

Rigoberto Gaitán-Hernández

Instituto de Ecología, Apartado postal 63, Xalapa, Veracruz 91000, México

***In vitro* evaluation of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: Effect of different organic supplements on the mycelial growth and fruit bodies**

p r o d u c t i o n

Abstract. An *in vitro* evaluation of three strains (687, 688 and 689) of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* was performed to evaluate the effect of three supplements on solid culture; additionally the fruit bodies production on substrate of barley straw was observed. The strains were evaluated on sterilized MEA (malt extract/yeast extract/oak powder/agar), MTA (malt extract/yeast extract/wheat straw powder/agar), MEUA (malt extract/yeast extract/eucalyptus powder/agar) and MEMA (malt extract/agar) as control. Linear growth on semisolid culture medium (measured every 48 hours during 8 days) and morphology of the mycelium were registered. Average growth rate was calculated in mm/day. Results showed a significant influence ($p < 0.05$) of supplement used and strain too. The best growth rate was observed on MEA and MTA. Goods results in the growing of *P. eryngii* were obtained with the use of substrate composed of barley straw/oak powder supplement, inoculated with spawn of each strain previously developed in rye seed. Biological efficiency ranged from 49.57% (689) to 57.58% (688), production rate from 0.76 to 0.91% and yield from 14.87 to 17.27%, respectively. The predominant mushrooms production corresponded to a pileus size (according to its diameter) from 5 to 9.9 cm.

Key words: *in vitro* evaluation, *Pleurotus eryngii*, organic supplements, fruit bodies.

Resumen. Para determinar el efecto de tres suplementos sobre el crecimiento micelial de *Pleurotus eryngii* y de obtener cuerpos fructíferos, en paja de cebada, se evaluaron *in vitro* tres cepas (687, 688, 689) en cuatro medios de cultivo; medio estéril de extracto de malta, agar bacteriológico y extracto de levadura, más uno de los siguientes suplementos: polvo de madera de encino (MEA), polvo de paja de trigo (MTA) y polvo de madera de eucalipto (MEUA); además de extracto de malta como testigo (MEMA). Se midió el crecimiento cada 48 h, durante 8 días y se registraron las características morfológicas de los micelios. Los resultados mostraron una influencia significativa ($p < 0.05$) del suplemento utilizado como de la cepa evaluada. Las cepas presentaron su mayor tasa de crecimiento (mm/día) en los medios MEA y MTA. Se obtuvieron cuerpos fructíferos en paja de cebada con polvo de encino como suplemento, inoculada con micelio en semilla de centeno. La eficiencia biológica fluctuó de 49.57% (689) a 57.58% (688), la tasa de producción de 0.76 a 0.91% y el rendimiento de 14.87 a 17.27%, respectivamente. De acuerdo al diámetro del píleo, los hongos fueron mayoritariamente de 5 a 9.9 cm.

Palabras clave: evaluación *in vitro*, *Pleurotus eryngii*, suplementos orgánicos, cuerpos fructíferos.

Autor para correspondencia: Rigoberto Gaitán Hernández
gaytan@ecologia.edu.mx

Introducción

En épocas recientes, se ha presentado en México un marcado interés por la producción comercial de hongos comestibles, en particular de *Pleurotus* spp., favorecido por las diversas ventajas que presenta, en especial por la posibilidad de producir alimentos de alto valor nutrimental empleando residuos agrícolas como sustrato.

De las aproximadamente 70 especies de *Pleurotus* que han sido registradas a nivel mundial, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm. es la especie más importante, de la cual muchas cepas comerciales son desarrolladas y cultivadas. Otro hongo de este género que se cultiva y podría expandirse rápidamente es *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Qué.

