del laboratorio interés sobre el capital de trabajo. 3) Costos por la depreciación de edificios y equipos, así como interés sobre costos fijos. De lo anterior, es evidente que la unidad de producción de semilla, si trabaja a plena capaci-

dad, haría un beneficio neto de 0.88 dólares por cada kilogramo de semilla producida y 22,000 dólares al año.

ECONOMÍA EN EL COSTO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS

Inversión, costos y retorno

Existe una amplia variación en el método, escala y sustratos usados para cultivar el hongo ostra en diferentes países o aun en diferentes áreas de un país. Por lo tanto, los datos económicos varían considerablemente. Sin embargo, al menos un aspecto es común: casi en cualquier parte sólo es practicado el cultivo estacional sin control de clima, lo que hace al cultivo una actividad mucho menos cara. El costo de operación es mantenido a un nivel mínimo también al utilizar sustratos que pueden ser conseguidos fácilmente en la localidad donde se establece la empresa. Además, el hongo ostra se puede cultivar sobre sustratos frescos o fermentados y el costo de la pasteurización disminuye al no requerir de un calentador o un túnel y sus auxiliares. Una pasteurización efectiva del sustrato se puede alcanzar ya sea por inmersión en agua caliente a 60-70°C por algún tiempo o por la inmersión durante la noche (16-18 hs) en agua con 75 ppm de carbendazim y 500 ppm de formaldehído en un tambor/tanque cubierto con una tapadera (Vijay y Sohi, 1987). La inmersión en agua caliente también ayuda a remover los componentes solubles del sustrato, los cuales frecuentemente son fuente de atracción para hongos contaminantes.

El nivel en el cultivo del hongo ostra también difiere ampliamente, desde nivel casero hasta un cultivo comercial pero aún en estos casos su tamaño y su capacidad es mucho más pequeña en relación con las plantas productoras de champiñón. En la India, el cultivo del hongo ostra es más popular en los estados del Sur, particularmente en Karnataka y Tamil Nadu. En Karnataka, se pueden distinguir y agrupar tres escalas diferentes de cultivo: plantas pequeñas con menos de 400 bolsas por ciclo de cosecha; plantas medianas con 401-800 bolsas por ciclo de cosecha; y plantas grandes con más de 800 bolsas por ciclo de cosecha. Generalmente se realizan ocho ciclos en un año por tales cultivadores, con 34-45 días por ciclo (Mamatha, 1998). Aunque Madan y Thakur (1991) han mencionado varios sustratos para el cultivo del hongo ostra en la India, tales como rastrojo de trigo, cáscara de arroz, aserrín, tallos de maíz, hojas secas y desechos de la industria alimenticia, pero en los estados del sur de este país solamente se usa rastrojo de maíz para el cultivo. Es el mismo caso de los estados del este, del noreste y del centro. Por otra parte, en los estados del noroeste del Punjab, Haryana e Himachal Pradesh, se usa rastrojo de trigo, aunque en estos estados el cultivo del hongo ostra es mucho menor que el champiñón. Ningún otro sustrato se usa en India en un contexto considerable. En otros países, sin embargo, existe más diversidad en los sustratos utilizados como rastrojo de trigo y de cebada, olote de maíz, cáscara de semilla de algodón, aserrín, pulpa de café, rastrojo de arroz, desecho de algodón, entre otros.

Al ver todas estas variaciones, aquí se presenta el análisis económico de algunos modelos, con el fin de dar una idea generalizada de la empresa en una situación particular.

Plantas del sur de la India

Mamatha (1998) realizó un análisis económico de pequeñas, medianas y grandes plantas de Karnaka y analizó su plan de inversión, costo de producción y beneficio, los cuales se resumen en las tablas 1-3.

Tabla 1. Distribución del capital en plantas de cultivo del hongo ostra.

<i>Concepto</i>	<i>Inversión en dólares EU</i>		
	<i>Planta pequeña</i>	<i>Planta mediana</i>	<i>Planta grande</i>
1. Obra civil	791.60 (75.15)	1536.35 (86.59)	3172.75 (89.66)
a) Terreno	205.75 (19.53)	595.73 (33.58)	883.57 (24.97)
b) Edificio	585.75 (55.62)	940.62 (53.01)	2289.17 (64.69)
2. Equipo, maquinaria e instalaciones	261.71 (24.84)	237.88 (13.40)	365.75 (10.33)
a) Maquinaria y equipo	246.62 (23.41)	220.26 (12.42)	343.48 (9.70)
b) Equipo de oficina	15.08 (1.43)	17.26 (0.98)	22.26 (0.63)
Total	1053.31 (100.00)	1774.23 (100.00)	3538.50 (100.00)

* Los números en paréntesis representan los porcentajes del total.

