

Cultivo experimental del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México

Teodoro Bernabé-González¹, Gerardo Mata²
Maricela Cayetano-Catarino¹, Gildardo Gutiérrez Reyes³

¹Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. ²Instituto de Ecología, Apartado postal 63, Xalapa, Veracruz 91000, México. ³Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero. km 2.5 Carretera Iguala-Tuxpan, Gro.

Experimental cultivation of shiitake mushroom *Lentinula edodes* on two agricultural by-products from Guerrero, Mexico

Abstract. Mycelial growth of two strains (IE-40 and IE-105) of *Lentinula edodes* was evaluated on plant of alfalfa, peanut hull, rice straw, sorghum straw and coconut fibres. The first two agricultural by-products were utilized as substrates in an experimental cultivation. The substrates were pasteurized in water at 75 °C during 90 min and inoculated under non-axenic conditions. Spawn was prepared from sorghum grains, peat moss, gypsum and powdered coffee pulp. In inoculation, plastic bags were utilized and incubated at 24 ± 1 °C in darkness for eight weeks. In fruiting period, the temperature was of 20 ± 1 °C, relative humidity between 85-90% and natural light 11 h per day. At three weeks of incubation, all replicates of plant of alfalfa showed a contamination by bacteria and they were discarded. In both strains one flush was obtained on peanut hull substrate. The primordia formation was presented on average to 59.1 ± 1.72 and 61.1 ± 2.23 days after inoculation with strains IE-40 and IE-105, respectively. The average at values of yield was of 291.64 ± 64.36 and 232.5 ± 71.03 g of fresh mushrooms that are equal to 55.5 ± 12.23 and 44.2 ± 13.5% of biological efficiency for strains IE-40 and IE-105, respectively. In the production there were not statistical differences among strains. The peanut hull could be an acceptable substrate for *L. edodes* production.

Key words: Shiitake, *Lentinula edodes*, agricultural by-products, mushrooms cultivation.

Resumen. Se evaluó el crecimiento micelial de dos cepas (IE-40 e IE-105) de *Lentinula edodes* sobre la planta de alfalfa, cáscara de cacahuete, paja de arroz, paja de sorgo y fibra de coco. Con los dos primeros subproductos agrícolas se realizó un cultivo experimental. Los substratos se pasteurizaron en agua a 75 °C durante 90 min y se inocularon bajo condiciones no axénicas. El inóculo se preparó a base de grano de sorgo, peat moss, CaSO₄ y pulpa de café en polvo. En la inoculación se utilizaron bolsas de plástico, que se incubaron a 24 ± 1 °C en oscuridad durante ocho semanas. En la fructificación la temperatura se mantuvo a 20 ± 1 °C, la humedad relativa entre 85 a 90%, con iluminación natural durante 11 h al día. A las tres semanas de incubación, las réplicas de la planta de alfalfa se contaminaron por bacterias y se desecharon. En la cáscara de cacahuete y con ambas cepas, se obtuvo una sola cosecha. Los primordios se presentaron en promedio a los 59.1 ± 1.72 y 61.1 ± 2.23 días después de la inoculación, en las cepas IE-40 e IE-105, respectivamente. Se obtuvo en promedio 291.64 ± 64.36 y 232.5 ± 71.03 g de cuerpos fructíferos que equivalen a 55.5 ± 12.23 y 44.2 ± 13.5% de eficiencia biológica para las cepas IE-40 e IE-105, respectivamente. En la producción no hubo diferencias estadísticas entre las cepas. La cáscara de cacahuete puede servir como substrato para el cultivo de *L. Edodes*.

Palabras clave: Shiitake, *Lentinula edodes*, subproductos agrícolas, cultivo de hongos.

Received 17 June 2006; accepted 18 September 2006.

Recibido 17 de junio 2006; aceptado 18 de septiembre 2006.

