



Theses and Dissertations

2009

Production of the edible mushroom (*Agaricus* sp.) under laboratory conditions for their multiplication in different culture media

Mercedes Victoria Galeón Alcón
Brigham Young University - Provo

Follow this and additional works at: <https://scholarsarchive.byu.edu/etd>



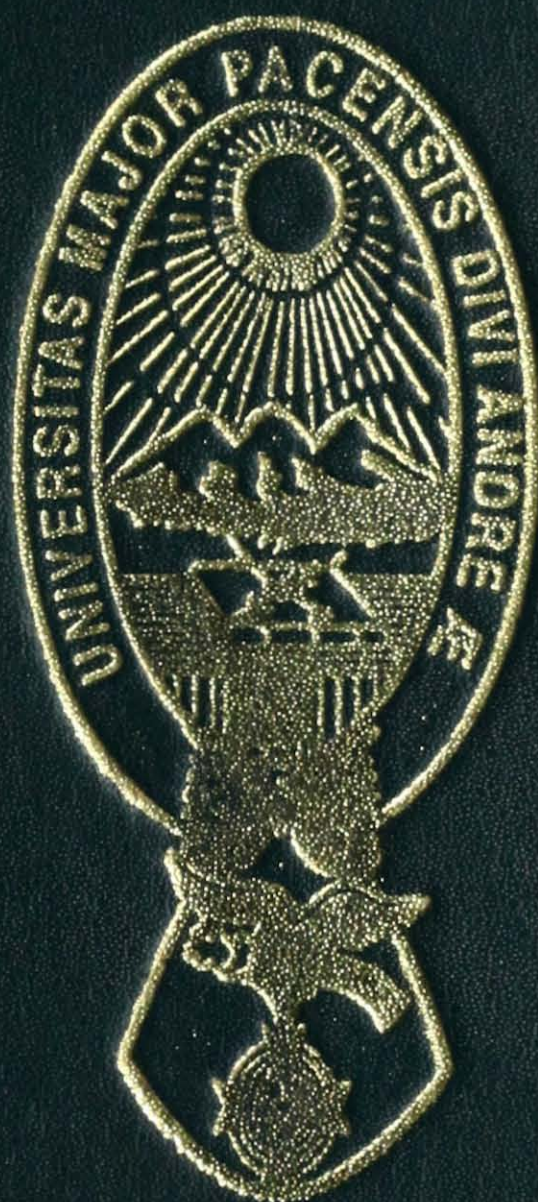
Part of the [Agronomy and Crop Sciences Commons](#)

BYU ScholarsArchive Citation

Galeón Alcón, Mercedes Victoria, "Production of the edible mushroom (*Agaricus* sp.) under laboratory conditions for their multiplication in different culture media" (2009). *Theses and Dissertations*. 5366. <https://scholarsarchive.byu.edu/etd/5366>

This Thesis is brought to you for free and open access by BYU ScholarsArchive. It has been accepted for inclusion in Theses and Dissertations by an authorized administrator of BYU ScholarsArchive. For more information, please contact ellen_amatangelo@byu.edu.

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA



TESIS DE GRADO
ESTABLECIMIENTO DEL HONGO COMESTIBLE
(*Agaricus sp.*) BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO PARA SU MULTIPLICACION EN
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

MERCEDES VICTORIA GALEON ALCON

LA PAZ - BOLIVIA

2009

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**



TESIS DE GRADO

**ESTABLECIMIENTO DEL HONGO COMESTIBLE (*Agaricus* sp.)
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO PARA SU
MULTIPLICACIÓN EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**

MERCEDES VICTORIA GALEÓN ALCÓN

**La Paz, Bolivia
2009**

Production of the Edible Mushroom (*Agaricus* sp.) Under Laboratory Conditions for Their Multiplication in Different Culture Media

Abstract

Edible mushroom production has two different stages: the vegetative stage and the fruiting stage. The vegetative phase is performed in a biotechnology laboratory and covers the technique for obtaining "spawns", which parameters include the multiplication and reproduction of the mycelium. The fruiting phase begins with the appearance of edible mushrooms and includes everything that occurs outside the laboratory.

In our country, production of edible mushrooms is limited and generally unknown. So, in this study, the vegetative phase was divided into two stages and conducted in the laboratory.

Stage 1: We inoculated spores and implants of the edible mushroom species *Agaricus* in three synthetic growth mediums: PDA (Potato-Dextrose-Agar), PDY (Potato-Dextrose-Yeast), and MEA (Barley-Biphosphate Potassium-Agar). These were incubated in different growth chambers at three different temperatures (17°C, 20°C, and 25°C). The best mushroom development in terms of micellar growth was obtained in the PDA growth medium. The temperature that contributed most favorably to this development was 17°C.

Stage 2: We re-inoculated implants from the crops of the previous step in four natural substrates (brown rice, barley creole, brown rice combined with horse manure, barley combined with horse manure) and incubated them in growth chambers at three different temperatures. It was observed that the best micellar growth occurred in the natural substrate containing barley creole. Also, the most effective incubation temperature was 20°C.

Thus, we established that the barley grains sold in our city work well as a cheap natural substrate to propagate and produce edible mushroom "seed" of the *Agaricus* species at a temperature of 20°C.

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

ESTABLECIMIENTO DEL HONGO COMESTIBLE (*Agaricus sp.*)
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO PARA SU
MULTIPLICACIÓN EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

*Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar al título de
Ingeniero Agrónomo*

Mercedes Victoria Galeón Alcón

Tutor:

Dr. M. Sc. Raúl PORTILLO PRIETO

Asesores:

Ing. Edgar GÓMEZ VILLALBA

Comité Revisor:

Ing. Cristal TABOADA BELMONTE

Dr. Alberto FIGUEROA SOLIZ

Ing. Hugo BOSQUE SANCHEZ

Aprobada

Presidente Tribunal Examinador

2009

Agradecimientos:

Amplios agradecimientos.

Principalmente al "BENSON AGRICULTURE AND FOOD INSTITUTE" que busca beneficiar a la sociedad de nuestro país mediante el auspicio e interés en la presente investigación.

Al personal de CIC - IBTEN (Viacha - La Paz) por su colaboración durante la etapa de laboratorio, parte importante dentro el proceso de esta investigación.

También agradecer al Dr. Raúl Portillo, Ing. Edgar Gómez por su colaboración como tutor y asesor de este trabajo de investigación.

A las Sras. Lic. Elizabeth García, Lic. Lourdes Alago y la Sra. Hilda Jerez por el orientación, comprensión e incentivo que recibí durante toda la gestión del trabajo de investigación.

A mi hija y amiga María Raquel Galón por compartir conmigo los buenos y malos momentos de esta etapa de mi vida.

Dedicatoria

A mis padres, Manuel Galón y Dora Alón, por incentivar mi vida con su ejemplo de superación, trabajo, esfuerzo y voluntad en todo.

A mis hermanos Froylan, Edelm, Margarita, Carmen y Jhona, y sobrinos/as...

Dedico este trabajo a mi hija María Raquel, y a mis sobrinos: Cecilia, Victoria, Andrea, Manuel, Pedro, Miguel, Leonel, Eduardo y Rodrigo

Por siempre sustentar mi vida espiritual y material.

con mi amor propio

Permitiendo que esta etapa de mi vida concluya favorablemente.

Agradecimientos:

Amplios agradecimientos:

Principalmente al "BENSON AGRICULTURE AND FOOD INSTITUTE" que busco beneficiar a la sociedad de nuestro país mediante el auspicio e interés en la presente investigación.

Al personal de CIC – IBTEN (Viacha – La Paz) por su colaboración durante la etapa de laboratorio, parte importante durante el proceso de esta investigación.

También agradecer al Dr. Raúl Portillo, Ing. Edgar Gómez por su colaboración como tutor y asesor de este trabajo de investigación.

A las Sras. Lic. Elizabeth García, Lic. Lourdes Aliaga y la Srta. Hilda Jerez por el orientación, comprensión e incentivo que recibí, durante toda la gestión del trabajo de investigación.

A mi hija y amiga Maria Raquel Galeón por compartir conmigo los buenos y malos momentos de esta etapa de mí vida.

A mis padres, Manuel Galeón y Dora Alcón, por incentivar mi vida con su ejemplo de superación, trabajo, esfuerzo y voluntad en todo.

A mis hermanos Froilan, Edwin, Margarita, Carmen y Jaime. Y sobretodo un...

"Gracias...Rey de reyes, Señor de señores, Jehová Bendito".

Por siempre sustentar mi vida espiritual y material,

con Infinito amor.

Permitiendo que esta etapa de mi vida concluya favorablemente.

INDICE GENERAL

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general.....	v
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras	x
Resumen.....	xi
CAPITULO I	
1 INTRODUCCIÓN.....	
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivo Especifico.....	2
CAPITULO II	
2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	
2.1 Taxonomía del hongo <i>Agaricus sp.</i>.....	3
2.2 Características generales.....	3
2.3 Morfología de la seta.....	4
2.3.1 Sombrero.....	5
2.3.2 Himenio.....	5
2.3.3 Pie.....	5
2.3.4 Anillo o velo.....	6
2.3.5 Volva.....	6
2.3.6 Micelio.....	6
2.3.7 Espora.....	7

CAPITULO IV

2.4	Estructura celular del hongo	7
2.5	Estructura Micelar del Hongo	9
2.6	Biología del hongo.....	10
2.7	Metabolismo.....	10
2.8	Reproducción.....	11
2.9	Crecimiento, fases y formación de la seta.....	12
2.9.1	Crecimiento.....	12
2.9.2	Fases del crecimiento.....	14
2.9.2.1	Fase de latencia.....	14
2.9.2.2	Fase exponencial.....	15
2.9.2.3	Fructificación.....	15
2.9.3	Formación de la seta.....	15
2.10	Factores que afectan el crecimiento micelar del hongo	16
2.11	Tasa de crecimiento micelar	17
2.12	Obtención o aislamiento del micelio del hongo	18
2.12.1	Esterilización y asepsia.....	18
2.12.2	Técnica para el cultivo puro.....	19
2.13	Medios de cultivo sintéticos	20
2.14	Medios de cultivo naturales	22
2.15	Identificación del hongo	22
2.15.1	Visualización del hongo - examen microscópico.....	23
2.16	Desarrollo del micelio en laboratorio	24

CAPITULO III

3.	LOCALIZACION	25
3.1	Ubicación geográfica	25

CAPITULO IV

4	MATERIALES Y METODOS	26
4.1	Material biológico	26
4.2	Recolección de setas silvestres	26
4.3	Limpieza de las setas y cosecha de esporas	27
4.4	Aislamiento del hongo <i>Agaricus</i> sp.	27
4.5	Obtención de cepa pura en medios de cultivo sintéticos	28
4.6	Evaluación macroscópica	29
4.7	Evaluación microscópica	31
4.8	Determinación de la tasa de crecimiento micelial	31
4.9	Producción de semilla en medios de cultivo naturales	32
4.10	Análisis de datos	33
4.10.1	Fuentes de estudio.....	34
4.10.2	Variables de respuesta.....	35

CAPITULO V

5	RESULTADOS Y DISCUSION	36
5.1	Aislamiento e identificación de caracteres	36
5.2	Caracteres macroscópicos	37
5.3	Caracteres microscópicos	38
5.4	Obtención de cepa pura en medios de cultivo sintéticos	39
5.4.1	Germinación de las esporas.....	39
5.4.2	Control de calidad de la cepa.....	39
5.4.3	Determinación de la tasa de crecimiento micelar.....	39
5.4.4	Determinación del medio de cultivo sintético óptimo.....	42
5.4.5	Determinación de la temperatura óptima.....	43
5.4.6	Curva de crecimiento.....	45
5.4.7	Otras observaciones.....	47

5.5	Producción de semilla en medios de cultivo naturales.....	48
5.5.1	Determinación del porcentaje de colonización.....	49
5.5.2	Control de calidad en la etapa de producción de semilla de hongo.....	49
5.5.3	Determinación del medio de cultivo natural óptimo.....	49
5.5.4	Determinación de la temperatura óptima.....	50
5.5.5	Curva de crecimiento.....	51
CAPITULO VI		
6	CONCLUSIONES.....	54
CAPITULO VII		
7	RECOMENDACIONES.....	57
CAPITULO VIII		
8	BIBLIOGRAFIA.....	58

INDICE DE CUADROS

1	Parámetros de evaluación macroscópica.....	30
2	Composición de los medios naturales.....	33
3	Características macro morfológicas del hongo <i>Agaricus</i> sp.....	38
4	Tasa de crecimiento para medios de cultivo sintéticos: A ₁ , A ₂ , A ₃	41
5	Tasa de crecimiento para medios de cultivo sintéticos: A ₁ , A ₂ , A ₃	50
6	Tasa de crecimiento para medios de cultivo sintéticos: A ₁ , A ₂ , A ₃	50
7	Partes de una hifa.....	14
8	Formación de una seta.....	16
9	Fotografía de esporas de un <i>Agaricus</i> sp.....	24
10	Preparación del inoculo para la Etapa de cepario.....	29
11	Preparación del inoculo para la Etapa de producción de semilla.....	33
12	Aspecto de las colonias de <i>Agaricus</i> sp.....	37
13	Crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	41
14	Colonias con crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	42
15	Histograma del crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	44
16	Placas mostrando el crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	44
17	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A1 (PDA).....	46
18	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A2 (PDY).....	47
19	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A3 (MEA).....	47
20	Placa con presencia de exudaciones amarillentas.....	48
21	Porcentaje de colonización en medios de cultivo: A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	50
22	Porcentaje de colonización para las temperaturas: B ₁ , B ₂ y B ₃	51
23	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₁	51
24	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₂	53
25	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₃	52
26	Colonización de micelio en los medios de cultivo naturales.....	53

INDICE DE FIGURAS

1	Corte esquemático de un hongo.....	6
2	Ultra estructura de la célula fúngica.....	8
3	Representación esquemática de la Quitina.....	8
4	Estructura del micelio.....	9
5	Detalle de las hifas terminales.....	9
6	Ciclo de vida de los hongos Basidiomycetes.....	12
7	Partes de una hifa.....	14
8	Formación de una seta.....	16
9	Fotografía de esporas de un <i>Agaricus</i> sp.	24
10	Preparación del inóculo para la Etapa de cepario.....	29
11	Preparación del inóculo para la Etapa de producción de semilla.....	32
12	Aspecto de las colonias de <i>Agaricus</i> sp.....	37
13	Crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	41
14	Colonias con crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	42
15	Histograma del crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	44
16	Placas mostrando el crecimiento micelar de <i>Agaricus</i> sp.....	44
17	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A1 (PDA).....	46
18	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A2 (PDY).....	47
19	Curvas de crecimiento del micelio para el Medio A3 (MEA).....	47
20	Placa con presencia de exudaciones amarillentas.....	48
21	Porcentaje de colonización en medios de cultivo: A ₁ , A ₂ , A ₃ y A ₄	50
22	Porcentaje de colonización para las temperaturas: B ₁ , B ₂ y B ₃	51
23	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₁	51
24	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₂	52
25	Porcentaje de colonización en el Medio de cultivo natural A ₄	52
26	Colonización de micelio en los medios de cultivo naturales.....	53

RESUMEN

La producción de hongos comestibles en general, comprende una fase vegetativa y una fase de fructificación. La fase vegetativa se realiza en un laboratorio biotecnológico y abarca toda la técnica para la obtención de "semilla de hongo", cuyos parámetros de multiplicación y reproducción de micelio es conocida también como obtención de cepa pura de hongo. La fase de fructificación inicia con la aparición de las setas u hongos comestibles y todo lo que implica las prácticas fuera de laboratorio.

En nuestro país esta producción es limitada, y por lo general desconocida, por ello en la presente investigación, se realizó en laboratorio la parte que implica la fase vegetativa, que a su vez la dividimos en dos etapas.

Etapas 1: Inoculamos esporas e implantes del hongo comestible *Agaricus sp.* en tres medios sintéticos de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), PDY (Papa-Dextrosa-Levadura), MEA (Malta-Bifosfato potásico-Agar) incubados en cámaras de crecimiento a tres diferentes temperaturas (17°C, 20 °C, 25 °C), y el mejor desarrollo del hongo en lo que se refiere al crecimiento micelar fue obtenido en el medio PDA, y la temperatura que contribuyo favorablemente en este desarrollo fue el de 17°C.

Etapas 2: Reinoculamos implantes del cultivo anterior en cuatro sustratos naturales (granos de arroz integral, granos de cebada criolla, granos de arroz integral combinado con estiércol de caballo y granos de cebada también combinada con estiércol de caballo) incubado en cámaras de crecimiento a tres diferentes temperaturas. El sustrato natural en el cual se observo el mejor desarrollo micelar fue en los granos de cebada criolla y la temperatura de incubación con mejor efecto fue de 20 °C.

De esta manera se pudo establecer que los granos de cebada que se comercializan en nuestra ciudad son buenos como sustrato natural y económico para propagar y producir "semilla" de hongo comestible *Agaricus sp.* a una temperatura de 20 °C.

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluye desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macro y microscópicos. Muchas variedades de hongos macroscópicos son comestibles, crecen espontáneamente en la naturaleza sobre diversos sustratos y se denominan "silvestres", porque no se los cultiva en forma comercial. A partir del champiñón silvestre (*Agaricus* sp.), se empezó a cultivar el champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) en Francia que luego fue difundido a los países vecinos (Steineck, 1972). Además, debido a que son alimentos sanos; con bajas calorías y tienen menor presencia de colesterol y pueden ser fácilmente certificados como alimentos ecológicos, orgánicos o biológicos, actualmente, en los países más desarrollados, se cultivan otras variedades de hongos. (Deschamps, 2005)

Las fuentes de abastecimiento de hongos comestibles son: China, Francia, Alemania, Holanda y Corea del sur, y en Sudamérica, Ecuador, Perú y Chile. Por otra parte, Estados Unidos, Alemania y Canadá son los principales importadores del mundo. (Cámara Nacional de Comercio, 1998)

En Bolivia el inicio y desarrollo de esta producción es limitado, y se desconoce actividades de investigación. Por otra parte existen pequeñas producciones de hongos comestibles que se comercializan en supermercados de los departamentos de Santa Cruz y La Paz (C.N.C, 1998) y es posible encontrar el Champiñón blanco (*Agaricus bisporus*), hongo ostra o *Hiratake*. (*Pleorutus ostreatus*), Shiitake (*Lentinus edodes*).

También se observa la venta al menudeo de hongos comestibles silvestres (*Agaricus* sp.), en mercados populares de La Paz, pero únicamente en época de lluvias (Febrero, Marzo).

Lo mencionado anteriormente ha impulsado esta investigación con el fin de optimizar el proceso de producción de hongos comestibles en su etapa inicial, el cual abarca obtener micelio o cepa pura del hongo *Agaricus* sp.

El desarrollo de la investigación permitirá establecer parámetros técnicos de multiplicación y reproducción de “semilla de hongo” o micelio, así en el futuro el interesado en producir setas no dependerá de las importaciones, puesto que éstas son costosas y riesgosas por la poca garantía que ofrecen las empresas extranjeras sobre el producto.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es el estudio de las condiciones de crecimiento micelar del hongo comestible *Agaricus* sp., durante los procesos de multiplicación de cepa pura del hongo y producción de semilla del mismo, en condiciones de laboratorio, para diferentes temperaturas y medios de cultivo.

Por otro lado, en zonas ricas en fuentes naturales de materia prima para el compost de hongo, al tener un fácil acceso a la “semilla del hongo” se creará una alternativa más de producción agrícola, al mismo tiempo constituirá una fuente complementaria de ingreso económico para el pequeño agricultor, y si esta alternativa es bien manejada, es posible minimizar las constantes migraciones humanas a las grandes urbes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la germinación de las esporas del hongo comestible *Agaricus* sp.
- Determinar la tasa de crecimiento micelial del hongo en diferentes temperaturas y medios de cultivo.
- Determinar la eficiencia biológica de los medios de cultivo.
- Cuantificar el rendimiento de los medios naturales de cebada, arroz integral y estiércol de caballo.

CAPITULO II

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 TAXONOMÍA DEL HONGO *Agaricus* sp.

Raven *et.al.* (1991), indica: Los basidiomicetes mejor conocidos son los de himenio laminar como el *Agaricus campestris* o seta de campo, cuya clasificación se basa particularmente en el tipo de reproducción y aspectos morfológicos.

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Basidio micota</i>
Grupo:	<i>Basidiomicetes</i>
Clase:	<i>Homo basidiomicetes</i>
Subclase:	<i>Hymenomyces</i>
Orden:	<i>Agaricales</i>
Familia:	<i>Agaricaceae</i>
Género:	<i>Agaricus</i>
Especie:	<i>Agaricus campestris</i>
Nombre común:	<i>Champiñón silvestre, Champiñón de prado, Callampa.</i>
Importancia:	<i>Alimentación humana.</i>

2.2 CARACTERISTICAS GENERALES

Guerra *et.al.*, (2003), indica: el champiñón común de los prados *Agaricus campestris*, es una especie relacionada con el champiñón cultivado *A. bisporus*, que es una de las pocas setas que pueden ser cultivadas comercialmente.

García (1987) acota: Las setas son la parte externa de ciertos hongos que crecen en diversos ambientes (tierra, árboles, residuos, etc.). En realidad cada hongo esta formado por numerosos hilos finísimos cuyo conjunto se denomina micelio Tales hilos van creciendo y extendiéndose por el sitio preferido por el hongo, por ejemplo unas veces bajo la superficie del suelo y otras bajo la corteza de los árboles débiles. Al llegar la época del año en que la humedad y la temperatura son las adecuadas, en ciertas partes del micelio se forman unos grumos que van aumentando de tamaño,

asoman al exterior y se convierten en las conocidas setas, cuya misión es la reproducción de la especie. Cada seta representaría para cada hongo algo así como el fruto para un árbol.