Tabla 2. Costo de Producción del hongo ostra

<i>Concepto</i>	<i>Inversión en dólares de EU</i>		
	<i>Planta Pequeña</i>	<i>Planta mediana</i>	<i>Planta grande</i>
i) Materia prima, rastrojo, semilla, bolsas de polypapel, pesticidas, gastos de transporte y misceláneos	307.11 (53.56)	705.73 (55.46)	1382.42 (52.91)
ii) Costo de energía	46.00 (8.08)	81.71 (6.41)	289.11 (11.06)
iii) Salarios	186.48 (32.52)	410.64 (32.25)	787.46 (30.14)
iv) Interés sobre el capital de trabajo	33.73 (5.88)	74.88 (5.88)	153.68 (5.88)
Total	573.32 (100.00)	1272.96 (100.00)	2612.67 (100.00)

* Los números en paréntesis representan los porcentajes del total.

Los datos en la tabla 1 indican que la inversión promedio en una planta pequeña, promedio y grande fueron de 1,053, 1,774 y 3,538 dólares respectivamente de los cuales el grueso de la inversión (75-89%) fue para la compra del terreno y del edificio y el resto fue para los equipos y maquinarias, tales como anaqueles, calentadores (tambores), aspersores, extractores, balanzas, tubería de agua, molinos, cortadoras, mesas y sillas, etcétera.

En la tabla 2, se presenta el costo variable de producción de ocho ciclos en un año. Esto muestra que la distribución del gasto en materias primas, salarios e interés sobre el capital de trabajo exhibió una mayor uniformidad entre las tres categorías de plantas. Solamente en lo que respecta a energía, la planta más grande gastó más en relación con

Tabla 3. Costo/beneficio del hongo ostra de plantas de cultivo con ocho ciclos por año

Concepto	Costo y beneficio en dólares de EU		
	Planta pequeña	Planta mediana	Planta grande
1. Costo total variable	573.32 (73.36)	1,272.96 (79.51)	2,612.67 (79.73)
2. Costos fijos (a+ b+ c)	208.20 (26.64)	328.08 (20.29)	664.13 (20.27)
a) Depreciación de edificios 5%	208.20 (26.64)	328.08 (20.29)	664.13 (20.27)
b) Depreciación de maquinaria 10%	26.20 (3.35)	23.80 (1.48)	36.57 (1.12)
c) Interés sobre el capital fijo 14.5%	152.72 (19.54)	257.26 (16.07)	513.08 (15.66)
3. Costo total (1+ 2)	781.52 (100.00)	1,601.04 (100.00)	3,276.80 (100.00)
4. Producción de hongos (kg)*	1,538.00	3,719.00	7,235.00
5. Precio de los hongos (US\$/kg)	0.757	0.692	0.744
6. Ingreso bruto (4× 5) US\$	1,164.26	2,573.54	5,384.44
7. Retorno sobre el costo variable (6-1)	590.94	1,300.58	2,771.77
8. Beneficio neto (6-3)	383.73	972.50	2,107.64

* El número de bolsas cultivadas en un año fue de 2487,5518 y 10,732 en las plantas pequeñas, mediana y grande respectivamente. Los números en paréntesis representan los porcentajes del costo total.

las otras dos. Es también evidente que el grueso del costo variable (83-89%) se va en materias primas y salarios en las tres categorías de plantas.

Basados en los costos fijos y variables, el análisis de costo/beneficio de las tres categorías de plantas se presenta en la tabla 3. Los datos computados sobre el costo total en los tres tipos de plantas indica que US\$ 781.52, 1601.04 y 3276.80 gastados para realizar ocho ciclos de cultivo en un año pudo generar ingresos netos de US\$ 383.73, 972.50 y 2,107.64 respectivamente con 1,538 kg, 3,719 kg y 7,235 kg de hongos frescos producidos y vendidos en US\$ 0.757, 0.692 y 0.744 por kilogramo de producto fresco. También, de 73 a 80% del costo total correspondió al costo variable y solamente 23-27% correspondió a costos fijos. El costo fijo en las plantas pequeñas fue superior (27%) al de las plantas medianas y grandes (20%).

