

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

CBS

**PRODUCCION DE INOCULO DE *Pleurotus sp* A NIVEL
PLANTA PILOTO**

INFORME FINAL

Que para obtener el diploma de
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGIA

presenta:

MIGUEL ANGEL GUTIERREZ CERON
Ingeniero Bioquímico Industrial

Asesores:

Dr. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
M. en C. MARIA DE LOS ANGELES AQUIAHUATL RAMOS

Realizado en la Planta Piloto de Fermentación Sólida de la UAM-I

Octubre de 1994

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos

Sabiendo de jamás existirá una forma de agradecer, en esta vida de lucha y superación constante.

Deseo expresarles, que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes y constituyen el legado más grande que pudiera recibir.

Con amor, admiración y respeto.

A María de la Paz

No es fácil llegar, se necesita ahinco, lucha, deseo, pero sobre todo apoyo y comprensión, como los que he recibido durante todo este tiempo.

Ahora más que nunca se acrecenta mi amor, admiración y respeto, por ti.

Gracias por lo que hemos logrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y al M. en C. María de los Angeles Aquiahuatl, por la dirección del presente trabajo, por todo el apoyo de que dispuse para llevar a buen termino el mismo; pero sobre todo, por todas las enseñanzas transmitidas, que han contribuido considerablemente a mi formación profesional.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ernesto Favela Torres, por su colaboración en la dirección de mi trabajo.

RESUMEN.

Los hongos comestibles constituyen una fuente de proteína para la alimentación humana, que en México ha sido utilizada desde épocas prehispánicas.

El cultivo de hongos comestibles (a excepción del cultivo del champiñón) es un proceso sencillo que no requiere de instalaciones costosas. Sin embargo, para que su producción sea alta y constante se necesita de un inóculo en cantidad y calidad suficiente, para mantenerla producción en los niveles que se requiere para hacer económicamente rentable su cultivo.

El presente trabajo se realizó con el fin de contribuir al desarrollo de una tecnología de producción de inóculo de *Pleurotus*. Se puso particular interés en la selección de cepas y el desarrollo de métodos de producción de inóculo a nivel de Planta Piloto.

Se evaluaron 10 cepas de *Pleurotus* (5 cepas de *Pleurotus ostreatus* y 5 de *Pleurotus cornucopiae*) en base a su velocidad de crecimiento radial sobre diferentes medios de cultivo en caja Petri, de las cuales se seleccionaron las cepas IE-8 y la UAM-1 (ambas *Pleurotus ostreatus*) que presentaron las velocidades de crecimiento más altas en todos los medio de cultivo estudiados. Estas cepas fueron cultivadas sobre paja de avena, donde la cepa UAM-1 fue la que presentó una mayor eficiencia biológica, lo cual la hace una cepa susceptible de ser utilizada en el cultivo de comercial de setas sobre paja de avena.

En cuanto a los métodos de producción de inóculo se evaluaron los siguientes: inóculo sólido, inóculo líquido y el inóculo en suspensión, de los cuales el segundo fue el que sobresalió en términos de productividad y calidad del inóculo obtenido.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible obtener un inóculo en cantidades y calidad mayores, sin que esto ocasione un desembolso mayor por parte del cultivador.

Con que criterios evaluar la calidad del inóculo líquido.

TABLA DE CONTENIDO

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1

1.1. INTRODUCCIÓN.	3
1.2. EL GÉNERO PLEUROTUS.	3
1.3. CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA EL CULTIVO DE PLEUROTUS.	4
1.3.1. TEMPERATURA	4
1.3.2. HUMEDAD.	5
1.3.3. LUZ.	5
1.3.4. CONCENTRACIÓN DE CO ₂	5
1.3.5. PH.	6
1.4. CULTIVO COMERCIAL DE PLEUROTUS.	6
1.4.1. ELABORACIÓN DE INÓCULO.	7
1.4.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.	8
1.4.3. CULTIVO DEL HONGO	9
1.5. PRODUCCIÓN COMERCIAL DE INÓCULO DE PLEUROTUS.	10
1.5.1. SELECCIÓN DE CEPAS	11
1.5.2. OBTENCIÓN DE CEPAS	12
1.5.3. MEDIOS DE CULTIVO	12
1.5.4. SUSTRATOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE INÓCULO.	13
1.5.5. ACONDICIONAMIENTO DE SUSTRATOS.	14
1.5.6. MÉTODOS DE ELABORACION DE INÓCULO.	15
1.5.7. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS.	16
1.6. CONCLUSIONES.	18

¡Error! Marcador no definido.

2. OBJETIVOS

20

2.1. OBJETIVO GENERAL.	20
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	20

3. MATERIAL Y METODOS

21

3.1. MICROORGANISMOS.	22
3.2. MEDIOS DE CULTIVOS.	22
3.3. SUSTRATOS.	22
3.4. ACONDICIONAMIENTO DE LOS SUSTRATOS.	22
3.5. SISTEMAS DE FERMENTACION.	23
3.6. RECUPERACIÓN DE CEPAS.	24
3.7. SELECCIÓN DE CEPAS EN BASE A SU CRECIMIENTO RADIAL.	25

¡Error! Marcador no definido.

3.8. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO.	25
3.9. FRUCTIFICACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS.	27
3.10. CONSERVACIÓN DE CEPAS.	29
3.11. MÉTODOS ANALÍTICOS.	30
3.11.1. MATERIA SECA.	30
3.11.2. MEDICIÓN DEL PH.	31
3.11.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL.	31
3.11.4. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO APICAL.	32
3.11.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS.	32

4. DISCUSION Y RESULTADOS **33**

4.1. RECUPERACIÓN DE CEPAS.	34
4.2. SELECCIÓN DE CEPAS EN BASE A SU CRECIMIENTO RADIAL.	34
4.3. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO PRIMARIO.	42
4.4. EFECTO DEL MODO DE PRODUCCIÓN DEL INÓCULO PRIMARIO SOBRE LA ELABORACIÓN DE INÓCULO SECUNDARIO.	46
4.5. EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO PRIMARIO EN BASE A LA PRODUCTIVIDAD QUE SE TIENE EN LA ELABORACIÓN DEL INÓCULO SECUNDARIO.	49
4.6. FRUCTIFICACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS.	52
4.7. CONSERVACIÓN DE CEPAS.	54
4.8. IDENTIFICACIÓN DE PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE PLEUROTUS.	58

5. CONCLUSIONES

5.1. SELECCIÓN DE CEPAS EN BASE A SU CRECIMIENTO RADIAL.	61
5.2. FRUCTIFICACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS.	61
5.3. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO.	61
5.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS.	62

REFERENCIAS **63**

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1. Introducción.

México ha tenido un gran incremento demográfico, el cuál ha ocasionado entre otras cosas, que los mexicanos dispongan cada vez de menos tierra cultivable. Esta circunstancia nos debe estimular a incrementar la eficiencia productiva y con ello aprovechar al máximo los productos orgánicos que se derivan del sector agropecuario. De esta forma, lo que antes se consideraba como desecho, ahora debe valorarse como materia prima para su aprovechamiento alimentario o industrial (Viniegra, 1990).

Los hongos comestibles, constituyen una fuente de proteína para la alimentación humana, que en México ha sido utilizada desde épocas prehispánicas. Su valor nutricional ha sido estudiado por diversos investigadores, en varias partes del mundo (ver Tabla 1-1), para el caso de *Pleurotus* existen publicaciones que lo sitúan entre las fuentes más ricas en proteínas, como son la carne de res, pollo y cerdo, la leche, etc (Bano *et al*, 1987 y 1989., Ghosh *et al*, 1990).

Tabla 1-1. Composición proximal (°) de algunas especies de hongos comestibles.

Especie	Humedad	Proteína	Grasas	Fibra cruda	Cenizas
<i>Agaricus bisporus</i>	84.4	29.4	4.9	9.2	8.5
<i>Auricularia sp</i>	89.1	4.2	8.3	19.8	1.7
<i>Lentinus edodes</i>	90.0	15.5	6.5	7.7	5.4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	82.3	20.5	1.9	8.1	8.0
<i>Pleurotus florida</i>	91.5	27.0	1.6	11.5	9.3
<i>Volvariella sulcipes</i>	79.9	35.3	2.9	14.3	10.4
<i>Volvariella udvasea</i>	85.1	25.9	2.4	9.3	8.8

Fuente : Hirata, 1986; Bano and Rajarathman, 1989; Calvo, 1993.

Tabla 1-2. Hongos Comestibles de México susceptibles de ser producidos comercialmente.

Nombre científico	Nombre común	Zona de localización
<i>Agaricus bisporus</i> <i>campestris</i> <i>silvicola</i>	Champiñón San Juan Champiñón	Casas especiales Templada a tropical Bosque de abetos y pinos
<i>Amanita tuza</i> <i>fulva</i> <i>caesarea</i>	Aiukna, tuza Pollita Jicarita, chullo	Bosque de pinos Bosque de encino y pinos Bosque de encino y pinos
<i>Auricularia delicata</i> <i>politricha</i>	Chole, judas Oreja de judia	Selva tropical Templado a tropical
<i>Boletus edulis</i> <i>pimicola</i> <i>regius</i>	Cemita Mazayel Guarin	Bosque de encino y pinos Bosque de pinos Bosque de encino
<i>Cokeina sulcipes</i>	Copa	Selva tropical
<i>Lactarius lepideus</i> <i>indigo</i>	Chilpan Zuine, zuin	Bosque de encino Bosques de pino y abeto
<i>Lentinus lepideus</i> <i>cubensis</i>	Jolote	Troncos de pino y ocote Troncos de pino y ocote
<i>Lycoperdon perlatum</i> <i>cebrinum</i>	Bola Blanquillo	Bosque de abetos Bosques de pino y abeto
<i>Morchella esculenta</i> <i>conica</i> <i>costata</i>	Monilla, elote Mazorca, olote Mazorca	Bosque de coníferas Bosque de encinos Bosque de coníferas
<i>Pleurotus cornucopiae</i> <i>ostreatus</i> <i>d'jamour</i> <i>smithii</i>	Hongo de maguey Oreja de palo, zeta Oreja de cazahuate	Templado a subtropical Templado a tropical Subtropical a tropical
<i>Russella alcatracea</i> <i>brenipes</i> <i>densifolia</i>	Tornpeta Iztacnanácatl Borrego blanco	Bosques de pino y abeto Bosques de pino y abeto Bosques de pino y abeto
<i>Tricholoma favovirens</i> <i>sejcentum</i> <i>raccinum</i>	Hongo oreja Escorpión Cuerno de venado	Bosques de pino y abeto Bosque de encino y abeto Bosques de pino y abeto

Fuente: Sánchez, 1993; Guzmán et al., 1993

El cultivo de hongos comestibles, sobre desechos orgánicos, se ha manifestado en los últimos años como una opción en la obtención de alimentos para consumo humano, sobre todo en países en vías de desarrollo (Martínez-Carrera, 1991). La tecnología utilizada es atractiva por el alto contenido proteico del hongo y por la posibilidad de obtener grandes cantidades de alimento, mediante técnicas sencillas, a bajo costo y en un periodo corto de tiempo (Sánchez Vázquez, 1992 y 1993).

De las especies reportadas como comestibles, en la Tabla 1-1, varias de ellas crecen de forma natural, en diferentes zonas de México y consecuentemente pueden llegar a producirse en el país (Martínez-Carrera *et al*, 1984).

1.2. El género *Pleurotus*.

Pleurotus posee un sombrerillo o pileo liso convexo, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra o de concha, puede presentar escamas hacia el centro o en la base, sus cuerpos fructíferos son por lo general conoresentes. Puede llegar a medir entre 5 a 15 cm de diámetro. El color del cuerpo fructífero depende de la especie del hongo (ver Tabla 1-3). Sus laminillas son decurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas algunas veces amarillas. El pie o estípote suele ser corto, ligeramente duro, blanco y algo peloso en la base. Su inserción suele ser algo lateral y su dirección ligeramente oblicua. Tanto su forma como su longitud dependen mucho de la situación del hongo. La carne es blanca, de olor algo fuerte, tierna al principio y después correosa. Las esporas son de color lila, elipsoide con un talla promedio de 95.5 X 3.5 micras (García, 1985., Guzmán *et al*, 1993).

Según Leong (Leong, 1989), todas las especies de *Pleurotus* tienen hábitat similares. La mayoría son saprófitos, crecen sobre madera y tienen la habilidad de degradar celulosa y lignina (hongos de pudrición blanca). Las especies que más se han utilizado para fines comerciales son *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. sajor-caju*, *P. florida* y *P. sapidus*.

Este hongo se adapta a diversas condiciones climáticas, que van desde templado a tropical, por lo que puede decirse que su distribución es cosmopolita (ver Tabla 1-2). Diversos estudios han mostrado diferentes sustratos en los que este hongo puede crecer y ser cultivado comercialmente (Guzmán *et al*, 1993).

Pleurotus es uno de los agaricales (ver Tabla 1-3) más estudiados debido a su gran potencial genético usado en la degradación lignocelulósica y producción de alimentos.

Tabla 1-3. Ubicación Taxonómica de las diferentes especies de *Pleurotus*.

Ubicación taxonómica de <i>Pleurotus</i>	
Reino	Fungi
División	Eucomycota
Subdivisión	Basidiomycotina
Clase	Hymenomycetes
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>ostreatus</i> (setas) <i>d'jamour</i> (setas blancas) <i>cornucopiae</i> <i>sajor-caju</i> (setas) <i>florida</i> (setas perla) <i>lewis</i> (setas blancas) <i>ostreatoroseus</i> (setas rosas) <i>columbinus</i> (setas azules)

1.3. Consideraciones técnicas para el cultivo de *Pleurotus*.

El crecimiento de este género está supeditado a ciertos factores, como son: La temperatura, la humedad del ambiente, la humedad del sustrato, el pH, las concentraciones de O₂ y CO₂ y la cantidad de luz. Las condiciones más adecuadas de estos factores dependen del tipo de desarrollo que se busca en el hongo (crecimiento micelial o desarrollo de fructificaciones) y de la especie del mismo (Sánchez Vázquez, 1992 y 1993).

1.3.1. Temperatura

El micelio de *Pleurotus* crece bien en un intervalo de temperaturas que va desde los 10°C hasta los 40°C. Sin embargo, la temperatura óptima de crecimiento oscila alrededor de los 25°C. Para la mayoría de las especies. *P. ostreatus* y *P. florida* registran óptimos de 30°C (Zadrazil, 1978).

La temperatura de fructificación varía de acuerdo con la especie, las especies tropicales de *Pleurotus* fructifican bien entre los 20 y 30 °C. Una temperatura adecuada para el desarrollo del hongo afecta directamente al rendimiento de la producción. Normalmente la temperatura de fructificación es más baja que la temperatura del desarrollo micelial. (Zadrazil, 1978).

1.3.2. Humedad.

La humedad relativa del ambiente y la humedad del sustrato son factores determinantes en el desarrollo de un hongo. La falta de humedad relativa inhibe la fructificación. La literatura reporta óptimos a 80-90 % y de 70-80 %, respectivamente. Para el caso de *P. ostreatus* se ha observado que una humedad relativa de 80-85 % es mejor (Guzmán *et al.*, 1993).

1.3.3. Luz.

Se ha comprobado que la obscuridad promueve el crecimiento micelial y que el suministro de luz es necesario para promover la fructificación. En general los hongos requieren de luz de longitudes de onda corta (cargado hacia el azul del espectro visible), la luz que se le debe suministrar a los hongos debe ser suficiente para que uno pueda leer material impreso (aproximadamente 150-200 lux) (Sánchez Vázquez, 1992 ; Guzmán *et al.*, 1993).

1.3.4. Concentración de CO₂.

La concentración de CO₂ es muy importante para el desarrollo de *Pleurotus*. Concentraciones de 20-25 % de CO₂ es útil para el desarrollo micelial del hongo, sin embargo, concentraciones superiores al 0.6 % inhiben la formación de cuerpos fructíferos (Zadrazil, 1978; Kurtzman y Zadrazil, 1989). Debido a esto, cuando se requiere producir este hongo a nivel comercial, es

necesario implementar un buen sistema de ventilación en la sala de fructificación, de tal manera que se retire constantemente el CO₂ formado por la respiración del hongo (Zadrazil, 1978).

Una ventilación deficiente se manifiesta en deformaciones de los cuerpos fructíferos, estas pueden ser desde un ligero alargamiento del estipite, la no formación del pileo o ambas cosas (Sánchez Vázquez, 1992 y 1993; Guzmán *et al.*, 1993).

1.3.5. pH.

El pH es de suma importancia, si un sustrato es demasiado ácido o demasiado alcalino puede detener, inhibir o estimular procesos vitales de la actividad fúngica. Se estima que la absorción y producción de vitaminas esenciales, la absorción de ácidos orgánicos y asimilación de minerales, así como la producción de antibióticos son influenciados por el pH del sustrato. En general, los hongos comestibles prefieren valores de pH entre 5 y 7 (Sobal y Martínez-Carrera, 1989).

1.4. Cultivo comercial de *Pleurotus*.

El cultivo de *Pleurotus* puede desarrollarse desde niveles tan pequeños y rústicos como las cooperativas rurales que obtienen de 60-70 kg/semana para su autoconsumo (Martínez-Carrera *et al.*, 1991), hasta grandes instalaciones tecnificadas en las que se pueden implementar sistemas expertos computarizados para el cultivo del hongo (Backus *et al.*, 1991).

Actualmente, en México, la producción industrial *Pleurotus*, se realiza siguiendo un procedimiento, como el que se muestra en la Figura 1-1. En dicha figura se nota que la producción de *Pleurotus* es un proceso sencillo, con una tecnología no sofisticada que involucra el mantenimiento de las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo. La humedad,

la ventilación, la temperatura la ventilación y el pH son factores primordiales que se deben vigilar y mantener constantes para la optimización de la producción de hongos.

La Figura 1-1 muestra como el cultivo de *Pleurotus* sp consta de 3 grandes etapas: elaboración de inóculo, preparación del sustrato y el cultivo del hongo.