P. eryngii o el rey ostra como comúnmente es llamado, crece en forma natural en la parte Sur de Europa y en áreas de Asia Central y América del Norte. Es apreciado como el mejor de todas las especies de *Pleurotus* por su excelente consistencia en sombrero y tallo, agradable aroma y cualidades culinarias. La especie silvestre es colectada comúnmente en Europa, África y en la mayor parte de Asia excepto en Corea y Japón, lugares donde el hongo es cultivado comercialmente. En Taiwán se cultiva desde 1993, con la tecnología de cultivo en frascos. Actualmente esta especie de *Pleurotus* ha comenzado a ser popular en mercados tradicionales o supermercados de estos países [8].

En México, dos especies de *Pleurotus* son producidas mayoritariamente por los cultivadores, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Éstas, tienen una relativa vida corta de anaquel (1 semana) y por su consistencia, el periodo para *P. eryngii* podría ser mayor. La introducción y desarrollo del cultivo de especies con una vida anaquel larga puede permitir el incremento del interés por su producción y consumo.

En el presente estudio se evaluaron *in vitro* tres cepas del hongo comestible *P. eryngii* en diferentes medios de

cultivo, para determinar su adaptación a distintos suplementos. Así mismo, se realizaron pruebas de fructificación a nivel planta piloto para observar las características morfológicas de los mismos y evaluar su productividad. Esto es el inicio de una serie de trabajos con esta especie, en busca de encontrar las mejores condiciones para incrementar el rendimiento y calidad de este hongo para su producción comercial en México.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Las tres cepas de *Pleurotus eryngii* evaluadas en el presente estudio se encuentran depositadas en el Ceparío de Hongos del Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz, México, con el registro IE-687, IE-688 e IE-689. Se mantuvieron en medio con extracto de malta y agar (MEMA) (BIOXON, EUA) a 25°C. Las cepas fueron donadas por Jean Michel Savoie de la Station de Recherches sur les Champignons (INRA) de Francia.

Medios de Cultivo

Para la evaluación de crecimiento micelial se elaboraron cuatro medios de cultivo. Todos se prepararon con 11% de extracto de malta, 27% de agar bacteriológico, 5% de extracto de levadura y 57% de suplemento en 1L de agua destilada. A cada medio se le agregó el suplemento a evaluar: polvo de madera de encino (*Quercus* sp.) (MEA), polvo de paja de trigo (*Triticum aestivum* L.) (MTA) y polvo de madera de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (MEUA), se mezclaron por separado y esterilizaron durante 15 min a 121°C. Adicionalmente se preparó medio de extracto de malta agar como testigo (MEMA). Una vez tibios, se vertieron 25 ml de cada medio a cajas de Petri de 90 mm x 15 mm y se inocularon con implantes de 0.8 cm (Ø) con micelio desarrollado de cada cepa; se realizaron cinco replicas por medio y por cepa.

Posteriormente las cajas inoculadas se incubaron en oscuridad a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 8 días. Durante el periodo de incubación, se midió el diámetro micelial logrado (mm) cada 48 h; para ello se trazaron 2 ejes cartesianos sobre la tapa de la caja, tomando como intersección el centro del implante.

Una vez que los micelios cubrieron por completo la superficie del medio, se determinó su densidad y características morfológicas de acuerdo a Gaitán-Hernández [1] y Stalpers [10].

Producción de inóculo

Semillas de centeno (*Secale cereale* L.) (90%) se mezclaron con polvo de madera de encino (9.5%) y CaSO_4 (0.5%) (San Patricio S.A. de C.V, México, D.F.); los porcentajes son en base seca. El inóculo alcanzó un contenido de humedad final del 70%. Se colocaron 250 g (peso fresco) de esta mezcla en bolsas de plástico y se esterilizaron por 1.5 h a 121°C. La mezcla estéril se inoculó con 1 cm² de MEMA con micelio de *P. eryngii* de cada una de la cepas y se incubaron en oscuridad durante 15 días a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Para obtener inóculo adicional, 700 g de mezclas nuevas estériles en frascos de vidrio de boca ancha, se inocularon con el primero, anteriormente desarrollado, para utilizarse en la siembra del sustrato.