Plantas de NABARD (India). Especificaciones

En vista de una tecnología simple de cultivo y una inversión moderada, algunas instituciones financieras de la India están proveyendo de apoyo a cultivadores potenciales del hongo ostra. El Banco Nacional de Agricultura y Desarrollo Rural (NABARD por sus siglas en inglés) aprobó recientemente especificaciones de costo unitario para el cultivo del hongo ostra con baja tecnología, como se describe a continuación:

Tamaño de la unidad:	400 bolsas por ciclo y dos ciclos por año
A. Capital de inversión:	Rs*
a) Costo de construcción del cobertizo	
4.5 × 4.5 × 1.8 m ³ (20.25 m ² a ≈ (Rs 333.3/m ²))	6,750.00
b) Anaqueles (12)	1,200.00

c) Bambú para los anaqueles (80)	400.00
d) Aspersor (1)	950.00
e) Tambor-calentador (1)	300.00
f) Cubeta (1)	50.00
g) Misceláneos (cuchillos, charolas, cuerda, etc.)	200.00
Subtotal	9,850.00

* La moneda de la India es la rupia (abreviado IR, plural Rs), cuya equivalencia es US \$ 1.00 = 43 Rs.

B. Costo de operación (por bolsa)

a) Rastrojo 1.2 kg/bolsa (seca) Rs 0.70/kg	0.84
b) Semilla 5% del peso seco Rs 0.02/gm	1.20
c) Bolsas de polietileno de 36× 56 cm 50g Rs 0.65/kg	0.35
d) Químicos y lazo	0.10
e) Imprevistos (transporte, misceláneos, etc.)	0.20
f) Previsión de pérdidas por operación deficiente 10%	0.27
Subtotal	2.96
	es decir: 3.00

Costo de operación de dos ciclos de 400 bolsas:

Rs. 3.00 por bolsa	24,00.00
--------------------	----------

Costo unitario: Costo fijo más costo variable (A+ B) 12,250.00

C) Producción e Ingreso

a) Rendimiento/bolsa	500 g
b) Rendimiento/ciclo 500g× 400 bolsas	200 kg
c) Ingreso Rs 25/kg por ciclo	Rs 5,000.00
d) Ingreso total de dos ciclos por año	Rs 10,000.00

Nota: Las agencias que desarrollen este sistema deben invariablemente asegurarse que las siguientes estipulaciones son reunidas antes de extender el apoyo financiero para promover esta actividad:

1. Los beneficiarios deben tener adecuada experiencia/capacitación en el cultivo de hongos impartido por la Dirección de Horticultura.
2. Debe estar asegurada la disponibilidad de semilla de alta calidad, libre de contaminantes y de una fuente reconocida.
3. Se debe asegurar la supervisión/asesoría de una agencia competente.
4. Las agencias que desarrollen este sistema deben asegurarse que los canales adecuados de mercado estén disponibles para los beneficiarios.
5. Las condiciones higiénicas deben tener la más alta prioridad en la planta productora para evitar infecciones y fallas en la producción.

Plantas en el Noroeste de la India

El Centro Nacional de Investigación en Hongos ha realizado el análisis económico del cultivo del hongo ostra en 1) Casas de plástico y 2) Casas de barro con rastrojo de maíz como sustrato (Upadhyay, 1990) de la siguiente manera:

1) Cultivo en casas de plástico (6.0 × 4.5 × 3.0 m²):	Rs
a) Gastos no recurrentes	27,850.00
b) Gastos recurrentes por ciclo	3,588.00
c) Rendimiento esperado (EB 70%) por ciclo	350 kg hongos frescos
d) Ingreso bruto por ciclo Rs.20/kg	7,000.00
e) Beneficio neto por ciclo	3,412.00
f) Beneficio anual por seis ciclos	20,472.00

2) Cultivo en casas de barro (18 × 6.0 × 3.6 m²):	Rs
a) Gastos no recurrentes	13,000.00
b) Gastos recurrentes por ciclo	11,000.00
c) Rendimiento esperado por ciclo (BE 60%)	1,200 kg hongos frescos
d) Ingreso bruto por ciclo Rs.20/kg	24,000.00
e) Beneficio neto por ciclo	13,000.00
f) Beneficio anual (seis ciclos)	78,000.00