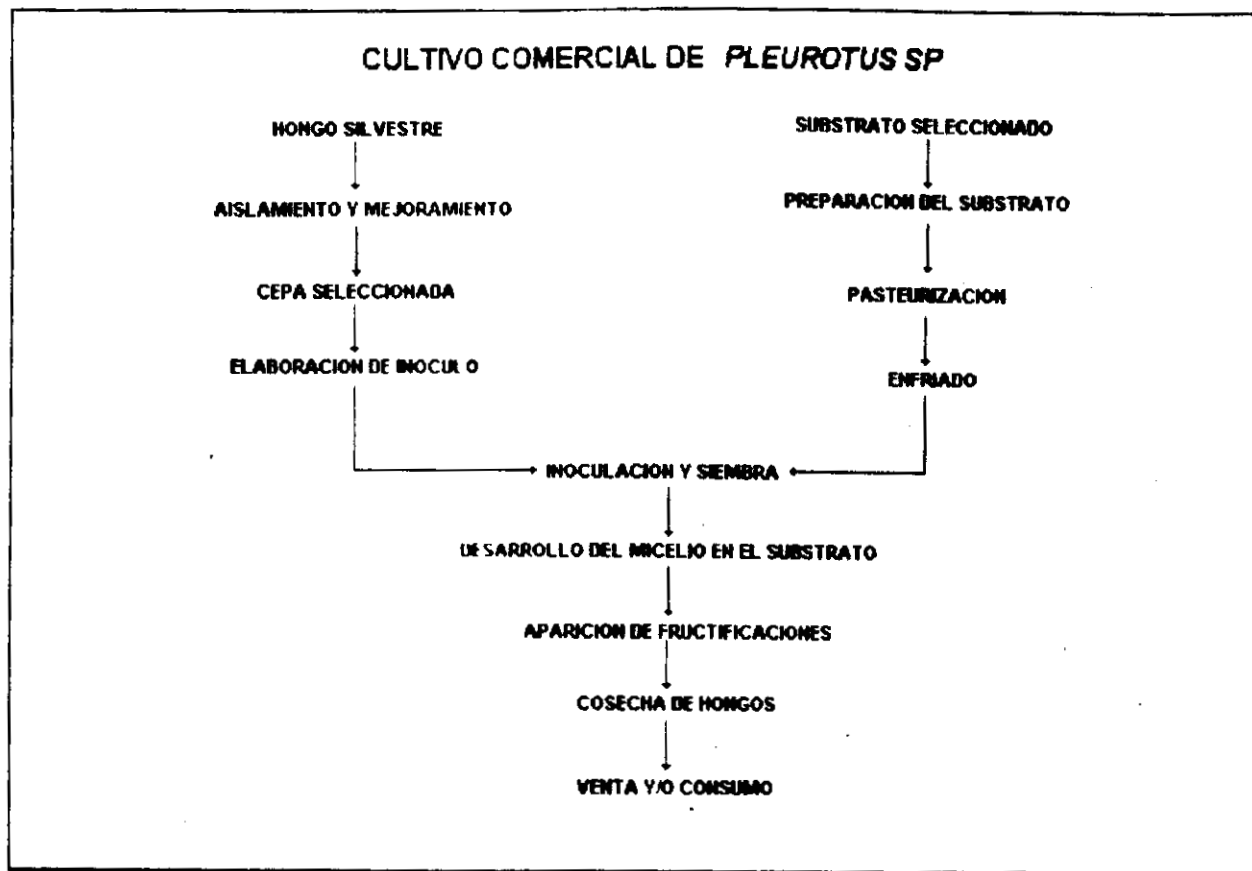


Figura 1-1. Proceso general de la Producción de Hongos Comestibles.

Fuente : Sánchez Vazquéz, 1993 y Guzmán et al. 1993.

1.4.1. Elaboración de inóculo.

El inóculo se prepara empleando semillas de gramíneas (sorgo, trigo, avena, etc.), estas se remojan durante 24 h; luego se introducen en frascos de boca ancha y se esterilizan durante 30 min., al enfriarse los frascos se inoculan con el micelio de la cepa seleccionada. Los frascos se incuban a

25 °C y en obscuridad. El micelio tarda alrededor de 20 días en colonizar todas las semillas del frasco.

1.4.2. Preparación del sustrato.

Los sustratos que se utilizan en el cultivo de *Pleurotus* son sometidos, a los siguientes tratamientos:

- a) Reducción del tamaño de partícula hasta un nivel de 3-5 cm (García, 1985).
- b) Lavado e inmersión en agua hasta alcanzar una humedad entre 70 y 80 % (Guzmán *et al*, 1993) o bien, se inyecta agua en una instalación de preparación en continuo de sustrato, hasta alcanzar 70% de humedad (Zadrazil, 1978).
- c) En algunas ocasiones se añade algo de carbonato de calcio para mantener casi neutro el pH del sustrato (García, 1985)
- d) La siguiente operación que se realiza al sustrato, es la pasteurización, ésta se lleva a cabo usando diferentes métodos, a saber :
 - * Calentar con vapor durante algunas horas hasta 70-90°C (Steineck, 1987).
 - * Subir la temperatura, mediante el uso de vapor, hasta 80°C en 6 horas, mantener durante 8 horas y finalmente enfriar con aire fresco en 12 horas (García, 1985).
 - * Sumergir el sustrato en agua caliente (70°C) durante 15-20 minutos, o bien con vapor, calentar a 62°C durante 2.5 horas, después mantener a 52°C durante 5.5 horas (Martínez-Carrera *et al*, 1988)
- f) Enfriado del sustrato.
- g) Ecurrido y llenado de contenedores

1.4.3. Cultivo del hongo.

1.4.3.1. Siembra e incubación.

Una vez que el sustrato se ha acondicionado, se procede a la siembra mediante el uso de un 5-10 % de inóculo (con respecto al peso fresco del sustrato). El inóculo se homogeniza con el sustrato y se coloca en un recipiente o contenedor (Zadrazil, 1978).

La incubación para el desarrollo del micelio se realiza en locales con ventilación, en la obscuridad y controlando la temperatura. Las temperaturas recomendadas para el desarrollo micelial se muestran en la Tabla 1-4.:

Tabla 1-4. Temperaturas recomendadas para el desarrollo micelial de *Pleurotus sp.*

Temperatura (°C)	Referencia
25	Garcia, 1985
20-25	Steineck, 1987
20-30	Zadrazil, 1978

El tiempo de incubación es de 1-3 semanas. La temperatura depende de la cepa que se esté utilizando en la producción de hongos comestibles.

1.4.3.2. Fructificación.

Para el desarrollo de cuerpos fructíferos se cambia la temperatura y se proporcionan periodos de iluminación al cultivo. Las temperaturas recomendadas para la fructificación se muestran en la Tabla 1-5.

Tabla 1-5. Temperaturas recomendadas para la producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.*

Temperatura (°C)	Referencia
10-18	Zadrazil, 1978
10-14	García, 1985
12-15	Steineck, 1987
20-25	Klibanski, 1993
20-27	Martínez-Carrera et al., 1991

Además del cambio de temperatura se debe proporcionar una ventilación equivalente a remover el aire de la cámara de fructificación 4 veces/h (Sánchez Vázquez, 1993). La producción de cuerpos fructíferos se da después de 1-2 semanas, se cosecha y se espera otra semana para volver a cosechar. Por lo general no resulta redituable esperar una tercera cosecha (García, 1985; Guzmán et al, 1993).

1.5. Producción comercial de inóculo de *Pleurotus*.

La producción de inóculo se refiere a la preparación de microorganismos de un cultivo en estado inactivo (en conservación) hasta un nivel suficiente para inocular una etapa final de producción (Hunt y Stieber, 1986).

En el caso de los hongos comestibles, en general, el inóculo o semilla es el desarrollo masivo de micelio del hongo sobre un sustrato determinado como lo pueden ser granos o semillas de gramíneas dentro de frascos, botellas o bolsas (Guzmán et al. 1993).

La producción de inóculo es lo que constituye la base del cultivo comercial de los hongos comestibles y es el principal problema de los productores, ya que para la elaboración del inóculo o semilla deben tener un laboratorio microbiológico y personal capacitado o en su defecto comprar

el inóculo a casas comerciales especializadas. Para la obtención de inóculo o semilla a nivel comercial se sigue la técnica descrita en la figura 1-2.

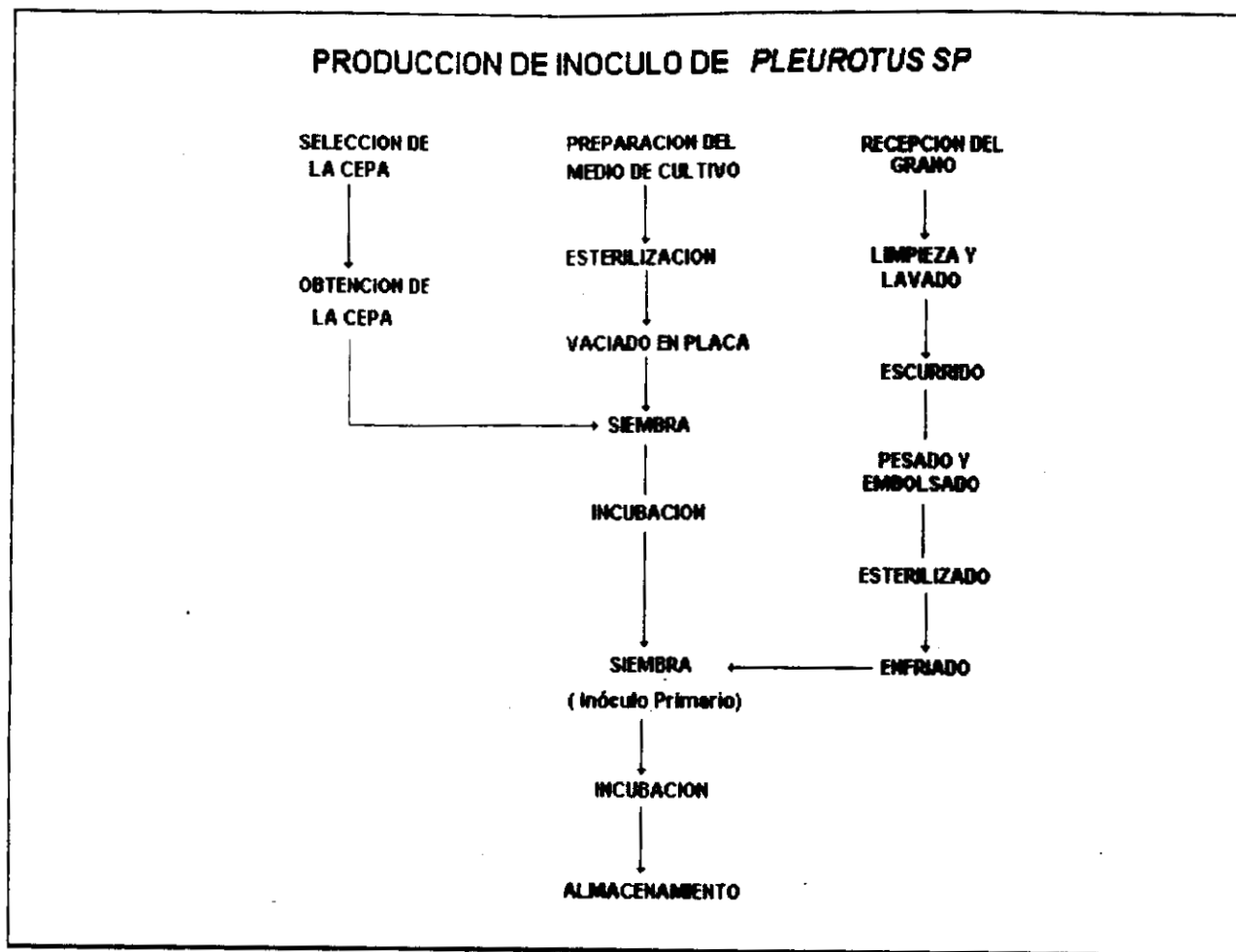


Figura 1-2. Producción Comercial de inóculo de *Pleurotus sp.*

Fuente : Guzmán et al, 1993

1.5.1. Selección de cepas.

El hecho que la producción de *Pleurotus* sea alta, constante y competitiva, dependerá en gran medida del mantenimiento adecuado de las cepas utilizadas. Estas cepas poseen diversas características de índole práctica, para lo cual deben ser adecuadamente seleccionadas (Leal, 1981; Guzmán et al., 1993); Entre las características que se mencionan se encuentran

- a) Simplicidad en la demanda de nutrientes (amplia variedad de sustratos).
- b) Alta capacidad para la formación de cuerpos fructíferos.
- c) Fructificación temprana.
- d) Alta velocidad de crecimiento
- e) Resistencia a ciertas enfermedades
- f) Producción de hongos de buen sabor, color, textura y tamaño.
- g) Producción de cuerpos fructíferos con bajos niveles de esporulación.

1.5.2. Obtención de cepas.

El proceso de producción de inóculo comienza con la obtención de la cepa, la cual es una masa de micelio desarrollada sobre un medio de cultivo apropiado, en caja Petri, en tubo de ensaye o en pequeños frascos.

La cepa puede obtenerse de una casa comercial, por ejemplo, de la ATCC (American Type Culture Collection) de E.U.A. o de algún laboratorio especializado. También se puede obtener la cepa directamente de un hongo fresco seleccionado.

La obtención de la cepa a partir del hongo fresco se puede hacer a partir de las esporas del cuerpo fructífero (aislamiento esporico) o de la "carne" de dicha fructificación (aislamiento vegetativo) (Guzmán *et al.*, 1993).

1.5.3. Medios de cultivo.

Para el cultivo y desarrollo de *Pleurotus* en el laboratorio es necesario utilizar determinados medios de cultivo, los cuales deben de proporcionar al hongo los nutrientes necesarios para su crecimiento.

El medio de cultivo a utilizar dependerá de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales. Los medios de cultivo son generalmente fáciles de conseguir comercialmente, los más comunes son Papa Dextrosa agar (PDA) Extracto de Malta Agar (EMA), Dextrosa Sabouraud Agar (DSA), Harina de Maíz Agar (HMA) e incluso algunos preparados con antibióticos. Si bien estos medios de cultivo tienen la ventaja de mantener su composición química y buena calidad, resultan ser relativamente caros.

En años recientes se ha procurado diseñar medios de cultivo con ingredientes de fácil acceso y de bajo costo. Así por ejemplo: se han elaborado medios de cultivo a base de harina de maíz (Martínez-Carrera *et al.*, 1991), extracto de ejote (Ayala *et al.*, 1991), extracto de paja y trigo (Guzmán *et al.*, 1993), grano de centeno molido (Guzmán *et al.*, 1993), pulpa de café y cáscara de cacao; los cuales han demostrado ser medios de cultivo adecuados para el desarrollo micelial del hongo.

1.5.4. Sustratos utilizados para la producción de inóculo.

Un gran número de materiales solos y combinados pueden usarse como sustrato para la elaboración de inóculo, (Martínez-Carrera, *et al.*, 1984; García Rollan, 1982) por ejemplo:

- * Materiales lignocelulósicos como la paja de arroz, desechos de algodón, viruta o aserrín de diversas maderas, pulpa de café, etc.
- * Semilla o granos de diversas gramíneas, tales como: trigo, sorgo, centeno, frijol, arroz, maíz, etc.

Sin embargo a nivel comercial, el micelio es transferido para su propagación a granos de cereales y de ahí su nombre de semilla de hongo

Para la selección de las semillas o granos que se emplearán como sustrato en el inóculo, será necesario considerar la disponibilidad, bajo costo, tiempo de almacenamiento del grano y humedad de los mismos, así como que estén libres de contaminación biológica (otros hongos) y/o química (fungicidas, por ejemplo).

1.5.5. Acondicionamiento de sustratos.

Del mismo modo que en la agricultura, antes de la siembra de las semillas se prepara el suelo, con la finalidad de proporcionar las condiciones adecuadas para la siembra, es necesario que el sustrato que se empleará en la producción del inóculo esté acondicionado (pretratamiento del sustrato).

Los sustratos que se utilizan en la producción de inóculo de *Pleurotus* son sometidos, a los siguientes tratamientos:

- a) Reducción de tamaño (a partículas de 3 a 5 cm, solo si es necesario).
- b) Lavado é inmersión en agua corriente (hasta alcanzar una humedad del 40-60 %).
- c) Ajuste del pH (entre 6.3 y 6.5).
- d) Ecurrido y llenado de los frascos hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con el sustrato
- e) Esterilizar los frascos a 15 lb/pulg² durante 30 min.
- f) Enfriado.

Una adecuada preparación del sustrato se verá reflejada en una abundante producción de micelio. La preparación del sustrato consiste en facilitarle al hongo los nutrientes necesarios para su crecimiento en una forma más accesible para su consumo (Guzmán *et al.*, 1993).

1.5.6. Métodos de elaboración de inóculo.

1.5.6.1. Inóculo sobre granos (Método tradicional).

A partir de cajas Petri se realizan cortes de agar de aproximadamente 1 cm² de micelio. Estos cortes se colocan en la parte superior de un frasco de boca ancha (2 porciones por frasco) que contienen el sustrato ya acondicionado. Los frascos se tapan, se etiquetan y se incuban durante 15 días a una temperatura a 27 °C. Cada tercer día se sacuden los frascos con el fin de dar una mejor distribución del micelio sobre el sustrato al inóculo así preparado se le denomina inóculo primario. De este inóculo se seleccionan aquellos frascos que presentan un desarrollo micelial uniforme y denso, estos frascos se utilizan para elaborar inóculo nuevo, llamado inóculo secundario (Sánchez, 1993; Guzmán *et al.*, 1993).

1.5.6.2. Inóculo en suspensión.

Para este caso el micelio crecido en caja Petri, se vacía totalmente en una licuadora con vaso de vidrio, el cual se esteriliza previamente y se adicionan 200 ml de agua destilada estéril. Se licúa durante 30 a 40 segundos y con ayuda de una jeringa estéril o pipeta se toman 5 ml. de la suspensión y se vacían en los frascos con el sustrato preparado (Guzmán *et al.*, 1993).

1.5.6.3. Medio líquido.

Recientemente se ha investigado en experimentos a nivel laboratorio en la posibilidad de usar inóculo líquido, es decir, micelio producido en cultivo sumergido usando aguas de desecho agroindustrial (vinazas, cachazas, agua de lavado de la industria cafetalera, etc.), lo que vendría a reducir los costos de preparación de inóculo y facilitaría el crecimiento del hongo en los sustratos

(Zadrazil y Kurtzman, 1989;). En la Tabla 1-6 se dan referencias de diferentes trabajos realizados sobre la utilización de medios líquidos en la producción de micelio de *Pleurotus sp.*

Tabla 1-6. Referencias sobre el uso de medios de cultivo líquidos en la producción de inóculo de *Pleurotus*.