Como características del hongo *Agaricus campestris*, Raven *et.al.* (1991) señala lo siguiente:

- Nivel celular: Organismo eucariota saprofito.
- Nutrición: Osmótrofa (absorción).
- Metabolismo del oxígeno (respiración): Aerobios o anaerobios facultativos
- Reproducción y desarrollo: Reproducción sexual, con gametos generalmente iguales, y multiplicación asexual por esporas resistentes
- Organización: Pluricelulares en general, con células en filamentos llamados hifas, cuyo conjunto forma un micelio
- Portadores de esporas
- Sin pigmentos clorofílicos
- Cuerpo vegetativo formado, en general, por estructuras ramificadas y filamentosas
- Pared celular definida de quitina y/o celulosa, rara vez ausente
- Inmóviles en la fase vegetativa, aunque puede haber células reproductoras móviles

Son muy bajas en calorías (25 a 35 Kcal. /100 g), ya que el 80 ó 90% de su contenido es agua; y son bajas en proteínas, con unos valores aproximados a las verduras. Su exquisito sabor se lo aportan los componentes nitrogenados, lo que las convierten en un alimento no apto para las personas que padecen gota, ácido úrico o tienen problemas de reuma. Su cantidad de grasa es mínima, contienen vitaminas del grupo B, niacina y ácido fólico, y minerales como fósforo, potasio, hierro, cobre y cinc. Su contenido en fibra (celulosa) es de un 2,5% y en hidratos de carbono un 4%.

2.3 MORFOLOGIA DE LA SETA

Según Toovey (1976), los macro hongos presentan un tamaño entre 5 y 10 cm.

Para caracterizar bien las setas o el basidiocarpo, se tiene que realizar un examen morfológico que dé una idea clara de cada parte que compone un ejemplar.

Según Terra.es (2006), las setas del orden de los agaricales, generalmente esta formada por el sombrero (carpóforo), himenio (himenoforo), pié, anillo o velo, la volva y el micelio. Es esencial saber diferenciar cada uno de estos elementos, ya que la mayoría de ocasiones requiere una observación exhaustiva si queremos identificar el hongo. Factores naturales como el viento, la lluvia o el sol, pueden eliminar o alterar cualquiera de estos elementos, pueden perder el anillo, el granulado de la cutícula del sombrero, o pueden producirse variaciones importantes en su coloración, con lo cual se hace más difícil su identificación.

2.3.1 Sombrero

Continúa Terra.es (2006): Es una de las partes fundamentales del hongo. Su medida varia notablemente, desde tener unos pocos milímetros en algunas especies, pudiendo llegar a los 30cm., en otras. Su forma también es variada y cuando es joven acostumbra a estar plegado alrededor del pié. En algunas especies puede cambiar varias veces de forma a medida que aumenta su edad. La piel que cubre el sombrero se llama cutícula y puede presentar diversos aspectos como arrugas, grietas, de aspecto aterciopelado o cubierta por escamas o granulaciones, y que en realidad se trata del resto del velo general que lo cubría en estado joven.

2.3.2 Himenio

Para Terra.es (2006), el himenio es la parte reproductora del hongo. Se trata de un tejido muy fino que comprende un conjunto de elementos fértiles reproductores de esporas. El himenio presenta una estructura laminar como la mayoría del género *Agaricus*. Y su color generalmente varia en la gama del pardo claro a un pardo intenso oscuro.

2.3.3 Pie

Terra.es (2006) dice que el pie es la parte del hongo que sostiene el sombrero, y que generalmente tiene forma cilíndrica. En el se encuentran una serie de detalles importantes para la identificación de la especie, como la forma, la ornamentación, su colocación respecto al sombrero, su interior (macizo o hueco) y su consistencia.

2.3.4 Anillo o velo

Terra.es (2006) indica: El anillo que muchas veces no puede observarse en algunos ejemplares de hongos, es en realidad el resto del velo parcial encargado de proteger el himenio del hongo joven, que al no haberse desprendido del todo, queda enganchado alrededor del pié. No todos son iguales ni se encuentran en la misma altura, si no que pueden ser altos (*Macrolepiota procera*), a media altura (*Agaricus campestris*), o relativamente bajos (*Amanita pantherina*).

2.3.5 Volva

Él mismo, continúa, cuando el velo general que cubre la mayoría de las especies del genero agarical se rompe para dejar pasar el sombrero, pueden pasar dos cosas; que desaparezca o que queden restos al pié. Estos restos en forma de saco o funda que envuelve la base del pié se llama volva.

2.3.6 Micelio

El micelio es la parte vegetativa del hongo, y en realidad el auténtico hongo. Su misión consiste en tomar del suelo los diversos compuestos orgánicos para alimentarse. Generalmente es de color blanco y puede llegar a tener muchos metros de longitud.

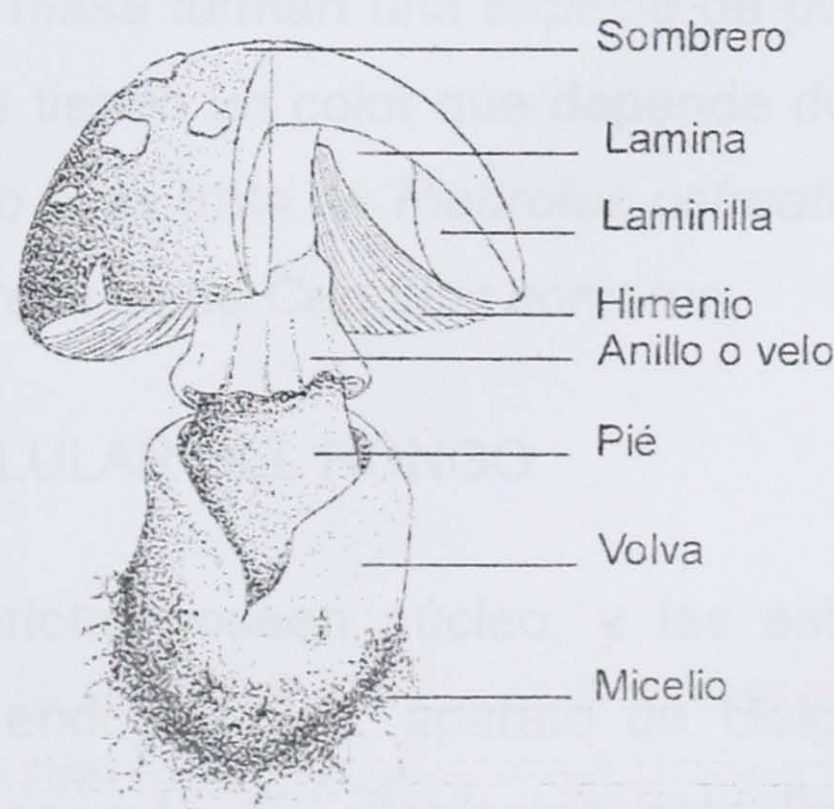


Figura 1. Corte esquemático de un hongo de la clase basidiomiceto y orden de los agaricales. Fuente: www.terra.es-2006

2.3.7 Espora

Para Toovey (1976), las esporas son corpúsculos ligeros que no pueden observarse a simple vista, pues sus medidas oscilan entre las 3 y 20 micras. Constituye la parte vital de reproducción de un hongo, como lo es una semilla para una planta superior. Se encuentran dentro las láminas de las setas, y cuando ésta ha madurado, son expulsadas al exterior en número, a veces tan elevado, que pueden ser miles de millones de esporas, debido a la escasa probabilidad de germinar. Para el grupo de los basidiomicetes la espora es denominada como basidio espora, mecanismo reproductivo del hongo, generalmente haploide y unicelular produciendo un nuevo organismo al dividirse por mitosis sin fusión con otra célula. La reproducción por esporas permite al mismo tiempo la dispersión y la supervivencia del hongo por largo tiempo en condiciones adversas. La espora es parte importante del ciclo vital biológico del hongo.

Estas esporas se esparcen a través del aire, el agua o los excrementos de los animales que las han comido, pueden permanecer durante largos años inactivas, hasta que encuentren un ambiente propicio de temperatura y humedad favorables para germinar y que, por si fuera poco, también interviene un factor sexual.

Según García (1987): Estas esporas son de tamaño microscópico (7.5 a 11.5 x 3 a 5.6 micras), oblongas, casi cilíndricas. Aunque no se distinguen a simple vista, cuando se depositan en masa forman una especie de polvillo harinoso denominado "esporada". Las esporas tienen un color que depende de la especie, así, es blanco con cierto reflejo grisáceo si se trata de *Pleurotus ostreatus*, de color tabaco si es de *Agrocybe aegerita* o negro si es de *Coprinus comatus*.

2.4 ESTRUCTURA CELULAR DEL HONGO

Consta de células eucariota, poseen núcleo, y las estructuras propias de estas células son: el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y un citoesqueleto, así como ribosomas. El citoplasma está limitado por una membrana celular, que posee esteroides, recubierta por una pared rígida y característica propia.

La pared celular de los hongos esta formada por capas o estratos, constituidos por diversos polímeros polisacáridos fibrilares, como la quitina (polímero Beta-1,4 de N-acetilglucosamina), la celulosa (polímero Beta-1,4 de glucosa) y por estructuras amorfas como otros glucanos (polímeros Beta-1,6, ramificados de glucosa) y mananos (polímeros á -1,6, ramificados de manosa). La pared de los hongos también contiene proteínas, asociadas a los polisacáridos y lípidos. Las estructuras amorfas, glucanos y mananos, contienen los principales antígenos de la pared. La pared es un exoesqueleto rígido que protege a la célula y condiciona la nutrición absorbtiva.

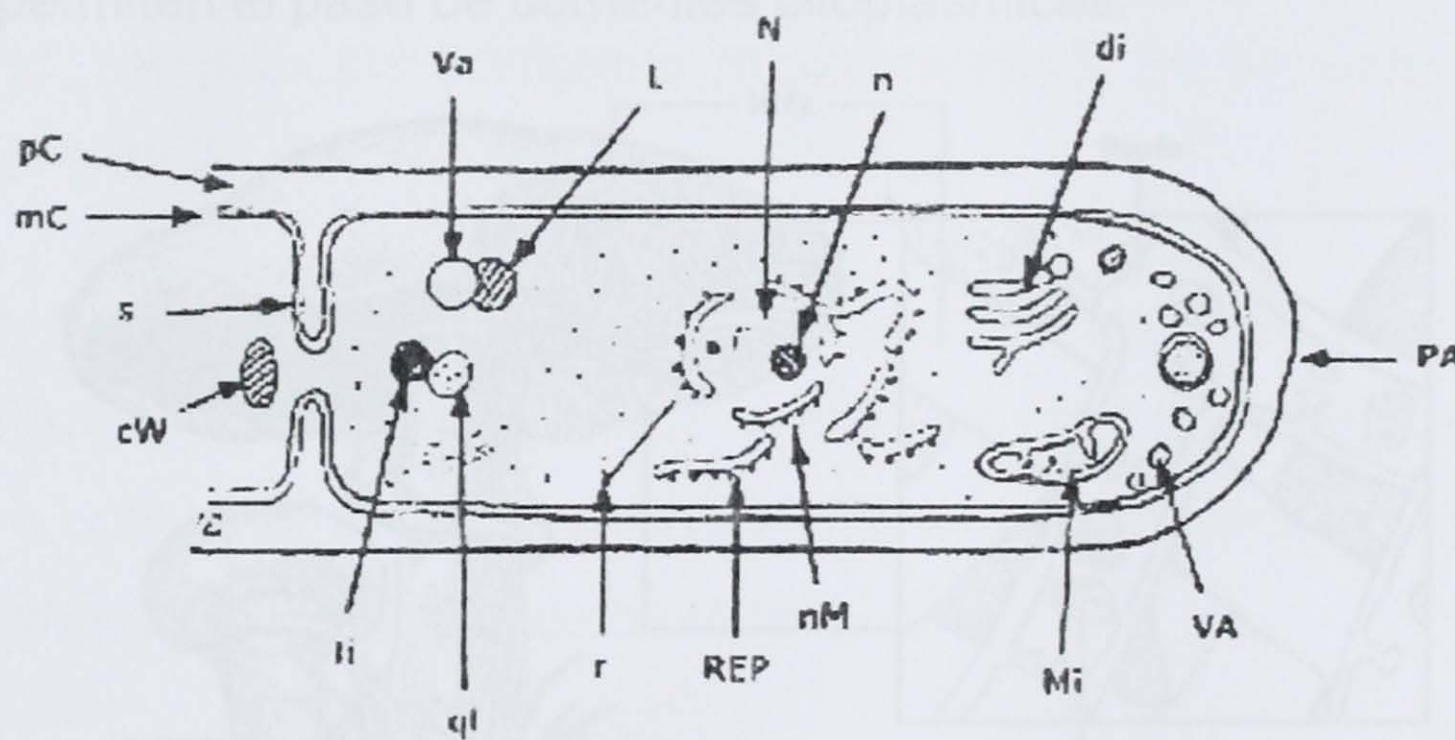


Figura 2. Ultra estructura de la célula fúngica. PA: polo apical; VA: vesícula apical; N:núcleo, n: nucleolo, di: dictiosomas, Mi: mitocondria, Rep: retículo endoplásmico, R: ribosomas, li: liposoma, gl: gliosisomas, mN: membrana nuclear, Va: vacuola, L:lisosoma, pC: pared celular, mC: membrana citoplásmica, s: septum, cW: cuerpo de Woronin. Fuente: <http://uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/hongos.pdf>

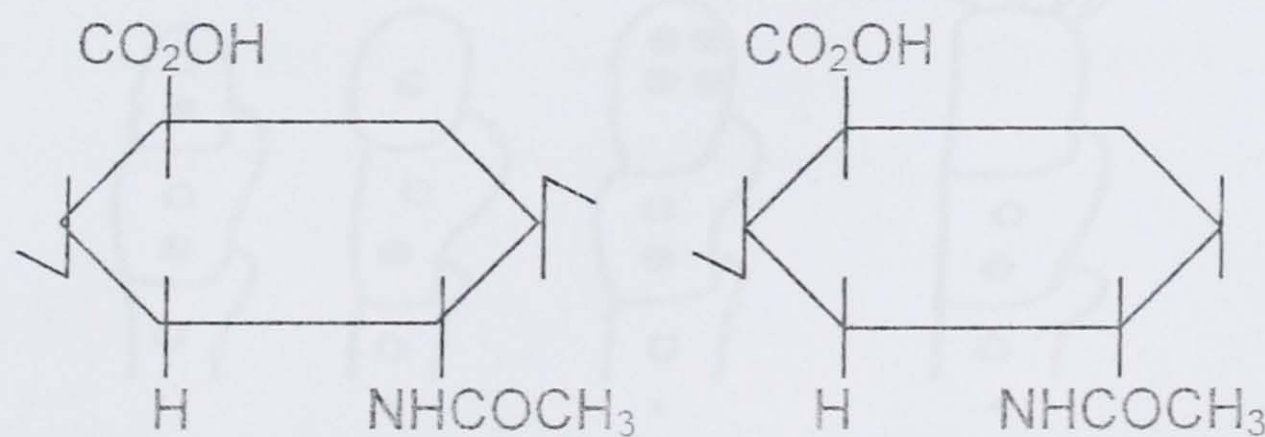


Figura 3. Representación esquemática de la Quitina
 $\beta(1-3)\beta(1-6)$ glucano

2.5 ESTRUCTURA MICELAR DEL HONGO

García (1999) menciona: El micelio de un basidiomiceto, como el champiñón cultivado *Agaricus campestris*, consiste en una masa de hifas blancas ramificadas con forma alargada (filiforme), que se encuentra especialmente bajo el suelo formando colonias subterráneas que miden hasta 200 metros de diámetro y pueden tener 500 años de antigüedad. Tienen un diámetro entre diez a cien veces menor que un milímetro, pueden alcanzar grandes extensiones de terreno. Su crecimiento es apical (en forma radial) y hacia abajo para cumplir su función de absorción.

Las hifas se dividen por medio de septos pero, tal y como en los ascomicetos, tienen orificios que permiten el paso de corrientes citoplásmicas.

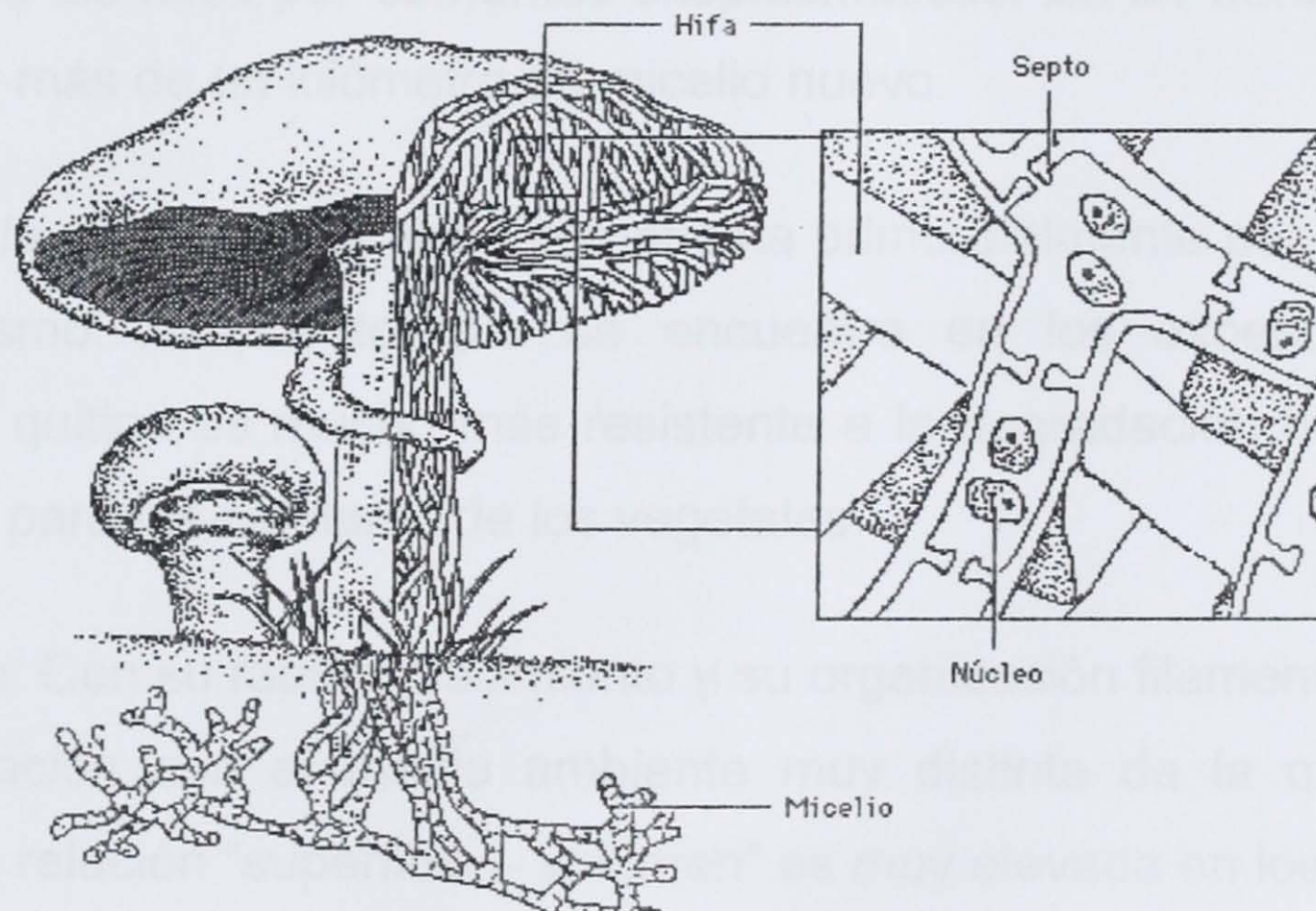


Figura 4. Estructura del micelio, Fuente: Enciclopedia multimedia 2002

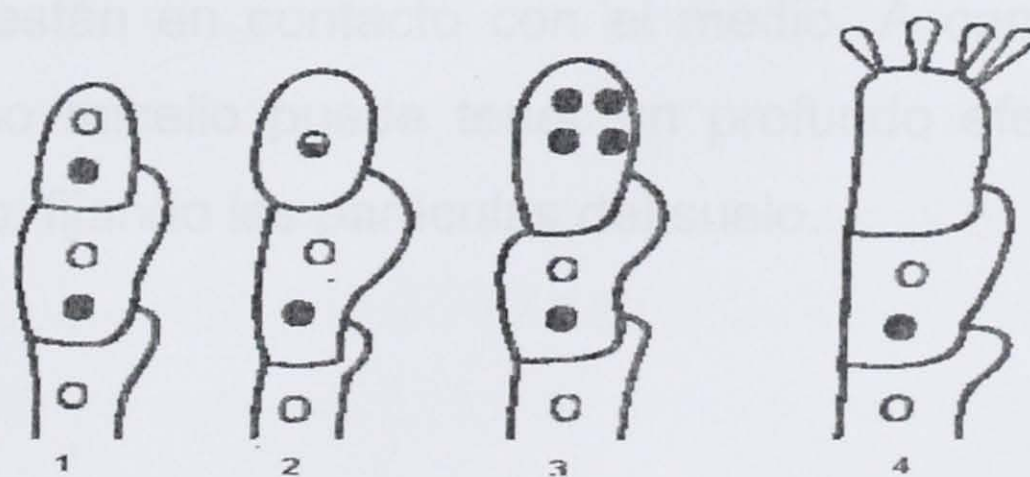


Figura 5. Detalle de las hifas terminales. 1. La parte superior de una hifa de un basidiomicete, cada célula contiene 2 núcleos, uno de cada padre. 2. Los dos núcleos de la parte superior se fusionan y forman un cigoto diploide, el cual inmediatamente se divide meióticamente. 3. Dando cuatro núcleos haploides. 4. Estos núcleos posteriormente migran a cuatro basidiosporas que se forman externamente. Fuente: Raven (1991)

En la vida libre o en los cultivos, el micelio se diferencia en dos partes, la que penetra en los sustratos nutritivos, denominada micelio vegetativo, y la que se dispone en superficie y contiene las estructuras reproductoras, constituye el micelio aéreo o reproductor.