Sustrato para la producción de cuerpos fructíferos

Para la producción de cuerpos de fructíferos se utilizó paja de cebada (*Hordeum vulgare* L.), la cual se trituró con una fragmentadora de forraje a un tamaño de partícula de 5 a 8 cm de longitud. Se hidrató por inmersión en agua durante 12 h. Al término de este periodo, la paja se drenó y mezcló con 20% (con base al peso seco) de polvo de madera de encino. El porcentaje de humedad de la mezcla se ajustó al 70%. En bolsas de polipropileno de 32 x 44 cm con dos filtros microporo (Unicorn Import and Manufacturing, Commerce, TX), se colocaron 1.2 kg de sustrato húmedo (360 g peso seco) y esterilizaron 1.5 h a 121°C. Una vez enfriadas se sembraron utilizando un 5% (w/w) de inóculo. El crecimiento

del micelio en el sustrato se llevó a cabo en un cuarto oscuro con una temperatura controlada de 25°C.

Una vez que *P. eryngii* creció sobre el sustrato, las muestras se transfirieron a un cuarto de producción con condiciones favorables de fructificación, en donde la bolsa de polipropileno fue removida. La humedad relativa se mantuvo entre 85 y 90% y la temperatura del aire a 18 °C. Se utilizó recirculación de aire para enfriamiento, distribución del mismo y mantener bajo el nivel de CO₂. Se proporcionó un fotoperíodo de 12 h con iluminación de 350 lux con lámparas de luz de día para favorecer la fructificación.

El corte de los hongos se realizó en su etapa madura. La madurez se determinó al exponer sus láminas y con el margen del píleo totalmente extendido. Se tomaron los datos morfológicos de los mismos. La producción de la primera cosecha se evaluó con base a la eficiencia biológica (EB) (relación de los hongos frescos / el peso seco del sustrato, expresado en porcentaje), tasa de producción (TP) (relación de la EB / el número total de días de producción, a partir de la inoculación) y rendimiento (R) (peso fresco de los hongos cosechados / peso fresco de sustrato, expresado en porcentaje). Además, se consideró el tamaño de los hongos producidos, según el diámetro del píleo: grupo 1 (G1) < 5 cm, grupo 2 (G2) de 5 a 9.9 cm y grupo 3 (G3) de 10 a 15 cm.

Resultados y Discusión

Crecimiento micelial en los medios de cultivo

Los resultados del diámetro (Ø) micelial logrado por las cepas en los diferentes medios de cultivo se presentan en la figura 1. En esta figura se observa un Ø mayor de las cepas 688 y 689, a los 8 días de incubación, con los medios MEA y MTA. La cepa 687, a los 8 días de incubación, tuvo su mejor desarrollo en MEA, con 36.5 mm (Figura 1-A) y con una tasa de crecimiento micelial (K_c) de 4.56 mm/día, estadísticamente distinto al resto de los medios (Tabla 1). No se observó

crecimiento en MEUA. Esta cepa, en general, presentó un crecimiento micelial lineal durante el periodo de incubación, sin diferencia significativa ($p > 0.05$) en MEA, MTA y MEMA (Figura 1-A).

En el mismo periodo de incubación, la cepa 688 tuvo un crecimiento similar en MTA y MEA ($p > 0.05$), con un \emptyset micelial promedio de 73.67 mm y 68.3 mm, con una K_i de 9.2 y 8.53 mm/día, respectivamente (Figura 1-B, Tabla 1). Los dos medios tuvieron una diferencia significativa con el testigo (MEMA). En MEUA, se observó un escaso crecimiento.

El desarrollo micelial de la cepa 689 fue significativamente diferente en todos los medios ($p < 0.05$) (Figura 1-C). A los 8 días de incubación en MEA se observó el mayor \emptyset micelial promedio, con 69.54 mm y una K_i de 8.69 mm/día. En MEMA y MEUA el crecimiento micelial fue menor (Figura 1-C, Tabla 2).

Para la cepa 689 al sexto día de incubación en MEA, el micelio tuvo un \emptyset de 44.90 mm, con una K_i de 8.70 mm/día. La K_i en MEA y en MTA fue notablemente superior al testigo. Por su parte, en el MEUA se presentó la tasa de crecimiento más baja ($K_i = 2.29$ mm/día) y un \emptyset micelial de 12.97 mm.