Medio de cultivo	Referencia
Medios a base de melaza purificada	Tellez, 1966
Medios a base de melaza y agua de mar	Anaya, 1972
Medios a base de sustratos lignocelulósicos y extracto de malta	Galli, 1991
Medios de cultivo líquidos	Zadrazil, 1978
Medio a base de un extracto de paja	Chahal, 1991

Cabe aclarar que la utilización de medios líquidos queda fuera de las posibilidades de los productores rurales o pequeñas empresas, ya que para su realización se necesita de equipo de fermentación más complejos, lo que aumenta el costo de producción de inóculo. Sin embargo, a nivel comercial, el uso de medios líquidos puede ser una opción viable para la producción de inóculo.

1.5.7. Métodos de conservación de cepas.

La conservación de cepas, tiene como finalidad evitar la degeneración de los cultivos, manteniendo su pureza, viabilidad y características morfológicas y fisiológicas de generación en generación, para lo cual se han propuesto gran variedad de técnicas (Helvi Heinonen-Tanski, 1986; Roussos *et al.*, 1989). La diversidad de metodologías derivan de las necesidades en tiempo de conservación que se tienen y por las diferentes propiedades biológicas que caracterizan a cada uno de los diferentes tipos de hongos, por lo que no existe una metodología de conservación que sea óptima para todos los grupos de hongos. Sin embargo en la literatura existen numerosas propuestas de conservación que se pueden ajustar a las necesidades de trabajo y del tipo de microorganismo de que se trate. En la tabla 1-7 se enlistan los métodos de conservación más utilizados en la preservación de cepas de hongos.

Tabla 1-7. Métodos de Conservación de cepas.

Métodos de conservación de cepas	
Métodos a corto plazo	Métodos a largo plazo
Refrigeración	Liofilización
Congelación	Conservación en suelo estéril
Secado	Conservación en silica gel
Conservación en agua estéril	Conservación en nitrógeno líquido
Conservación en aceite mineral	

En general los métodos de conservación coinciden en tratar de disminuir los factores externos, así como los mecanismos de recombinación genética o de reproducción, mediante el resguardo de células en ausencia total de nutrientes, en forma deshidratada o a temperaturas extremadamente bajas para evitar la acción enzimática por baja actividad de agua.

En la Tabla 1-8 se presenta una comparación de la utilización de los diferentes métodos de conservación más ampliamente usados para los hongos.

Tabla 1-8. Comparación entre métodos de conservación.

Método	Costo	Labor	Longevidad	Estabilidad
Resiembra	Bajo	Alto	6 meses	Pobre
Congelación	Bajo	Medio	1-5 años	Moderada
Agua estéril	Bajo	Medio	1-5 años	Moderada
Aceite mineral	Bajo	Medio	10-20 años	Moderada
Suelo estéril	Bajo	Medio	5-10 años	Moderada
Silica gel	Bajo	Medio	5-10 años	Buena
Liofilización	Alto	Inicial	4-40 años	Buena
Nitrógeno líquido	Alto	Bajo	infinito	Buena

Para poder determinar cual de los diferentes métodos es el más adecuado para un hongo y un proceso dados es necesario tomar en cuenta los siguientes criterios :

- 1) Viabilidad de la cepa
- 2) Tiempo que se desea conservar la cepa.

- 3) Estabilidad de la cepa.
- 4) Factibilidad de escalamiento.
- 5) Costo del proceso de conservación.

En la conservación de cepas de hongos comestibles se pueden utilizar tanto las esporas del hongo como su micelio y de acuerdo a lo que se use para la conservación de las cepas se pueden utilizar determinados métodos (ver Tabla 1-9)

Tabla 1-9. Métodos de conservación de cepas utilizados en hongos comestibles.

Métodos de conservación	Recomendado para
Resiembra periódica	micelio
Conservación en aceite mineral	micelio
Nitrógeno líquido	micelio
Refrigeración a 5 °C	esporas y micelio
Conservación en agua estéril	esporas y micelio
Liofilización	esporas

Fuente : Guzmán *et al.*, 1993.

Finalmente se puede decir que el método de conservación de cada cepa en particular depende del tiempo que se quiera conservar al microorganismo, la parte del organismo que se quiera guardar e incluso de la especie de cada hongo

1.6. Conclusiones.

De acuerdo con lo descrito en la revisión bibliográfica se puede concluir que aunque la producción de inóculo y, en general, el cultivo de *Pleurotus* es una tecnología sencilla, no sofisticada es necesario el conocimiento de el mantenimiento de las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo. La humedad, la ventilación, la temperatura la ventilación y el pH son factores primordiales que se deben vigilar y mantener constantes para la optimización de la

producción de hongos comestibles. Sin embargo ésta tecnología dista de estar optimizada, por lo que los trabajos de investigación deben dirigirse hacia este punto.

Lo anterior nos plantea la alternativa de importar o desarrollar una tecnología que se adecúe a las necesidades que plantea el cultivo en nuestro país. Es imprescindible desarrollar nuestra propia tecnología para el cultivo de hongos comestibles, ya que en México se cuenta con una gran variedad de especies pueden llegar a producirse industrialmente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

2.1.1. Desarrollar una tecnología para la producción de inóculo de *Pleurotus* sp.

2.2. Objetivos particulares.

2.2.1. Desarrollar una técnica de conservación, manipulación y propagación de *Pleurotus* sp.

2.2.2. Comparar diferentes metodos de producción de inóculo primario.

2.2.3. Extrapolar los resultados obtenidos a un nivel de planta piloto.

2.2.4. Contribuir a la ingeniería básica de producción de inóculo de setas. ✓

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Microorganismos.

Para nuestros estudios se utilizaron 12 cepas de *Pleurotus* 5 cepas de la colección del INRA (Station de Champignons - INRA Bordeaux) , 1 cepa de la colección de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (CICB-UAT), 5 cepas de la colección de la UAM-I (Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa) y 1 cepa de la colección del CIES (Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste). En la Tabla 3-1 se señalan las cepas utilizadas y su origen.

Tabla 3-1 : Cepas de *Pleurotus* estudiadas.

Especie de hongo	Registro	Origen
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	INRA-1	Francia
	INRA-2	Francia
	INRA-3	Francia
	INRA-4	Francia
	INRA-5	Francia
	UAT-1	Tlaxcala, México
<i>Pleurotus ostreatus</i>	UAM-1	Puebla, México
	UAM-2	Puebla, México
	UAM-3	México
	UAM-4	México
	IE-8	Alemania
<i>Pleurotus sp</i>	UAM-5	Francia

Las cepas antes mencionadas fueron enviadas a la Universidad en frascos viales, con Papa Dextrosa Agar (PDA) como medio de cultivo y mantenidas en refrigeración a 4 °C.

3.2. Medios de cultivos.

En el presente estudio se utilizaron los siguientes medios de cultivo : Papa Dextrosa Agar (PDA), Extracto de Malta Agar (EMA), Amaranto Dextrosa Agar (ADA) y Czapek Dox Agar (CZA). Para la composición de los medios ver Anexo 1.

3.3. Sustratos.

Los sustratos que se utilizaron en este estudio fueron seleccionados en base a la cantidad y abundancia de los desechos agroindustriales que se generan en el área de Atlacomulco, Edo. Méx. A continuación se listan los sustratos utilizados :

Tabla 3-2 : Sustratos utilizados.

Sustratos	Presentación
Paja de avena	trozos de 3-5 cm
Sorgo	granos

Los sustratos fueron recolectados y transportados al laboratorio de los sitios donde se generan como contaminantes o desechos de alguna actividad agroindustrial.

3.4. Acondicionamiento de los sustratos.

Los sustratos que se utilizaron en la producción de inóculo de *Pleurotus* fueron sometidos, a los siguientes tratamientos:

- Reducción de tamaño (a partículas de 3 a 5 cm, solo si es necesario).

- b) Lavado é inmersión en agua corriente (hasta alcanzar una humedad del 40-60 %).
- c) Ajuste del pH (entre 6.3 y 6.5), con CaCO_3 .
- d) Escurrido y llenado de los frascos hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con el sustrato para el caso del sorgo y llenado de bolsas de polipapel hasta un peso aproximado de 500 g en caso de la paja de avena.
- e) Esterilización los frascos y/o las bolsas a 15 lb/pulg² durante 30 min.
- f) Enfriado.

3.5. Sistemas de fermentación.

Para llevar a cabo el presente estudio se contó con una incubadora de convección forzada, para la producción de inóculo. La fructificación de las cepas se realizó en una cámara de fructificación que fue diseñada en la misma Universidad, la cuál nos permitía el control de la temperatura, la humedad relativa, la cantidad de luz y la ventilación (ver Figuras 3-1 y 3-2).

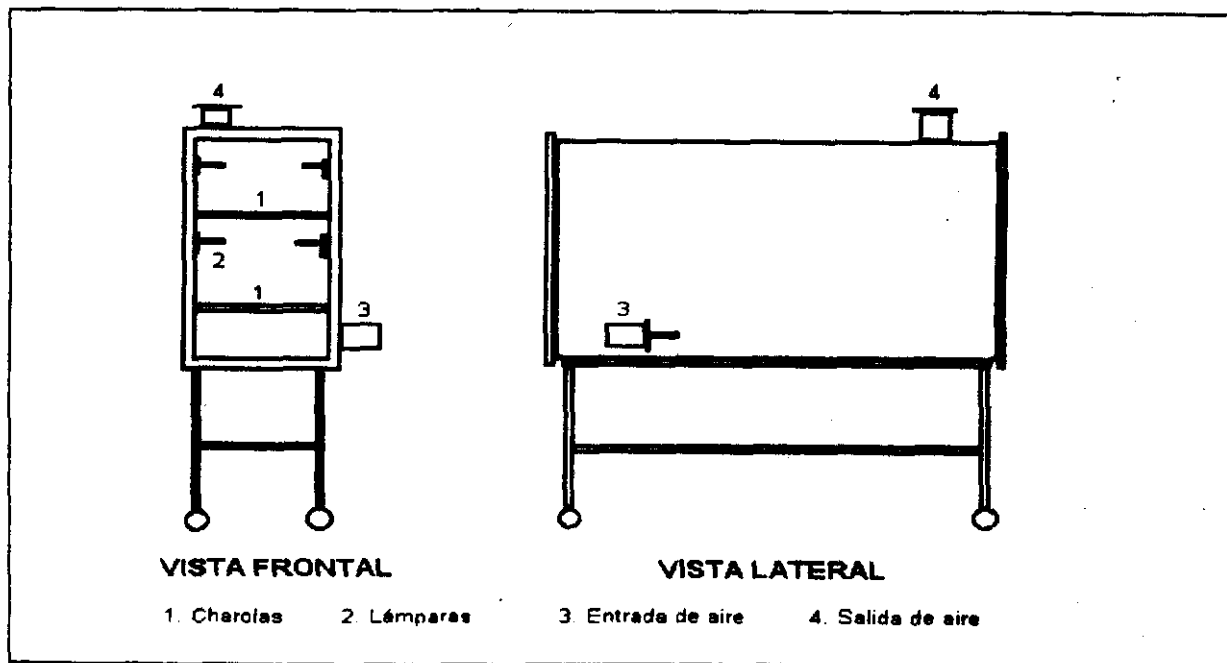


Figura 3-1 : Cámara de fructificación de *Pleurotus* sp, vista frontal y lateral.

En el caso de los estudios de la fase micelial en medio de cultivo sólido se utilizaron cajas petri desechables de 8 cm de diámetro y para los estudios de producción de inóculo se usaron tubos de vidrio con tapón rosca de 160 x 25 mm.

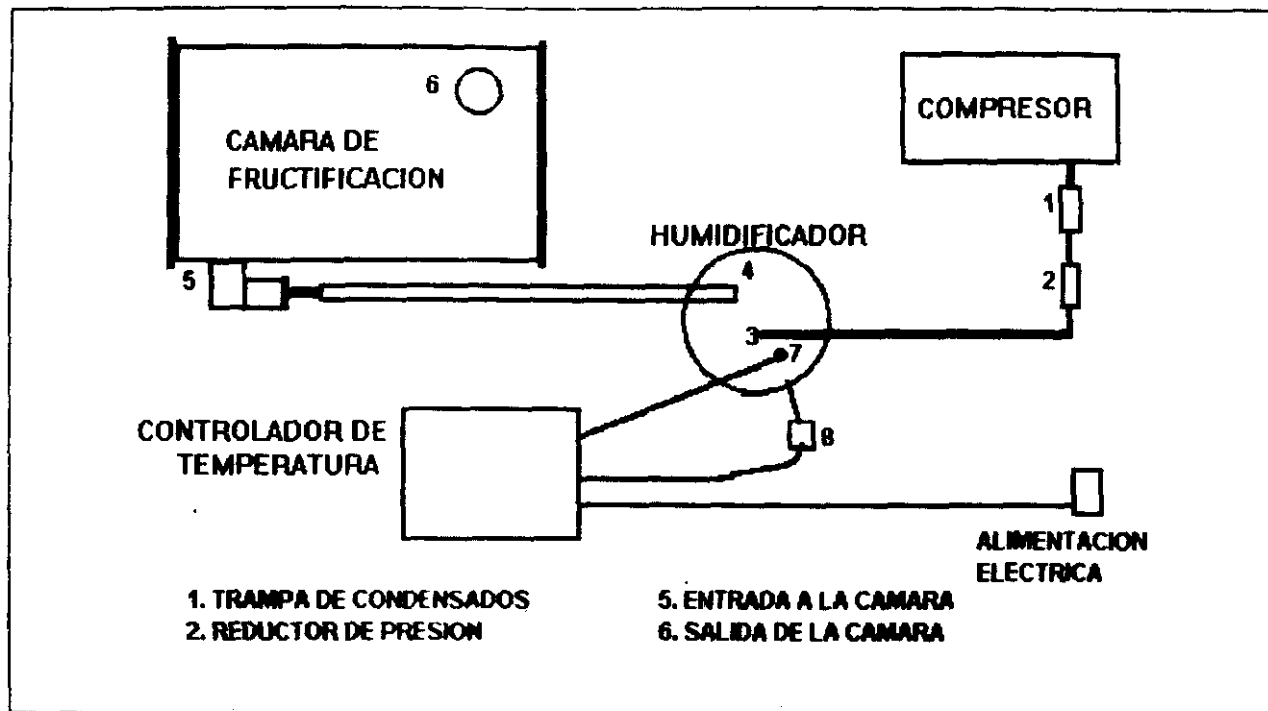


Figura 3-2 : Sistema de fructificación de *Pleurotus* sp, vista superior.

3.6. Recuperación de cepas.

De los frascos viales que contenían las cepas se tomaron pequeñas porciones de micelio y se sembraron en cajas petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 25 °C durante 15 días.

Las cepas se resembraron con el fin de comprobar y mantener la pureza de las cepas, además de obtener una cantidad suficiente del hongo para la producción de inóculo o semilla.

3.7. Selección de cepas en base a su crecimiento radial.

En el presente trabajo, se estudió el efecto que tienen el tipo de medio de cultivo y el pH sobre la morfología de la colonias y crecimiento de los hongos comestibles. Además de comparar un medio de cultivo a base de amaranto con otros medios comerciales como son : Extracto de Malta Agar, Papa Dextrosa Agar y Czapeck Dox Agar.

Las cepas se cultivaron a 25 °C sobre Extracto de Malta Agar (EMA), Papa Dextrosa Agar (PDA), Czapeck Dox Agar (CZA) y Amaranto Dextrosa Agar (ADA), cuyo pH inicial se fijó entre 5.5 y 6.0, en cada caso. EMA, PDA y CZA son medios de cultivo comerciales (Bioxon y Merck,) de composición conocida (ver Anexo 1). El pH se ajustó con HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N. Los ensayos se realizaron por quintuplicado. Se realizó una caracterización macroscópica de las colonias, tomando en cuenta su color, textura y densidad. La velocidad de crecimiento radial del hongo (extensión radial del micelio) se estimó midiendo el diámetro alcanzado por las colonias cada 48 h, hasta que alcanzaban el borde de la caja petri y se expresó como velocidad de crecimiento radial (ver 3.10.3).

3.8. Métodos de producción de inóculo.

En el presente trabajo se evaluaron tres métodos de elaboración de inóculo primario, tomando como base la velocidad de crecimiento apical presentada por el hongo (ver 3.10.4).

El procedimiento seguido se muestra en la figura 3-3. Los métodos evaluados fueron : Inóculo sólido, Inóculo en suspensión e Inóculo líquido.

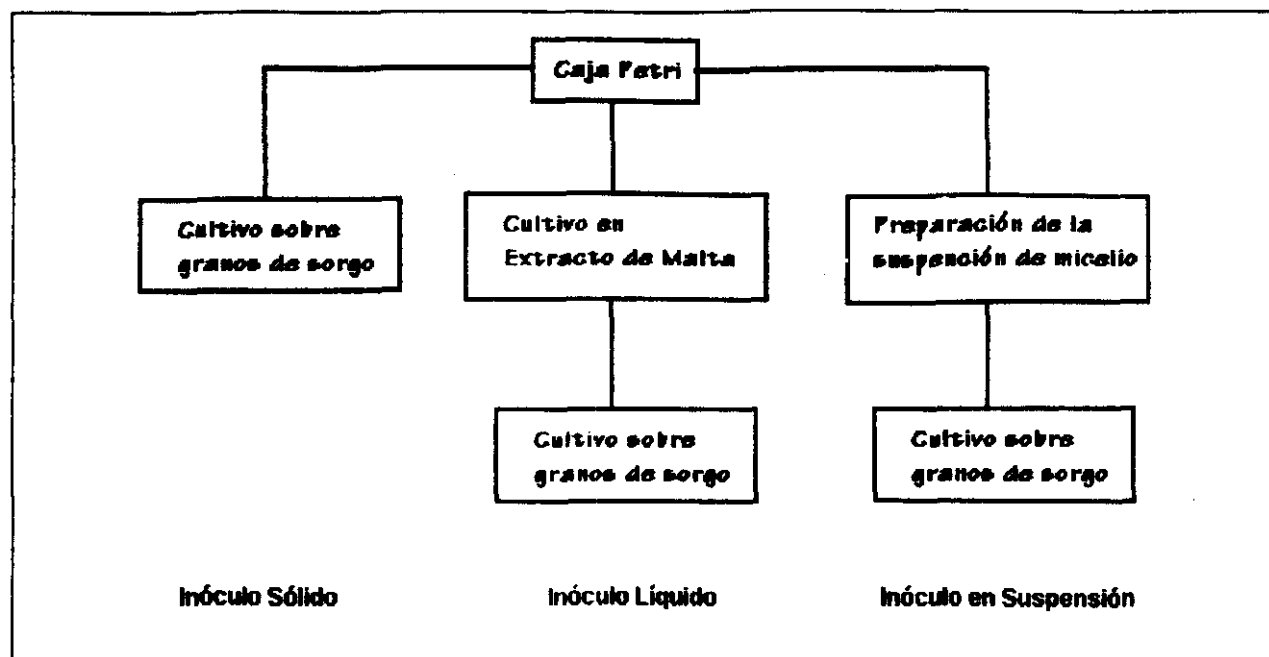


Figura 3-3 : Proceso seguido durante la evaluación de los métodos de producción de inóculo.