Autor para correspondencia: Teodoro Bernabé-González
teobernaglez@hotmail.com

Introducción

En el estado Guerrero se practican una gran diversidad de cultivos agrícolas, que generan cantidades importantes de subproductos que no tienen aplicación. Algunos de estos se han utilizado como sustrato en el cultivo de especies del género *Pleurotus* [1, 2, 3, 4]. Ahora, se inician los trabajos tendientes a utilizar tales subproductos en el cultivo de otros hongos comestibles, como es el caso del shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, debido a que es el segundo hongo más importante entre las especies industrialmente cultivadas, sobre todo en países asiáticos [14]. En México, se han adaptado y modificado las técnicas tradicionales para reducir el ciclo de cultivo y bajar los costos de producción, al utilizar como sustrato materiales antes no considerados, como son la viruta y aserrín de diferentes árboles [6, 11, 12] y varios subproductos agrícolas [15, 8, 13]. Con base en lo anterior, en el presente estudio se evaluó el diámetro de crecimiento del micelio de dos cepas de *L. edodes* sobre cinco subproductos agrícolas generados en el estado de Guerrero, con la finalidad de conocer cual o cuales de ellos pueden servir como sustrato. Posteriormente, los dos subproductos agrícolas que mostraron un mayor crecimiento micelial se utilizaron en un cultivo experimental. La pasteurización fue en agua a 75 °C durante 90 min y la siembra se hizo de manera manual, con el objetivo de establecer una técnica sencilla que reduzca los gastos generados por la esterilización de los sustratos, y que a mediano plazo pueda implementarse en comunidades rurales de la entidad federativa, en una producción inicial de autoconsumo.

Materiales y métodos

Cepas

Las dos cepas utilizadas de *L. edodes* pertenecen al cepario

del Instituto de Ecología A.C. de Xalapa, Ver., y se encuentran registradas como IE-40 e IE-105 procedentes de Hong Kong y de USA, respectivamente. Las cepas se propagaron en agar extracto de malta y se incubaron en oscuridad a 25 ± 1 °C durante tres semanas.

Desarrollo del micelio en los subproductos agrícolas

Los sustratos evaluados fueron: planta de alfalfa (*Medicago sativa* L.), cáscara de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), paja de arroz (*Oryza sativa* L.), paja de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) y fibra de coco (*Cocos nucifera* L.). Se fragmentaron manualmente en pedazos de 0.3 a 0.5 cm y se deshidrataron en un horno a 65 °C durante 24 h. Después se hidrataron 10 g por triplicado de cada subproducto agrícola en agua a 80 °C durante 14 h para conocer su capacidad de absorción. La planta de alfalfa adquirió 76.3% de humedad, el resto de los subproductos alcanzó entre 65 y 70%. Después se colocaron 10 g húmedos de cada sustrato en cajas Petri de vidrio de 100 x 15 mm y se esterilizaron a 121 °C durante 1 h. Por cepa y por sustrato se prepararon 5 réplicas. Cada caja Petri, se inoculó en el centro con un implante de 0.7 cm de diámetro con micelio previamente desarrollado en agar extracto de malta. Enseguida se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad. La evaluación se realizó a los 14 días de incubación y para ello, se midió el tamaño del micelio en dos diámetros, uno tomado perpendicularmente del otro [13]. Los dos sustratos que mostraron mayor crecimiento del micelio, se utilizaron en el cultivo experimental.

Preparación del inóculo

Para proporcionar resistencia al micelio de las cepas de *L. edodes* contra los posibles ataques de *Trichoderma* sp [9, 10], se preparó un inóculo a base de 88.5% de granos de sorgo, 1.3% de peat moss (turba sin marca), 1.3% de CaSO₄ (Merck) y 8.8% de pulpa de café. El grano de sorgo se hidrató por separado durante 12 h. Se eliminó el exceso de humedad y se agregaron los demás ingredientes. La humedad se ajustó

alrededor del 65% con base a la diferencia entre el peso seco y el peso húmedo de los sustratos y se colocó en bolsas de polipapel de 15 x 20 cm y se esterilizaron a 121 °C, durante 90 min. Se inocularon con cuadros de agar extracto de malta de un cm² con micelio desarrollado en cajas Petri. Posteriormente se cerraron con tapones de algodón, esterilizados por separado. El peso húmedo de cada bolsa fue de 300 g y se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad durante tres semanas.