Plantas en NEH India

A continuación se presenta el análisis económico con tecnología sencilla y estandarizado por Verma y colaboradores en North Eastern Hills (NEH). Esta tecnología se refiere al cultivo en cubo sobre cascarilla de arroz en casas de bambú y techo de palma (8 × 3.5 × 3.2 m³), con capacidad para 150 cubos 50 × 25 × 18 cm) por ciclo y seis ciclos en un año (Anónimo, 1985; Chandra *et al.*, 1995).

	Rs
a) Gastos no recurrentes	7,900.00
b) Gastos recurrentes por año	16,378.00
c) Rendimiento esperado (2kg/cubo) por año	1,800 kg frescos
d) Ingreso bruto por año Rs 30/kg	54,000.00
e) Beneficio neto por año	37,622.00

Plantas basadas en la pulpa de café en México

Algunas plantas para el cultivo de hongos ostras basadas en el pulpa de café como sustrato han surgido en áreas de México y usan ya sea pulpa fresca fermentada o pulpa seca almacenada en costales. El costo y el beneficio de tales plantas ha sido reportado por Oci (1991) y se presenta a continuación:

	Dólares de EU
a) Gastos no recurrentes sobre el terreno (0.5 ha), edificio para laboratorio de semilla y cuartos de incubación, un vehículo, equipos, etc.	70,000.00
b) Gastos recurrentes por año	21,240.00
c) Rendimiento esperado por año 50 kg por día	18,000 kg hongo fresco
d) Ingreso bruto por año US\$ 3.50/kg	63,000.00
e) Beneficio neto por año	41,760.00

Pequeñas plantas de Filipinas

El programa de extensión de la Universidad de Filipinas en Los Banos (UPLB) propuso esta alternativa de cultivo de hongos ostra con 2000 bolsas por mes. Oci (1991) ha presentado el siguiente análisis económico de tal planta demostrativa.

Capacidad: 2000 bolsas por mes

Rendimiento esperado: 21 kg de hongos frescos por 100 kg de sustrato

Precio de los hongos: 30 pesos filipinos/kg.

Tasa de cambio considerada: US\$ 1.00 = 40 pesos filipinos.

Pesos filipinos

a) Inversión no recurrente en la sala de fructificación consistente en techo de nipa y paredes de tablas, anaqueles de madera, área del piso 10m ²	8,000.00
b) Costo de 2000 bolsas ya sembradas	
3 pesos por bolsa	6,000.00
c) Costo de 2000 bolsas para fructificación a	
3 pesos por bolsa	6,000.00
d) Producción esperada por mes	410 kg hongo fresco
e) Menos 15% por manejo y pérdidas por transporte	60 kg hongo fresco
f) Ventas netas de 350 kg al mes	
Ingreso bruto 35 pesos/kg	10,500.00
g) Recaudo por mes 50%	5,250.00
h) Número de meses para recuperar los costos del proyecto	4 meses

Plantas de Hiratake en el Japón

Delcaire (1978) realizó el análisis económico del cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Hiratake) sobre aserrín en las provincias japonesas de Nagano y Hokkaido. Los datos presentados sobre el costo y beneficio indicaba cerca de 150% de beneficio sobre ventas netas de la siguiente manera:

	<i>Costo (dólares de EU)</i>
a) Gastos no recurrentes sobre edificio, equipos, botellas, etc.	94,700.00
b) Gastos recurrentes por año, que incluyen materias primas, energía, depreciación y gastos de mercadeo	42,900.00
c) Rendimientos esperados por año de siete ciclos	72,000 kg hongos frescos
d) Ingreso bruto por año US\$ 1.50/kg	108,000.00
e) Beneficio neto por año	65,000.00
f) Porcentaje de retorno sobre la inversión	68%

El cultivo de diferentes especies de *Pleurotus* bajo condiciones locales también ha sido reportado en países como Taiwán, Hungría, Francia, Italia y Suiza (Delcaire, 1978). Debido a la disponibilidad de diferentes especies con diferentes requerimientos de temperatura, no se necesita acondicionamiento de este factor y por lo tanto el cultivo ha sido reportado como menos caro y simple.