Inóculo sólido.

A partir de cajas Petri se realizan cortes de agar de aproximadamente 1 cm² de micelio. Estos cortes se colocan en la parte superior de tubos de ensaye de 160 x 25 mm con tapón rosca (1 porción por tubo) que contienen 15 g de sorgo ya acondicionado (ver 3.4). Los tubos se tapan, se etiquetan y se incuban durante 15 días a una temperatura a 27 °C (Sánchez, 1993; Guzmán *et al.*, 1993).

Inóculo en suspensión.

Para este caso el micelio crecido sobre Extracto de Malta Agar en caja Petri, se vacía totalmente en una licuadora con vaso de vidrio, el cual se esteriliza previamente y se adicionan 200 ml de agua destilada estéril. Se licúa durante 30 a 40 segundos y con ayuda de una jeringa estéril o pipeta se toman 5 ml. de la suspensión y se vacían en la parte superior de tubos de ensaye de 160 x

25 mm con tapón rosca (1 alicuota por tubo) que contienen 15 g de sorgo ya acondicionado (ver 3.4.). (Guzmán *et al.*, 1993).

Inóculo líquido.

2 Trozos de 1 cm de diámetro de agar con micelio de 5 días de crecimiento, se transfieren a un matraz erlenmeyer de 100 ml que contiene 20 ml de medio de Extracto de Malta y se mantiene en forma estática por 4 días a 26 - 28 °C. Posteriormente estos se transfieren a una matraz de 1000 ml que contiene 200 ml de medio de Extracto de Malta y se incuba a 26-28 °C en un agitador orbital (shaker) a 100 rpm, durante 4 días. Transcurrido este tiempo se utilizan 10 ml del medio para inocular frascos con 400 g de sustrato acondicionado (ver 3.4.) (Guzmán, *et al.*, 1993).

3.9. Fructificación de cepas seleccionadas.

El método que siguió para la fructificación de *Pleurotus* se muestra en Figura 3-4 y se describe a continuación.

Para el cultivo de *Pleurotus* se utilizaron bolsas de polipapel, las cuales contenían 400 g de peso fresco de paja de avena, como sustrato. Así que una vez preparado el inóculo secundario, éste se distribuyó homogéneamente sobre la misma. La cantidad de inóculo que se utilizó equivalía al 10% en peso del sustrato húmedo

Una vez inoculado el sustrato, éste se incuba a 27 ± 2 °C y en oscuridad hasta que el sustrato quedó completamente cubierto por el micelio del hongo (aproximadamente 20 días), ocurrido esto las bolsas se pasaron a la cámara de fructificación (ver Figuras 3-1 y 3-2).

En la cámara de fructificación el hongo se incubó a 22 °C, con una humedad relativa del 95 % y en un fotoperiodo de 12 hr. luz y proporcionando una ventilación equivalente a remover el aire de la cámara de fructificación 4 veces/h., al poco tiempo (aproximadamente 5 días) se observaron los primordios de fructificación y es en este momento cuando se retiraron las bolsas. Después de esto se producen las fructificaciones (alrededor de 15 días).

Cuando se han desarrollado los cuerpos fructíferos, éstos se cortan selectivamente, es decir, cosechando los más grandes y maduros y dejando los más jóvenes. Para, luego calcular los rendimientos de producción de hongos (ver 3.10.5.).

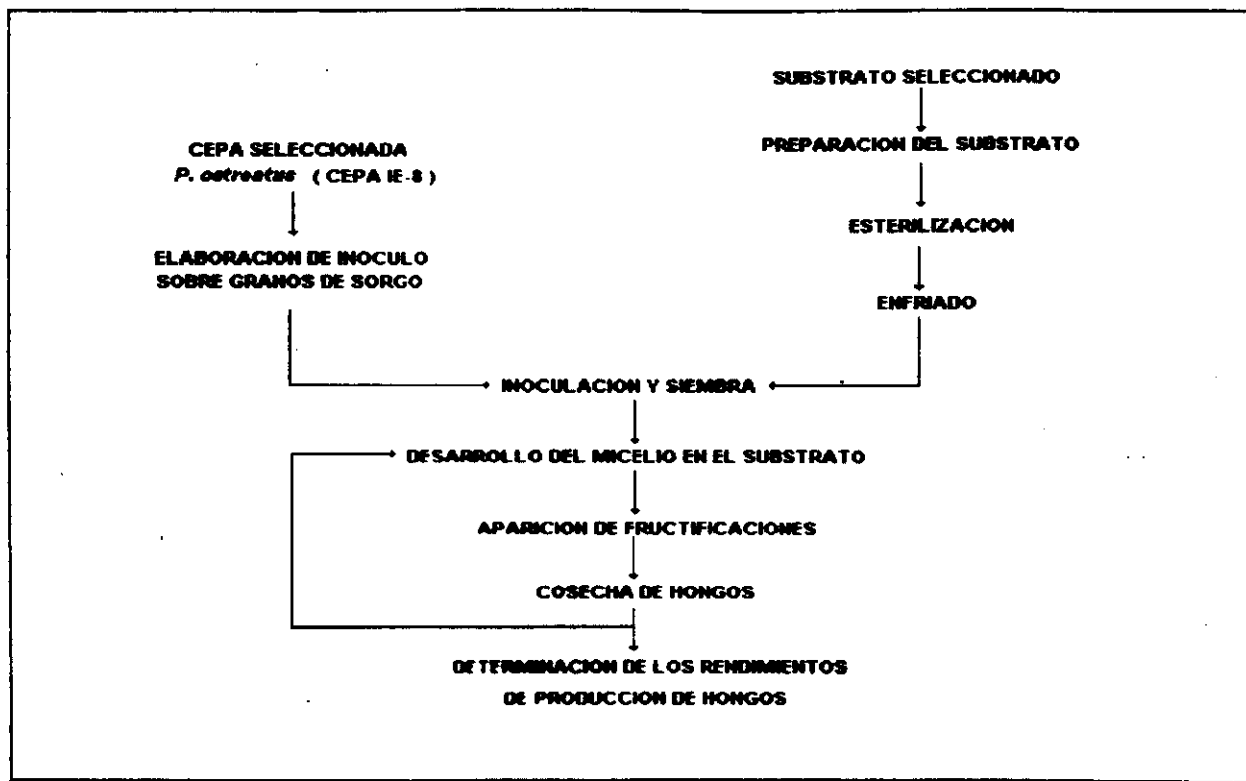


Figura 3-4 : Método de cultivo para las cepas de *Pleurotus*

3.10. Conservación de cepas.

Este estudio tiene como objetivo evaluar los métodos de conservación susceptibles de ser utilizados a nivel comercial. Los métodos que se evaluaron se listan en la Tabla 3-3. Además de determinar la viabilidad de la cepas, su capacidad para formar agregaciones hifales y velocidad de crecimiento de las colonias.

Los método evaluados se muestran en la Tabla 3-3 y el procedimiento que se siguió en este experimento se muestra en la Figura 3-4

Tabla 3-3 : Métodos de conservación evaluados para *Pleurotus*.

METODOS DE CONSERVACION DE CEPAS	
Conservación en CZA	Conservación en Agua Estéril
a temperatura ambiente	a temperatura ambiente
en refrigeración a 5 °C	en refrigeración a 5 °C

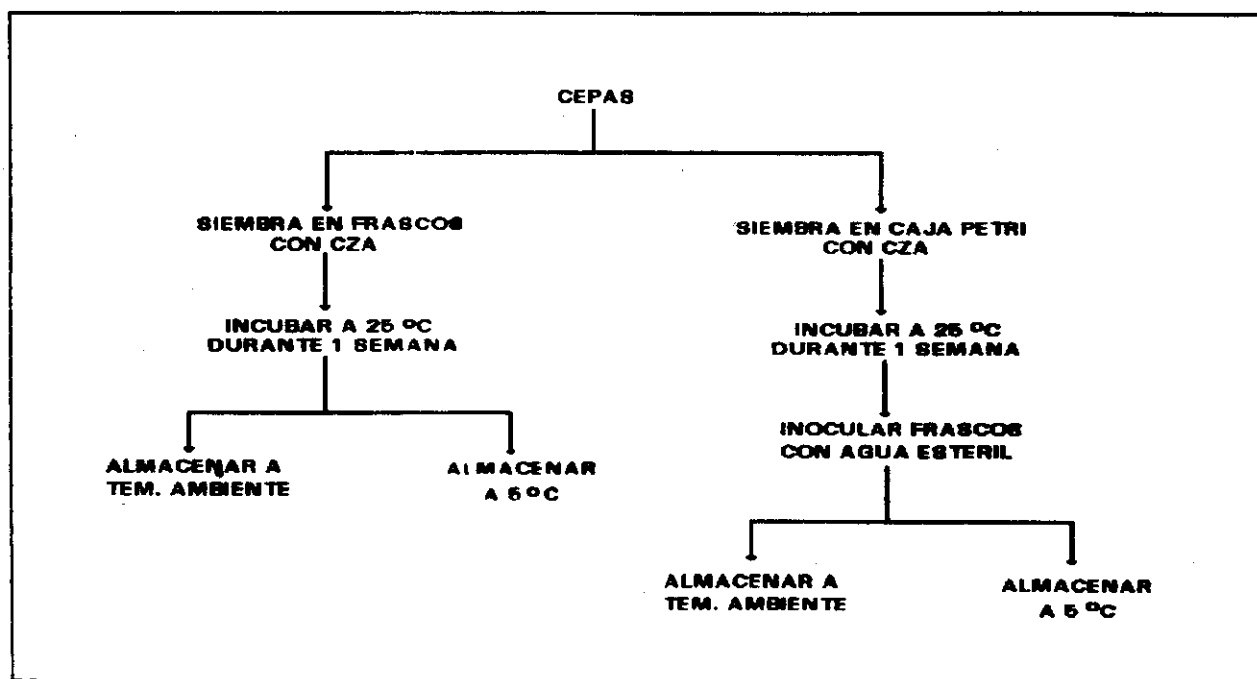


Figura 3-5 : Proceso seguido durante la evaluación de los métodos de conservación de cepas.

Cada 2 meses se tomarón, para cada una de las cepa, un frasco de cada método y se evaluó la viabilidad de la cepas y el crecimiento radial de las colonias.

Conservación en CZA.

Se prepararon frascos de 15 ml con agar inclinado de CZA, posteriormente los frascos fueron inoculados con las cepas de *Pleurotus* y se incubaron a una temperatura de 25 °C. Después de una semana de incubación la mitad de los frascos fueron conservados a temperatura ambiente y la otra mitad en refrigeración.

Agua Estéril.

Se prepararon cajas petri con CZA, posteriormente las cajas fueron inoculados con las cepas de *Pleurotus* y se incubaron a una temperatura de 25 °C. Después de una semana de incubación se tomaron de las cajas 5 discos de 0.5 cm de diámetro que contenían micelio, estos discos fueron inoculados a frascos de 12 ml. que contenían agua estéril. La mitad de los frascos fueron conservados a temperatura ambiente y la otra mitad en refrigeración.

3.11. Métodos analíticos.

3.11.1. Materia seca.

La pérdida de peso seco se evalúa por diferencias de peso. Se toman de 6 a 8 g de muestra (peso fresco) y se colocan en un recipiente de aluminio previamente tarado. La muestra se pone a secar.

en una estufa durante 24 h a 105 °C. Después se coloca en un desecador durante 15 minutos y se pesa nuevamente la muestra. Los resultados se expresan como % de humedad o en % de materia seca. (Saucedo, 1991).

3.11.2. Medición del pH.

La determinación del pH se efectúa directamente sobre la suspensión obtenida con la dilución de la muestra de fermentación (1:10). La medición se realiza con un pHmetro digital. El ajuste del aparato se lleva a cabo mediante la utilización de buffers de pH 4 y pH 7 a 25 °C. (Saucedo, 1991).

3.11.3. Evaluación del crecimiento radial.

- a) Se tomaron cada una de las cepas puras recuperadas y mediante el uso de una espátula estéril se inóculo una caja Petri con medio de cultivo por cepa, empleando para ello un inóculo de 10 mm de diámetro. Dicha caja se incubo a 27 °C y en oscuridad.
- b) Se midió cada 24 horas el diámetro de cada uno de los halos de crecimiento formados en cada caja Petri, la medición del halo se realizó en 2 direcciones (perpendiculares), utilizando para tal acción un Vernier.
- c) Se anotaron los 2 diámetros por halo y se obtuvo un promedio de estos.
- d) Se dejo de medir el crecimiento de los halos hasta que estos estuvieron a punto de tocar el borde de la caja Petri.
- e) Se graficaron los promedios de cada cepa en función del tiempo y se obtuvo mediante un ajuste de datos las pendientes de las curvas, con lo cual se logró conocer la velocidad de crecimiento radial de cada cepa.

3.11.4. Evaluación del crecimiento apical.

- a) Un tubo de vidrio de 160 x 25 cm se le llena hasta $\frac{3}{4}$ partes de su volumen total con granos de sorgo acondicionado (ver 3.4.).
- b) Los tubos así preparados se esterizaron durante 30 min. y, posteriormente, se dejaron enfriar.
- c) Los tubos se inocularon, en su superficie superior, con un trozo de agar con micelio de 2 cm de diámetro, previamente crecido en PDA a 27 °C durante 5 días.
- d) Los tubos se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad.
- e) Cada 48 horas se medían los mm avanzados por el micelio del hongo, a partir del inóculo. la medición del micelio se realizó en 2 direcciones (perpendiculares), utilizando para tal acción un Vernier.
- f) Se graficaron los promedios de cada cepa en función del tiempo y se obtuvo mediante un ajuste de datos las pendientes de las curvas, con lo cuál se logró conocer la velocidad de crecimiento apical de cada cepa.

3.11.5. Expresión de resultados.**Perdida en peso seco :**

$$\%PPS = \frac{\text{Peso seco inicial de la muestra} - \text{Peso seco final de la muestra}}{\text{Peso seco inicial de la muestra}} \times 100$$

Eficiencia biológica :

$$\text{Eficiencia Biologica} = \frac{\text{Peso fresco de los hongos recolectados}}{\text{Peso seco del sustrato}} \times 100$$

Rendimiento ($Y_{x/s}$) :

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso fresco de los hongos recolecta}}{\text{Peso fresco del sustrato}}$$

4. DISCUSION Y RESULTADOS

4.1. Recuperación de cepas.

De las 12 cepas recibidas solo se recuperaron 10 de ellas (ver Tabla 4-1), esto posiblemente debido a que varias de estas cepas tenían más de 6 meses en refrigeración y esto provocó que las cepas perdieran su viabilidad.

Tabla 4-1 : Cepas de *Pleurotus* recuperadas sobre PDA a 25 °C

ESPECIE	REGISTRO	TIEMPO DE REFRIGERACION	RECUPERACION
<i>Pleurotus ostreatus</i>	UAM-1	3 meses	SI
	UAM-2	3 meses	SI
	UAM-3	3 meses	SI
	UAM-4	8 meses	NO
	IE-8	4 meses	SI
<i>Pleurotus sp.</i>	UAM-5	6 meses	SI
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	UAT-1	5 meses	SI
	INRA-1	8 meses	SI
	INRA-2	8 meses	SI
	INRA-3	9 meses	NO
	INRA-4	8 meses	SI
	INRA-5	8 meses	SI

4.2. Selección de cepas en base a su crecimiento radial.

En cuanto a la evaluación del crecimiento de *Pleurotus*, se tiene que cada una de las cepas estudiadas reaccionó de forma diferente frente a los cambios del medio de cultivo y pH. En las

Tablas 4-2 a 4-5, puede observarse la influencia de cada variable sobre la morfología macroscópica de las cepas de *Pleurotus* estudiadas.

En las Tablas 4-2 a 4-5 se observa que el medio de cultivo no tiene efecto sobre el color de las colonias (las colonias siempre fueron de color blanco) y tiene un efecto marcado en el crecimiento de *Pleurotus*, ya que modifica la textura, la densidad y la cantidad de micelio aéreo de las colonias estudiadas. Así, por ejemplo: la cepa UAM-1 presentó colonias blancas, con textura aterciopelada en ADA y CZA y algodonosa en PDA y EMA, siendo la densidad abundante a pH 6.0 y regular a pH 5.5. La cepa UAT-1 presentó colonias blancas con textura algodonosa en EMA, ADA y PDA y aterciopelada en CZA, siendo la densidad abundante a pH 6.0 y regular a pH 5.5.

El efecto del pH es nulo o poco significativo sobre el color y la textura de las colonias de *Pleurotus* y ejerce un efecto positivo sobre la densidad y el crecimiento aéreo del micelio de *Pleurotus*. Esto concuerda con lo reportado en trabajos anteriores (Sobal *et al.*, 1989).