Con base a la tasa de crecimiento micelial, los medios de encino agar y de trigo agar favorecieron ($p < 0.05$) el desarrollo de *P. eryngii* (Tabla 1). Sin embargo, al ver el crecimiento individual de cada cepa en los diferentes medios, se observa que el polvo de encino benefició el desarrollo del hongo y el polvo de eucalipto lo perjudicó. En ambos medios, el pH fue notablemente diferente (Tabla 1), factor que pudo influir en el resultado. Un pH superior a 5.5, se ha citado como favorable para el desarrollo micelial de esta especie [11]. Mientras que el pH del medio de eucalipto fue de 4.76, en el resto de los medios se mantuvo en los valores aceptables. Otro factor que pudo influir en las diferencias observadas en los resultados, es el contenido de nitrógeno o proteína presente en los medios de cultivo, factores no registrados en este estudio, pero que posiblemente influyeron en la preferencia de las

cepas por los suplementos evaluados [8].

La morfología de los micelios de las tres cepas de *P. eryngii* en los cuatro medios fue similar. En general el micelio fue blanco, algodonoso y con una densidad regular, características que concuerdan con lo citado por Stamets [11], para esta especie (Tabla 2).

La temperatura de incubación, utilizada en este estudio, para el desarrollo micelial, ha sido previamente evaluada por otros autores, quienes también han mencionado, como una característica de la especie, un crecimiento lento del micelio [13]. La utilización de los suplementos como salvado de trigo y arroz, en sustratos estériles a base de aserrín de diversas maderas para la producción de este hongo, con la tecnología del cultivo en frascos o bolsas, a favorecido los rendimientos del mismo [2, 5, 6, 7, 8, 9]. El salvado de arroz es popularmente más utilizado, sin embargo en este estudio, en las pruebas *in vitro*, con otros suplementos, se determinó el efecto de los mismos en el desarrollo de ésta especie, que posteriormente podrían favorecer su productividad.

Producción de cuerpos fructíferos

Después de 48 días de incubación, bajo las condiciones controladas previamente citadas, se desarrollaron cuerpos fructíferos de *P. eryngii*, con las características propias de la especie (Figura 2). El periodo de incubación de este estudio, coincide con los 42 a 43 días citados por Peng [4] y Peng *et al.* [8], para la producción de este hongo en frascos con aserrín estéril de diversas maderas.

En el presente estudio, se lograron obtener fructificaciones en el sustrato de paja de cebada y polvo de encino, éste último, suplemento que presentó los mejores resultados en su evaluación *in vitro*. La cepa 687 tuvo un periodo de incubación superior a 48 días, así también el tiempo de aparición de primordios fue mayor al obtenido por la 688 y 689. El lento crecimiento de la cepa 687 en el sustrato, coincide con lo observado en los medios de cultivo.