Cultivo experimental

Los subproductos seleccionados fueron la planta de alfalfa y la cáscara de cacahuate que se fragmentaron manualmente. Los segmentos de la planta de alfalfa quedaron entre 3 y 6 cm de longitud y se deshidrataron al sol durante tres días. Los fragmentos de la cáscara de cacahuate quedaron entre 1.5 y 2.5 cm², y no necesitaron deshidratarse. Con cada sustrato se formaron montones de forma piramidal con 20 kg en peso semiseco; se remojaron y cubrieron con plásticos durante 18 h. Enseguida se lavaron para eliminar posibles residuos de suelo u otros materiales. El pH en ambos sustratos fue cercano a 7, medido con papel indicador.

La pasteurización consistió en mantener sumergidos los sustratos en agua a 75 °C, durante 90 min. Después se extendieron en una mesa de concreto de 3 x 1 m previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 5%. Esta técnica es similar a la que se emplea para el cultivo de *Pleurotus* [5].

Cuando la temperatura del sustrato descendió a 28 °C, se realizó la siembra colocando manualmente capas de sustrato dentro de bolsas transparentes de polietileno de 30 x 40 cm, a las que previamente se le practicaron pequeñas perforaciones con agujas esterilizadas, agregando el inóculo de manera homogénea (15% en peso húmedo del sustrato). El peso húmedo de cada bolsa en ambas cepas y sustratos fue de 2000 g. El peso en base seca para la planta de alfalfa y para la cáscara de cacahuate fue de 474 y 526 g, respectivamente. Por cada cepa y sustrato se prepararon diez bolsas (réplicas).

Durante la incubación, las bolsas inoculadas permanecieron en oscuridad a 23 ± 1 °C, hasta que el micelio mostró manchas de color café oscuro, y fue entonces cuando se permitió una iluminación natural e indirecta con una duración al día de aproximadamente 11 h. El plástico de las bolsas se eliminó cuando el micelio formó una costra de color café oscuro (pseudoesclerocio). Se humectaron los sustratos de manera manual con un aspersor, durante tres o cuatro veces al día. La humedad ambiental en el área de producción se mantuvo entre 85 y 90%. Para facilitar la formación de los primordios se hizo descender la temperatura a 20 ± 1 °C y no se requirió de ningún remojo como lo realizaron otros autores [6, 8]. Sin embargo, para estimular la formación de los segundos primordios, los sustratos se remojaron durante seis horas, repitiendo este proceso en tres ocasiones. La ventilación en el área fue por medio de un extractor de aire.

Diseño experimental y análisis estadístico

En la primera etapa de experimentación se utilizó un plan bifactorial 2 x 5 y en la segunda, un diseño completamente al azar. A los datos obtenidos se les practicó un análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$).

En el cultivo experimental se consideró el número de días en que se formaron los primordios, número y peso (g) de cuerpos fructíferos en relación al diámetro del píleo, la producción total y la eficiencia biológica (EB), la cual se determinó expresando en porcentaje la relación entre el peso fresco de los cuerpos fructíferos cosechados y el peso en base seca del sustrato empleado. Para el tamaño del diámetro del píleo, se establecieron tres grupos: G1: < 5 cm, G2: de 5 a 9.9 cm y G3: > 10 cm [7]. Además, se hizo la comparación en porcentajes de la producción obtenida en cada uno de los tres grupos del diámetro del píleo.