ECONOMÍA DEL MANEJO POSCOSECHA

Inversión y costos

Un manejo rápido y apropiado del hongo ostra contribuye a obtener el máximo beneficio y evitar pérdidas, obviamente porque es un producto perecedero y tiene una vida corta de anaquel. Inmediatamente después de la cosecha, el deterioro en los parámetros de la calidad da inicio causando que el hongo pierda turgencia por pérdida de humedad, se sobre-madure, pierda textura y sabor, cambie de color, además de que se desarrolle un crecimiento bacteriano/fúngico que conduce a la licuefacción del producto. Todos estos factores causan la disminución en el valor de mercado del producto y disminuyen el margen de beneficio para el productor. Por esto, el productor no tiene mas opción que 1) vender inmediatamente el producto fresco, 2) aplicar un tratamiento poscosecha adecuado para prevenir cualquier deterioro, o 3) agregarle valor por medio del procesado de los hongos para ofrecer productos fáciles de usar o de hacer. En el caso del hongo ostra, las opciones disponibles son limitadas actualmente porque los estudios hechos sobre manejo poscosecha de los hongos están relacionados con el champiñón y muy poca información está disponible en relación con el hongo ostra.

Mercado fresco

La mejor opción es vender el producto inmediatamente después de la cosecha, la cual es también la opción más barata. Un empaçado en bolsas de polietileno o polipropileno de menos de 100 micras de espesor y con perforaciones que provean un área de ventilación del 0.5% no requiere gasto extra, excepto el costo de las bolsas, mano de obra y el sellado con una simple máquina selladora eléctrica. Estas bolsas pueden ser transportadas de manera segura apiladas en charolas de plástico entre-distribuidas con algunas

bolsas de polietileno con cubos de hielo, pero envueltas en papel periódico. Las charolas también deben ser cubiertas con lámina de plástico perforado para proteger doblemente el producto. Tal empaqueo y transporte provee la manera más barata de movilizar el producto a lugares que pueden ser alcanzados hasta el día siguiente, y ayuda a obtener un buen beneficio.

Sin embargo, si el producto requiere almacenamiento por varios días, el gasto por su conservación a baja temperatura (8-10°C) incurrirá en el costo de un refrigerador horizontal con valor de \$ 2,000.00 dólares o en cámara fría con un valor de \$ 10,000.00 dólares. Ambos equipos implican un costo por electricidad que repercute en el beneficio global.

Conservación

El secado, liofilizado y congelado han sido considerados como apropiados para la conservación del hongo ostra en general, y el enlatado es aplicado sólo para *P. cystidiosus* y *P. abalonus*.

Deshidratado. El hongo ostra es comúnmente sujeto a la deshidratación con el fin de limitar la disponibilidad de humedad para el crecimiento de microbios, así como para prevenir el deterioro del producto. Si se almacena en un recipiente sellado, el producto seco puede permanecer a salvo y permanecer apto para el consumo por largo tiempo. El secado es rápido y económico y de hecho mejora el sabor del hongo. El secado al sol es también el más barato entre lo barato y no involucra costo de energía. Sin embargo, los productos secados al sol necesitan ser puestos en hornos a 50°C por algunos días hasta antes de empacarlos en recipientes al abrigo del aire. El uso de secadores solares eficientes ha eliminado este requerimiento y por lo tanto pueden lograrse productos bien secos con un costo de energía casi nulo. Tales secadores solares pueden ser fabricados en la India a un costo de \$ 200-350 dólares según el tamaño y el material utilizado.

El secado mecánico es requerido sólo cuando la producción es muy grande y durante la época de lluvia, cuando los días con sol son raros. Se pueden usar secadores de gabinete, rotativos, torres y anaqueles de secado u hornos de costos muy variables. Un cultivador muy pequeño puede adaptarse con un secador casero de alrededor de \$ 300 dólares. Sin embargo, el precio de los secadores comerciales en la India fluctúa entre US \$ 750 y los 1,000 o aun más según su capacidad.