En la Tabla 3 se observa la productividad de

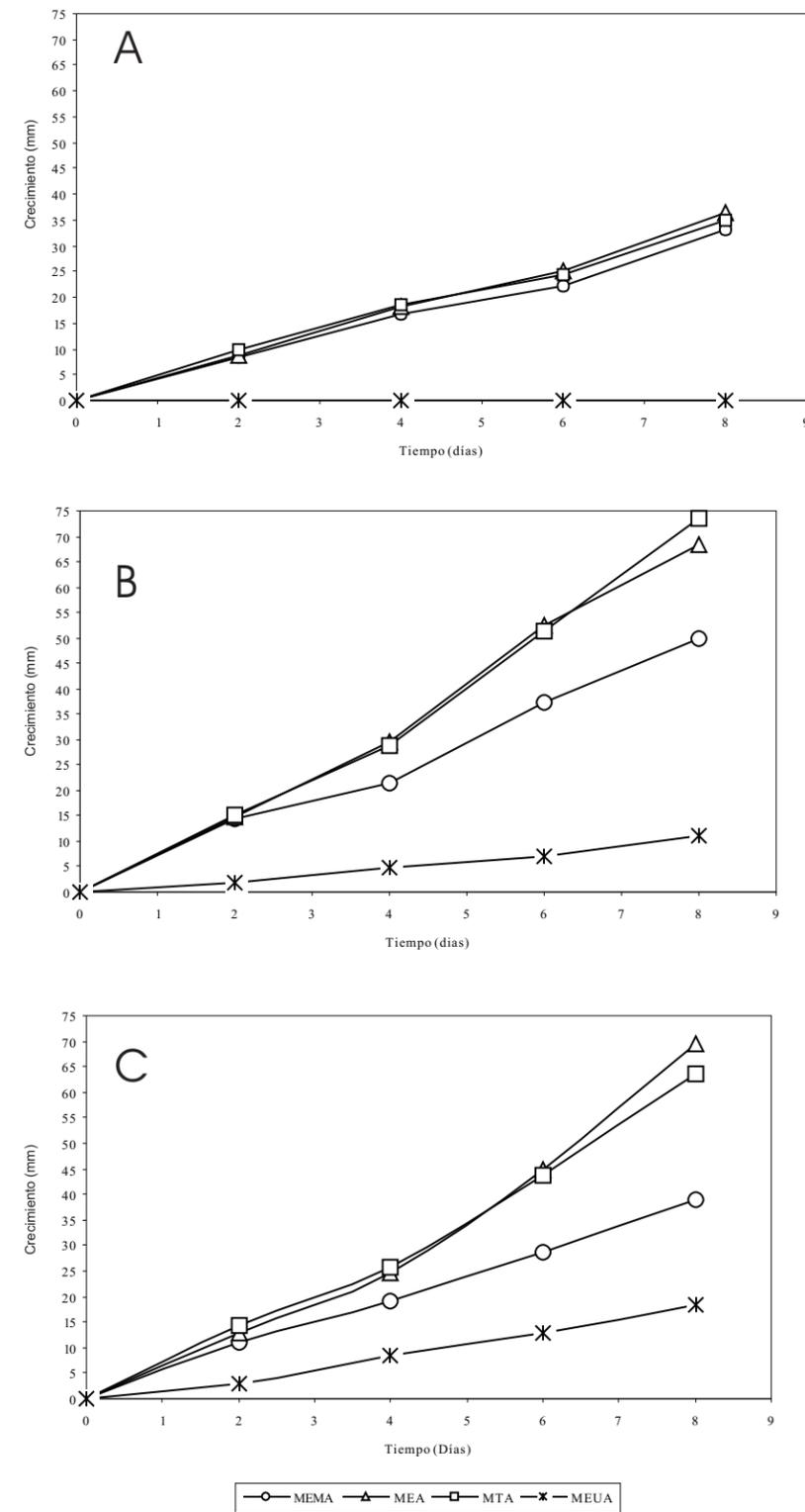


Figura 1. Diámetro micelial promedio (mm) de *P. eryngii*, logrado durante 8 días de incubación de la cepa 687 (A), 688 (B) y 689 (C), en medio de extracto de malta agar (MEMA), medio de encino agar (MEA), medio de trigo agar (MTA) y medio de eucalipto agar (MEUA).

Tabla 1. Tasa de crecimiento micelial (K_t mm/día) de *Pleurotus eryngii* en los medios de cultivo evaluados, incubados a 25 °C.

Medio ¹⁾	pH previo a la Esterilización	pH después de la esterilización	Cepa			
			687	688	689	Promedio
MEMA (testigo)	6.40	6.16	4.13±1.08 ^c	6.23±2.00 ^f	4.84±0.59 ^e	5.06 ^b
MEA	6.00	5.78	4.56±0.86 ^d	8.53±1.89 ^h	8.69±3.08 ⁱ	7.26 ^c
MTA	6.30	5.99	4.38±1.01 ^c	9.20±2.27 ⁱ	8.24±1.60 ^g	7.27 ^c
MEUA	4.89	4.76	0.00 ^a	1.39±0.52 ^b	2.28±0.50 ^b	1.22 ^a
Promedio			3.26 ^a	6.33 ^b	6.01 ^b	

¹⁾ MEMA: medio de extracto de malta agar; MEA: medio de encino agar; MTA: medio de trigo agar; MEUA: medio de eucalipto agar.