García (1997) dice: Gracias a su capacidad metabólica los hongos pueden degradar

2.6 BIOLOGÍA DEL HONGO

elementos (exoenzimas) que segregan en el medio

Raven *et.al.* (1991) indica: Las estructuras denominadas setas están formadas por muchos filamentos estrechamente unidos. Los filamentos fúngicos se conocen con el nombre de hifas, y la masa de hifas recibe el nombre de micelio. Las hifas crecen por sus extremos, pero las proteínas se sintetizan en todo el micelio y se transportan a los extremos de las hifas por corrientes citoplasmáticas. En 24 horas un solo hongo puede producir más de un kilómetro de micelio nuevo.

2.7 REPRODUCCIÓN

En los hongos la pared celular esta compuesta primordialmente por el polisacárido – quitina- el mismo compuesto que se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos. La quitina es mucho más resistente a la degradación bacteriana que la celulosa de las paredes celulares de los vegetales.

También afirma: Con su rápido crecimiento y su organización filamentosa, los hongos tienen una relación con el medio ambiente muy distinta de la que tienen otros organismos. La relación “superficie – volumen” es muy elevada en los hongos, lo cual significa que tienen un contacto muy íntimo con el medio. Prácticamente todas las partes de un hongo están en contacto con el medio. A consecuencia de ello, un hongo con un extenso micelio puede tener un profundo efecto sobre su espacio inmediato, por ejemplo, fijando las partículas del suelo.

2.7 METABOLISMO

Según Raven *et.al.* (1991), todos los hongos son heterótrofos. Obtienen su alimento como saprófito (organismos que viven sobre materia orgánica muerta), el alimento se ingiere por absorción después de que ha sido digerido o descompuesto parcialmente por enzimas secretados fuera de la célula fúngica.

Raven *et.al.* (1991), también indica que la vía habitual para la obtención de energía lo constituye el proceso de la glucólisis, seguida de la respiración aerobia, a partir de la glucosa, puesto que no obtienen suficiente energía de los procesos fermentativos.

García (1987) dice: Gracias a su capacidad metabólica los hongos pueden degradar las sustancias complejas con fermentos (exoenzimas) que segregan en el medio húmedo que les rodea, después absorbe las sustancias degradadas a través de la fina pared de la célula y distribuye el alimento por difusión simple como flujos protoplasmáticos por las aberturas de los septos. También tiene la capacidad de almacenar alimento, en las paredes de las hifas, en forma de glucógeno, sustancia relacionada con el almidón y con la dextrina, principal polisacárido de reserva de los hongos.

2.8 REPRODUCCIÓN

Según Ramírez (2004). El micelio constituye en realidad el hongo mismo, ya que la seta (a la que vulgarmente se llama hongo), es su aparato reproductor o cuerpo fructífero.

Raven *et.al.* (1991), menciona: En la naturaleza la mayoría de los basidiomicetos se reproducen principalmente a través de la formación de esporas que constituye el tipo de reproducción sexuada. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero. Este se caracteriza por tener tres tipos de micelio: El micelio primario que se desarrolla directamente a partir de las basidioesporas; al principio sus hifas son multinucleadas pero luego se tabican formando así el micelio multicelular monocariótico. El micelio secundario, que se origina por plasmogamia de las células mononucleadas del micelio primario. Es decir las células uninucleadas compatibles del micelio primario se fusionan entre sí formando células binucleadas ($n+n$); las células así formadas, se multiplican y proliferan por mitosis desarrollando el micelio secundario dicariótico. El micelio terciario está representado por los tejidos especializados del cuerpo fructífero del hongo: el basidio, la fíbula y el micelio dicariótico terciario.

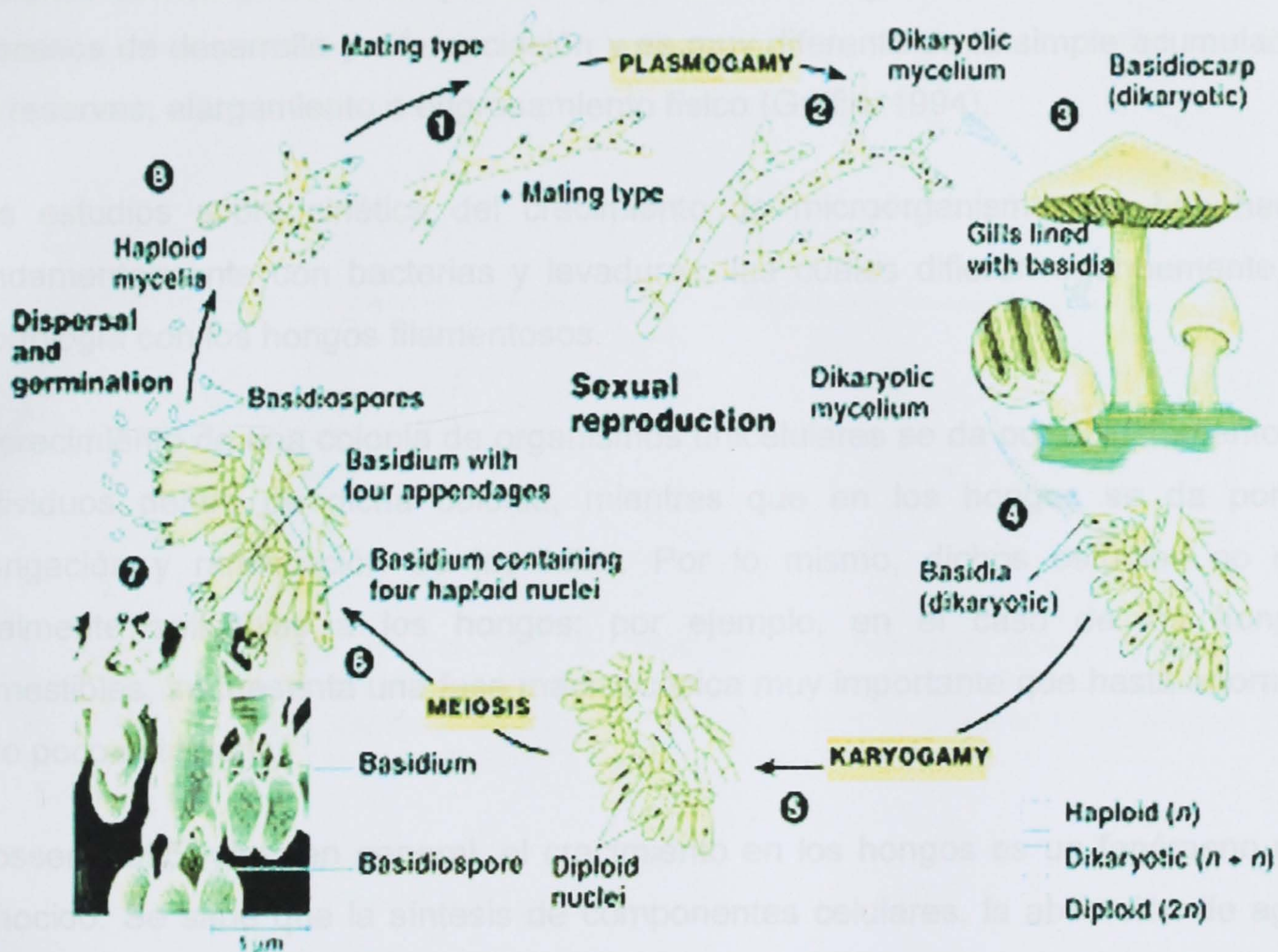


Figura 6. Ciclo de vida de los hongos Basidiomycetes. 1, Germinación de basidiosporas haploides y formación de un micelio; 2, Plasmogamia de hifas indiferenciadas de individuos compatibles de diferente signo; 3, y desarrollo de un micelio dicariótico (núcleos haploides procedentes de los diferentes parentales); 4, Basidiocarpo; 5, Detalle de las laminillas del himenio en las que se forman basidios dicarióticos; 6, Cariogamia y posterior meiosis en los basidios inmaduros; 7, Maduración de los basidios con formación de los esterigmas y las basidiosporas; 8, Liberación de las basidiosporas.

Fuente: www.ual.es/GruposInv/myco-ual/

Por otra parte, la reproducción asexual puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio, mediante prácticas de microbiología en laboratorio.

2.9 CRECIMIENTO, FASES Y FORMACION DE LA SETA

2.9.1 Crecimiento

El crecimiento de un hongo filamentoso como lo son los hongos comestibles, es un fenómeno complejo que no tiene una definición sencilla. Según Prosser (1995), es un incremento ordenado de los componentes celulares que involucra un aumento de biomasa. Es un proceso balanceado que implica generalmente el mantenimiento más

o menos constante de la composición química de un organismo, va acompañado de procesos de desarrollo y diferenciación y es muy diferente de la simple acumulación de reservas, alargamiento o engrosamiento físico (Griffin, 1994).

Los estudios sobre cinética del crecimiento de microorganismos se han hecho fundamentalmente con bacterias y levaduras, las cuales difieren enormemente en morfología con los hongos filamentosos.

El crecimiento de una colonia de organismos unicelulares se da por el incremento de individuos dentro de dicha colonia, mientras que en los hongos se da por la elongación y ramificación de las hifas. Por lo mismo, dichos estudios no son totalmente aplicables a los hongos; por ejemplo, en el caso de los hongos comestibles, se presenta una fase macroscópica muy importante que hasta ahora ha sido poco estudiada.

Prosser (1995) dice: en general, el crecimiento en los hongos es un fenómeno mal conocido. Se sabe que la síntesis de componentes celulares, la absorción de agua por la hifa y la presión de turgor juegan un papel importante en la elongación del ápice; sin embargo poco se sabe sobre el fenómeno de ramificación.

Seguramente que el hecho de que la tasa de síntesis en toda la hifa sea mayor que la tasa de incorporación en el ápice, es un factor que interviene en dicho fenómeno; sin embargo, mucho queda todavía por ser aclarado.

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

Trinci (1969-1971); y Koch (1975), indican que el crecimiento sólo se da en la parte apical de la hifa, la cual tiene la capacidad de elongarse alejándose del centro de la colonia. El ápice penetra nuevos territorios y establece nuevas fronteras. Por esta

característica, según el tamaño y la edad de la colonia, un hongo puede presentar de manera simultánea una zona de crecimiento, una zona de poco o nulo crecimiento e inclusive, una zona de autólisis.

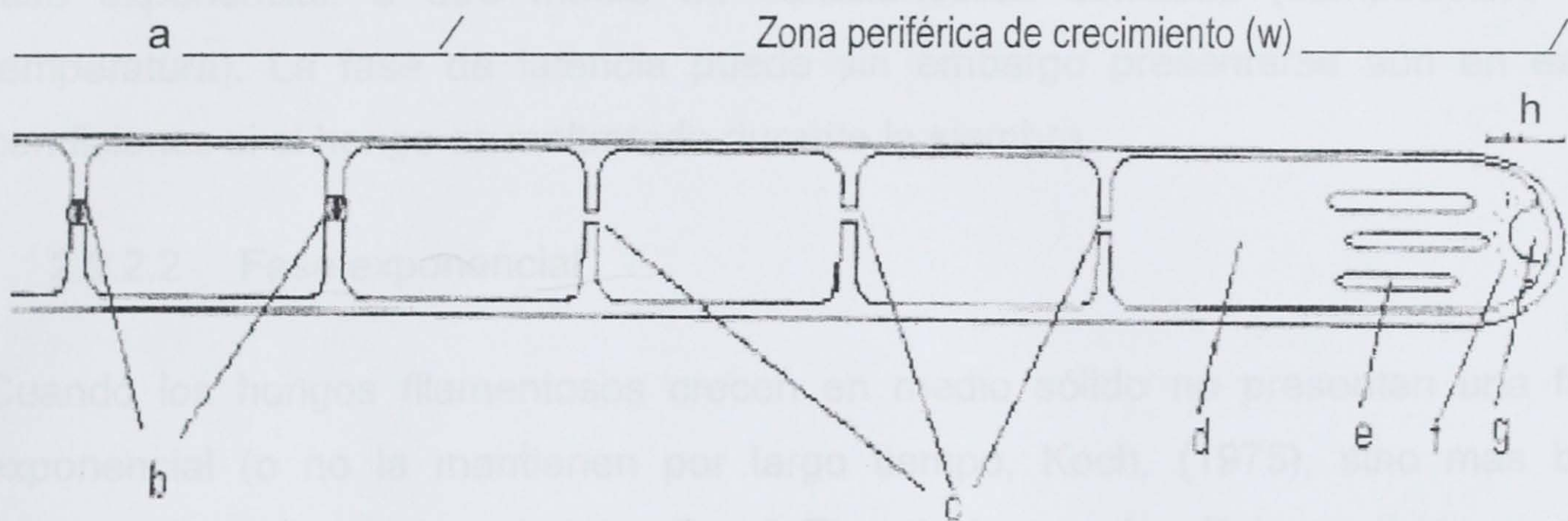


Figura 7. Partes de una hifa, a: Zona que no contribuye con protoplasma a la extensión hifal; b: Septos obstruidos; c: Septos no obstruidos; d: Célula apical; e: Mitocondria; f: Vesículas apicales; g: Cuerpo apical; h: Zona en extensión; w: Zona periférica de crecimiento. Fuente: Prosser y Trinci (1979)

2.9.2 Fases del crecimiento

Según Sánchez *et. al.* (2001), el crecimiento de un hongo varía según si se da en un medio líquido o en un medio sólido. Los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos, y que consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte. Sin embargo para Lilly y Barnett, (1951), cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal, y si se trata de un basidiomiceto, además puede presentarse, según las condiciones, una etapa de fructificación.

2.9.2.1 Fase de latencia

Continua Sánchez *et. al.* (2001): Esta fase se presenta inmediatamente después de que el hongo ha sido inoculado en un medio apropiado para su crecimiento. Es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular. Si el hongo fue dañado durante la siembra, en esta etapa de latencia sintetizará pared celular y preparará puntos de crecimiento. La duración de la fase de latencia es muy

variable y depende del tipo y del estado fisiológico del hongo, así como del tipo de substrato y de las condiciones de cultivo. La fase de latencia se minimiza o aun puede ser suprimida si un hongo es reinoculado, a partir de una colonia que crece en fase exponencial, a otro medio de características similares (composición, pH, temperatura). La fase de latencia puede sin embargo presentarse aún en estas condiciones si el hongo es maltratado durante la siembra.

2.9.2.2 Fase exponencial

Cuando los hongos filamentosos crecen en medio sólido no presentan una fase exponencial (o no la mantienen por largo tiempo, Koch, (1975), sino mas bien presentan una fase de crecimiento lineal. En esta fase cada célula se divide en dos, manteniéndose constante la velocidad del crecimiento.

2.9.2.3 Fructificación

Garcia (1999) dice que después de cierto tiempo aparecen a intervalos sobre el micelio masas compactas de hifas llamadas yemas o setas en fase de huevo. La yema da lugar a la seta adulta. Y ocurre cuando el micelio ha crecido suficientemente sobre el substrato y las condiciones del medio ambiente lo permiten (temperatura, luz, humedad relativa, cantidad de oxígeno y gravedad), las hifas se agregan para formar las setas, o carpóforos, cuya función específica es producir y diseminar esporas.

Los mecanismos que dirigen y regulan la formación de cuerpos fructíferos no son conocidos en la actualidad y resultan aún difíciles de explicar; sin embargo es claro que su desarrollo requiere de una modificación del comportamiento normal, invasivo del micelio vegetativo, por otro en el cual las hifas no tengan un crecimiento divergente, sino que converjan para formar un órgano diferenciado (Moore, 1995).

2.9.3 Formación de la seta

López, (1995), indica que los procesos por los que atraviesa un basidiocarpo (seta), para su formación son:

- Iniciación : Germina la espora y produce micelio primario.
- Diferenciación : Las hifas genéticamente diferentes pero compatibles del micelio primario se fusionan y forman el micelio secundario.
- Expansión : Multiplicación y proliferación del micelio.
- Maduración final: Formación del micelio terciario representado por los tejidos especializados del cuerpo fructífero o seta adulta.

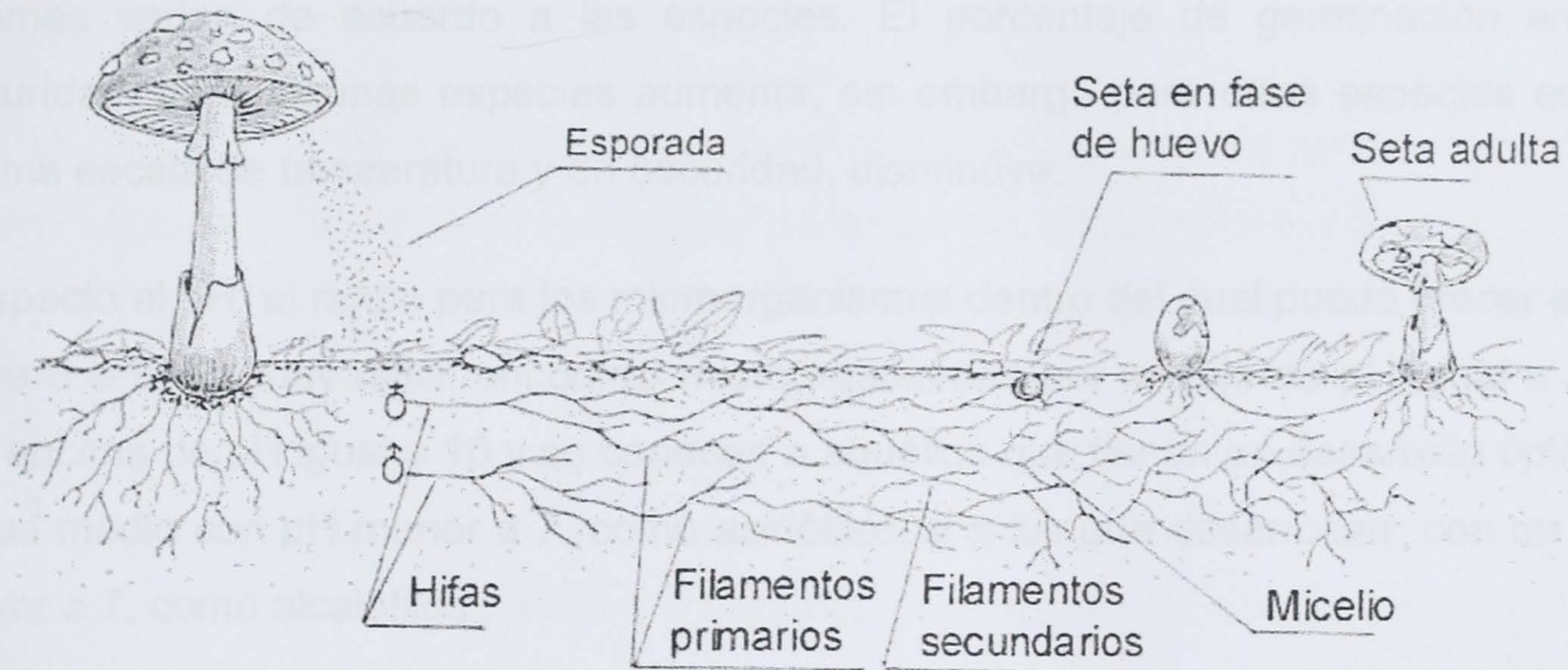


Figura 8. Formación de una seta. Fuente: López (1995)

2.10 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICELAR DEL HONGO

García (1987) menciona de una manera general: En cuanto al crecimiento del hongo, bien sea en la tierra, en la madera o en el medio de cultivo, requiere la existencia de nutrientes adecuados que puedan ser aprovechados por las hifas del micelio; además la temperatura y la humedad del sustrato ha de ser las convenientes para la especie de que se trate. Cuando ya se forman las setas, su crecimiento requerirá también una temperatura y humedad adecuadas, así como aire que aporte el oxígeno necesario y, en algunos casos cierta cantidad de luz.

Sin embargo si el crecimiento micelar inicia a partir de la germinación de esporas, ésta debe encontrarse en medio de factores externos propicios como son la temperatura, el pH y el oxígeno.

Una espora es capaz de permanecer en latencia o dormancia por muchos años, pero puede convertirse de nuevo en una célula vegetativa en cuestión de minutos, cuando las condiciones vuelven a ser favorables, las esporas germinan.

En cuanto a la germinación de las esporas, Weinberg *et.al.* (1969) hace hincapié en la temperatura como el factor externo predominante, indicando que en general la germinación de esporas puede ocurrir entre 15 y 30°C, aunque las temperaturas óptimas varían de acuerdo a las especies. El porcentaje de germinación en la oscuridad, para algunas especies aumenta, sin embargo para otras especies en la misma escala de temperatura y en oscuridad, disminuye.

Respecto al pH el rango para los microorganismos dentro del cual puede crecer esta entre 5 a 9. Es muy difícil encontrar microorganismos por debajo de pH igual a 2 o por encima de pH igual a 10 y se conocen a aquellos que tienen un desarrollo óptimo en un medio con pH menor a 7, como acidófilos, y a los que desarrollan con un pH mayor a 7, como alcalófilos.

El oxígeno O₂, en cuanto a la necesidad, es importante; pero también en cuánto a la tolerancia, y así se clasifican en aerobios y anaerobios.

2.11 TASA DE CRECIMIENTO MICELAR

Para Petrarca (1991), el crecimiento de los hongos filamentosos se puede poner de manifiesto por varios métodos, como son la determinación de la tasa de crecimiento radial, del crecimiento longitudinal, del peso seco y del peso húmedo.