En las Figuras 4-1 a 4-4 se observa la influencia del medio de cultivo y pH sobre la velocidad de crecimiento radial de las diferentes cepas de *Pleurotus* estudiadas (ver 3.6.). Las cepas de *P. ostreatus* presentaron un mayor crecimiento radial sobre Amaranto Dextrosa Agar a pH 6.0. Las cepas IE-8, UAM-2 y UAM-3 presentaron una velocidad de crecimiento radial de 1.5, 1.4 y 1.3 cm/d respectivamente. Mientras que las cepas de *P. cornucopiae* presentaron un mayor crecimiento sobre Extracto de Malta Agar a pH 6.0. Las cepas INRA-4 e INRA-2 observaron una velocidad de crecimiento de 1.1 y 0.9 cm/d respectivamente. De lo anterior se desprende que las cepas de *P. ostreatus* crecen más rápido que las cepas de *P. cornucopiae*.

Tabla 4-2 : Descripción Morfológica de las colonias de *Pleurotus* estudiadas en Papa Dextrosa Agar.

Cepas	pH	Textura	Densidad	Micelio Aéreo
UAM-1	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-2	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-3	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-5	5.5	Aterciopelada	Abundante	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Abundante
IE-8	5.5	Aterciopelada	Abundante	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Regular
UAT-1	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
INRA-1	5.5	Aterciopelada	Regular	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Regular	Escaso
INRA-2	5.5	Aterciopelada	Regular	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Regular	Escaso
INRA-4	5.5	Aterciopelada	Regular	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Escaso
INRA-5	5.5	Aterciopelada	Regular	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Regular	Escaso

Tabla 4-3 : Descripción Morfológica de las colonias de *Pleurotus* estudiadas en Extracto de Malta Agar.

Cepas	pH	Textura	Densidad	Micelio Aéreo
UAM-1	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-2	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-3	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Abundante	Abundante
UAM-5	5.5	Aterciopelada	Abundante	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Abundante
IE-8	5.5	Aterciopelada	Abundante	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Regular
UAT-1	5.5	Lanosa	Regular	Escaso
	6.0	Lanosa	Abundante	Regular
INRA-1	5.5	Lanosa	Regular	Escaso
	6.0	Lanosa	Regular	Regular
INRA-2	5.5	Lanosa	Regular	Escaso
	6.0	Lanosa	Regular	Escaso
INRA-4	5.5	Lanosa	Regular	Escaso
	6.0	Lanosa	Abundante	Escaso
INRA-5	5.5	Lanosa	Regular	Escaso
	6.0	Lanosa	Regular	Escaso

Tabla 4-4 : Descripción Morfológica de las colonias de *Pleurotus* estudiadas en Czapeck Dox Agar.

Cepas	pH	Textura	Densidad	Micelio Aéreo
UAM-1	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
UAM-2	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
UAM-3	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
UAM-5	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
IE-8	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
UAT-1	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
INRA-1	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
INRA-2	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
INRA-4	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso
INRA-5	5.5	Aterciopelada	Escasa	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Escasa	Escaso

Tabla 4-5 : Descripción Morfológica de las colonias de *Pleurotus* estudiadas en Amaranto Dextrosa Agar.

Cepas	pH	Textura	Densidad	Micelio Aéreo
UAM-1	5.5	Aterciopelada	Regular	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Regular
UAM-2	5.5	Aterciopelada	Regular	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Escaso
UAM-3	5.5	Aterciopelada	Regular	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Abundante
UAM-5	5.5	Aterciopelada	Abundante	Regular
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Abundante
IE-8	5.5	Aterciopelada	Abundante	Escaso
	6.0	Aterciopelada	Abundante	Escaso
UAT-1	5.5	Algodonosa	Regular	Regular
	6.0	Algodonosa	Regular	Regular
INRA-1	5.5	Algodonosa	Regular	Abundante
	6.0	Algodonosa	Regular	Abundante
INRA-2	5.5	Lanosa	Regular	Regular
	6.0	Lanosa	Regular	Abundante
INRA-4	5.5	Lanosa	Regular	Regular
	6.0	Lanosa	Regular	Abundante
INRA-5	5.5	Algodonosa	Regular	Escaso
	6.0	Algodonosa	Regular	Abundante

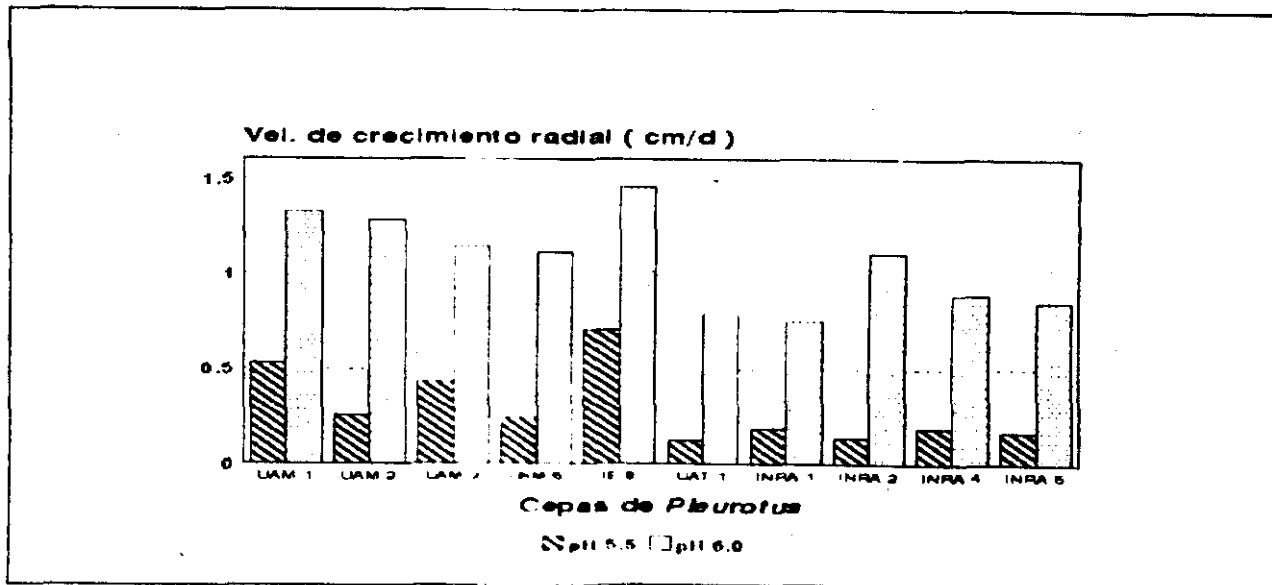


Figura 4-1 : Crecimiento de *Pleurotus* sobre EMA a pH 5.5 y pH 6.0; Incubado a 25 °C durante 7 días en oscuridad.

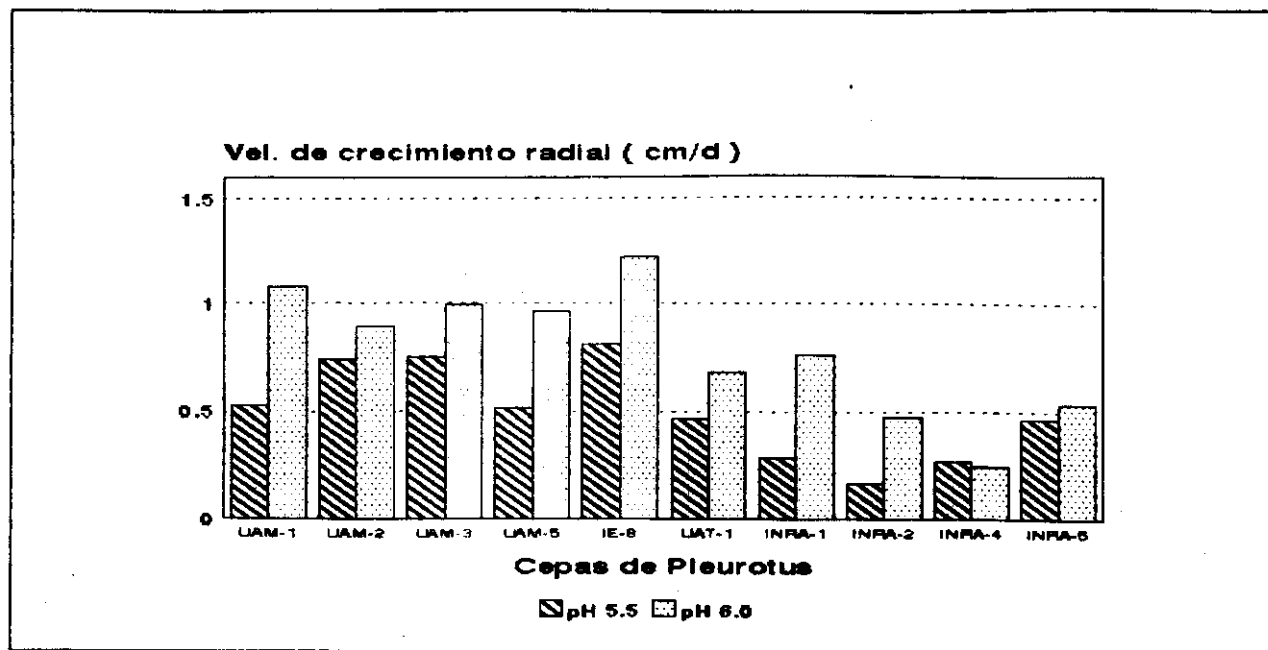


Figura 4-2 : Crecimiento de *Pleurotus* sobre PDA a pH 5.5 y pH 6.0; Incubado a 25 °C durante 7 días en oscuridad.

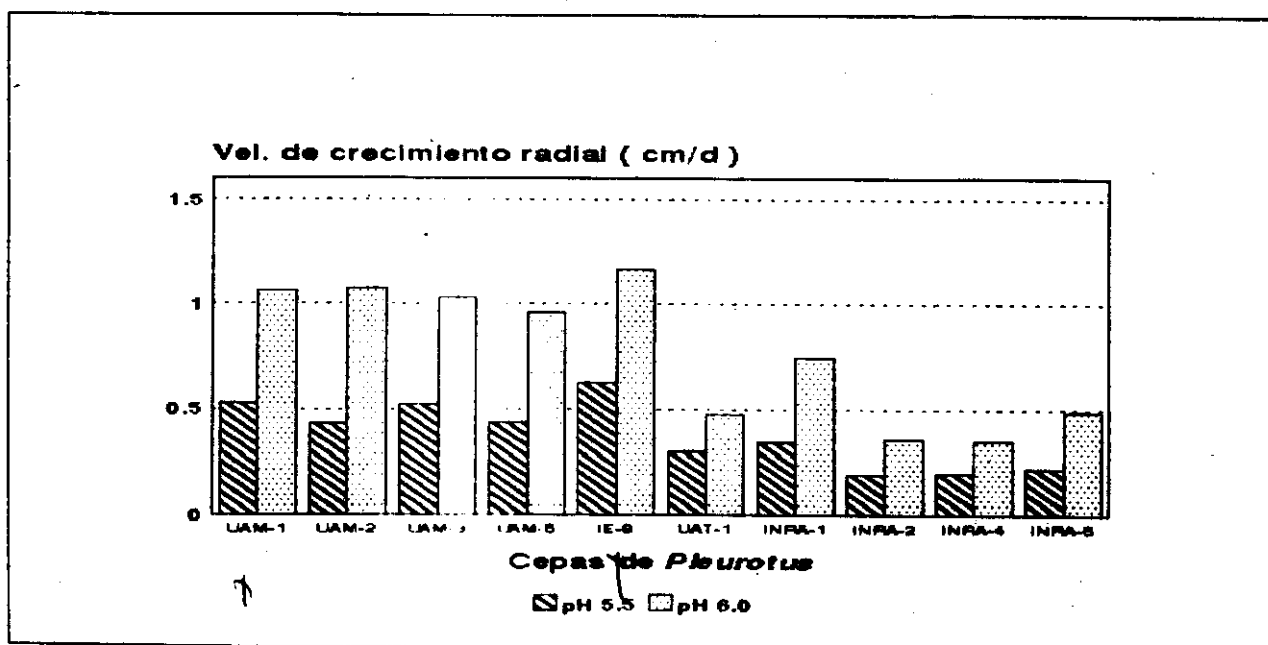


Figura 4-3 : Crecimiento de *Pleurotus* sobre CZA a pH 5.5 y pH 6.0; Incubado a 25 °C durante 7 días en oscuridad.

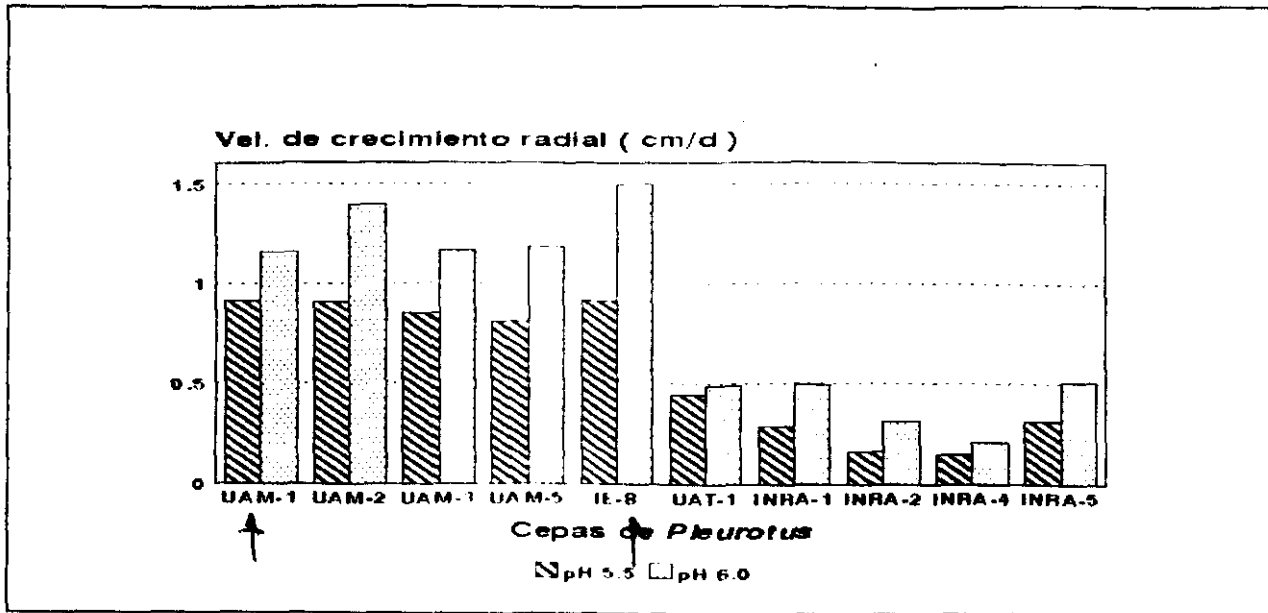


Figura 4-4 : Crecimiento de *Pleurotus* sobre ADA a pH 5.5 y pH 6.0, Incubado a 25 °C durante 7 días en oscuridad.

En las Figuras 4-1 a 4-4 se puede observar que las cepas de *P. ostreatus* tuvieron un crecimiento mayor cuando fueron cultivadas sobre EMA y ADA, mientras que las cepas de *P. cornucopiae* crecieron más rápido sobre PDA y EMA. Lo anterior nos conduce a que el medio de cultivo ADA es adecuado para la propagación de *P. ostreatus*, ya que este es barato y fácil de elaborar. Para la propagación de *P. cornucopiae* se propone el medio de PDA, ya que este el hongo crece a la misma velocidad que cuando se cultiva sobre EMA, pero este último tiene la desventaja de que el hongo crece muy compacto lo que dificulta su manejo en la elaboración de inóculo del hongo.

La preparación del medio de cultivo a base de amaranto es sencilla y la disponibilidad del amaranto durante el año se presenta con ligeras variaciones. El precio de elaboración aunado a su rendimiento hacen que este medio sea económicamente favorable para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

4.3. Evaluación de diferentes métodos de producción de inóculo primario.

Para la realización de este estudio se manejaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus*, la IE-8 y la UAM-1; las cuales se seleccionaron por su mayor velocidad de crecimiento radial (ver figuras 4-1 a 4-4).

Primero se elaboró el inóculo primario (ver 3.7.) por cada uno de los diferentes métodos de producción estudiados (sólido, en suspensión y líquido), posteriormente el inóculo se sembró sobre granos de sorgo y se determinaron las velocidades de crecimiento apical (ver 3.10.4.) de cada inóculo.

La cinética de crecimiento apical de los diferentes inóculos primarios (sólido, líquido y en suspensión) se muestra en las figuras 4-5 y 4-6, en las que se observa que el inóculo líquido invade más rápidamente el sustrato y el inóculo más lento fue el inóculo sólido.

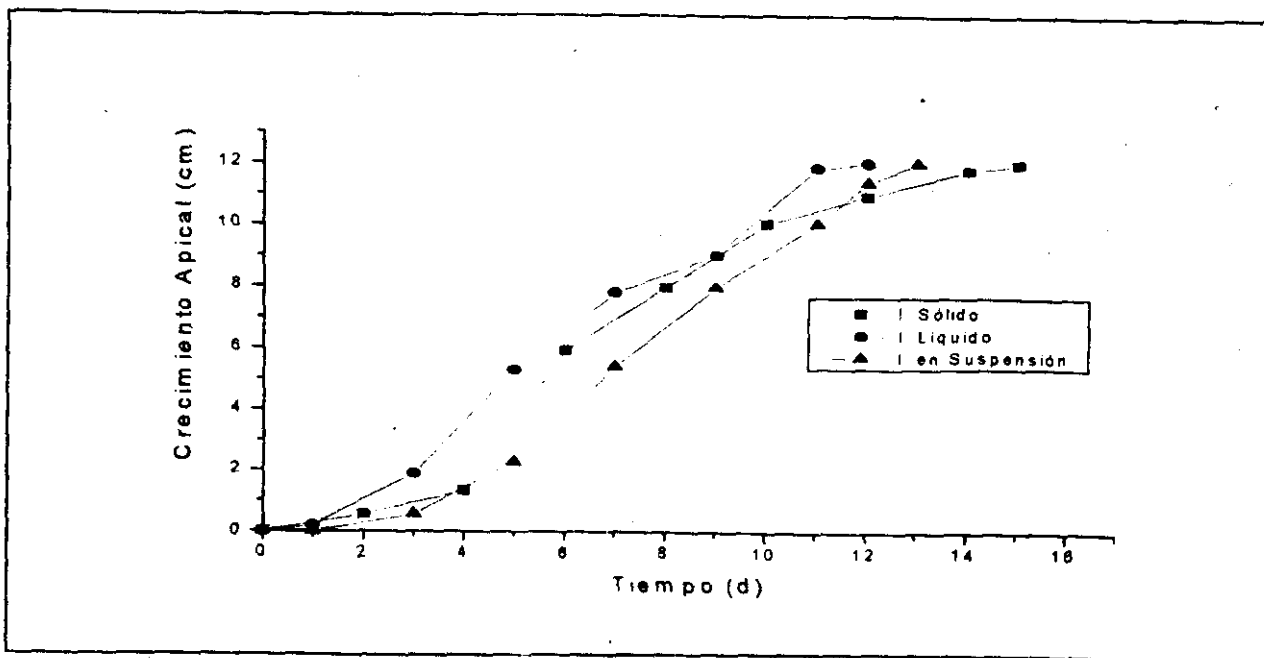


Figura 4-5 : Cinética de crecimiento apical de la cepa EI-8 (*P. Ostreatus*) en los diferentes métodos de producción de inóculo primario (sólido, líquido y en suspensión).