Los valores son medias de cinco réplicas. Medias en una columna con diferentes superíndices de cada cepa en los cuatro medios y sólo entre los promedios son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Duncan).

Tabla 2. Características morfológicas de los micelios de de *Pleurotus eryngii* en medio de extracto de malta agar (MEMA), medio de encino agar (MEA), medio de trigo agar (MTA) y medio de eucalipto agar (MEUA), incubados a 25°C.

Cepa	Medio de Cultivo	Zona de crecimiento	Micelio aéreo	Color	Densidad
687	MEMA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MEA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MTA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MEUA	-----	-----	-----	-----
688	MEMA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MEA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MTA	En relieve	Zonado	Blanco	Regular
	MEUA	-----	-----	-----	-----
689	MEMA	En relieve	Algodonoso	Blanco	Regular
	MEA	En relieve	Aterciopelado	Blanco	Regular
	MTA	En relieve	Zonado	Blanco	Regular
	MEUA	-----	-----	-----	-----

Pleurotus eryngii durante la primera cosecha. La cepa 687 desarrolló cuerpos fructíferos, pero sólo en una muestra, por lo que no hubo datos suficientes para su evaluación. Los hongos fueron de tres grupos de tamaño, con excepción de la cepa 688, que produjo sólo G1 y G2. La producción predominante por ambas cepas correspondió al G2. La mayor presencia de G3 con la cepa 689 fue notable, con el 42.93% de la producción total.

La EB promedio de la cepa 688 fue de 57.58% y de la 689 de 49.57%, la TP de 0.91 y 0.76% y el R de 17.27 y

Tabla 3. Productividad obtenida de *Pleurotus eryngii* en paja de cebada con viruta de encino, durante la primera cosecha.

Cepa	Distribución de la producción por grupos de tamaño (%) ¹⁾			EB ²⁾	TP ³⁾	R ⁴⁾
	G1	G2	G3			
	688	30.70	69.30			
689	10.52	46.55	42.93	49.57 ± 14.41 ^a	0.76 ± 0.22 ^a	14.87 ± 4.32 ^a

¹⁾ Grupos de tamaño de acuerdo al diámetro del píleo: grupo 1 (G1) <5 cm; grupo 2 (G2) de 5 a 9.9 cm; grupo 3 (G3) de 10 a 15 cm. ²⁾ Eficiencia biológica (%) (hongos frescos / el peso seco del sustrato), ³⁾ Tasa de producción (%) (EB / el número total de días de producción, a partir de la inoculación). ⁴⁾ Rendimiento (%). ⁵⁾ Los valores son medias ± Desviación Estándar de cinco réplicas. Medias en una columna con diferentes superíndices de cada cepa son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).



Figura 2. Cuerpos fructíferos adultos de la cepa 689 de *Pleurotus eryngii*, producidos en una mezcla de paja de cebada y polvo de madera de encino estéril.

Los hongos producidos de *P. eryngii* presentaron un píleo pardo claro, un poco más claro en el margen, liso, plano o subconcavo; láminas decurrentes blanquecinas, con cierto tono rosa tenue; pie blanco y contexto blanco sin olor (Guzmán 36779, Herbario XAL), características similares a las mencionadas por Zadrazil [12], aunque la falta de olor en los hongos cultivados producidos en este estudio, posiblemente se debió a la naturaleza del sustrato utilizado, cepas y condiciones ambientales.

El sustrato enriquecido con madera de encino como suplemento, entre otros, representa un residuo potencial para

el cultivo *P. eryngii* en México.