Sánchez *et. al.* (2001), dice que la tasa de crecimiento de las cepas de todos los hongos generalmente se comportan de diferente manera en cada medio de cultivo. De un medio a otro puede variar su morfología, su color, su tasa de crecimiento, etc. Por lo mismo, cuando se recibe una cepa nueva, se deben hacer ciertos estudios básicos de caracterización micelial y de conservación para saber como se comporta en cada medio y cuál es el método de conservación que mejor se adapta a ella.

2.12 OBTENCIÓN O AISLAMIENTO DEL MICELIO DE HONGO

Un medio de cultivo rico en nutrientes es favorable, para que en su superficie el hongo empiece a brotar satisfactoriamente, sólo que también pueden brotar otras especies de hongos y bacterias. Y como no queremos producir un zoológico microbiano, tenemos que eliminar todo indicio de impureza desde el inicio del ciclo de vida del hongo pudiendo ser a partir de la espora o cuando se genera de una parte de tejido de la seta.

García (1987) dice: Si se intentase cultivar cualquier especie de seta imitando el proceso que tiene lugar en la naturaleza para su reproducción, el riesgo de fracaso sería muy grande. Ya hemos visto que las setas son partes de hongos que se reproducen mediante esporas, por lo que habría que empezar sembrando esporas en un medio de cultivo adecuado. Pero las esporas, siempre de tamaño microscópico, podrían caer en zonas inadecuadas y bastaría una pequeña irregularidad del medio, temperatura o humedad distintos, o con distinta composición nutritiva, para que no germinaran.

Todos estos inconvenientes se soslayan consiguiendo aislar y mantener cultivos puros del hongo deseado, en medios artificiales y en ambiente controlado en laboratorio.

El micelio así obtenido en poco tiempo y sin competencia, se multiplica después en medios manejables (sobre granos de cereales por ejemplo) que se comercializan y son adquiridos por el cultivador de setas.

2.12.1 Esterilización y asepsia

García (1987), dice que si queremos conseguir un cultivo puro de micelio, no hay más remedio que matar a todos los gérmenes que pudieran contaminarlo.

En realidad hay que actuar con las mismas técnicas y precauciones con que se trabaja en un laboratorio. El ambiente del laboratorio deberá mantenerse lo más limpio posible y será sometido a desinfecciones periódicas, un desinfectante potente para cualquier local es el formol, las puertas y ventanas deben ser herméticas; los

operarios emplearán ropa limpia y distinta de la que usan fuera, además de guantes desechables.

La esterilización de los materiales o utensilios de laboratorio, más frecuente es la que se realiza mediante calor, sobre todo en aparatos llamados autoclaves donde se utiliza el vapor de agua a presión.

Según Yaunner *et.al* (1988). La esterilización en autoclave a 121°C durante 15 - 30 minutos en forma de vapor a presión, es la forma de esterilización más práctica y más segura. La temperatura del vapor ofrece las ventajas de rapidez de calefacción, penetración y humedad abundante, que favorece la coagulación de las proteínas, lo cual es la causa principal de destrucción de los microorganismos. El material a esterilizar debe ser debidamente empaquetado antes de colocarse en la autoclave, dejando espacios libres entre ellos para facilitar la circulación del vapor.

2.12.2 Técnica para el cultivo puro

Para García (1987), lo primero que hay que conseguir es aislar la especie de hongo que queremos cultivar. Eso puede lograrse a partir de las esporas que producen las setas o utilizando una porción del sombrero.

Guerra *et.al.* (2003) refiere que los basidios van soltando las esporas poco a poco, y éstas son diseminadas por el viento. Si se coloca el sombrero de una seta ya madura sobre una cartulina, cristal o papel de filtro y se deja durante un día o más veremos que se ha depositado un polvillo denominado esporada, sobre la cartulina.

La esporada así obtenida puede utilizarse inmediatamente o refrigerarse entre 2 y 5 °C; para ello, es preferible dejarla secar durante algunas horas. El siguiente paso es la germinación de la esporada en un medio de cultivo adecuado. El procedimiento de siembra en este sentido es sumamente delicado; requiere de una serie de cuidados y medidas que deben seguirse escrupulosamente.

Según Mroginski *et al.* (1995) el aislamiento y germinación de micelio para las dos formas de reproducción tanto sexual como asexual (en laboratorio) es necesario utilizar un medio de cultivo en el que disponga sustancias nutritivas como proteínas,

azúcares, minerales y vitaminas, para el normal desarrollo micelar, además de tener un pH adecuado, estar esterilizado y protegido de posibles contaminaciones.

Steineck (1972) indica que la temperatura óptima del desarrollo micelar es de 25°C. Y el contenido de humedad del sustrato debe oscilar entre el 65%.

2.13 MEDIOS DE CULTIVO SINTÉTICOS

García (1987) indica: Tanto para aislar el hongo de que se trate como para conseguir su desarrollo óptimo en cultivo puro, se utilizan medios preparados mezclando sustancias que proporcionan al hongo los elementos nutritivos que necesita y que se mantendrán a temperatura adecuada en estufas de cultivo.

Muchos de los medios de cultivo se preparan con agar como principal componente, carbohidrato que se obtiene de algas marinas (Gelidium, Chondrus, etc.) y que constituye el soporte de los medios de cultivo sólidos.

Según Yaunner *et.al* (1988). Los medios de cultivo están constituidos por sustancias líquidas o sólidas que pueden utilizarse en el laboratorio para inducir el crecimiento de microorganismos. Cualquier trabajo con microorganismos requiere la preparación de medios nutricionales para el cultivo de los mismos en condiciones artificiales de laboratorio.

Los medios de cultivo se emplean con los fines siguientes:

- Aislar los microorganismos de sus fuentes naturales.
- Desarrollar y conservar cultivos de microorganismos en condiciones asépticas.
- Estudiar la acción de los microorganismos sobre alguna sustancia o producto determinado, bien sea en procesos industriales o con fines investigativos.

Un medio de cultivo que va a utilizarse para estos fines, debe responder a las condiciones siguientes:

- Contener todas las sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos correspondientes.
- Tener el pH y la presión osmótica adecuados a las exigencias que de estos factores tienen los microorganismos.
- No contener sustancias que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos que han de cultivarse.
- Estar estériles.

Un requisito fundamental en la preparación de los medios de cultivo lo constituye la determinación y el ajuste de pH, dada la importancia de la gran sensibilidad de los microorganismos a la reacción del medio.

Según prácticas de microbiología la adición al medio, de antibióticos como el cloranfenicol o la gentamicina, inhiben el crecimiento de las bacterias contaminantes, o antifúngicos especiales.

Guerra *et.al.* (2003) Indica, la composición de los medios de cultivo mas utilizados en el aislamiento y cultivo de hongos se basan en las siguientes fórmulas de laboratorio: un litro de agua pura; 15 g de agar; 5 g de glucosa; 5 g de maltosa; 0.5 g de fosfato monopotásico; 5 g de sulfato de magnesio; solución de cloruro férrico al 1%-0.5 cc; 50 µg de tiamina y 1 µg de biotina. Comercialmente se pueden conseguir en laboratorios medios de germinación ya preparados utilizados para la proliferación de hongos; el más común se denomina dextrosa-agar de *Sabouraud*.

Un medio de cultivo casero válido para las setas comunes y otras especies afines se puede prepara con 50 g de papas y zanahorias, peladas, rayadas y puestas en maceración durante una hora; a continuación se ponen a hervir en una olla durante 10 minutos. El puré obtenido se tamiza a través de una gasa y al líquido obtenido se le añaden 20 g de glucosa o de azúcar de caña y 20 g de agar. El preparado debe esterilizarse en su propio envase para evitar contaminaciones.

2.14 MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

Los medios de cultivo naturales empleados en la producción de “semilla de hongo”, generalmente son los granos de cereales por proveer condiciones favorables.

Según García (1987) el micelio que el productor emplea para obtener setas sobre un sustrato cualquiera, debe estar en cantidades disponibles grandes y en una forma que permita una manipulación fácil. Por ejemplo la forma granulada es muy útil por que facilita la siembra al poder mezclarse uniformemente con el sustrato y permitir el uso a mayores escalas.

Para Guerra *et.al.* (2003), la mayoría de los sustratos destinados al crecimiento de los micelios se realizan sobre un nutriente que contenga granos como trigo o arroz integral, a los que se añade perlita o vermiculita esterilizadas. Los granos de arroz o trigo se hierven con suficiente agua y tiempo para que se reblandezcan sin que la albúmina estalle y rompa la testa protectora. El grano debe estar entero y finalmente seco, para lo cual debe hornearse ligeramente. A continuación se mide la acidez, que debe oscilar entre 6 y 6,5 de pH; si es ácido, se añade carbonato de calcio (en el caso del trigo es de 3,5 g/kg) y algo de yeso (de 5 a 8 g), para evitar que se apelmace si está muy pegajoso.

Algunas fórmulas incluyen salvado de trigo y perlita con carbonato y agua. Algunos tipos de hongos como *Lentinula* o *Flammulina* crecen naturalmente sobre la madera; por ello, se preparan sobre aserrín esterilizado y humedecido, además del grano de cereal cocido.

Algunas casas comerciales administran los micelios ya preparados para ser utilizados en la cría posterior de los carpóforos o setas que serán finalmente destinadas al consumo.

2.15 IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

Según Pemán *et.al* (2001). Un hongo se identifica en primer lugar por la morfología macroscópica de la colonia, color, textura y velocidad de crecimiento. Los hongos filamentosos se identifican a nivel de género o especie por la morfología del micelio,

pero sobre todo por las características microscópicas de sus esporas asexuadas y los elementos que las originan.

2.15.1 Visualización del hongo - Examen microscópico

El examen microscópico del hongo en las muestras de los cultivos se efectúa previa tinción y directamente en fresco.

Yaunner *et.al* (1988). Indica: En la práctica se observará el micelio del hongo con los filamentos tubulares microscópicos denominados hifas que pueden ser septadas con células mononucleadas, septadas con células multinucleadas y no septadas.

Para las preparaciones microscópicas se utiliza el lacto fenol como líquido de montaje. Una manipulación de este tipo rompe y desorganiza las estructuras del organismo, pues la disposición característica de la que depende la identificación se pierde y no es posible clasificarlo. Por lo que un método mejor para examinar al hongo es la técnica de cultivo en portaobjetos (micro cultivo), ya que permite manejar y observar la especie sin modificar su desarrollo, y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactos.

Yaunner *et.al* (1988) continúa diciendo: En las preparaciones microscópicas de hongos no se utiliza el agua como líquido de montaje, ya que se evapora rápidamente y trae como consecuencia que las hifas se hinchen por ósmosis y en consecuencia se adhieran entre sí.

Respecto al examen de las esporas indica que son un material muy importante en la clasificación de un hongo y una buena observación solo puede darse cuando las esporas están maduras. En el caso de los Agáricos no es necesario conocer la disposición de las esporas para identificarlos, en este examen también se utiliza como líquido de montaje lactofenol.

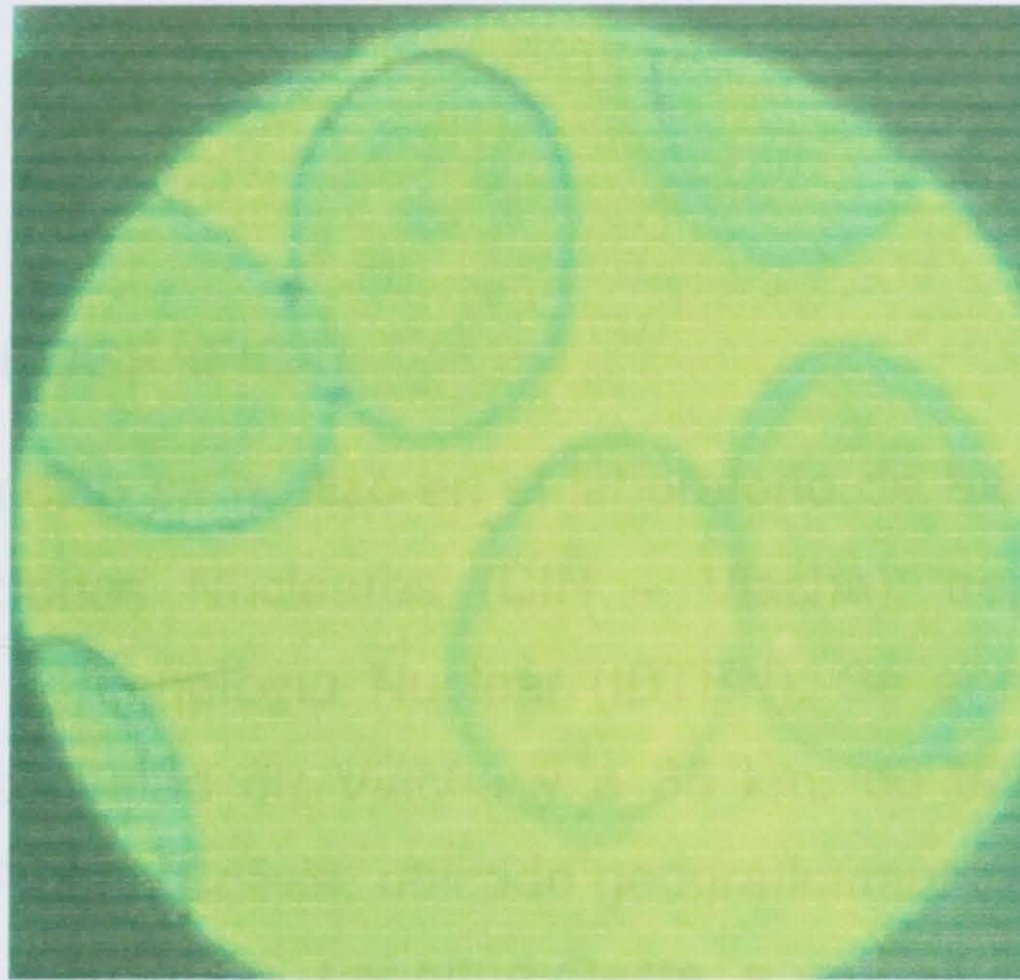


Figura 9. Fotografía de esporas de un *Agaricus* sp. Fuente: Charly S. (1963)

2.16 DESARROLLO DEL MICELIO EN LABORATORIO

Guerra *et.al.* (2003) indica: Antes de desarrollar la parte de seta en laboratorio o con la intervención del hombre, el hongo pasa por una serie de fases, cada fase requiere un procedimiento y un medio de cultivo generalmente distinto:

- El principio del ciclo comprende la fase vegetativa del hongo que consiste en el aislamiento o germinación de micelio a partir de esporas o a partir de implantes.
- Luego, la multiplicación de los micelios desarrollados.
- Y al final alcanza un completo desarrollo cuando el micelio obtenido se siembra o inocula en un sustrato definitivo que se realiza fuera de un laboratorio, y esta es la denominada fase de producción, cuando ya se obtienen las setas.

CAPITULO III

3. LOCALIZACION

3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN – Viacha), dependiente del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN). Se encuentra en la Provincia Ingavi, a 3 km. de la ciudad de Viacha y a 35 km. de la ciudad de La Paz del departamento de La Paz en Bolivia, ubicado geográficamente entre los paralelos 16° 39' 25" Latitud Sur y 68° 18' 00" Longitud Oeste, a una altura de 3.850 m.s.n.m. El clima de la región es frío, con una temperatura media anual de 7.1° C y una temperatura máxima de 16.6° C, con una humedad relativa media anual de 57.8 %

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico en estudio fueron setas recolectadas del hongo *Agaricus sp.*, esporas recolectadas del mismo hongo *Agaricus sp.*, granos de cebada cruda cosechados en el entorno del municipio boliviano correspondiente al departamento de La Paz, granos de arroz integral provenientes del departamento de Santa Cruz y como materia orgánica, utilizamos el estiércol de caballo recogido en las caballerizas existentes en el Municipio de Mecapaca.

4.2. RECOLECCIÓN DE SETAS SILVESTRES

La recolección se realizó en el municipio de Mecapaca del Departamento de La Paz, tomando en cuenta aquellas setas que presentaron mejor calidad, mejor tamaño y mayor grado de madurez. Se depositaron las setas en bolsas de polipropileno sin cerrar, tratando de que los sombreros sean los que descansen en la base, para evitar que caiga la esporada, y luego introducidas en cajas de cartón para evitar posibles contaminaciones. Cada bolsa se etiquetó indicando la fecha, el lugar, la temperatura del día, humedad y el nombre del colector.

4. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo experimental se realizó en dos etapas, la primera que permitió determinar cuál medio de cultivo sintético de los tres que se propuso y a que grado de temperatura, tuvo mejor efecto en el crecimiento del micelio para originar una cepa pura del hongo comestible *Agaricus* sp. La segunda que consistió también en determinar qué temperatura y cuál de los cuatro medios de cultivo naturales probados presentaban las mejores cualidades para ser utilizado como sustrato de "semilla de hongo *Agaricus* sp".

Toda la experimentación se desarrolló en condiciones de laboratorio de biotecnología vegetal.

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico en estudio fueron setas recolectadas del hongo *Agaricus* sp., esporas cosechadas del mismo hongo *Agaricus* sp., granos de cebada criolla cosechados en el entorno del altiplano boliviano correspondiente al departamento de La Paz, granos de arroz integral provenientes del departamento de Santa Cruz y como materia orgánica, utilizamos el estiércol de caballo recogido en las caballerizas existentes en el Municipio de Mecapaca.

4.2. RECOLECCIÓN DE SETAS SILVESTRES

La recolección se realizó en el municipio de Mecapaca del Departamento de La Paz, tomando en cuenta aquellas setas que presentaron mejor calidad, mejor tamaño y mayor grado de madurez. Se depositaron las setas en bolsas de polipropileno sin cerrar, tratando de que los sombreros sean los que descansan en la base, para evitar que caiga la esporada, y luego introducidas en cajas de cartón para evitar posibles contaminaciones. Cada bolsa se etiquetó rotulando la fecha, el lugar, la temperatura del día, humedad y el nombre del colector.

4.3. LIMPIEZA DE LAS SETAS Y COSECHA DE ESPORAS

Se limpio las setas silvestres con un cepillo de cerdas suaves, todos los restos de tierra que tenían en la base del pie y encima del sombrero, se lavó con agua de pileta y detergente normal para quitar restos de suelo adheridos. Luego se limpio el cuerpo de las setas con alcohol al 70% rápidamente para evitar dañar el tejido que fácilmente perece. Después, se corto $\frac{3}{4}$ partes del pie de las setas y se coloco los sombreros parados sobre el resto de pie que les queda, en placas Petri, para recoger ahí las esporas que vayan cayendo hasta que la seta deje de esporular. Cosechadas de esta manera las esporas, se sellaron las placas con plastifilm evitando contaminaciones posteriores y se almaceno a una temperatura de 5° C.

4.4 AISLAMIENTO DEL HONGO *Agaricus* sp.

Se realiza el aislamiento con la finalidad de obtener una cepa pura del hongo, con ausencia total de cualquier otro tipo de agente micológico.

Han sido dos las técnicas previas utilizadas para el aislamiento del hongo. La primera a partir de la inoculación de esporas y la segunda a partir de la inoculación de pequeños implantes de tejido viable, extraído con un bisturí de la parte central de la seta madre, ubicado entre el sombrero y pie de la misma.

Tanto esporas como tejido fueron inoculados sobre un medio general PDA (Papa-Dextrosa-Agar) con un pH de 6.5 ajustado con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, ambos al 0.1 N dependiendo el caso, en tubos y placas Petri que luego se incubo en penumbra y a una temperatura entre 18°C a 23°C de la sala de crecimiento del laboratorio.

El micelio desarrollado en lo posterior servirá para la obtención de la cepa pura del hongo *Agaricus* sp. en los medios sintéticos propuesto para la multiplicación del micelio.

4.5 OBTENCIÓN DE CEPA PURA DEL HONGO *Agaricus* sp. EN MEDIOS DE CULTIVO SINTÉTICOS

La cadena de producción de setas comestibles abarca dos fases importantes que son la Fase Vegetativa y la Fase Reproductiva, la primera es una fase estéril durante la cual solo se obtiene la cepa pura y se produce la semilla del hongo deseado, y son conocidas como la etapa de cepario y etapa de producción de semilla de hongo.

Para establecer un medio de cultivo sintético óptimo para el desarrollo de micelio del hongo *Agaricus* sp., en la etapa de cepario, se elaboró tres medios de cultivos sintéticos o comerciales, según las siguientes formulaciones:

Composición de los medios de cultivo sintéticos

A₁: (PDA) Papa Dextrosa Agar

Extracto de papa.....250.0 gr.

Dextrosa..... 10.0 gr.

Agar..... 15.0 gr.

Agua destilada.....1000 ml.

Disolver todos los componentes en los 1000 ml. de agua destilada.

A₂: (PDY) Papa Dextrosa Levadura

Extracto de papa.....250.0 gr.

Dextrosa..... 10.0 gr.

Agar..... 15.0 gr.

Extracto de levadura.....1.5 gr.

Agua Destilada.....1000 ml.

Disolver todos los componentes en los 1000 ml. de agua destilada.

4.6 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

A₃: (MEA) Malta Bifosfato potásico Agar

Malta.....20.0 gr.

Bifosfato potásico.....0.1 gr.

Agar.....25.0 gr.

Agua Destilada.....1000 ml.

Disolver todos los componentes en los 1000 ml. de agua destilada.

Una vez preparados los medios, se vertió un volumen de 10 ml. de cada medio en las placas Petri de 5.5 cm x 1.5 cm y se esterilizó en autoclave durante 15 min., a 121° C de temperatura y 1 Atm. de presión.

Luego se dejó reposar dentro la cámara de flujo laminar unas 24 horas antes de la inoculación. Posteriormente se inoculó con implantes cubiculares de micelio, de más o menos 0.5 cm² de un área considerada dentro del margen activo del micelio crecido anteriormente en las placas y tubos de ensayo.