Liofilización. Este método de conservación es raramente usado para el hongo ostra. Esto es porque requiere una alta inversión en capital y tecnología consumidora de energía y ha alcanzado muy limitadas aplicaciones hasta ahora. En la India, solo una planta productora de champiñón ha instalado una unidad a un costo de cerca de dos millones de dólares con equipo importado. Por esta técnica, los hongos son primeramente congelados a -20°C y después deshidratados a través de una sublimación con bajo calentamiento y un muy bajo vacío (0.5 mm Hg), lo que requiere un alto costo de energía. Ahora, el

producto liofilizado 100K parece fresco y es altamente aceptado por las cadenas de comida rápida en países desarrollados. A menos que la demanda del hongo ostra alcance los niveles del champiñón en el mercado internacional, específicamente en las cadenas de comida rápida, la posibilidad de aplicar esta técnica de conservación parece remota, al menos en el futuro próximo.

Congelación. Este método también requiere de capital, pero su costo operacional es comparativamente menor, porque los requerimientos energéticos son mucho menores debido al hecho de que los hongos son rápidamente enfriados a -25°C con vapor de nitrógeno. Sin embargo, los hongos congelados requieren ser transportados al mercado en contenedores enfriados, aunque el producto es bien aceptado en los supermercados y en grandes centros de consumo debido a que el sabor, aroma y consistencia se conserva bien. El hongo ostra responde adecuadamente a esta técnica de conservación, pero el alto costo impide su aplicación en la industria, particularmente en países en desarrollo.

Enlatado. La conservación del hongo ostra por enlatado es exitoso sólo en el caso de *P. cystidiosus* y *P. abalonus*, aunque el 90% del comercio mundial del champiñón se da en la forma de productos enlatados. El enlatado es también una propuesta cara tanto en términos de capital de inversión como de costos de operación. Una enlatadora de hongos consistente en un almacenamiento frío de preenlatado (20m^2 a $4-50^{\circ}\text{C}$), un área de enlatado (60m^2) con equipos de alto costo y un almacenamiento posenlatado (88m^2) puede ser construida en la India a un costo estimado de \$ 100,000.00 dólares si una línea de enlatado local es instalada (US \$50 000.00). Sin embargo, si una línea de enlatado importada se instala, el costo de la enlatadora sube hasta US \$ 250,000.00, los cuales tienen la capacidad de enlatar 2.5 toneladas de hongos por hora y alcanzarán los estándares impuestos por la FDA en Estados Unidos, el importador más grande del mundo el día de hoy.

Salmueras. Éste es naturalmente un método más barato, sencillo, no requiere mucha inversión y tiene también ventajas adicionales. El hongo ostra puede ser conservado por algún tiempo por este método con su forma original y buena textura. Los hongos requieren ser blanqueados y después de eliminar el exceso de agua se sumergen en una solución de 22-25% de sal común. Por largos períodos de almacenamiento, los hongos son colocados en frascos de vidrio o barriles con 18-20 de salmuera, a los cuales se les agrega ácido cítrico para bajar el pH a 3.5. Después se cierra la boca de los frascos con tela de muselina o preferiblemente con aluminio. Una máquina tapadora-selladora que permite cerrar la boca del frasco con aluminio es disponible en la India a un costo razonable de \$ 200-250 dólares. Aparte de esto, ninguna otra maquinaria es requerida para esta técnica y por lo tanto es muy adaptable para el hongo ostra.

Valor agregado

La preparación de botanas, sopas, trozos, bizcochos, etcétera, con el hongo ostra son algunos de los productos con valor agregado, los cuales pueden ser elaborados con una

moderada inversión y empleando trabajadores calificados en lugar de grandes maquinarias. Tales procesos contribuyen a superar cualquier acumulación de la producción y caída de precios del hongo fresco y pueden ser empleados también por pequeños productores.

ECONOMÍA DE MERCADO

El mercadeo del producto requiere tanta atención como la producción, puesto que el monto de la ganancia de una planta dependerá de la eficiencia en la mercadotecnia del producto. El mercadeo es un proceso multietapas y su éxito depende de un paquete de servicios que incluyen la clasificación, el pesado, el empacado, el almacenamiento, el transporte, el manejo, entre otros procesos, es decir, actividades que requieren gastos por parte del productor. También, para asegurar un mercado regulado para el producto, particularmente para uno perecible como los hongos, es necesaria una revisión e investigación previa del mercado. Aunque ellos también exigen de gastos, tales esfuerzos pueden ayudar a desarrollar un sistema eficiente y ordenado de mercado, y a asegurar el costo y el beneficio de varios canales de mercadeo.