Resultados y discusión

Desarrollo del micelio en los subproductos agrícolas

El micelio en los sustratos evaluados mostró variaciones en el diámetro de crecimiento. Hubo diferencias estadísticas entre cepas y sustratos. La planta de alfalfa mostró un mayor diámetro de crecimiento seguida por la cáscara de cacahuete en ambas cepas (Tabla 1). Los valores del crecimiento micelial en la planta de alfalfa y en la cáscara de cacahuete, se aproximaron a los obtenidos en las brácteas de la corona de piña y en el bagazo de caña de azúcar, y los valores de la paja de arroz y de la paja de sorgo, son similares a los obtenidos en diferentes pajas de cereales [13]. En cuanto a la fibra de coco, es probable que contenga sustancias que inhibieron el crecimiento micelial o tal vez se deshidrata con facilidad. Con base a los resultados, la planta de alfalfa y la cáscara de cacahuete se seleccionaron para continuar con el cultivo experimental.

Cultivo experimental

En las dos primeras semanas de incubación, los sustratos mostraron buen crecimiento del micelio por ambas cepas. Sin embargo, en la tercera semana, la planta de alfalfa con ambas

Tabla 1. Diámetro (mm) del crecimiento micelial de dos cepas de *L. edodes* (IE-40 e IE-105) sobre cinco subproductos agrícolas a los 14 días de incubación a 25 ± 1 °C.

Sustratos	Promedios $\pm \sigma$ en las cepas *	
	IE-40	IE-105
Planta de alfalfa	79.7 \pm 3.27 a**	83.4 \pm 6.04 a
Cáscara de cacahuete	78.9 \pm 3.71 a	71.4 \pm 3.62 b
Paja de arroz	39.0 \pm 9.13 b	37.1 \pm 4.15 c
Paja de sorgo	38.5 \pm 5.75 b	33.5 \pm 5.51 c
Fibra de coco	8.6 \pm 0.89 c	8.3 \pm 0.97 d
Coefficiente de variación	11.25743	9.430512

*Medias de 10 repeticiones

**Medias con la misma letra en las columnas no son significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$.

cepas se contaminó, debido tal vez a la humedad (76.3%) que provocó que el sustrato se compactara y el micelio no dispuso de suficiente oxígeno. La contaminación fue provocada por bacterias y no por *Trichoderma* sp., u otros mohos. Por lo anterior, el cultivo continuó con la cáscara de cacahuete.

A los 26 días después de la siembra, aún con el micelio blanquecino, en algunas réplicas se formaron pequeños primordios que pronto se secaron, excepto en una repetición (cepa IE-105), en donde el primordio creció de manera deforme y no hubo diferenciación del cuerpo fructífero. Situación similar se observó en el cultivo de la cepa IE-40 sobre pulpa de café [8]. A partir de los 32 días, el micelio se tornó a un color café claro a café-violáceo y a los 50 días se transformó en una costra de color café semiobscuro (pseudoesclerocio) [5].

Los primordios en las cepas IE-40 e IE-105, se formaron en promedio a los 59.1 ± 1.72 y 61.1 ± 2.23 días después de la inoculación, respectivamente (Tabla 2). La única cosecha se realizó en promedio a los 66.1 y 68.1 días. El tiempo en la formación de primordios y días a la cosecha, fueron más elevados en comparación con los 40 y 45 días en que se realizó la primera cosecha en pulpa de café (cepa IE-40), y con los 38 a 41 días en el bagazo de caña de azúcar (cepa IE-40) [8, 13], pero son similares a los días en la cosecha sobre bagazo de maguey (54 a 66, cepa IE-105), sobre hojas de caña de azúcar (61 a 64, cepa IE-40) y sobre las brácteas de la corona de piña (54 a 75, cepa IE-40; 64 a 78, cepa IE-105) e inferiores a la cosecha en las brácteas de la corona de piña (75 a 79, cepa IE-105) [13].