Conclusiones

Con base en la tasa de crecimiento micelial de las cepas evaluadas, el MEA y MTA fueron los medios que favorecieron el desarrollo de *P. eryngii*, y la 688 y 689, las cepas que mejor se adaptaron a los suplementos. En general, las cepas presentaron un micelio en relieve, aéreo

gonoso, color blanco y con una densidad regular. De acuerdo al sustrato utilizado para la fructificación y los parámetros ambientales establecidos, se obtuvieron cuerpos fructíferos de *P. eryngii*, de forma y coloración típicos de la especie.

A pesar de su exquisito sabor y cualidades ideales para una vida larga de anaquel, se trata de unas de las especies cultivadas menos populares, el crecimiento de su micelio es más lento al de otras especies y el sustrato de producción es más susceptible a la contaminación. Los procesos de preparación de sustratos, suplementación y tratamiento térmico de los mismos, son factores, entre otros, determinantes en el éxito productivo de esta especie. Por lo anterior, el presente estudio representa el inicio de una serie de investigaciones, en busca de encontrar las mejores condiciones para su producción comercial en México.

Agradecimientos

El autor agradece a los Biólogos Carlos Ortega Sánchez y Norberto Cortés Esquivel del Instituto de Ecología, por su asistencia técnica, así como a Citlali Colín Chávez, del Instituto Tecnológico de Morelia, quién en su estancia de verano científico, participó activamente en una de las etapas de este estudio. Al Dr. Jean-Michel Savoie, de Francia, quién amablemente donó las cepas utilizadas. Un especial agradecimiento al Dr. Gastón Guzmán por su apoyo siempre brindado al autor y en particular por realizar la descripción morfológica de los especímenes obtenidos en este estudio. Finalmente, al Instituto de Ecología, A.C. y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionar el apoyo financiero.

Literatura citada

1. Gaitán-Hernández, R., 2000. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel planta piloto. Revista Iberoamericana de Micología 17: 20-24.
2. Peng, J.T., 1996a. Preliminary studies on the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Quel. on sawdust filled in Polypropylene bags. Journal of Agriculture Research of China 45: 388-392.
3. Peng, J.T., 1996b. The Cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Quel. on rice straw substrate. Journal of Agriculture Research of China 45: 382-387.
4. Peng, J.T., 1997. Study on the effects of single and mixed sawdust of different origins on the production of *Pleurotus eryngii*. Journal of Agriculture Research of China 46: 51-59.
5. Peng, J.T., M.C. Dai y Y.F. Tsai, 2000a. Effect of different methods for controlling humidification on the production of *Pleurotus eryngii* using bottle cultivation technology. Journal of Agriculture Research of China 49: 54-59.
6. Peng, J.T., C.M. Lee y Y.F. Tsai, 2000b. Effect of rice bran on the production of different king oyster mushroom strain during bottle cultivation. Journal of Agriculture Research of China 49: 60-67.
7. Peng, J.T., C.M. Lee y Y.F. Tsai, 2000c. Effect of different organic supplements on the production of king oyster mushroom by using bottle cultivation technology. Journal of Agriculture Research of China 49: 56-64.
8. Peng, J.T., M.C. Dai, Y.F. Tsai, M.H. Chen y J.T. Chen, 2001. Selection and breeding of king oyster mushroom. Journal of Agriculture Research of China 50: 43-58.
9. Royse, D.J. y J.E. Sánchez, 1999. Effect of brewer's grain and delayed release nutrient supplementation on yield and size of *Pleurotus eryngii*. In: Proceedings of 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products and AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference. Eds. Broderick, A., and T. Nair. University of Western Stdney, Hawkesbury., pp. 54-59.
10. Stalpers, J.A., 1978. Identification of wood-inhabiting Aphylllophorales in pure culture. Stud. Mycol. 16: 1-248.
11. Stamets, P., 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Berkeley. 554 p.
12. Zadrazil, F., 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. Mushroom Science 9: 621-652.
13. Ziombra, M. 2001. Influence of preparation method of substrate on the yielding of *Pleurotus eryngii* (Fr.) Quel. Vegetable Crops Research Bulletin 54: 223-226.