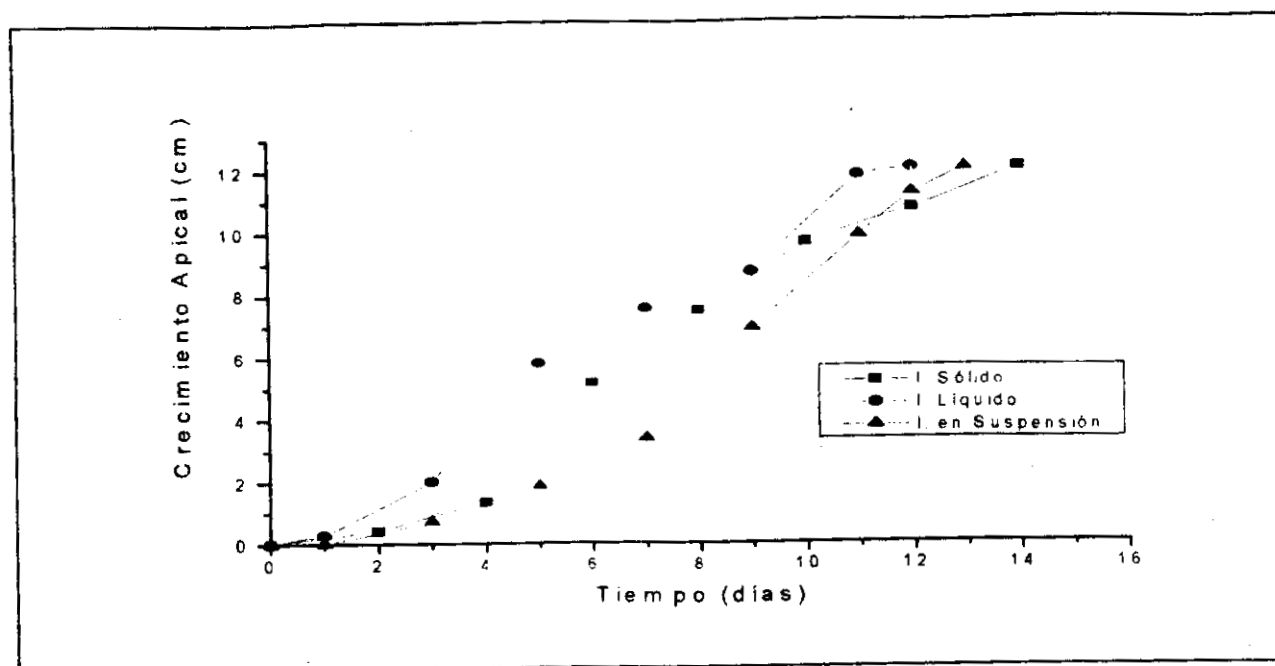


Figura 4-6 : Cinética de crecimiento apical de la cepa UAM-1 (*P. Ostreatus*) en los diferentes métodos de producción de inóculo primario (sólido líquido y en suspensión).

En las figuras 4-5 y 4-6 se nota que la diferencia en el tiempo de invasión al sustrato se debe principalmente a la etapa de adaptación del inóculo al sustrato. Etapa que se da durante los 3 primeros días.

Una vez realizada la cinética de crecimiento apical se pasó a calcular la velocidad de crecimiento de las cepas en los diferentes métodos de producción de inóculo (ver Figura 4-7). Además se realizaron observaciones sobre el crecimiento del hongo en el sustrato. (ver Tablas 4-6 y 4-7). Esto con el fin de ir seleccionando el método de producción de inóculo más adecuado.

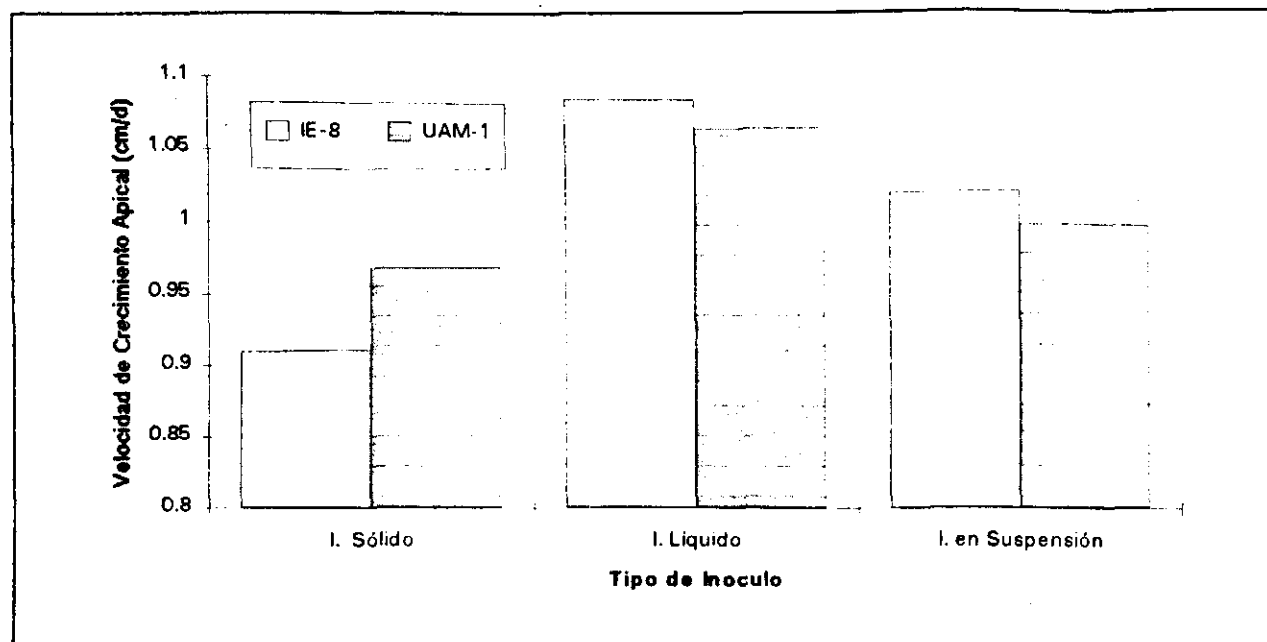


Figura 4-7 : Velocidades de crecimiento apical presentadas por las cepas IE-8 y UAM-1 (*P. Ostreatus*) en los diferentes métodos de producción de inóculo primario estudiados (sólido, líquido y en suspensión).

El inóculo líquido invade más rápido el sustrato, esto puede ser debido a que la fase de adaptación del hongo al sustrato se ve reducida al adicionar, junto con el inóculo, medio de cultivo. El inóculo en suspensión es el segundo en invadir más rápido el sustrato y por último el inóculo sólido (ver Tablas 4-6 y 4-7), esto puede ser debido a que el inóculo en suspensión se distribuye de una manera más homogénea sobre el sustrato que el inóculo sólido.

En las Tablas 4-6 y 4-7 se puede observar que las diferencias entre los inóculos no sólo radica en las velocidades de crecimiento apical, si no que el hongo desarrollado sobre el sorgo crece morfológicamente diferente. Así por ejemplo: el micelio obtenido del inóculo sólido es fuerte, denso y compacto, mientras que el obtenido mediante el inóculo en suspensión es ralo y poco denso.

DISCUSION Y RESULTADOS

Tabla 4-6 : Descripción del crecimiento apical de la cepa IE-8 sobre granos de sorgo, Durante la evaluación de los diferentes métodos de producción de inóculo primario.

Método Evaluados	Crecimiento apical (cm/d)	Descripción Morfológica		Observaciones
		Densidad	Textura	
I. Sólido	0.9098	alta	lanosa	Micelio de color blanco de apariencia bastante fuerte. Se presento crecimiento descendente
I. Líquido	1.0845	Regular	algodonosa	Micelio de color blanco. El micelio. Se presento crecimiento ascendente.
I. Suspensión	1.0188	Baja	algodonosa	El hongo creció de una forma muy rala, daba la apariencia de ser un micelio muy débil. Micelio de color blanco. Se presento crecimiento ascendente.

Tabla 4-7 : Descripción del crecimiento apical de la cepa UAM-1 sobre granos de sorgo, Durante la evaluación de los diferentes métodos de producción de inóculo primario.

Método Evaluados	Crecimiento apical (cm/d)	Descripción Morfológica		Observaciones
		Densidad	Textura	
I. Sólido	0.9680	alta	lanosa	Micelio de color blanco de apariencia bastante fuerte. Se presento crecimiento descendente.
I. Líquido	1.0643	Regular	algodonosa	Micelio de color blanco. El micelio. Se presento crecimiento ascendente.
I. Suspensión	0.9951	Baja	algodonosa	El hongo creció de una forma muy rala, daba la apariencia de ser un micelio muy débil. Micelio de color blanco. Se presento crecimiento ascendente.

En las Tablas 4-6 y 4-7 se muestra que el crecimiento del inóculo sólido fue descendente, mientras que los otros 2 inóculos tuvieron un crecimiento ascendente. Esto se debió a que el inóculo líquido y en suspensión, una vez que fueron sembrados, se escurrieron hasta el fondo del recipiente.

Al comparar el crecimiento de sobre granos de sorgo de las cepas IE-8 y UAM-1 se puede observar que ambas cepas se comportan de una manera muy similar, ya que las velocidades de crecimiento en cada uno de los diferentes métodos de producción de inóculo primario y la descripción morfológica del micelio obtenido en cada uno de ellos es muy similar, por lo que hasta ahora no se pudo seleccionar una de las cepas y seguir trabajando con ella; así que prosiguió trabajando con ambas cepas, hasta que se pudo seleccionar la más adecuada para la producción de setas comestibles.

4.4. Efecto del modo de producción del inóculo primario sobre la elaboración de inóculo secundario.

Una vez que se obtuvo el inóculo primario por los diferentes métodos de producción, este se utilizó para sembrar el sustrato secundario (granos de sorgo), a este último se le determinó su velocidad de crecimiento apical, con el fin de observar el efecto del origen del inóculo primario sobre la elaboración del inóculo secundario (ver Figuras 4-8 y 4-9).

El tamaño del inóculo primario que se utilizó para sembrar el sustrato secundario correspondió al 10 % en peso de este último. La inoculación se realizó en la superficie superior del sustrato, tal y como se explica en el punto 3.10.4.

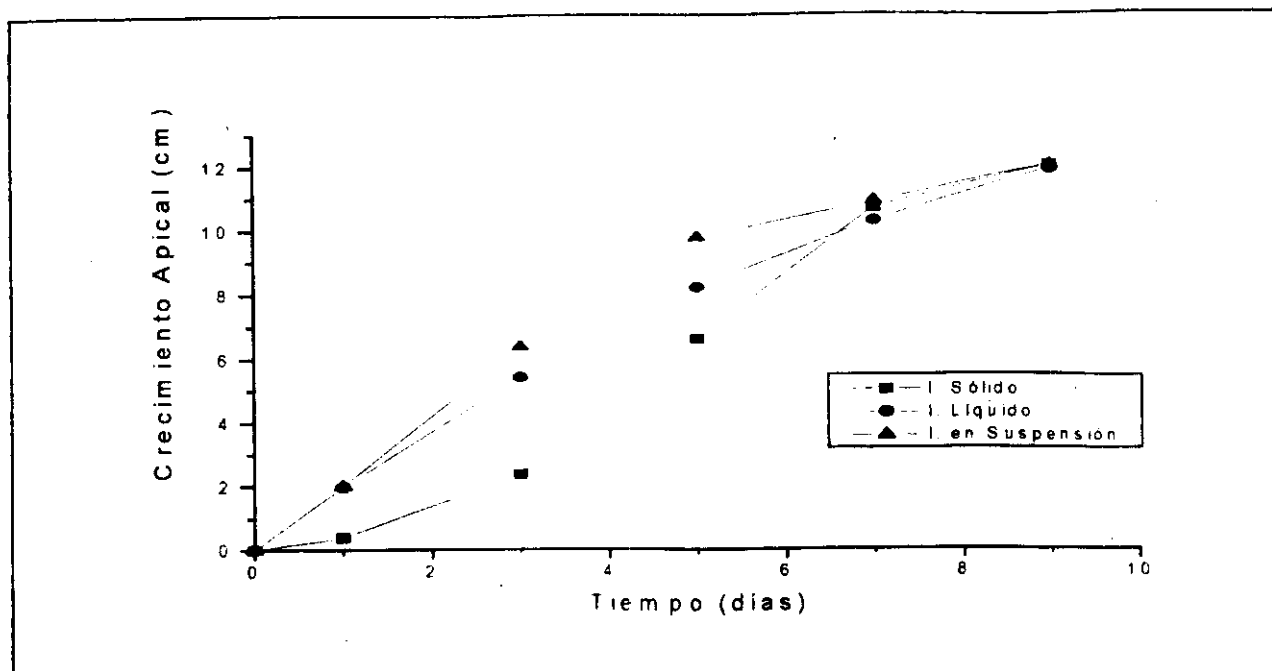


Figura 4-8 : Crecimiento apical de la cepa IE-8 en la elaboración de inóculo secundario. El inóculo primario proviene de los diferentes métodos evaluados (sólido, líquido y en suspensión).

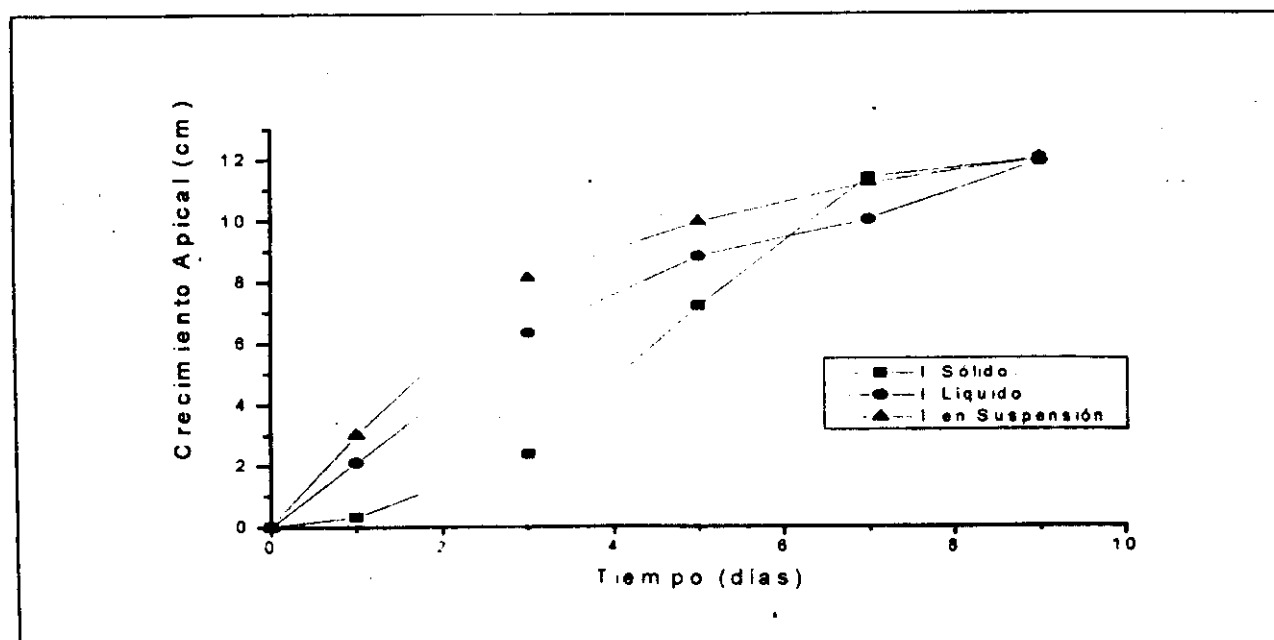


Figura 4-9 : Crecimiento apical de la cepa UAM-1 en la elaboración de inóculo secundario. El inóculo primario proviene de los diferentes métodos evaluados (sólido, líquido y en suspensión).

En las figuras 4-8 y 4-9 se observa que sin importar el origen del inóculo primario (sólido, líquido o en suspensión), el tiempo de elaboración del inóculo secundario es el mismo, además de que no se presentan diferencias morfológicas entre los micelios obtenidos (ver Tabla 4-8).

Una vez evaluados los métodos de producción de inóculo en base a su velocidad de crecimiento apical, se paso a determinar cual es la productividad de cada uno de los métodos evaluados (ver Figuras 4-10 a 4-12 y Tabla 4-9).

Tabla 4-8 : Observaciones realizadas sobre el micelio obtenido en la elaboración del inóculo secundario. El inóculo primario proviene de los diferentes métodos de producción estudiados (sólido, líquido y en suspensión).