En el caso del hongo ostra, el sistema de mercadeo está todavía desorganizado en la mayoría de los países productores. Aún, pueden operar uno o más de los siguientes canales en el mercado doméstico, a través de diferentes intermediarios.

I) Cultivador	Mercado	Consumidor
II) Cultivador	Detallista	Consumidor
III) Cultivador	Comisionista	Consumidor
IV) Cultivador	Consumidor	

Es evidente que existen gastos en cada nivel de estos canales, los cuales se agregan al costo de comercialización del producto.

Costo al nivel del productor

El costo de mercadeo del productor incluye los gastos de limpieza, selección, pesado, empacado, almacenamiento, procesado, transporte y manejo del producto hasta que es vendido al comprador. Naturalmente, en caso del hongo ostra, estos gastos son moderados si se comparan con el champiñón, puesto que es empacado en bolsas de polietileno/polipropileno y transportado en charolas/canastas de plástico. En un estudio de caso en Karnataka, el costo promedio de empacar y transportar un kilogramo de hongo ostra fue de Rs 1.00 y 0.33 respectivamente (Mamatha, 1998).

Costos y márgenes al nivel intermediario

Los intermediarios, como todos los vendedores, agencias de mercadeo, detallista y comisionistas incurren en gastos por salarios, sueldos, derechos por licencias, transporte,

renta, pérdidas, etcétera, en relación con el mercadeo del producto. Las agencias deben gastar en el mantenimiento de una oficina y su acondicionamiento. En general, los intermediarios invierten en manejo, transporte y pérdidas, los cuales son gastos que se agregan al costo de mercadeo. Debido a ello, éste puede diferir según la eficiencia de trabajo y los recursos. En el estado sureño de Karntaka, en la India, un estudio comparativo indicó que la Sociedad Cooperativa de Mercadeo de Productos Hortícolas (HOPCOMS, por sus siglas en inglés) trabajó más eficientemente en el mercadeo del hongo ostra y gastó solamente Rs 0.35 por manejo y también por transporte de un kilogramo de hongo. Por el contrario, los detallistas gastaron Rs 1.60 y 0.45 y los comisionistas gastaron Rs 0.80 y 0.60 en manejo y transporte de un kilogramo de hongos, respectivamente. La distribución de los intermediarios en el mercadeo del hongo ostra también fué variada. El producto a granel de los cultivadores pequeños, medianos y grandes fue vendido a HOPCOMS (54-42%) luego a los detallistas (36-25%) y a consumidores (18-11%). El margen de beneficio de cada nivel de intermediario también se suma al costo de mercadeo y determina el precio final al consumidor. La diferencia entre el precio pagado y el precio recibido por cada intermediario es su impacto al precio del producto. En los canales de mercadeo de Karnataka mencionados anteriormente, se observaron las siguientes posiciones:

Descripción	Canal-I	Canal-II	Canal-III	Canal-IV
Precio bruto de cultivadores	Rs 30.00/kg	Rs 34.00/kg	Rs 28.00/kg	Rs 40.00/ kg
Costo de mercadeo de cultivadores	Rs 1.33/kg	Rs 1.30/kg	Rs 0.50/kg	Rs 1.00/kg
Precio neto de cultivadores	Rs 28.67/kg	Rs 33.20/kg	Rs 27.50/kg	Rs 39.00/kg
Impacto de cultivadores en el consumo	82%	83%	73%	95%
Márgen de los intermediarios	Rs. 5.00/kg (HOPCOMS)	Rs. 5.50/kg (detallista privado)	Rs. 38.50 kg (comisionista)	Ninguno (consumidor)
Costo de manejo, etc.	Rs 0.70/kg	Rs 4.00/kg	Rs 1.40/kg	Ninguno
Beneficio neto de los intermediarios.	Rs 4.30/kg	Rs 1.50/kg	Rs 9.10/kg	Ninguno
Impacto de los intermediarios en el precio al consumidor	12%	4%	24%	Ninguno

De lo anterior se puede concluir que el cultivador obtiene más beneficio si el número de intermediarios es menor. El máximo reparto en el precio del consumidor fue observado cuando los hongos fueron vendido directamente al consumidor, seguido de los detallistas y mercados —HOPCOMS. Sin embargo, el comisionista realizó el más alto impacto en el precio del consumidor, lo cual sucede con los supermercados y tiendas departamentales.