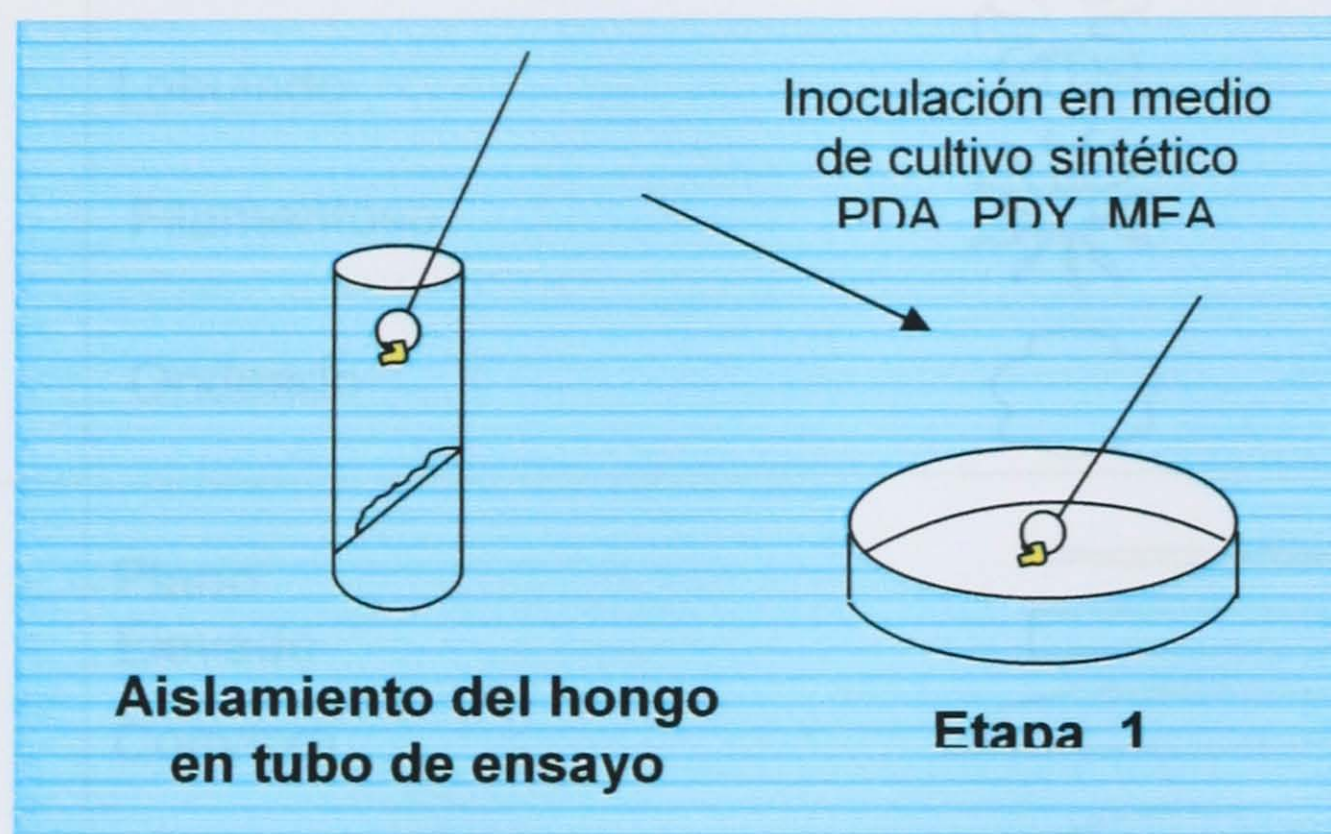

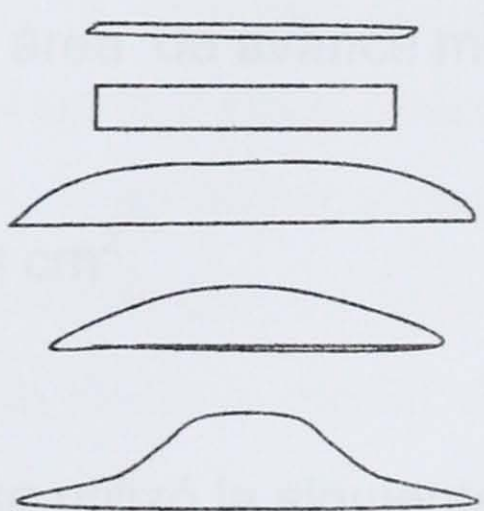


Figura 10. Preparación del inóculo para la Etapa de cepario. Fuente: Propia

Terminada la inoculación se sellaron las placas con plastifilm y se rotuló como corresponde a cada placa, luego se incubó en oscuridad en tres cámaras de crecimiento graduados a tres diferentes temperaturas: 17°C, 20°C y 25°C. , con 6 repeticiones cada tratamiento

4.6 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

Para la evaluación macroscópica de las colonias obtenidas, se recurrió a los parámetros macroscópicos sugeridos para la descripción macro morfológica en cualquier práctica microbiológica de hongos, como puede observarse en el cuadro 1.

Forma	Puntiforme, circular, rizoide, irregular o filamentosa	
Tamaño	Grande (mas de 3mm.) Mediano (2 a 3 mm.) Pequeño (1 a 2 mm.)	
Color	Blanco, crema o café	
Borde	Entero Ondulado Lobulado Filamentoso Ondeado	
Elevación	Plano Elevado Convexo Pulvinado Umbonado	
Superficie de aspecto:	Suave, brillante, rugosa, plegada, seca, polvorienta, algodonosa	
Desarrollo del micelio	Muy bueno Bueno Escaso	+++ ++ +

Cuadro 1. Parámetros de evaluación macroscópica en hongos filamentosos. Fuente.: Compilado de varias fuentes

4.7 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

La morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. Para la evaluación de las hifas se realizó una observación microscópica en fresco, cuyo procedimiento también es el mismo para las esporas y es el siguiente:

- Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de una colonia de hifas o de una esporada.
- Colocar la cinta sobre una gota de azul de lactofenol colocada a su vez sobre un portaobjetos.
- Observar al microscopio para conocer la forma y ordenamiento de las hifas.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL

Durante el periodo de incubación, para la estimación del crecimiento de micelio de *Agaricus sp.* se utilizó el método de medida lineal, tomando en cuenta los radios de las colonias formadas, determinando en las placas Petri, orientaciones Norte, Sur, Este y Oeste, se midió el crecimiento sobre papel milimetrado cada 7 días hasta que el micelio llegó al borde de la placa, obteniendo un promedio de las cuatro lecturas en centímetros. Con estos resultados se calculó el área de avance micelial en cm^2 .

$$\text{Área} = \pi \times \text{radio}^2 = \text{cm}^2$$

Para el cálculo de la Tasa de crecimiento micelial se utilizó la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l} \text{Tasa de} \\ \text{Crecimiento} \\ \text{Micelial} \end{array} = \frac{\text{Área (cm}^2\text{)}}{\text{Tiempo transcurrido (horas)}} = \text{cm}^2/\text{hora}$$

Ya concluido el tiempo del crecimiento micelar en esta etapa, disponemos la cepa pura del hongo *Agaricus sp.* obtenida para la siguiente etapa.

4.9 PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE HONGO *Agaricus* sp. EN MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

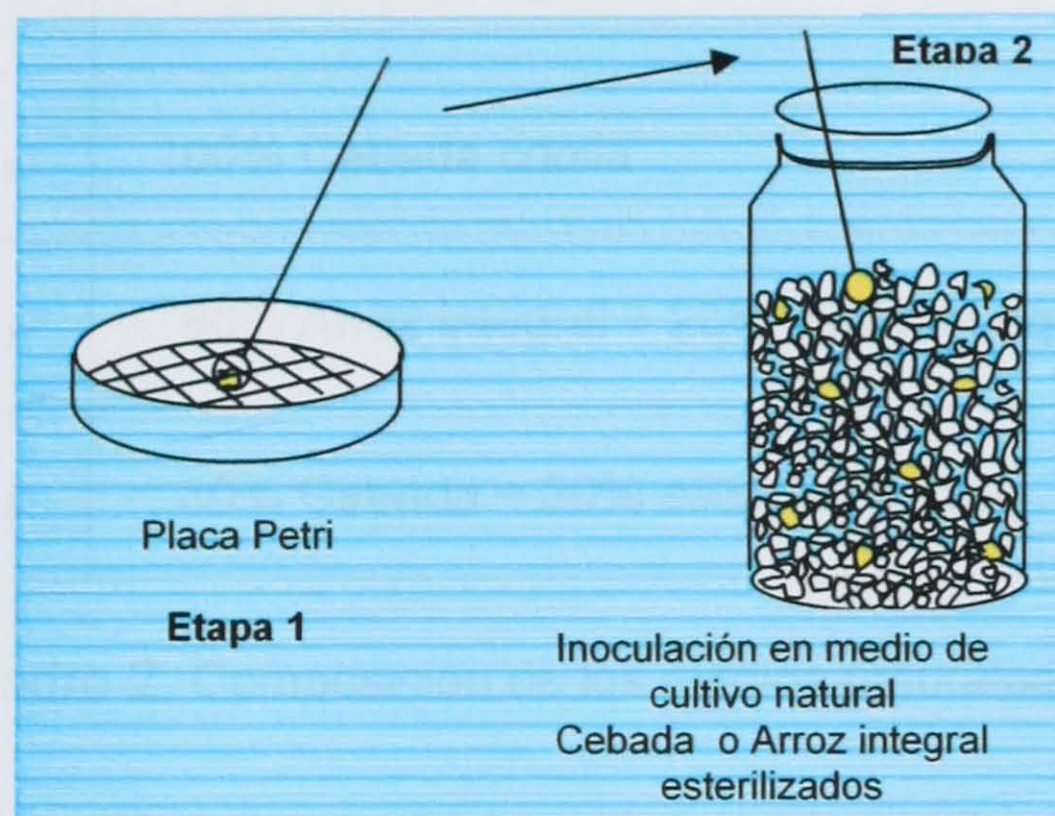


Figura 11. Preparación del inóculo para la Etapa de producción de semilla

Para el efecto, se prepararon cuatro medios de cultivo naturales: Granos de arroz integral, Granos de cebada sin pelar, Granos de arroz integral + Estiércol de caballo, y Granos de cebada + Estiércol de caballo, de los cuales solo los granos tuvieron un tratamiento de precocido; en el caso del arroz integral, el grano debe estar entero y ligeramente húmedo, en la cebada no debe romperse la testa o cascarilla y también debe estar ligeramente húmedo. Para la preparación del tercer y cuarto medio solo se mezcló con estiércol equino ligeramente humedecido, con un peso equivalente al 20% de la composición total del medio y el grano con un peso del 80 %.

Los sustratos preparados fueron introducidos en frascos de vidrio de 6 cm. de diámetro y un alto de 11 cm. hasta cubrir sólo dos tercios de su capacidad, luego se selló el borde del frasco con papel aluminio, y esterilizo en autoclave durante 15 min., a 121° C de temperatura y 1 Atm de presión. Una vez fríos los frascos se tomaron porciones pequeñas de "semilla madre" sustraídas de las placas Petri de la primera etapa, y se inocularon en los sustratos o medios naturales con una réplica de cuatro unidades para cada medio designándolos como: A₁, A₂, A₃ y A₄ respectivamente cuya formulación se explica en el Cuadro 2, incubados a tres grados diferentes de temperatura B₁ (17°C), B₂ (20°C) y B₂ (25°C).

Estos medios naturales tienen la siguiente formulación:

A ₁	100% Arroz integral
A ₂	100% Cebada criolla
A ₃	80% Arroz integral + 20% estiércol equino
A ₄	80% Cebada + 20% estiércol equino

Cuadro 2. Composición de los medios naturales

Luego de esterilizados y fríos los frascos se los traslado al interior de la cámara de flujo laminar, donde, se sustrajo con un asa de siembra previamente flameada, pequeñas porciones de micelio contenido en las placas y se sembró entre el sustrato de granos. Las repeticiones se practicaron por cuadruplicado.

Para realizar una buena siembra se inclinó el frasco en dirección del mechero, dejando un espacio entreabierto entre el sustrato y la pared del frasco, hacia el medio interior, lugar donde se deposita el implante. Este procedimiento se realiza cinco a seis veces en forma radial. De esta manera se acelera la colonización de todos los granos.

Terminada la siembra, se selló los frascos con plástifilm y ligas, y se rotuló como corresponde a cada frasco. Luego se traslado a las distintas cámaras de crecimiento con diferentes temperaturas hasta que el micelio creció cubriendo la mayor parte de la superficie de los granos.

4.10 ANALISIS DE DATOS

El proceso de las dos etapas, tanto para la obtención de cepa pura como para la producción de "semilla del hongo" *Agaricus* sp. se desarrolló en base a un Diseño Bifactorial, con una distribución completamente aleatoria.

Factor B Modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$

Donde: μ = Media general

A_i = Efecto de los medios de multiplicación

B_j = Efecto de las escalas de temperatura

AB_{ij} = Efecto de la interacción del Factor A y el Factor B

E_{ijk} = Error experimental

i = Niveles para el Factor A

j = Niveles para el Factor B

k = 6 repeticiones por interacción de los Factores A y B para la etapa de cepario, y 4 repeticiones por interacción de los Factores A y B para la etapa de producción de semilla de hongo *Agaricus* sp.

4.10.1 Fuentes de estudio

Factor A = Medios de cultivo

Factor B = Escalas de temperatura

Composición de los factores para los Medios Sintéticos

Factor A A_1 : PDA
 A_2 : PDY
 A_3 : MEA

Factor B B_1 : 17° C
 B_2 : 20° C
 B_3 : 25° C

Composición de los factores para los Medios naturales:

Factor A A_1 : 100% Arroz integral
 A_2 : 100% Cebada
 A_3 : 80% Arroz integral + 20% estiércol equino
 A_4 : 80% Cebada + 20 % estiércol equino

- C. Factor B
- B₁ : 17° C
 - B₂ : 21° C
 - B₃ : 25° C

4.10.2 Variables de respuesta

- Porcentaje de germinación de las esporas (%)
- Tasa de crecimiento micelial (cm²/hora)
- Tiempo de colonización del micelio en los diferentes medios de cultivo.
(Días/medio de cultivo)
- Eficiencia biológica de los medios de cultivo (%)

CAPITULO V

5. RESULTADOS y DISCUSION

La producción de micelio en granos es primordial cuando se planifica una producción masiva de hongos comestibles. En la figura 10 y el acápite siguiente se muestra el resultado del paso inicial de preparación para la obtención de cepa pura del hongo *Agaricus sp.*

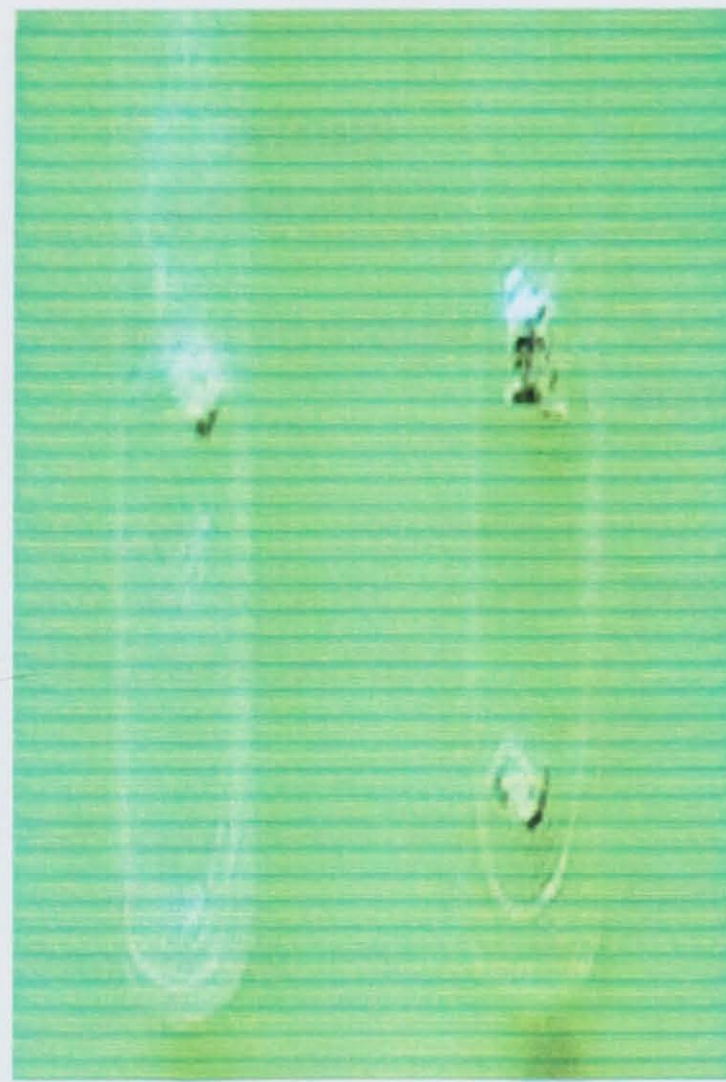
5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CARACTERES.

Del organismo en estudio *Agaricus sp.*, una vez limpiada y desinfectada, se cosechó las esporas y se sustrajeron fragmentos de tejido.

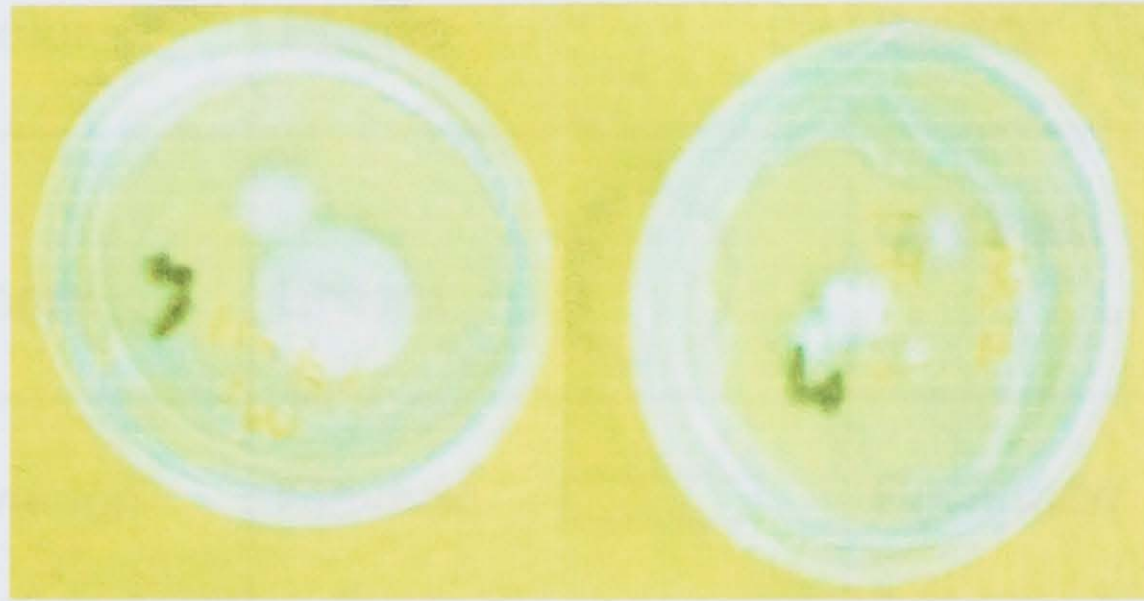
Han sido dos las técnicas previas utilizadas para el aislamiento e identificación del hongo, la sugerida por García (1987): reproducción sexual a partir de esporas, y la de Raven *et.al* (1981) que dice: la reproducción asexuada puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio.

De estas dos, en la primera técnica, el tiempo de adaptación de las esporas al medio fue más lento y en este lapso no se observó crecimiento de micelio, y cuando germinaron las esporas, esta no fue uniforme, sin embargo la colonización fue más rápida y se extendió en toda la superficie del medio, cumpliéndose este hecho con lo mencionado por García Mendoza (1999) que dice: el crecimiento es apical y en forma radial. (Fig. 12-B)

Durante el desarrollo de la segunda técnica el crecimiento micelar no fue igual que en la anterior técnica, debido posiblemente, a que, el implante de tejido de la seta contenía nutrientes que provocaron un crecimiento micelar para el hongo en menos tiempo, pero solo sobre el mismo implante, y sobre el medio que lo rodeaba tardo más que en la primera con un crecimiento pobre sin llegar a cubrir la superficie del medio de cultivo, lo cual genero dificultad al realizar los cortes para la obtención de implantes que se inocularían en los tres medios de las placas Petri. (Fig. 12 - A).



A



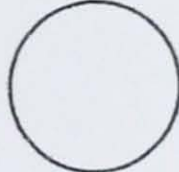



B

Figura 12. Aspecto de las colonias de *Agaricus* sp: A) Colonia sobre PDA, dos semanas de cultivo, 20° C con crecimiento micelar a partir de implantes de tejido fúngico en tubos; B) Colonias sobre PDA, dos semanas de cultivo, 20° C con crecimiento micelar a partir de esporas en placas.

Una vez crecido el micelio se procedió a la identificación del hongo basado principalmente en el estudio de los caracteres morfológicos, macro y microscópicos, realizando el examen antes de inocular los tres medios de cultivo propuestos para la obtención de la cepa pura.

5.2 CARACTERES MACROSCÓPICOS

Las colonias desarrolladas presentaron las siguientes características macromorfológicas evaluadas de acuerdo al Cuadro 1 y según el origen de su reproducción: sexual y asexual.