La producción total promedio fue de 291.64 ± 64.36 y de 232.5 ± 71.03 g de cuerpos fructíferos, que corresponden a 55.5 ± 12.23 y $44.2 \pm 13.5\%$ de EB para las cepas IE-40 e IE-105, respectivamente. El análisis estadístico indicó que en el total de la producción y en las EB no hubo diferencias significativas entre cepas (Tabla 2). Las EB de este estudio, son superiores a las alcanzadas en las brácteas de la corona de

piña (37.5 y 36.3%, cepas IE-40 e IE-105) en dos y tres cosechas, respectivamente [13] y son similares a las obtenidas en aserrín suplementado de *Quercus* sp. y *Bursera* sp. (53.8 y 49.9%, cepa CP-7) en una y dos cosechas, respectivamente [11, 12], pero son inferiores a las alcanzadas en bagazo de caña de azúcar (130.2 y 133.4%, cepas IE-40 e IE-105), en hojas de caña de azúcar (82.7 y 97.8%, cepas IE-40 e IE-105) en tres y cuatro cosechas [13] y en pulpa de café (64.3%, cepa IE-40) en dos y tres cosechas [8]. Porcentajes cercanos al 50% obtenido en subproductos forestales, con formación de primeros primordios a más de 90 días después de la siembra, son señalados como buenos sustratos para el cultivo del shiitake [11, 12].

En cuanto al peso por grupos del tamaño del píleo, para la cepa IE-40, predominó el G2 (60.2%), seguido por el G1 (29.0%). En la cepa IE-105, predominó el G3 (51.3%), seguido por el G2 (43.0%). De manera general, en la producción predominó el G2 con 51.6%. (Tabla 2). Estos porcentajes son similares a los obtenidos en la pulpa de café con la cepa IE-40, en donde predominó el G2 (52.3%) [8]. En el bagazo de caña de azúcar y en las hojas de caña de azúcar predominó el G2 (57 y 63%, respectivamente) y en las brácteas de la corona de piña predominó el G3 (45%), mientras que con la cepa IE-105, en el bagazo de caña de

azúcar y en las brácteas de la corona de piña predominó el G2 (41 y 53%, respectivamente) [13].

A los 128 días a partir de la siembra, se indujo sin éxito la formación de segundos primordios. Por el contrario, en algunas réplicas en su parte inferior se observó la presencia de *Trichoderma* sp., y se formaron grietas en el pseudoesclerocio, lo que provocó que la cáscara de cacahuete se expandiera y se observara a simple vista. Probablemente la cáscara de cacahuete no retuvo la suficiente humedad después de la primera cosecha. O bien, durante la incubación el micelio se fortaleció con el nitrógeno contenido en ella (relación C/N de 22), pero después de la primera cosecha, tal vez necesitó de más carbono que de nitrógeno. Esto es con base a que Salmones *et al.*, [13] obtuvieron elevadas eficiencias biológicas en el bagazo de caña de azúcar y en las hojas de caña de azúcar, los cuales tienen la relación C/N de 159.6 y 131.1, respectivamente, que coinciden con los valores recomendados en la literatura para el cultivo del shiitake.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio, demostraron que el micelio de las cepas utilizadas no fue capaz de colonizar a todos los sustratos estudiados. Es necesario utilizar cepas que estén bien adaptadas para crecer en pajas y en diferentes subproductos agrícolas. En la segunda parte, se comprobó que la forma en que se realizó la

Tabla 2. Promedios de número de días a la formación de los primordios, peso (g), porcentaje de los cuerpos fructíferos por grupo cosechado y eficiencia biológica, con dos cepas de *L. edodes* (IE-40 e IE-105), sobre cáscara de cacahuete en diez repeticiones.