Método evaluado	Velocidad de Crecimiento Apical		Observaciones
	EL-8 (cm/d)	UAM-1 (cm/d)	
I. Sólido	1.476	1.522	Crecimiento abundante de textura algodonosa. Micelio de color blanco
I. Líquido	1.327	1.303	Crecimiento abundante de textura algodonosa. Micelio de color blanco
I. Suspensión	1.368	1.301	Crecimiento abundante de textura algodonosa. Micelio de color blanco

se utilizo para sembrar 10 frascos secundarios por lo que al final obtenemos 88 Kg de inóculo secundario, listo para ser utilizado.

$$\frac{44 \text{ porciones}}{\text{caja petri}} \times \frac{1 \text{ frasco } 1^{\text{o}}}{2 \text{ porciones}} \times \frac{10 \text{ frascos } 2^{\text{do}}}{\text{frasco } 1^{\text{o}}} \times \frac{0.4 \text{ Kg de inoculo}}{\text{frasco } 2^{\text{do}}} = 88 \frac{\text{Kg de inocul}}{\text{caja petri}}$$

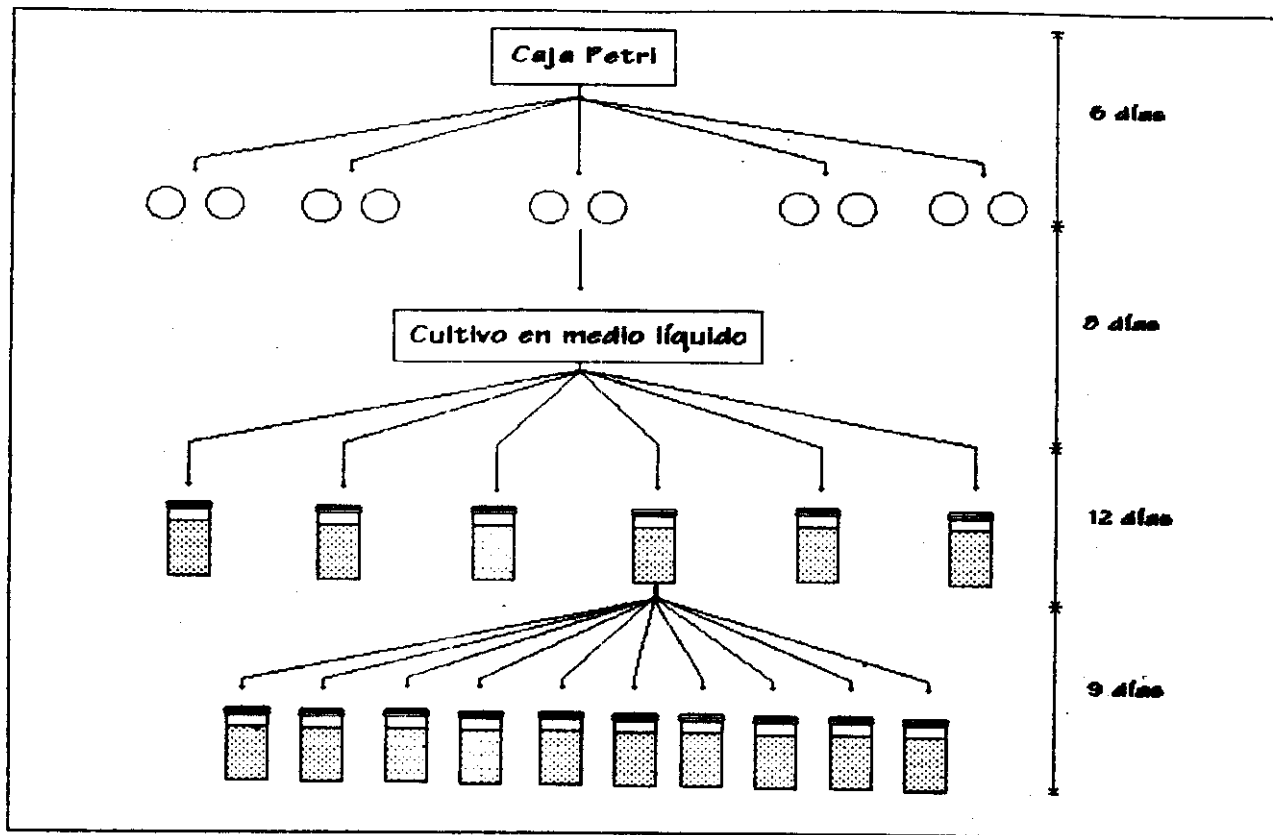


Figura 4-11 : Producción de inóculo por el método líquido.

Inóculo Líquido :

Se parte de una caja Petri de 10 cm de diámetro (78.54 cm²), de la cual se obtienen 44 trozos de 1.5 cm de diámetro (1.77 cm²). De cada 2 porciones se obtienen 200 ml de medio de cultivo, de esta forma obtenemos 4.4 litros de medio. Para inocular frascos con 0.4 Kg de sustrato (en peso fresco) se requieren 10 ml de medio de cultivo y de esta forma tenemos 176 Kg de sustrato

primario. Cada frasco primario se utilizó para sembrar 10 frascos secundarios por lo que al final obtenemos 1760 Kg de sustrato secundario listo para ser utilizado.

$$\frac{44 \text{ porciones}}{\text{caja petri}} \times \frac{200 \text{ ml de medio}}{2 \text{ porciones}} \times \frac{1 \text{ frasco 1o.}}{10 \text{ ml de medio}} \times \frac{10 \text{ frascos 2do.}}{\text{frasco 1o.}} \times \frac{0.4 \text{ Kg de inculo}}{\text{frasco 2do.}} = \frac{1760 \text{ Kg de incul}}{\text{caja petri}}$$

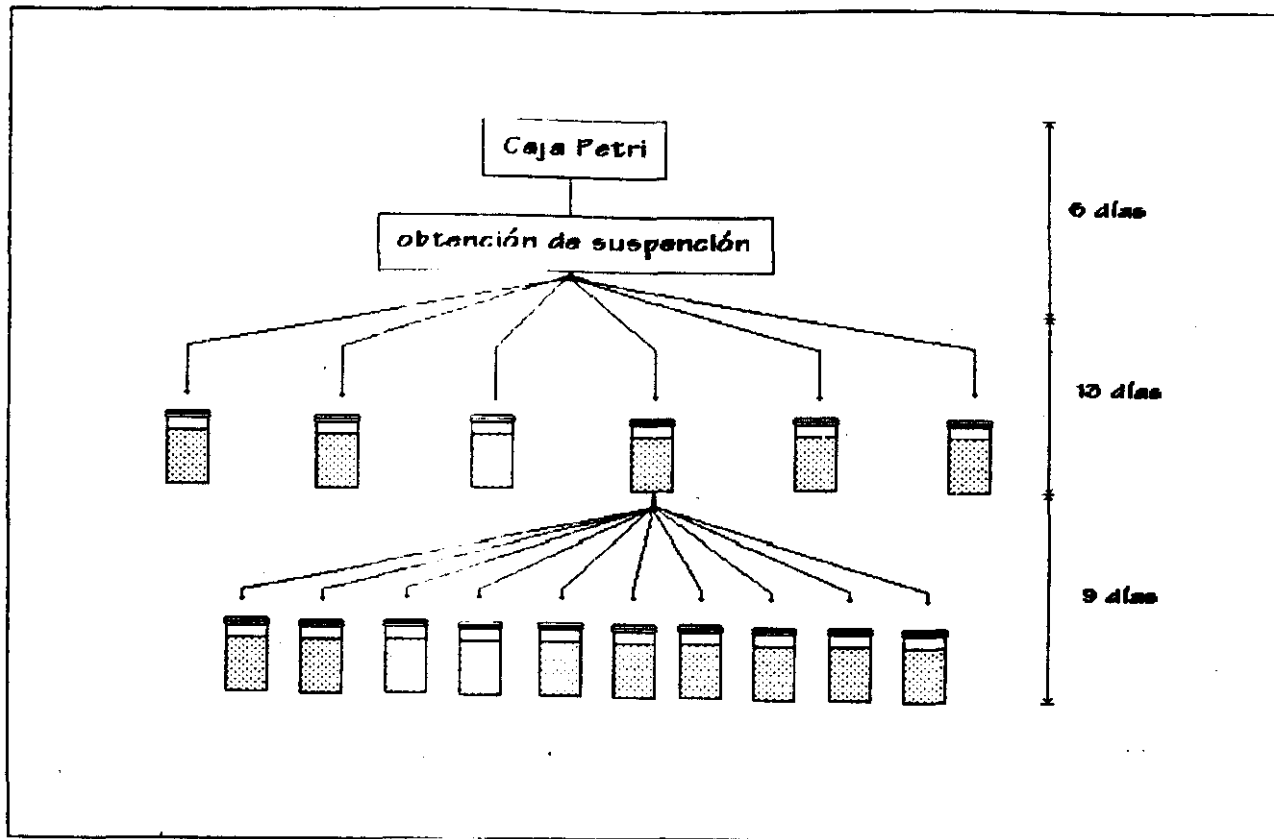


Figura 4-12 : Producción de inóculo por el método en suspensión.

Inóculo en Suspensión :

Se parte de una caja Petri de 10 cm de diametro (78.54 cm²) de la cual se obtienen 150 ml de suspensión micelial, 5 ml de la misma sirven para inocular frascos con 400 g de sustrato (en peso fresco), de esta forma se obtienen 12 Kg de sustrato primario. Cada frasco primario fue utilizado

para inocular 10 frascos secundarios, por lo que al final obtenemos 120 Kg de sustrato secundario listo para ser utilizado.

$$\frac{150 \text{ ml de suspensión}}{\text{caja petri}} \times \frac{1 \text{ frasco 1.º}}{5 \text{ ml de suspensión}} \times \frac{10 \text{ frascos 2.º}}{\text{frasco 1.º}} \times \frac{0.4 \text{ Kg de inóculo}}{\text{frasco 2.º}} = \frac{120 \text{ Kg de inóculo}}{\text{caja petri}}$$

Tabla 4-9 : Rendimientos de la producción de inóculo, por los diferentes métodos estudiados.

Tipo de Inóculo	Producción de inóculo (Kg/caja petri)	Tiempo de elaboración del inóculo (días)	Productividad (Kg/d.caja petri)
Sólido	88	30	2.93
Líquido	1760	35	50.28
Suspensión	120	28	4.28

En la tabla 4-9 se muestra que el inóculo líquido es el método que tiene una mayor productividad, siguiendo en orden descendente, el inóculo sólido y el inóculo en suspensión.

Por lo anteriormente expuesto, tenemos que el método de producción de inóculo más adecuado para un nivel de planta piloto, es inóculo líquido, ya que es un método fácil de seguir y el inóculo secundario que se obtiene es de consistencia fuerte, además de que se obtiene una gran cantidad de inóculo en un lapso de tiempo corto

4.6. Fructificación de cepas seleccionadas.

Se estudiaron las cepas IE-8 y UAM-1, ambas son *Pleurotus ostreatus*. Ambas cepas mostraron un buen crecimiento micelial.

El inóculo secundario obtenido se anteriores ensayos se utilizó para inocular "pastelitos" de 400 g de paja (peso fresco), cuya humedad era del 75 %. Los pastelitos inoculados se colocaron en una cámara de fructificación.

La producción de los cuerpos fructíferos de las cepas cultivadas en paja de avena, se muestra en la tabla 4-10; En dicha tabla se presentan los datos promedio de producción, eficiencia biológica y rendimientos de las cepas cultivadas.

Tabla 4-10 : Producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sobre paja de avena.

Cepa	Cosecha 1 (g de hongo)	Cosecha 2 (g de hongo)	Total (g de hongo)	Eficiencia Biológica	Rendimiento ^b
IE-8	35.76	15.11	50.87	78.26	7.83
UAM-1	35.25	24.54	59.78	93.41	9.19

a = (Peso fresco de cuerpos fructíferos / peso seco del sustrato) * 100

b = Peso seco de cuerpos fructíferos / peso seco del sustrato.

Los "pastelitos" se mantuvieron en la cámara de fructificación hasta obtener el máximo de cosechas posibles. Donde la 1ra. cosecha fue la más elevada en peso.

La UAM-1 tiene la mayor producción de cuerpos fructíferos con 59.78 g durante 2 cosechas, logrando una eficiencia biológica de 93.41 %. La menor producción se registró con la cepa IE-8 con una producción de 50.87 g de hongos en 2 cosechas, alcanzando una eficiencia biológica de 78.26 %.

La aparición de los primordios de fructificación varió entre 20 y 25 días, después de la inoculación del sustrato. Por su parte el desarrollo de los cuerpos fructíferos tomó lugar entre 5 y 10 días después de la aparición de los primordios de fructificación.

Con los datos anteriores se demuestra que la cepa UAM-1 es una cepa susceptible de ser utilizada en el cultivo comercial de *Pleurotus* sobre paja de avena.

4.7. Conservación de cepas.

Este estudio tiene como objetivo evaluar los métodos de conservación de cepas susceptibles de ser utilizados a nivel comercial. Los métodos que se evaluaron se listan en la Tabla 3-3. Esto se hizo a través de determinar la viabilidad de la cepas, su capacidad para formar agregaciones hifales y velocidad de crecimiento de las colonias.

Las cepas conservadas se sembraron cada 2 meses sobre Extracto de Malta Agar (EMA), se calculó la velocidad de crecimiento radial promedio y se estudio la morfología de las colonias recuperadas (ver. Tablas 4-11 a 4-14).

Tabla 4-11 : Descripción macroscópica de las colonias de la cepa IE-8, después de haber sido conservada a diferentes tiempos.

Tiempo (meses)	Método de Conservación	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo
0	Conservación	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
2	en CZA a	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
4	temperatura	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
6	ambiente	Blanco	Aterciopelada	Abundante	Regular
0	Conservación	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
2	en CZA	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
4	en	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
6	refrigeración	Blanco	Aterciopelada	Abundante	Abundante
0	Conservación	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
2	en agua estéril	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
4	a temperatura	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
6	ambiente	Blanco	Aterciopelada	Abundante	Regular
0	Conservación	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
2	en agua estéril	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
4	en	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante
6	refrigeración	Blanco	Aterciopelado	Abundante	Abundante.

Forma

Tabla 4-12. Descripción macroscópica de las colonias de la cepa UAM-1, después de haber sido conservada a diferentes tiempos.

Tiempo (meses)	Método de Conservación	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo
0	Conservación	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
2	en CZA a	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
4	temperatura	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
6	ambiente	Blanco	Algodonoso	Abundante	Regular
0	Conservación	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
2	en CZA	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
4	en	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
6	Refrigeración	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
0	Conservación	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
2	en agua estéril	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
4	a temperatura	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
6	ambiente	Blanco	Algodonoso	Abundante	Regular
0	Conservación	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
2	en agua estéril	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
4	en	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante
6	refrigeración	Blanco	Algodonoso	Abundante	Abundante

En las tablas anteriores se nota que las cepas estudiadas no muestran alteraciones en la morfología de sus colonias después de 4 meses de conservación. A los 6 meses las cepas conservadas a temperatura ambiente presentan una variación en su morfología, lo cual concuerda con la disminución en la velocidad de crecimiento de las cepas recuperadas (ver Tablas 4-13 y 4-14).

Tabla 4-13. Crecimiento de las colonias de la cepa IE-8, después de haber sido conservada hasta por 6 meses.

METODOS DE CONSERVACION DE <i>Pleurotus ostreatus</i> (IE-8)					
Tiempo (meses)	Conservación en CZA		Conservación en Agua		Observaciones
	Refrigeración	T. Ambiente	Refrigeración	T. Ambiente	
	Velocidad (cm/d)		Velocidad (cm/d)		
0	1.45	1.45	1.45	1.45	
2	1.38	1.36	1.42	1.40	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.
4	1.41	1.33	1.40	1.34	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.
6	1.38	1.16	1.35	1.21	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.

Tabla 4-14. Crecimiento de las colonias de la cepa UAM-1, después de haber sido conservada hasta por 6 meses.

METODOS DE CONSERVACION DE <i>Pleurotus ostreatus</i> (UAM-1)					
Tiempo (meses)	Conservación en CZA		Conservación en Agua		Observaciones
	Refrigeración	T. Ambiente	Refrigeración	T. Ambiente	
	Velocidad (cm/d)		Velocidad (cm/d)		
0	1.32	1.32	1.32	1.32	
2	1.28	1.30	1.29	1.32	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.
4	1.26	1.24	1.25	1.26	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.
6	1.25	1.10	1.25	1.09	Aparición de manchas cafés sobre el micelio crecido en CZA a temperatura ambiente.

En las tablas 4-13 y 4-14 se muestra que la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas no se afecta a 4 meses de conservación, independientemente del método utilizado. Sin embargo después de 6 meses las cepas que se conservaban a temperatura ambiente presentaron manchas amarilla sobre su micelio. Estas manchas se relacionan con el envejecimiento de las cepas, ya que las manchas son ác. orgánicos secretados por el hongo y que son tóxicos para él mismo. (Guzmán *et al*, 1993). Mientras que los métodos de conservación en refrigeración no presentan alteración aparente dentro de este mismo lapso de tiempo.

La declinación en las características deseables de una cepa, se ha atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma. Esto puede ser causado por la carencia y el agotamiento de los nutrientes en el medio, por la acumulación de secreciones tóxicas propias del

metabolismo del hongo, por la alteración del pH en el medio y por la disminución de la concentración del O₂ y la consecuente acumulación de CO₂.

Para evitar lo anterior, las cepas se deben resembrar periódicamente a nuevos recipientes, una vez que se ha cubierto completamente el medio en el que se encuentra. El tiempo que puede permanecer una cepa sin transferir, con los métodos estudiados, puede ser de hasta 6 meses en refrigeración.

4.8. Identificación de problemas en el cultivo de *Pleurotus*.

Durante la elaboración del inóculo se presentaron diversos problemas. En la Tabla 4-15 se muestran los problemas identificados y las posibles causas que lo ocasionan.

Tabla 4-15. Problemas presentados durante la elaboración de inóculo de *Pleurotus*.

PROBLEMA	CAUSAS
Los frascos o bolsas se rompían al abrirse	La presión de la autoclave se bajo rápidamente.
Los granos de los frascos no se separaban entre si	La humedad de los granos era alta.
Se presento poco ó nulo crecimiento del micelio sobre el sustrato	El sustrato no estaba lo suficientemente húmedo o estaba muy caliente cuando se inoculó con el hongo.
Contaminación del sustrato despues de ser inoculado	Deficiencias en la esterilización o en el manejo del material en proceso.

Las contaminaciones son el resultado de una mala esterilización o de deficiencias en el manejo o en la siembra del material en proceso (Guzmán, et al. 1993).

Durante la incubación son muy frecuentes las contaminaciones, estas pueden deberse a las deficiencias en la limpieza de los locales de incubación o a fallas en en tapado de los frascos, lo que permite la entrada de contaminantes al sustrato

La contaminación presente en los medio de cultivo y sustratos se debió a diversos hongos (*Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*), los cuales compiten con *Pleurotus* por los nutrientes.