Características	Sexual (esporas)	Asexual (implantes)
Micelio	Aéreo y sumergido	Aéreo y poco sumergido
Forma	Circular, originados en la espora como pequeños puntos	Irregulares
Tamaño	De pequeños puntos (1-2mm.) hasta fusionarse en uno grande	Irregulares
Color	Blanco	Blanco
Borde	Entero 	Ondeado 
Elevación	Elevado 	Pulvinado 
Superficie	Suave , algodónosa	Suave, algodónosa
Desarrollo	+++ (muy bueno)	++ (bueno)

Cuadro 3. Características macro morfológicas del hongo *Agaricus* sp. Fuente: Propia

5.3 CARACTERES MICROSCÓPICOS

Durante la evaluación microscópica se ha identificado un micelio blanquecino compuesto de hifas filiformes y ramificadas, que corrobora lo indicado por García Mendoza (1999), las hifas son septadas y presentan orificios para facilitar el paso de sustancias nutritivas entre ellas.

5.4 OBTENCIÓN DE CEPA PURA DEL HONGO *Agaricus* sp. EN MEDIOS DE CULTIVO SINTÉTICOS

En el proceso de obtención del micelio de *Agaricus* sp., en tres medios de cultivo distintos en su composición, e incubados a su vez en tres diferentes temperaturas, se evaluó la germinación de las esporas, la calidad de la cepa, también se determinó la tasa de crecimiento micelar, el medio de cultivo sintético óptimo para el desarrollo micelar y la determinación de la temperatura adecuada para el desarrollo micelar.

5.4.1 Germinación de las esporas

Se realizó una estimación indirecta de la germinación, mediante el conteo visual de las colonias que se desarrollaron a partir de esporas en diferentes temperaturas y medios sintéticos de cultivo. Se observó mayor inducción a la germinación a una temperatura de 25° C y un menor tiempo de germinación en el medio sintético: A₁ (PDA).

5.4.2 Control de calidad de la cepa

En esta etapa del proceso de producción al evaluar el crecimiento micelar, se ha detectado y se ha visto necesario desechar las placas Petri donde se observó la presencia de microorganismos contaminantes del género *Aspergillus* y *Penicillium* en los medios de cultivo. También se apartó las placas donde se iniciaron antes la germinación y las que presentaban mejor densidad micelar sin desechar las otras.

5.4.3 Determinación de la tasa de crecimiento micelar

El tiempo total de incubación en esta primera etapa fue de seis semanas, sin embargo, no se tomó en cuenta la primera semana por que no hubo crecimiento micelar en ninguna placa, debido a la fase de adaptación del hongo al medio de cultivo.

Los valores del crecimiento durante la incubación se obtuvieron en cm² durante cinco semanas (840 horas). El micelio de *Agaricus* sp., tuvo un crecimiento que se

inició a partir de la segunda semana en la mayoría de los tratamientos y entre los 21 a 28 días más el micelio cubría todo el medio, en Papa-Dextrosa-Agar, entre los 21 a 28 días en Papa-Dextrosa-Levadura y hasta los 35 en Malta-Bifosfato potásico-Agar.

Para la estimación y expresión del crecimiento de micelio de *Agaricus* sp., se determinó en las placas, orientaciones Norte, Sur, Este y Oeste y se midió el crecimiento sobre papel milimetrado cada 7 días hasta que el micelio llegó al límite de la placa, obteniendo un promedio de las cuatro lecturas.

Con estos resultados se calculó el área de avance micelar y la tasa de crecimiento micelar (TCM) expresado en cm^2/hora , en el cuadro siguiente se observa los datos de las tasas de crecimiento correspondientes a cada medio de cultivo.

Trat.	Rep.	Prom. (cm.)	Área (cm^2)	TCM (cm^2/h)
A ₁ B ₁	6	2.50	19.6	0.023
A ₁ B ₂	6	2.36	17.6	0.020
A ₁ B ₃	6	2.06	13.4	0.016
A ₂ B ₁	6	2.23	15.7	0.018
A ₂ B ₂	6	2.20	15.2	0.017
A ₂ B ₃	6	1.51	7.42	0.008
A ₃ B ₁	6	1.75	9.65	0.011

A ₃ B ₂	6	1.82	8.7	0.012
A ₃ B ₃	6	1.37	5.9	0.006

Cuadro 4. Tasa de crecimiento para los diferentes medios de cultivo sintéticos: A₁, A₂, A₃

Con los valores de las tasas de crecimiento más altas de cada medio, se elaboro el histograma siguiente.

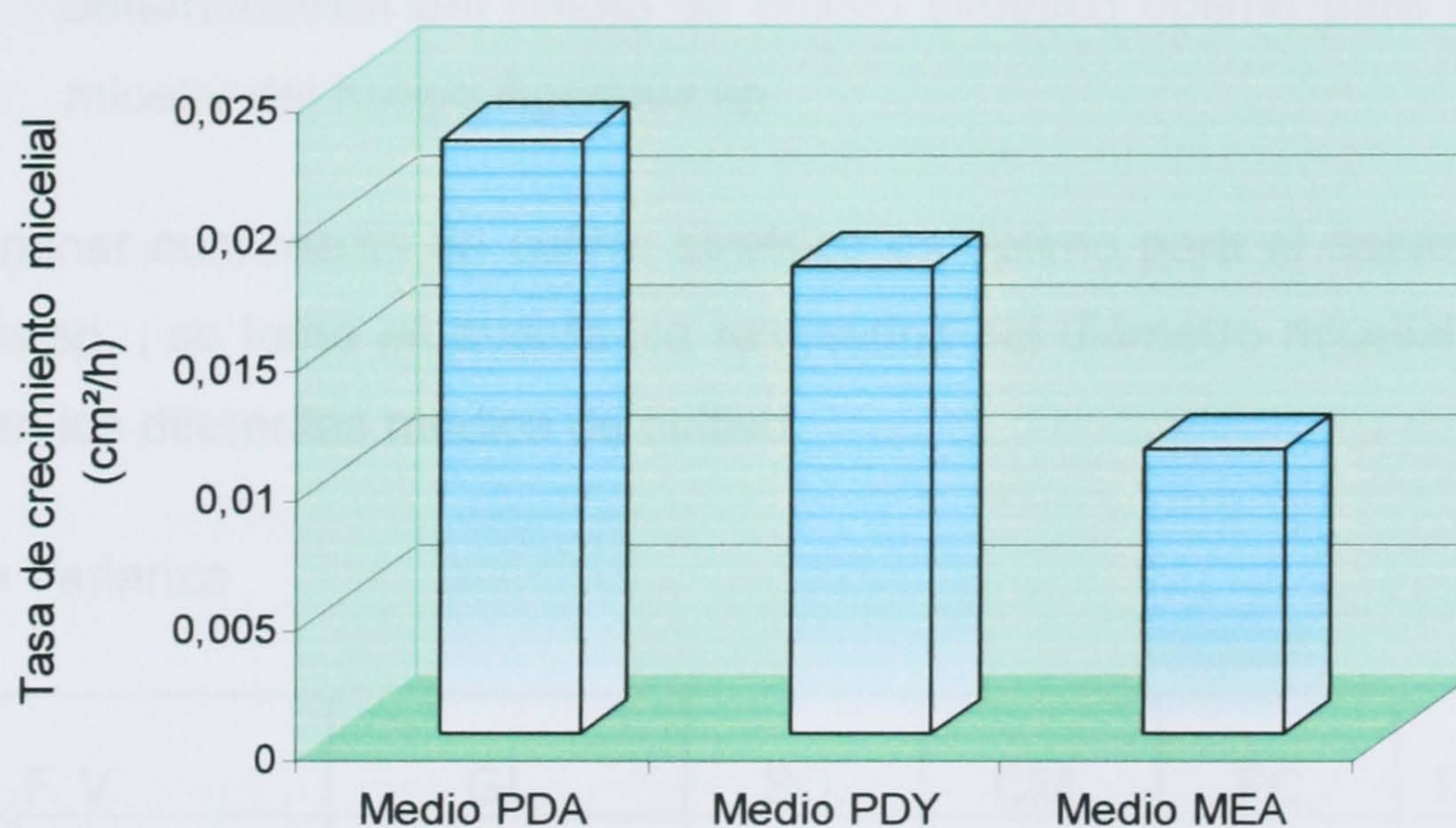


Figura 13. Crecimiento micelar de *Agaricus* sp., expresado en tasa de crecimiento, para los medios de cultivo sintético: A₁, A₂ y A₃.

Donde se demuestra que el hongo *Agaricus* sp., se desarrollo con mayor rapidez en el Medio de cultivo A₁: PDA (Extracto de papa, dextrosa, agar), cuya tasa de crecimiento micelial mas alto es de 0.023 cm²/h, seguido inmediatamente por el crecimiento en el Medio de cultivo A₂: PDY (Extracto de papa, dextrosa, extracto de levadura, agar), con una tasa de crecimiento micelial de 0.018 cm²/h, finalmente el Medio de cultivo A₃: MEA (Malta, Bifosfato potásico, agar), con la tasa de crecimiento micelial de 0.012 cm²/h. Constituyéndose el medio PDA, como el medio de cultivo más apropiado para promover un buen desarrollo micelial del hongo *Agaricus* sp. y como se observa en las placas de la figura 14 el micelio desarrollado en el medio PDA es mas consistente y denso que los micelios desarrollados en los otros medios.

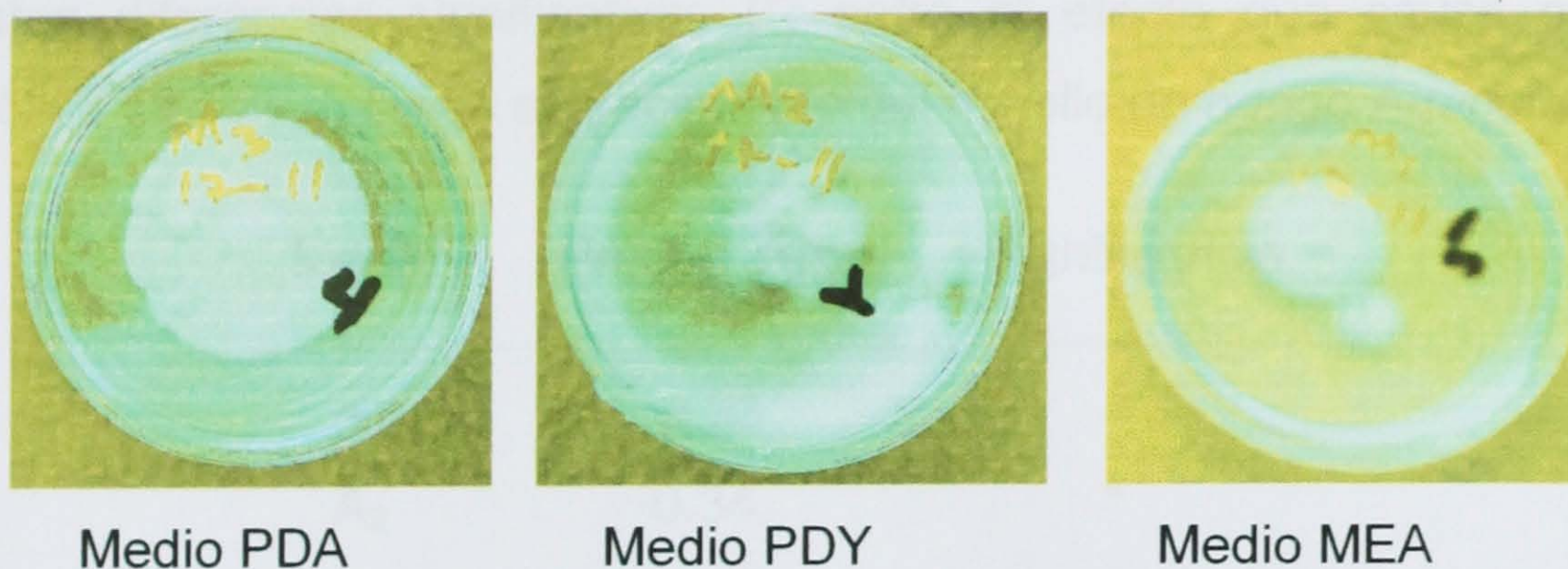


Figura 14. Colonias con crecimiento micelar de *Agaricus* sp. en diferentes medios para un mismo tiempo de incubación.

5.4.4 Determinación del medio de cultivo sintético óptimo para el desarrollo micelar del hongo *Agaricus* sp.

Para determinar cual medio de cultivo sintético es óptimo para el desarrollo micelar de *Agaricus* sp. , se tomo en cuenta los resultados del diámetro micelial logrado por las cepas en los diferentes medios de cultivo.

Análisis De Varianza

F. V.	GL.	SC.	CM.	FC.	FT. (5%)
A (Medios de cultivo)	a-1=2	4,001	2,001	117,706	3,21 *
B (Temperaturas)	b-1=2	2,944	1,472	86,588	3,21 *
AB	(a-1)(b-1)=4	0,318	0,080	4,706	2,08 *
Error	ab(r-1)=45	0.745	0,017		

Total abr-1=53

Coeficiente De Variación

$$CV. = \frac{\sqrt{CME}}{X} = \frac{\sqrt{0,017}}{1,980} = 0,066 \times 100 = 6,59 \%$$

Según los resultados de este análisis de varianza, en cuanto a los medios sintéticos de cultivo se puede afirmar que:

- Existen diferencias significativas (*) entre el efecto que causa cada medio sintético de cultivo sobre el crecimiento del micelio de hongo *Agaricus* sp.

Medio	Prueba Tukey	Significancia
A ₁	0.33	*
A ₂	0.34	*
A ₃	0.67	*

Los resultados que emite la Prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%, demuestran que:

- Existen diferencias significativas (*) entre los crecimientos de micelio en el medio A₃ (1,64 cm²/placa) respecto de los crecimientos en el medio A₂ (1,98 cm²/placa) y el medio A₁ (2,31 cm²/placa), por la diferencia de carbohidratos que cada medio posee en su composición.
- Existen diferencias significativas (*) entre los crecimientos en el medio A₂ y en el medio A₁.
- Por tanto el medio sintético con mayor crecimiento micelar es el medio A₁, debido a los carbohidratos que aporta el tubérculo de papa

5.4.5. Determinación de la temperatura óptima para el desarrollo micelar del hongo *agaricus* sp.

Otro factor importante que afecta el crecimiento del micelio es la temperatura, según Steineck. (1972) la temperatura óptima del desarrollo micelar es de 25°C. En la presente investigación evaluamos tres niveles diferentes de temperatura los cuales son: B₁: 17°C, B₂: 20°C y B₃: 25°C.

Y según los datos del anexo 1, con los que se elaboró la figura 15, las temperaturas que provocaron un mayor crecimiento micelar para el *Agaricus* sp., son las siguientes B₁ (17° C) y la B₂ (20° C), contrariamente a lo que indica Steineck (1972). También

se ha observado que el efecto de la temperatura no es tan relevante como el efecto que provoca el medio de cultivo.

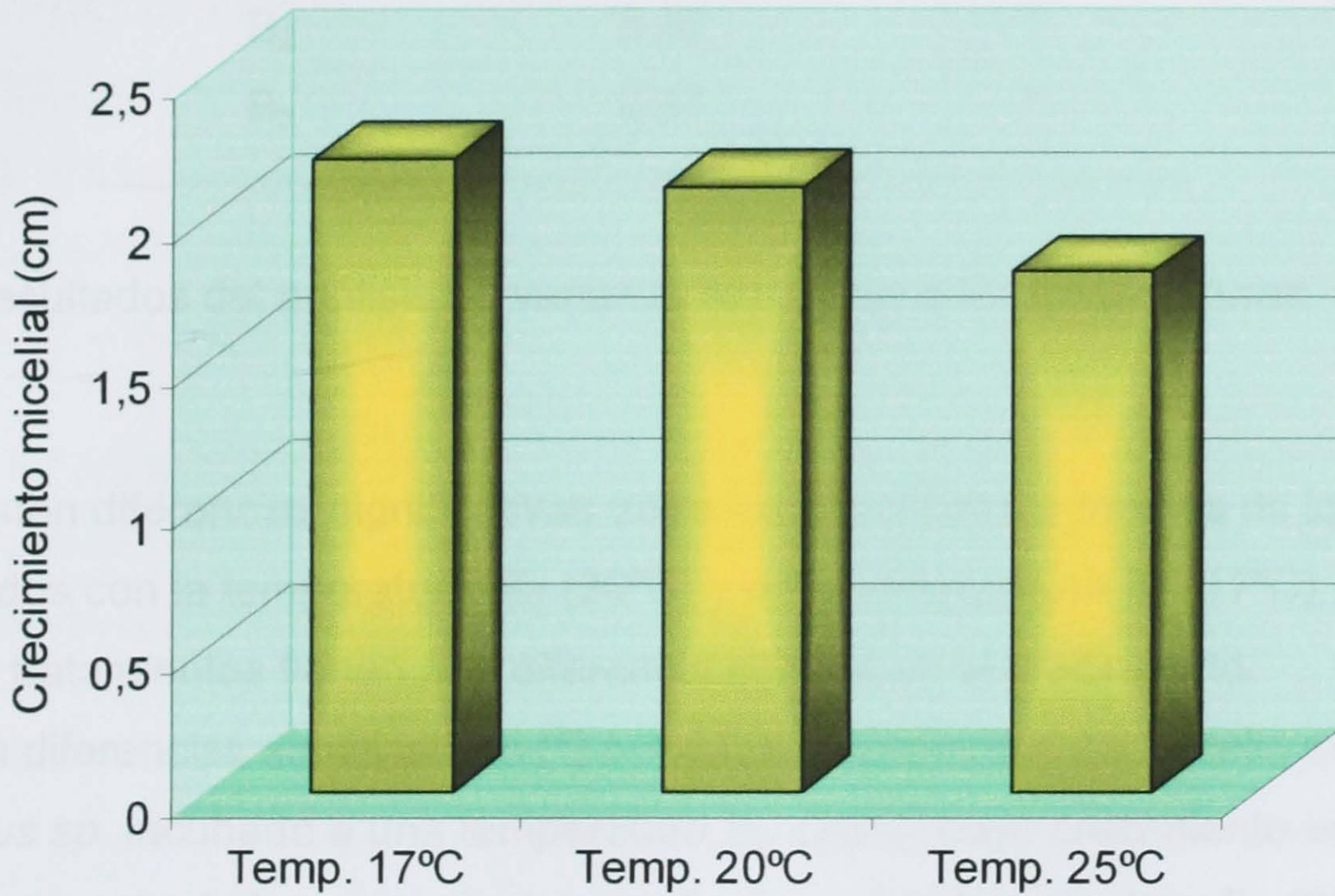


Figura 15. Histograma del crecimiento micelar de *Agaricus sp.* en diferentes niveles de temperatura: B₁, B₂, B₃.

También, indicar que la temperatura de 25° C ha inducido la germinación de esporas de contaminantes como *Aspergillus* o *Penicillium*.

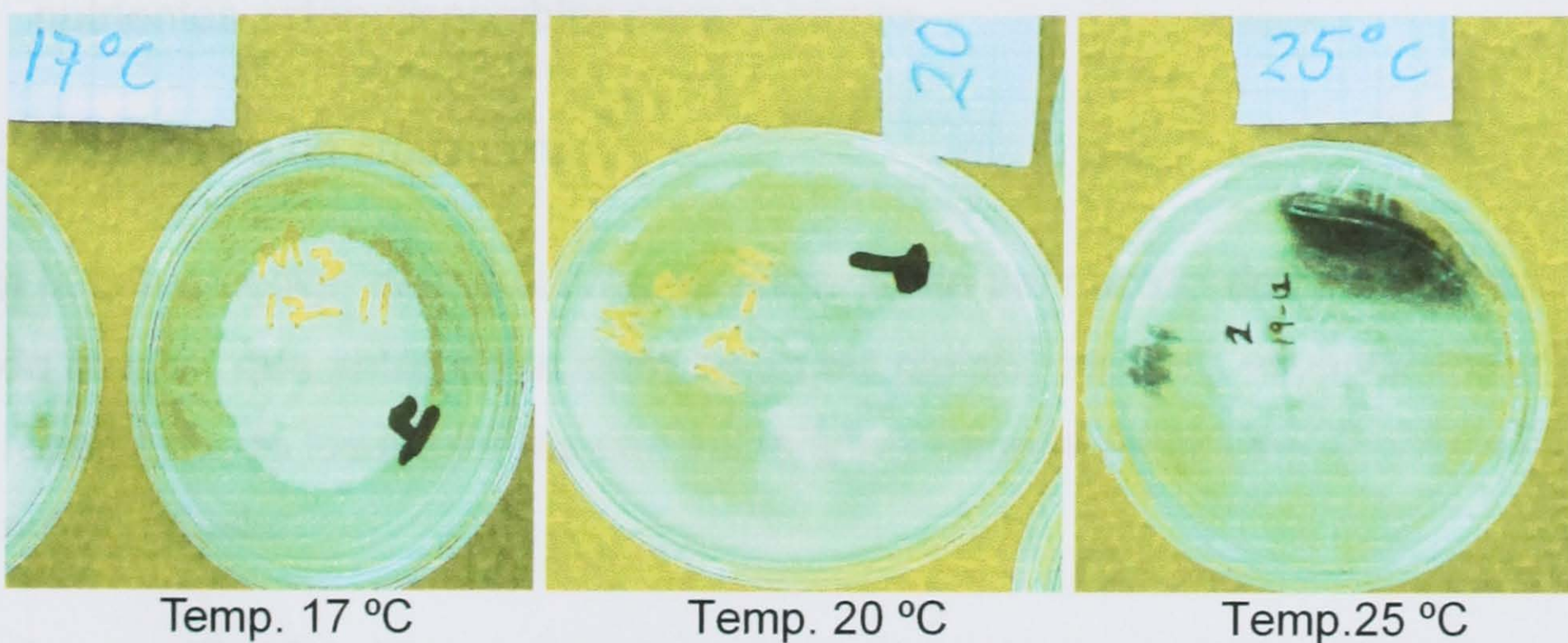


Figura 16. Placas mostrando el crecimiento micelar de *Agaricus sp.*, incubados en diferentes niveles de temperatura.