Cepa	Formación primordios (días) $\pm \sigma$	Grupos por tamaño del píleo, peso en g			Total (g) $\pm \sigma$	Eficiencia biológica (%) $\pm \sigma$
		G1 $\pm \sigma$	G2 $\pm \sigma$	G3 $\pm \sigma$		
IE-40	59.1 \pm 1.72	87.33 \pm 69.11 (29.0)*	177.01 \pm 72.42 (60.2)	27.3 \pm 37.33 (10.8)	291.64 a \pm 64.36	55.5 a \pm 12.23
IE-105	61.1 \pm 2.23	13.89 \pm 13.46 (5.7)	98.6 \pm 66.53 (43.0)	120.01 \pm 79.2 (51.3)	232.5 a \pm 71.03	44.2 a \pm 13.5

* Entre paréntesis los porcentajes de la producción en cada grupo.

G1: < 5 cm, G2: de 5 a 9.9 cm y G3: > 10 cm

Medias con letras distintas en las columnas, son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey para $\alpha = 0.05$.

pasteurización y siembra en los substratos, es práctica y sencilla que viene a reducir los gastos de producción y que es factible de implementarse en un cultivo a mayor escala. Finalmente, se determinó que la cáscara de cacahuete puede servir como sustrato para el cultivo de *L. edodes*.

Literatura citada

1. Bernabé-González, T., M. S. Domínguez R., S.A. Bautista B., 1993. Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. *florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. Revista Mexicana de Micología 9: 13-18.
2. Bernabé-González, T., J. M. Arzeta-Gómez, 1994. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre cáscara de cacahuete y hoja seca de maíz. Revista Mexicana de Micología 10: 15-20.
3. Bernabé-González, T., R. Garzón-Mayo, 1995. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de sorgo y cáscara de cacahuete. Revista Mexicana de Micología 11: 165-168.
4. Bernabé-González, T., M. Cayetano-Catarino, A. Adán-Díaz, M.A. Torres-Pastrana, 2004. Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* sobre diversos subproductos agrícolas de Guerrero, México. Revista Mexicana de Micología 18: 77-80.
5. Guzmán, G., G Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos, 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, D.F.
6. Mata, G., D. Salmones, G Guzmán, 1990. Cultivo del shiitake japonés, *Lentinus edodes*, en bolsas con viruta de madera. Revista Mexicana de Micología 6: 245-251.
7. Mata, G., G Guzmán, 1993. Cultivation of *Lentinus boryanus* in wood shaving in Mexico. Cryptogamic Botany 4: 47-49.
8. Mata, G., R. Gaitán-Hernández, 1994. Avances en el cultivo del shiitake en pulpa de café. Revista Iberoamericana de Micología 11: 90-91.
9. Mata, G., J.-M. Savoie, J.-M. Olivier, 1998. Reduction in the incidence of *Trichoderma* spp. using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *Lentinula edodes* on pasteurised wheat straw. Agronomie 18: 515-520.
10. Mata, G., R. Gaitán-Hernández, R. Pérez-Merlo, C. Ortega, 2002. Improvement of shiitake spawn for culturing on pasteurized wheat straw. In: Sánchez, J.E., G. Huerta, E. Montiel (Eds.). Mushroom Biology and Mushroom Products. UAEM. Cuernavaca, México.
11. Morales, P., D. Martínez-Carrera, 1990. Cultivation of *Lentinula edodes* in Mexico. Micología Neotropical Aplicada 3: 13-17.
12. Morales, P., D. Martínez-Carrera, 1991. *Bursera* sawdust as a substrate for shiitake cultivation. Micología Neotropical Aplicada 4: 41-47.
13. Salmones, D., G. Mata, L.M. Ramos, K.N. Waliszewski, 1999. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. Agronomie 19: 13-19.
14. Shen, Q., Q. Tan, D. J. Royse, 2004. Growing *Lentinula edodes* and others mushrooms in China a low input technology alternative. Revista Mexicana de Micología 18: 15-20.
15. Soto-Velazco, C., S. Fausto, L. Guzmán-Dávalos, 1992. Cultivo del hongo de encino (*Lentinus* spp.) sobre una mezcla de bagazo de maguey tequilero y bagazo de caña de azúcar. I Congreso Centroamericano de Micología. (Memorias). Guatemala.