Las contaminaciones se disminuyen notablemente si se pone esmerado empeño en trabajar bajo condiciones de asepsia rigurosa y si se verifica que el tratamiento de esterilización del sustrato sea efectuado adecuadamente. También el personal que esta en contacto directo con el material en proceso debe observar condiciones estrictas de limpieza.

5. CONCLUSIONES

5.1. Selección de cepas en base a su crecimiento radial.

En base a los resultados obtenidos, puede decirse que el medio de cultivo (PDA, EMA, CZA y ADA) no afectó el color de las cepas de *Pleurotus* y tuvo un efecto importante sobre la textura, densidad, crecimiento aéreo y velocidad de crecimiento de las cepas, aunque todas las cepas reaccionaron de forma diferente frente al cambio del medio de cultivo. El pH tuvo un efecto nulo sobre el color y la textura de las colonias y ejerce un efecto positivo sobre la densidad, el crecimiento aéreo del micelio y la velocidad de crecimiento, cuando su valor es de 6.0.

El crecimiento más rápido de las cepas se observó para la cepa de *Pleurotus ostreatus* IE-8 crecida sobre Amaranto Dextrosa Agar y a un pH de 6.0. La velocidad de crecimiento fue del orden de 1.5 cm/día; esta velocidad radial es 23 % más rápida que la velocidad de crecimiento presentada por la cepa más rápida de *Pleurotus cornucopiae*, INRA-2, que tuvo una velocidad de 1.1 cm/d sobre Papa Dextrosa Agar a un pH de 6.0

De este estudio se desprende que las cepas de *Pleurotus ostreatus* crecen más rápido que las cepas de *Pleurotus cornucopiae*, haciéndolas potencialmente útiles en la elaboración de inóculo de setas comestibles. Además se pudo establecer que el medio de cultivo de ADA es adecuado para la propagación de *P. ostreatus*.

Debido a los resultados antes mencionados, se seleccionaron 2 cepas de *Pleurotus*, debido a su rápido crecimiento en los medios de cultivo probados. Esperando que este comportamiento se mantenga cuando las cepas se hagan crecer sobre algún sustrato sólido.

5.2. Fructificación de cepas seleccionadas.

En el cultivo de las cepas de *Pleurotus ostreatus* (cepas: IE-8 y UAM-1) se encontró que la cepa UAM-1 es una cepa adecuada para la producción comercial de hongos sobre paja de avena, ya que esta alcanza una Eficiencia biológica de 93.41, que es 19 % mayor que la presentada por la cepa IE-8 (78.26 %).

Con los datos anteriores muestra que la cepa UAM-1 es una cepa susceptible de ser utilizada en el cultivo comercial de *Pleurotus* sobre paja de avena.

5.3. Evaluación de diferentes métodos de producción de inóculo.

- * Para la cepa IE-8, se obtuvieron velocidades de crecimiento apical de 1.08, 1.02 y 0.91 cm/d para los inóculos líquido, en suspensión y sólido, respectivamente.
- * Para la cepa UAM-1, se obtuvieron velocidades de crecimiento apical de 1.06, 0.99 y 0.97 cm/d para los inóculos líquido, en suspensión y sólido, respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que la velocidad de crecimiento apical es un parámetro adecuado para evaluar el crecimiento de un microorganismo sobre un sustrato dado y de esta forma evaluar el efecto que tiene el tipo de inóculo sobre la producción de micelio del hongo.

Las diferencias entre los inóculos no solo radica en las velocidades de crecimiento apical, si no que el hongo desarrollado sobre el sorgo ~~crece morfológicamente diferente~~. Así por ejemplo: el micelio obtenido del inóculo sólido es denso y compacto, mientras que el obtenido mediante el inóculo en suspensión es ralo y poco denso.

Durante la elaboración del inóculo secundario se observó que sin importar el origen del inóculo primario (sólido, líquido o en suspensión), el tiempo de elaboración del inóculo secundario es el mismo, además de que no se presentan diferencias morfológicas entre los micelios obtenidos (ver Tabla 4-8). Conjuntamente existe una disminución en el tiempo de producción del inóculo secundario con respecto al inóculo primario. Esto debido a que el hongo se encuentra adaptado al sustrato en el cual se esta propagando. //

El método de mayor productividad fue el inóculo líquido (50.28 Kg de inóculo/caja petri.d), siguiendo en importancia el inóculo en suspensión (4.28 Kg de inóculo/caja petri.d) y finalmente el inóculo sólido (2.93 Kg de inóculo/caja petri.d)

Por lo anteriormente expuesto, tenemos que el método de producción de inóculo más adecuado para un nivel de planta piloto, el inóculo líquido, ya que es un método fácil de seguir y el inóculo que se obtiene es de consistencia fuerte, además de que se obtiene una gran cantidad de inóculo en un lapso de tiempo corto.

5.4. Conservación de cepas.

Después de 4 meses de conservación no existen diferencias entre los métodos de conservación evaluados. Después de 6 meses las cepas conservadas a temperatura ambiente empiezan a envejecer y a presentar diferencias morfológicas con el resto de las cepas conservadas.

Para evitar lo anterior, las cepas se deben resembrar periódicamente a nuevos recipientes, una vez que se ha cubierto completamente el medio en el que se encuentra. El tiempo que puede permanecer una cepa sin transferir con los métodos estudiados, puede ser de hasta 6 meses en refrigeración y de 4 meses a temperatura ambiente.

REFERENCIAS

1. Ayala, N., Carrillo, M., Bernal, R. (1991). Comportamiento de una cepa extranjera de *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo semisintético en contraste con cuatro medios comerciales. In : Memorias del IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, Tlax., 14-18 de octubre de 1991. pp : 92.
2. Backus J.W.M., Van Roestel A.J.J., Van Griensven J.L.V. (1991). Development of an expert system for the cultivation of mushrooms and validation of the prototype. In: Science and cultivation of edible fungi. Maher (Ed). Balkema, Rotterdam. pp: 791-798.
3. Bano Z., Rajarathnam S. (1989) *Pleurotus* mushrooms as a nutritious food. In: Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods. Chang S. T. and Quimio T. H. (Eds). The Chinese University Press pp 47-61.
4. Bano Z., Rajarathnam S., Nagaraja N. (1987) Some important studies on *Pleurotus* Mushroom technology. In: Indian mushroom science : II. Proceedings of the international conference on science and cultivation technology of edible fungi. Kaul T. N. and Kapur B. M. (eds). pp: 53-64.
5. García Rollan, Mariano (1982) Cultivo Industrial de *Pleurotus ostreatus*. In: " Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ". Madrid, España.
6. García Rollan, Mariano (1985) Nuevas Técnicas del Cultivo del *Pleurotus ostreatus*. In: " Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ". Madrid, España.
7. Ghosh, N. Chakravarty, D. K. (1990) Predictive analysis of the protein quality of *Pleurotus citrinopileatus*. J. Fd. Sci. Technol., 27(4) 326-238.

8. Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Davalos, L. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Ed. Instituto Politecnico Nacional, México.
9. Helvi Heinonen-Tanski. Maintenance Methods for Ectomycorrhizal Fungi. Agriculture, Ecosystems and Environment, 28(1989). 171-174.
10. Hirata-Twasaky, R. J. (1986) Obtención de micelio "blanco de hongo" de dos especies de *Pleurotus* en el estado de Puebla. Tesis Profesional. UNAM Zaragoza México, D.F.
11. Klibanski M.M., Mansur M., Gutiérrez I., Gonzalez L. (1993). Production of *Pleurotus ostreatus* on sugar cane agrowastes. Acta Biotechnol. 13:1.71-78.
12. Kurtzman R.H. and Zadrzil F. (1989). The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods. Chang S.T. and Quimio T.H. (Eds). The Chinese University Press. pp: 299-348.
13. Leal Lara, H. (1981). Produccion de hongos comestibles. In: Biotecnologia para el aprovechamiento de los desperdicios organicos. Monroy Hermosillo, H. y Viniegra Gonzalez, G. (compiladores) AGT Editor, S. A., Mexico. pp:156-176.
14. Leong P.C. (1989). Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on cotton waste substrate in Singapore. In: Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods. Chang S.T. and Quimio T.H. (Eds). The Chinese University Press. pp: 46-71.
15. Lozano. Producción del Champiñon (*Pleurotus ostreatus*) en Pulpa de Café. Fitopatología Colombiana(1991) 14:42-47
16. Martinez-Carrera, D., et al. El Cepario de Hongos Comestibles del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bioticos. Ciencia(1988) 39:113-120.

17. Martinez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M. (1991) Edible mushroom cultivation for rural development in tropical America. In: Science and Cultivation of edible fungi. Maher (ed). Balkema, Rotterdam. pp: 805-811
18. Martinez-Carrera, D., Quirarte, M., Soto, C., Salmones, D., Guzmán, G. (1984). Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agroindustriales en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 19:207-219
19. Martinez-Ortiz, P. (1991) Production de blanc de *Pleurotus cornucopiae* par fermentation en milieu solide sur reflex de mais au Mexique. Document 2. Etat d'avancement des travaux de fevrier a septembre. ORSTOM
20. Peña Avila, J. C., Lopez Huerta, F., Barba Chavez, J. M. (1992). El cultivo de los hongos comestibles alternativos. In: Productos Naturales, Vol. 1, Peña Avila, J. C., Lechuga Corchado, J. A., Cruz Sosa, F. (Eds) Universidad Autonoma Matropolitana. pp :51-62.
21. Roussos S., Aquihualt M. A., Brizuela A., Olmos W. R., Viniegra G. (1989). Conservación y viabilidad de inóculo de hongos filamentosos para las fermentaciones sólidas. Micol. Netrop. Apl. 2:3-17.
22. Sánchez Vázquez, J. E. (1992) Producción de *Pleurotus* a partir de residuos de la agricultura (Manual). SARH-INIFAP-CERI, Tapachula, Chiapas, México.
23. Sánchez Vázquez, J. E. (1993) Tecnología para la producción de *Pleurotus*. In: Memorias del curso "Producción de hongos comestibles". Sánchez Vázquez, J. E. (Compilador). Tapachula, Chiapas, México pp 20-37
24. Saucedo Castañeda, G. (1991) Controle du métabolisme de *Scawanniomyces castillii* cultive sur support solide. Tesis de Doctorado. Universidad de Montpellier II. Francia.

25. Sobal, M., Morales, P. y Martínez-Carrera, D. (1989). Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio. Micol. Neotrop. Apl. 2 : 19-39.
26. Soto Velazco, C., Arias García, A., Fausto, S. (1993). Cultivo de *Pleurotus* sp. en diversos medios de cultivo sencillos. (resumen). In : IV Simposio de Botanica. La Habana, Cuba. 22 al 26 de junio de 1993. pp: 69.
27. Steineck H. (1987). Cultivo Comercial del Campiñón. Acribia, S.A., Zaragoza (España).
28. Viniegra Gonzalez, G. (1990) Consideraciones económicas sobre el aprovechamiento de los desperdicios agrícolas, ganaderos y agroindustriales. In: Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. Monroy Hermosillo, O., Viniegra Gonzalez, G. (Compiladores). AGT Editor. pp: 19-29.
29. Zadrazil F. (1978). Cultivation of *Pleurotus*. In: The biology and cultivation of edible mushrooms. Chang S.T. and Hayes W.A. (Eds). Academic Press, New York. pp: 119-135.

ANEXO 1

Medios de cultivo utilizados en la propagación de hongos comestibles.

Extracto de Malta Agar (EMA) :

Extracto de malta		30 g
Peptona		3 g
Agar - Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

* Este es un medio de uso general, en el cultivo de hongos.

Papa Dextrosa Agar (PDA) :

Infusión de papa		200 g
Dextrosa		20 g
Agar - Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

* Este es un medio de uso general, en el cultivo de hongos.

Czapek Dox Agar (CZA) :

NaNO ₃		3 g
KH ₂ PO ₄		1 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O		0.5 g
KCl		0.5 g
FeSO ₄ 7 H ₂ O		0.01 g
Sacarosa		30 g
Agar - Agar		15 g
Agua	c b p.	1000 ml

* Este es un medio sintético comúnmente usado para cultivar hongos del suelo.

Glucosa Peptona Agar (GPA) :

Glucosa		5 g
Peptona		1 g
Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

* Este medio es útil para aislar acrasiomicetos del suelo. Los ingredientes pueden ser variados según convenga.

Jugo de 8 Verduras Agar (V-8 A) :

Jugo de verduras V-8		180 ml
CaCO ₃		2 g
Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

* Este es un medio excelente para uso general. La mayoría de los ascomicetos esporulan bien en él; al igual que los mucoráceos y muchos deuteromicetos.

Extracto de Malta Centeno Agar (EMCA) :

Extracto de Malta		20 g
Harina de grano de centeno		5 g
Peptona		5 g
Extracto de levadura		2 g
Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

Extracto de Trigo Paja y Malta Agar (ETPMA) :

Trigo		400 g
Paja		100 g
Extracto de Malta		18.06 g
Agar		15 g

Agua	c.b.p.	1000 ml
------	--------	---------

- * El trigo se hierve en un litro de agua y se deja consumir hasta que queden 500 ml; lo mismo se hace con la paja. Se filtran ambos extractos y se mezclan en un sólo recipiente, se agregan los demás ingredientes y se afora a un litro. Se deja hervir un min.

Amaranto Dextrosa Agar (ADA) :

Semilla de amaranto		24 g
Dextrosa		5 g
Agar - Agar		15 g
Agua	c.b.p.	1000 ml

- * La semilla de amaranto se muele y se pasa a través de un tamiz del No. 40, posteriormente la semilla se disuelve en 500 ml de agua destilada y se agregan los demás ingredientes y se afora a un litro. Se deja hervir un minuto

ANEXO 2

Producción de semilla por inoculación sólida. Cinética de crecimiento apical.

Producción del Inóculo Primario :

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
2.00	0.49	0.62	0.56	0.09
4.00	1.28	1.38	1.33	0.07
6.00	6.08	5.71	5.89	0.27
8.00	8.07	7.84	7.95	0.16
10.00	10.23	9.80	10.01	0.30
12.00	10.94	10.89	10.92	0.04
14.00	11.95	12.00	11.98	0.04

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
2.00	0.37	0.47	0.42	0.07
4.00	1.30	1.39	1.34	0.07
6.00	5.17	5.07	5.12	0.07
8.00	7.48	7.45	7.47	0.02
10.00	9.61	9.61	9.61	0.00
12.00	10.75	10.68	10.72	0.05
14.00	12.00	12.00	12.00	0.00

Producción del Inoculo Secundario :

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
1.00	0.29	0.48	0.38	0.14
3.00	2.16	2.52	2.34	0.25
5.00	6.00	7.20	6.60	0.85
7.00	10.56	10.80	10.68	0.17
9.00	12.00	12.00	12.00	0.00

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
1.00	0.37	0.25	0.31	0.08
3.00	2.40	2.28	2.34	0.08
5.00	7.80	6.60	7.20	0.85
7.00	11.66	11.14	11.40	0.37
9.00	12.00	12.00	12.00	0.00

ANEXO 3

Producción de semilla por inoculación líquida. Cinética de crecimiento apical.

Producción del Inóculo Primario :

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	cm	cm	cm	promedio	Desv.STD
1.00	0.22	0.20	0.25	0.20	0.21	0.22	0.02
3.00	2.18	2.15	1.58	1.26	2.17	1.87	0.43
5.00	6.80	7.40	2.00	2.10	8.10	5.28	2.98
7.00	9.60	10.80	4.10	4.20	10.20	7.78	3.34
9.00	11.40	11.76	5.20	5.10	11.58	9.01	3.52
11.00	12.00	12.00	11.80	11.35	12.00	11.83	0.28

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	cm	cm		promedio	Desv.STD
1.00	0.29	0.19	0.30	0.40		0.30	0.09
3.00	2.20	2.17	1.85	1.80		2.00	0.21
5.00	8.50	8.36	3.40	2.80		5.77	3.09
7.00	11.20	11.04	4.20	3.70		7.54	4.15
9.00	12.00	12.00	5.50	5.30		8.70	3.81
11.00	12.00	12.00	11.50	11.50		11.75	0.29

Producción del Inóculo Secundario

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	cm			promedio	Desv.STD
1.00	1.68	1.98	1 80			1.82	0.15
3.00	5.25	5.40	5 67			5.44	0.21
5.00	8.30	8.22	8 25			8.26	0.04
7.00	10.84	10.26	10 00			10.37	0.43
9.00	12.00	11.88	11 90			11.93	0.06

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	cm			promedio	Desv.STD
1.00	2.00	2.12	2 10			2.07	0.06
3.00	6.24	6.40	6 30			6.31	0.08
5.00	8.45	8.90	8 82			8.72	0.24
7.00	10.68	11.23	10 02			10.64	0.61
9.00	12.00	11.92	11 90			11.94	0.05

ANEXO 4

Producción de semilla por inoculación en suspensión. Cinética de crecimiento apical.

Producción del Inóculo Primario :

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	cm	cm	Promedio	Desv. STD
1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.00	0.48	0.86	0.50	0.30	0.54	0.24
5.00	4.20	3.36	0.80	0.70	2.27	1.78
7.00	10.80	7.20	1.90	1.60	5.38	4.44
9.00	12.00	10.20	4.50	5.10	7.95	3.72
12.00	12.00	11.40	11.10	10.95	11.36	0.46

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	cm	cm	Promedio	Desv. STD
1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.00	0.61	1.09	0.10	1.05	0.71	0.46
5.00	2.04	2.52	1.50	1.30	1.84	0.55
7.00	3.00	6.00	2.50	1.90	3.35	1.82
9.00	8.40	9.60	4.70	4.90	6.90	2.48
12.00	12.00	12.00	10.50	10.30	11.20	0.93

Producción de Inoculo Secundario :

CEPA : IE-8

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
2.00	1.44	2.52	1.99	0.54
4.00	5.76	6.96	5.57	1.49
6.00	9.36	10.20	8.52	2.22
7.00	10.44	11.28	9.57	2.27
9.00	12.00	12.00	11.00	1.73

CEPA : UAM-1

Días	cm	cm	Promedio	Desv. STD
2.00	2.76	3.24	2.67	0.63
4.00	8.40	7.80	6.73	2.39
6.00	10.20	9.72	8.64	2.30
7.00	11.04	11.40	9.81	2.44
9.00	12.00	12.00	11.00	1.73