Limitaciones del mercado

Siendo cultivado por empresas de cultivo estacional, el hongo ostra enfrenta dificultades tanto en el nivel de producción como en las diversas etapas del mercadeo. Los rendimientos bajos e inconsistentes son la mayor dificultad en la etapa de producción,

lo cual afecta su mercadeo por la interrupción en el suministro regular de este hongo a los compradores tanto en términos de cantidad como de calidad. Hasta ahora, el hongo ostra ha tenido una seria competencia de otras especies como el champiñón, shiitake, y algunas especies silvestres como *Morchella* spp. trufas, de tal manera que difícilmente se localiza una demanda de hongo ostra en el mercado mundial. A pesar de ello, recientemente la demanda por hongos ostra secos ha mostrado una tendencia al alza en el mercado internacional, lo cual ha ayudado a impulsar su producción en los países en desarrollo. Sin embargo, su cultivo no debe depender completamente de la exportación porque factores externos pueden afectar su mercado en cualquier momento.

De igual modo, en el mercado interno la principal dificultad es la baja demanda y un precio más bajo por este hongo, debido en parte a una falta de información sobre su valor nutritivo y sus propiedades culinarias, así como por una preferencia por el champiñón. Las instalaciones para mercadeo inadecuadas y una corta vida de anaquel son las otras dificultades para la venta en fresco de este hongo. La falta de instalaciones para el secado en la vecindad de las plantas productoras también restringe la producción. El cultivo estacional limita su disponibilidad por un periodo del año, lo cual también enreda el mercado regular.

Para eliminar estas dificultades, por lo tanto, se necesita cultivar el hongo ostra a lo largo de todo el año para tenerlo en todo momento. Se deberá además, soportar por una vigorosa promoción del producto, así como por programas de información a través de los medios de comunicación, para aumentar la demanda tanto en el mercado interno como en el mercado mundial. Esto a su vez podrá conducir a mejores precios y beneficios para todos aquellos involucrados en su mercadeo y su producción. El día en que esto se realice, el cultivo del hongo ostra se convertirá en una empresa altamente remunerativa con una moderada inversión y mucho más dirigida a los cultivadores de hongos de los países en desarrollo.

REFERENCIAS

- Anónimo. 1985. Bankable Projects on Mushroom Cultivation. Technological Bulletin of ICAR Research Complex for NEH Region During the Decade (1975-1984) Vol.I. Agricultural Sciences, Shillong, India.
- Chandra, S., A.K. Singh y Sangeet Kumar. 1995. Cultivation of oyster mushroom. Technical Bulletin, ICAR Research Complex for NEH Region, Barapani, Meghalaya (India), pp13.
- Delcaire, J.R. 1978. Economics of Cultivated Mushrooms. *In*: "The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms", eds. S.T. Chang and W.A. Hayes, pp.728-775, Academic Press, New York.
- Madan, R.L. y D.P. Thakur. 1991. Cultivation of Oyster (Dhingri) mushroom in Haryana. *Haryana Farming* 20(2):1.
- Mamatha, B.G. 1998. An Economic Analysis of Mushroom Production, Marketing and Exports: A study in Karnataka. Doctoral thesis submitted to UAS, Bangalore, India.
- Oei, P. 1991. Manual on Mushroom Cultivation - Techniques, Species and Opportunities for commercial applications in developing countries, pp. 249. Tool Publications, The Netherlands.
- Upadhyay, R.C. 1990. Cultivation of oyster mushroom. Technical Bulletin No.1 of the National Centre for Mushroom Research & Training, Solan, India. pp.28.
- Verma, R.N. y D.N. Borthakur. 1987. Prospects and Problems of Mushroom Cultivation in North Eastern Hill States of India. *Indian Mush. Sci.* 2:111-114.
- Verma, R.N., S.M. Singh y Th. G.B. Singh. 1992. Yield of *Pleurotus* spp. on crop residues and grasses. *Bioved.* 3(1):57-58.
- Vijay, B. y H.S. Sohi. 1987. Cultivation of Oyster Mushroom *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer on chemically sterilized wheat straw. *Mush. J. Tropics*, 7:75-76.
- Vijay, B. y R.N. Verma. 1996. Economics and production technology of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in India. Xvth All India Rose Convention, Indore, 13-16 Jan., 1996.