Temperatura	Prueba de Tukey	Significancia
B ₁	0.04	NS
B ₂	0.47	*
B ₃	0.51	*

Según los resultados del análisis de varianza en cuanto a las temperaturas, se afirma que:

- No existen diferencias significativas entre los crecimientos medios de las placas incubados con la temperatura B₂ (20°C) y en la temperatura B₁ (17°C), porque ambos tratamientos tienen una diferencia mínima en el crecimiento.
- Existen diferencias significativas (*) entre los crecimientos del micelio de hongo *Agaricus sp* incubado a una temperatura B₃ (25°C) cuyo crecimiento es 1.8 cm²/placa respecto de los crecimientos incubados a una temperatura B₂ (20°C) con 2.1 cm²/placa y a una temperatura B₁ (17°C) con 2.2 cm²/placa. Esto debido a que la temperatura B₃ (25°C) seca el medio de cultivo quedando los nutrientes atrapados y no disponibles para el hongo.
- Las temperaturas que indujeron un mayor crecimiento micelar son B₁ (17°C) y B₂ (20°C), debido posiblemente a que estas temperaturas permiten que los nutrientes estén disponibles para el hongo.

5.4.6. Curva de crecimiento

Para la construcción de las curvas de crecimiento del micelio de hongo *Agaricus sp.*, ayudo mucho, que antes de la siembra en las placas, se diera especial importancia a la preparación de los implantes con las mismas características en cuanto a tamaño y desarrollo micelar.

Las figuras 17, 18 y 19 nos muestran las curvas de crecimiento del hongo para las temperaturas B₁, B₂ y B₃ respectivamente. Entre la primera y segunda semana se observa que el hongo aparentemente no ha crecido nada, debido a que atraviesa primero por una fase de adaptación al medio de cultivo como indica Sánchez *et.al.*

(2001), también llamada fase de latencia. A partir de la segunda semana se observa mayor crecimiento del hongo en sentido radial, en los medios de cultivo sintético A₁ (PDA) y A₂ (PDY) con una velocidad de crecimiento constante, coincidiendo con Lilly y Barnett (1951) y Koch (1975) que indican que; si el crecimiento de un hongo, se da en un medio sólido, se presenta una fase de crecimiento lineal óptimo. En el medio sintético A₃ (MEA) el crecimiento ha sido lento y entró en fase estacionaria sin cubrir la superficie de la placa Petri.

A partir, de la quinta semana de incubación el hongo entró en una fase estacionaria dado que su crecimiento disminuyó progresivamente lo que ocurrió por agotamiento de los nutrientes cumpliendo con lo indicado por Sánchez *et.al.* (2001).

Generalmente, una vez que la colonia alcanza la fase estacionaria, si seguimos incubando el medio de cultivo, las células, aunque pueden permanecer vivas, mueren y se lisan. En nuestro caso antes de que pierdan su potencial de crecimiento y mueran, las reinoculamos en los medios naturales que se tratan en el punto 5.5.

En las tres figuras subsiguientes, las temperaturas B₁ y B₂ tuvieron mejor efecto en el crecimiento micelar en los medios de cultivo sintéticos A₁ (PDA) y A₂ (PDY). En el primero cubrió la totalidad del área de la placa que es 2.5 cm², en el segundo alcanzó los 2.3 cm². En el tercer medio sintético A₃ (MEA) el crecimiento solamente alcanzó 1.8 cm² del área total de la placa.



Figura 17. Curvas de crecimiento del micelio de *Agaricus sp.* para el medio de cultivo sintético A₁ (PDA).

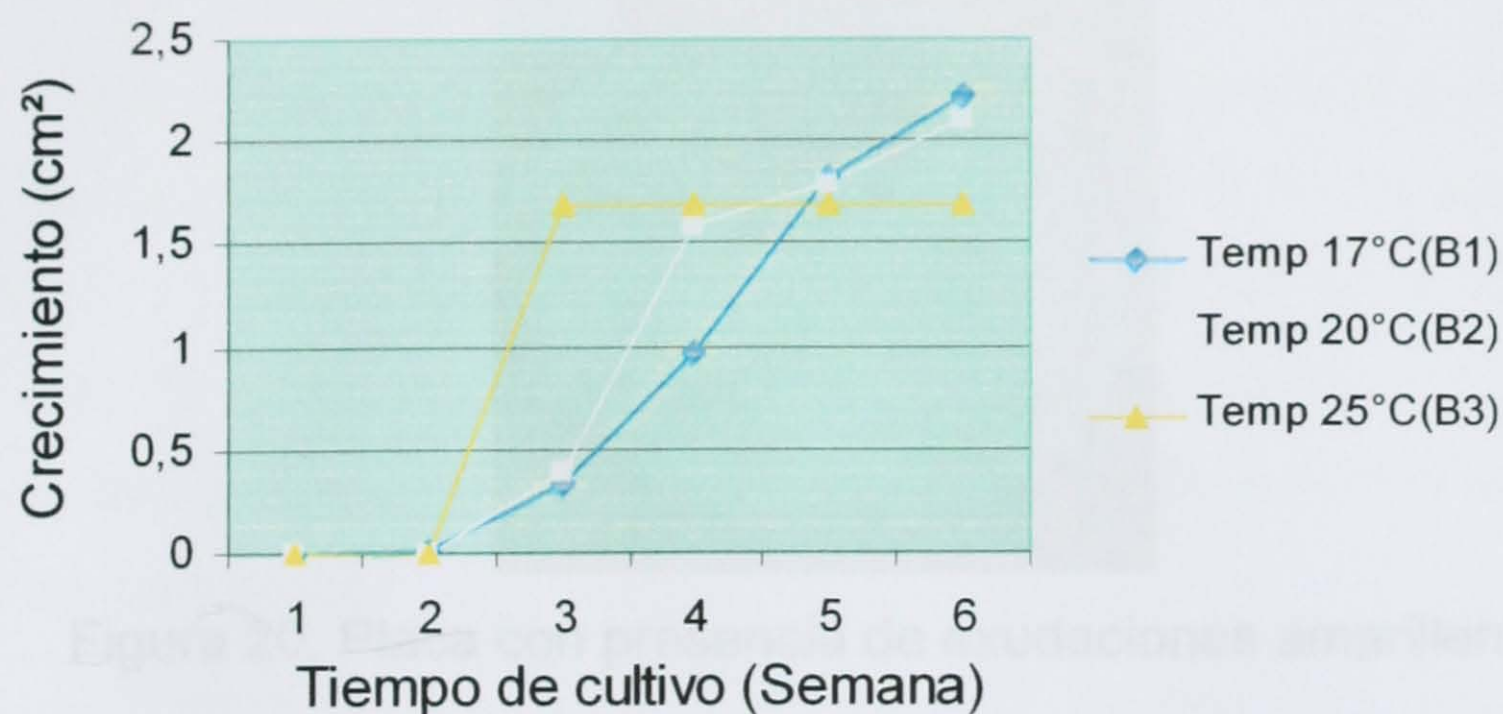


Figura 18. Curvas de crecimiento del micelio de *Agaricus sp.* para el Medio de cultivo sintético A₂ (PDY).

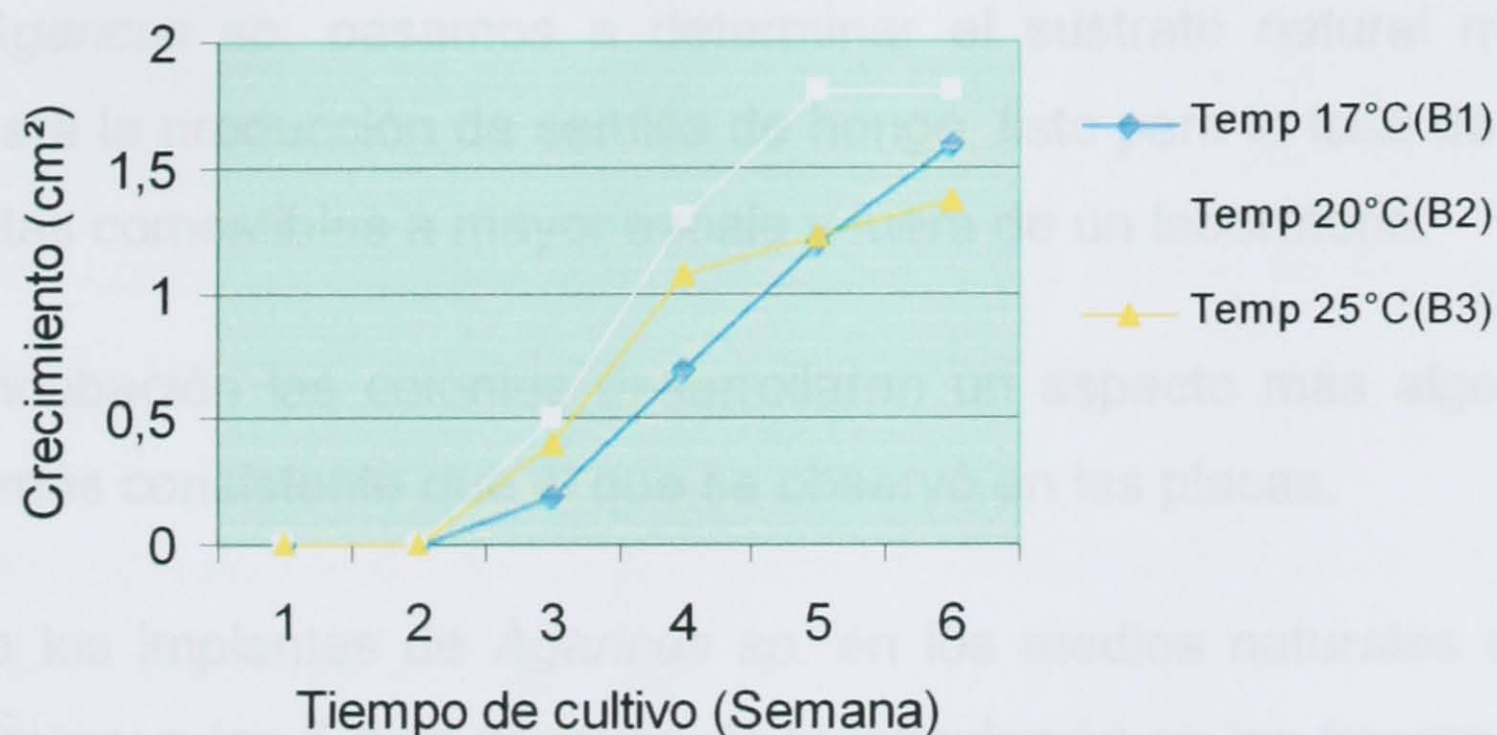


Figura 19. Curvas de crecimiento del micelio de *Agaricus sp.* para el Medio de cultivo sintético A₃ (MEA)

5.4.7 Otras observaciones, resultado del procedimiento en esta etapa

En el aislamiento del hongo *Agaricus sp.*, se evidenció la contaminación con otro tipo de hongos como el *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, todos son patógenos que comúnmente se encuentran presentes en el ambiente.

Durante la incubación las colonias presentaron una escasa exudación cristalino-amarillenta, producto de la sudoración interna del medio.



Figura 20. Placa con presencia de exudaciones amarillentas

5.5 PRODUCCIÓN DE SEMILLA EN MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

Una vez determinado el medio sintético más óptimo para la multiplicación de micelio del hongo *Agaricus sp*, pasamos a determinar el sustrato natural más óptimo y económico para la producción de semilla de hongo, listo para la fase de fructificación y producir setas comestibles a mayor escala y fuera de un laboratorio.

Durante la incubación las colonias desarrollaron un aspecto más algodonoso y de color blanco más consistente que el que se observó en las placas.

El micelio de los implantes de *Agaricus sp*. en los medios naturales empezaron a colonizar, primero: a los 5 días después de la inoculación en los frascos incubados a una temperatura B₂ (20° C), y a los 10 días más o menos en los frascos incubados a una temperatura B₁ (17° C) y B₃ (25° C).

La medición de la masa micelar es difícil y poco confiable debido principalmente a problemas de interferencia y separación con el sustrato. Según Luque (1989) en anteriores investigaciones solo se han realizado estimaciones indirectas de masa micelar mediante mediciones de la actividad respiratoria del hongo.

Por tanto la colonización del micelio se evaluó en tanto por ciento para cada frasco durante 90 días y la mayor colonización se observó en los frascos tratados con la temperatura B₂, seguido de la temperatura B₃ y luego la B₁, siendo más eficiente biológicamente los granos de cebada puros o medio de cultivo natural A₂ en comparación con los otros medios.

5.5.1 Determinación del porcentaje de colonización

La evaluación descriptiva de los medios respecto a la colonización del micelio de *Agaricus* sp., se realizó, marcando en los frascos, hasta el límite superior de los medios o granos, 10 partes iguales, constituyendo cada parte a un 10 % y las 10 partes a un 100 % y se pudo así registrar en forma detallada e individual el porcentaje de colonización, cada 10 días hasta que el micelio colonizó la mayor parte del contenido de los frascos.

5.5.2 Control de calidad en la etapa de producción de semilla de hongo

Durante la evaluación del porcentaje de colonización en esta etapa de producción de semilla de hongo *Agaricus* sp., no se ha observado la presencia de ningún género contaminante. Sin embargo se ha podido sentir la producción de gases muy fuertes debido a la descomposición de los medios de cultivo A₃ y A₄, que estaban asociados con estiércol de caballo y en los cuales hubo un poco o casi nada de colonización del micelio del hongo, por tanto estos frascos fueron apartados.

5.5.3 Determinación del medio de cultivo natural óptimo para la colonización micelar del hongo *agaricus* sp.

El medio de cultivo A₁ a influido en un 18.25 % de colonización de micelio de *Agaricus* sp. en el sustrato.

El medio de cultivo A₂ es el que mejor ha respondido con lo requerido por el micelio del hongo, con un promedio de 71.5 %.

Los medios A₃ y A₄ tuvieron un crecimiento mínimo que en su mayoría no sobrepasaba el 10 % de la colonización. Sin embargo un frasco que contenía medio A₃ a una temperatura de 25° C presento un crecimiento del 35%, con densidad micelar más compacta de la que se observa en el medio A₂.

Así se puede observar en el cuadro 5 y la figura 21.

Tratamiento	Promedio del % de colonización
Medio A ₁	18.25
Medio A ₂	71.42
Medio A ₃	0.0
Medio A ₄	9.17

Cuadro 5 Valores medios de 4 repeticiones para 4 medios de cultivo con un promedio de colonización significativamente diferentes

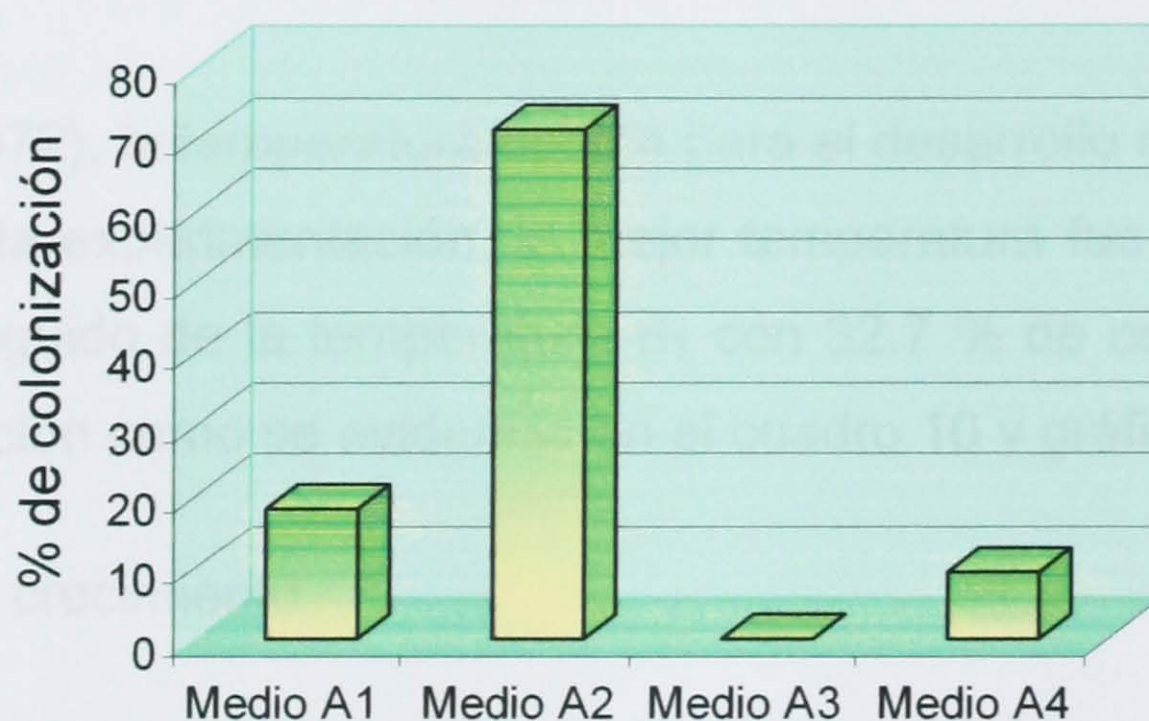


Figura 21. Porcentaje (%) de colonización para los medios de cultivo naturales: A₁, A₂, A₃ y A₄

5.5.4 Determinación de la temperatura óptima para una máxima colonización del hongo *Agaricus* sp.

Tratamiento	Promedio del % de colonización
Temp. B ₁ (17°C)	32.67
Temp. B ₂ (20 °C)	33.83
Temp. B ₃ (25°C)	32.33

Cuadro 6. Valores medios del % de colonización en 4 repeticiones para tres niveles de temperatura diferentes

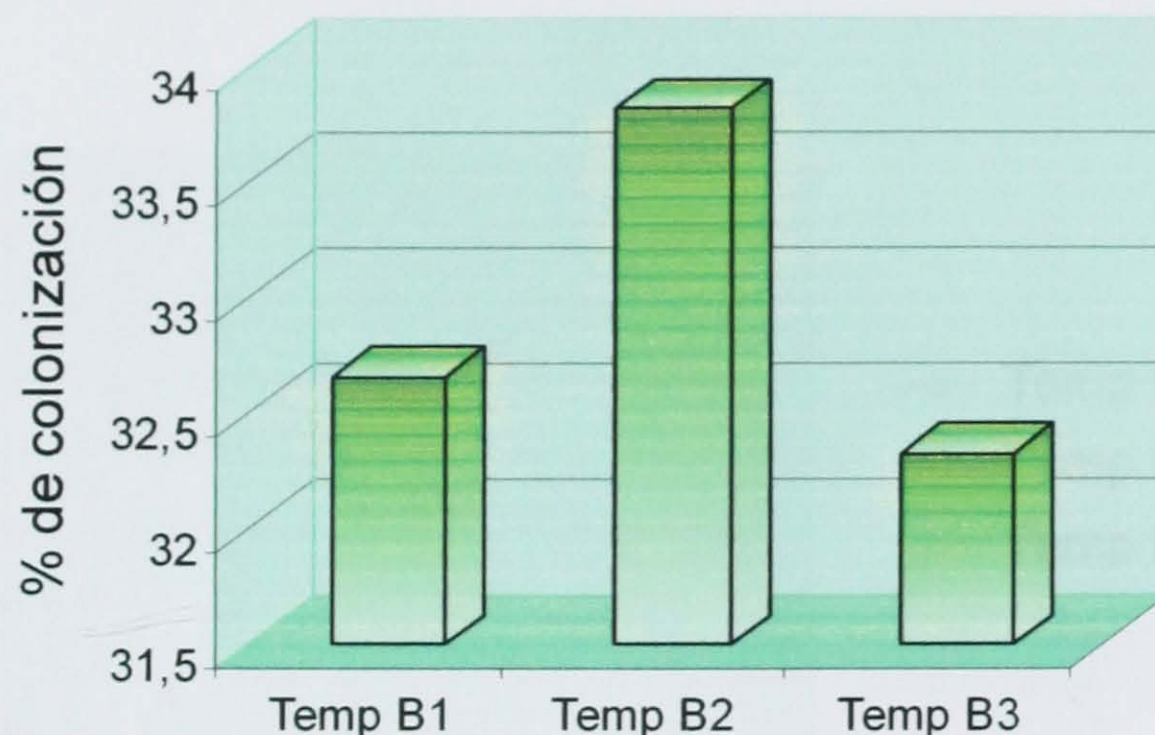


Figura 22. Porcentaje (%) de colonización para las temperaturas: B₁ (17°C), B₂ (20 °C) y B₃ (25°C)

Según Steineck (1972), la temperatura óptima para el desarrollo micelar es de 25° C., sin embargo en esta experimentación, la mejor temperatura fue B₂ con casi el 34% de colonización, seguido de la temperatura B₁ con 32.7 % de colonización y B₃ con 32.3 % de colonización como se evidencia en el cuadro 10 y gráfico 5.

5.5.5 Curva de crecimiento

Se observaron los primeros inicios de crecimiento micelar entre los 5 a 10 días después de la inoculación en la mayoría de los tratamientos, demandando después, unos 20 días de fase exponencial y continuar recién con una fase estacionaria.

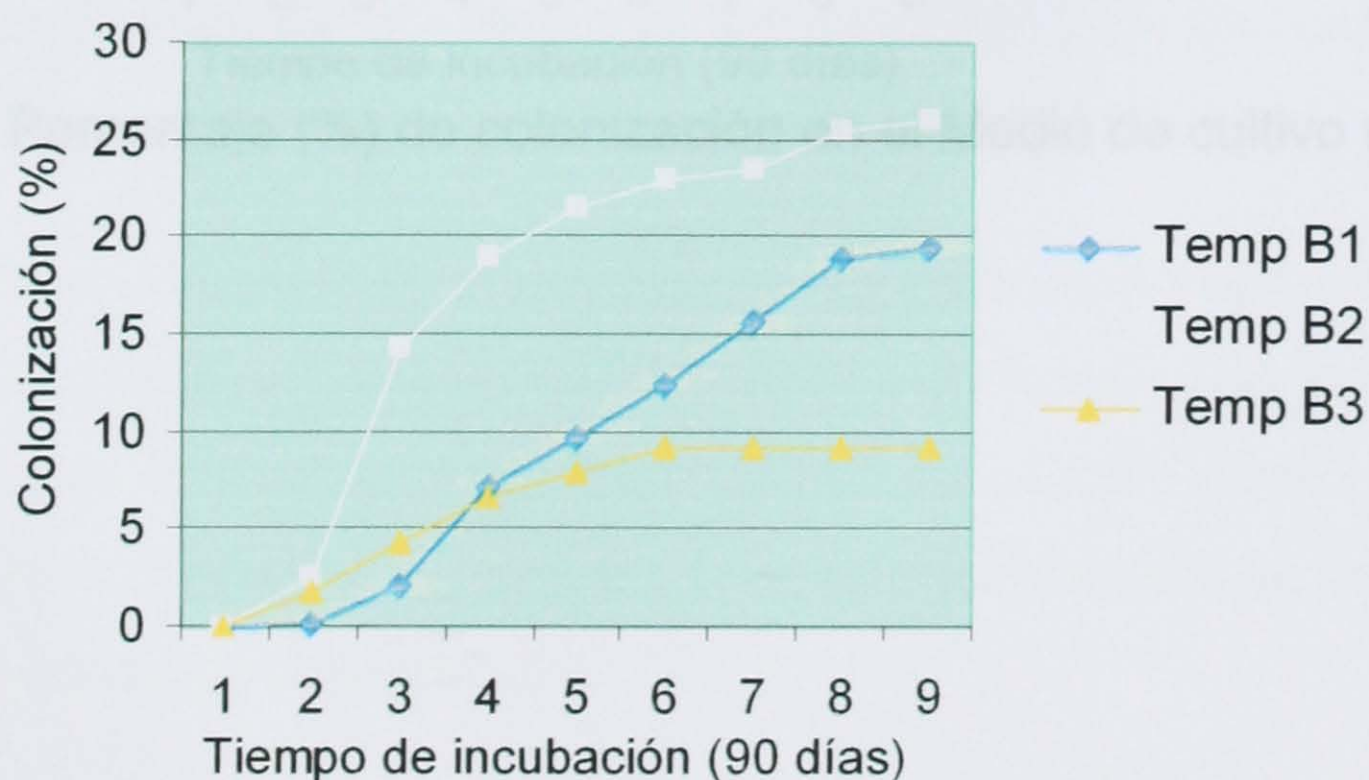


Figura 23. Porcentaje (%) de colonización en el Medio de cultivo natural A₁

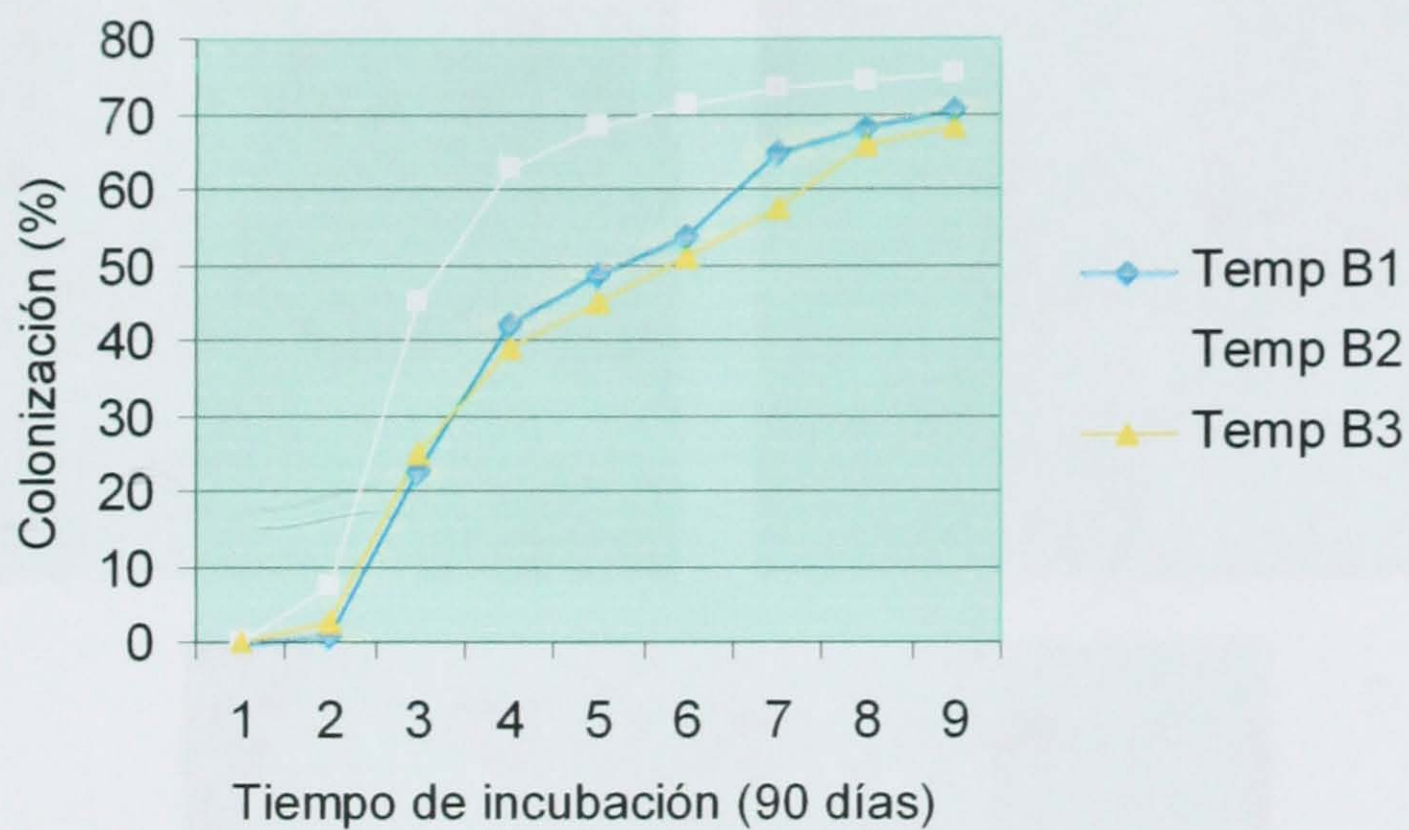


Figura 24. Porcentaje (%) de colonización en el Medio de cultivo natural A₂

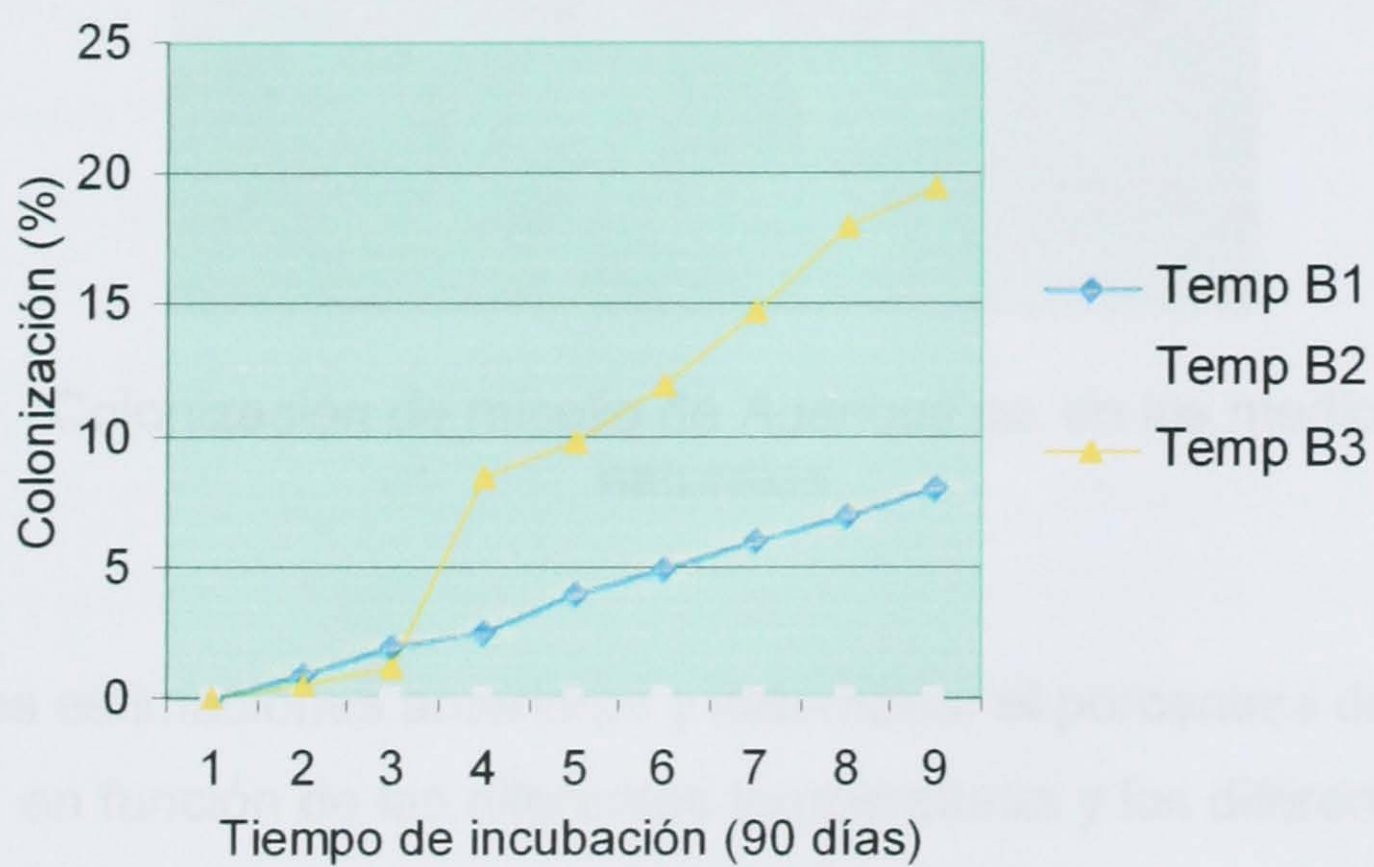


Figura 25. Porcentaje (%) de colonización en el Medio de cultivo natural A₄

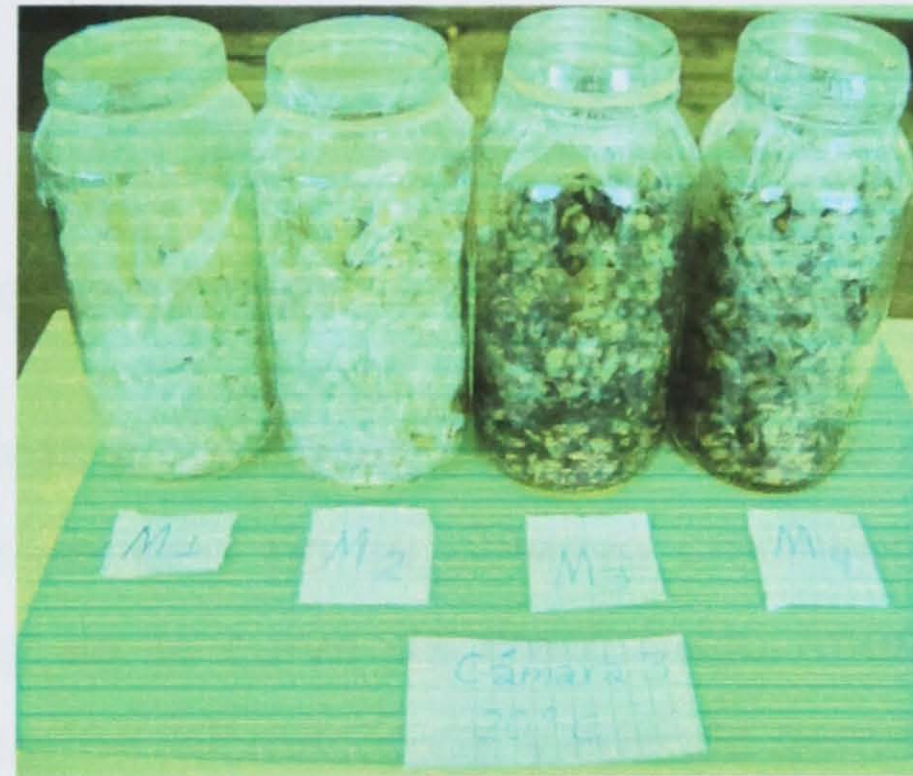


Figura 26. Colonización de micelio de *Agaricus sp.* en los medios de cultivo naturales

Tras realizar las estimaciones anteriores y determinar el porcentaje de colonización y optimizar éste, en función de las diferentes temperaturas y los diferentes medios de cultivo, para esta etapa de producción de semilla podemos indicar:

- Existen diferencias entre el efecto que causa cada medio natural de cultivo sobre el porcentaje de colonización del micelio de hongo *Agaricus sp.*
- En cuanto a las temperaturas también existen diferencias entre los efectos de los tres niveles diferentes de temperaturas sobre el porcentaje de colonización del micelio de hongo *Agaricus sp.*

CAPITULO VI

6. CONCLUSIONES

En cuánto al porcentaje de germinación de las esporas:

- El tiempo de adaptación de las esporas a cualquiera de los medios de cultivo sintéticos fue lento y en la primera semana no se observó crecimiento de micelio cumpliendo con la Fase Lag de la curva de crecimiento enunciado para el crecimiento de cualquier población microscópica, y cuando germinaron las esporas, esta no fue uniforme.

En cuánto al aislamiento:

- Según las reacciones observadas durante el aislamiento del hongo *Agaricus sp.* concluimos que para identificar caracteres es mejor trabajar directamente con esporas porque el crecimiento de micelio que se genera en el medio de cultivo es más denso, con mayor diámetro y elevación uniforme asegurando facilidad en el manipuleo.

En cuánto a la multiplicación en los medios sintéticos:

- El hongo *Agaricus sp.* en esta primera etapa, se desarrolla mejor en el medio de cultivo sintético Papa-dextrosa-agar con una Tasa de Crecimiento Micelar de $0.023 \text{ cm}^2/\text{hora}$. Y el medio de cultivo con menor eficiencia y mayor incidencia de contaminación fue el de Malta-bifosfato potásico-agar, con un crecimiento de $0.012 \text{ cm}^2/\text{hora}$.
- Durante este proceso se ha generado un tipo de micelio primario que se considera como "semilla primaria o semilla madre", porque esta proviene directamente de la seta madre recolectada. Esta semilla o micelio aún no es apta para ser sembrada directamente en un substrato de producción de setas, por que desarrolla un micelio débil con crecimiento lento que puede perecer, debido a que el micelio no está adaptado al nuevo medio.

- En esta etapa como en el proceso de los tubos, para obtener cepas puras de *Agaricus sp.* es necesario una asepsia rigurosa durante la inoculación, debido a que se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, el cual puede posibilitar el crecimiento de microorganismos no deseados, principalmente hongos y bacterias presentes en el ambiente o en otras fuentes de contaminación.

En cuanto a la multiplicación en medios naturales:

- Para la segunda etapa, el medio de cultivo natural más eficiente biológicamente en el crecimiento de la masa micelar son los granos de cebada criollos con un 71.5 % de una rápida colonización, con un corto periodo en la Fase Lag. Y en el se desarrolla un micelio más denso y más fuerte dando origen a la “semilla secundaria o semilla definitiva” que tiene mas posibilidades de subsistir y garantizar una colonización más rápida y más efectiva en el substrato definitivo para la producción de setas.
- El grano de cebada brinda a un productor de setas, mayores posibilidades de almacenaje debido a que el grano mantiene, aún después de ser colonizado totalmente por el micelio, una buena reserva de humedad en comparación a los otros granos evaluados, debido probablemente a que conserva la testa y no deja secarse fácilmente al grano. Por tanto a parte de ser económico, de fácil adquisición, de otorgar un manipuleo limpio, garantiza una buena producción de semilla de hongo *Agaricus sp.*
- Los granos de arroz integral debido a que carecen de testa tienden a perder humedad más rápidamente, entonces el micelio frente a poca humedad deja de crecer y no cubre en su totalidad al 100 % de los granos, provocando ya desde esta etapa, pérdidas económicas, puesto que el arroz integral es costoso.
- La mezcla entre cualquier tipo de granos de cereal con estiércol de caballo sea fresco o seco y contenidos en un envase cerrado produce gases

fermentativos nocivos para el crecimiento micelar. Sin embargo durante la incubación el estiércol se empieza a descomponer y liberar agua, la cual se precipita en el fondo del envase, desequilibrando la humedad necesaria para el hongo, provocando la recesión del crecimiento micelar.

- A partir de los parámetros establecidos en esta investigación, cepas nativas o cepas importadas de hongos comestibles podrán fácilmente adaptarse a nuestro medio y ser adoptados por el agricultor como un cultivo más, ya sea bajo los factores climáticos del altiplano, del valle o el llano.
- La fase de adaptación al medio fue más corta en los medios naturales, que en los medios sintéticos
- La diversidad de contaminantes es mayor en la etapa de cepario que en la etapa de producción de semilla de hongo.

En lo que se refiere a la temperatura:

- Para la primera etapa de multiplicación de micelio de hongo en medios sintéticos la temperatura más recomendable es 17°C, por que su efectividad en el desarrollo de cepas puras del hongo *Agaricus sp.* fue más alto, más uniforme y más completo, que el de los otros niveles de temperatura y no así para otros microorganismos contaminantes. La temperatura 20°C ha sido más efectivo para el desarrollo de otras cepas contaminantes provocando competencia de nutrientes con la cepa en estudio. La temperatura 25°C ha influido en el desarrollo de cepas contaminantes, además de resecar el medio nutritivo dentro las placas Petri provocando que la cepa en estudio no tenga un desarrollo normal, completo y uniforme.
- Para la segunda etapa o producción de semilla en grano la mejor temperatura fue 20°C, debido posiblemente a que la misma alcanza el centro geométrico del frasco, estimulando positivamente en una rápida colonización. La temperatura 17°C y 25°C no ha sido óptimo para estimular una colonización rápida del micelio de *Agaricus sp.*, en los granos o medios naturales.

CAPITULO VII

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para cualquier tipo de hongo, trabajar desde un principio con esporas porque desarrolla un buen micelio más rápidamente, en comparación cuando se trabaja con implantes de tejido fúngico. Sin embargo si se quiere mantener las características fenológicas de las setas madre, lo cual es conveniente en una producción de setas para el mercado, es mejor iniciar el trabajo con implantes.
- De los cuatro medios naturales probados para la producción de semilla de *Agaricus sp.* el más recomendable es el grano de cebada, por su bajo costo de adquisición, la pronta accesibilidad al grano en cuanto a la cantidad y a la continuidad, el buen manipuleo que ofrece dentro y fuera del laboratorio, sus propiedades físico químicas aseguran un buen desarrollo para el micelio de *Agaricus sp.*, además son similares al grano de trigo integral (el cual es muy utilizado en la producción de semillas de *Pleurotus spp.*).
- Aparte de los medios probados en esta investigación se recomienda probar a multiplicar la semilla de hongo en pastos nativos como paja brava, totora, malhoja de maíz (choclo).
- Se recomienda estudiar e identificar otras cepas fúngicas comestibles existentes en el ámbito nacional y conservarlas en colecciones de cultivo de referencia dando la posibilidad de realizar investigaciones posteriores.
- También debe establecerse en nuestro medio un programa de mejoramiento genético o banco de germoplasma que proporcione semilla de cepas nativas para promover el desarrollo de una alternativa de producción y diversificación agrícola y orientar la producción de setas u hongos comestibles al campo de la industria alimenticia.

CAPITULO VIII

8. BIBLIOGRAFIA

- VG Lilly, HL Barnett , EW Sinnott. 1951. Physiology of the Fungi. New York. P.imprenta: McGraw-Hill. New York. USA. Consultado 6-7-2008. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr>
- Weinberg Eric. Voeller Bruce.1969. Induction Of Fern Spore Germination. Vol. 64. The Rockefeller University, New York. National Academy of Sciences. pp 835-841
- Hellmut Steineck. 1972. Cultivo comercial del champiñon. Ed. Acribia. España. pp 48 -108.
- Openshaw H I. 1973. Manual de laboratorio de análisis orgánico. Ed. Madrid. Madrid. pp 45 - 47.
- Toovey FT. 1976. Cultivo del champiñon. Ed. Acribia. España. pp 5 - 149.
- De La Loma J L. 1979. Experimentación agrícola. Ed. Uteha. España. pp 258-262.
- García Rollan M. 1985. Nuevas técnicas de cultivo del *Pleurotus ostreatus*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. Neografis. S. L. Madrid. España. pp 3-4
- Garcia Rollan M. 1987. Cultivo de setas y trufas. Ed. Mundi Prensa. España. pp 50-85.
- Yaunner Sara. Delgado Maria. 1988. Prácticas de microbiología. Ed. Pueblo y Educación. Cuba. pp 71 - 76.

- Luque, J. 1989. Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. *Anales Jará. Bot.* Madrid. España pp 46
- Raven. Evert. Eichhorn. 1991. Biología de las plantas. Ed. Reverté. España. pp 216 - 217.
- F. Petrarca. 1991. Fermentaciones Industriales. Coordinación General de Universidades Tecnológicas. N°321. México d. f. pp. 110-116
- Paredes Zarate R. 1994. Elementos para la elaboración y evaluación de proyectos. Ed. Catacora. Bolivia. pp 100-103.
- Mrogrinski Luis. Sansberro Pedro. Flaschland Eduardo. 1995. Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Ed. Acribia. España. pp. 35
- Armando López R. 1995 Guía ilustrada - Cultivo de setas Alternativa Alimenticia de la Economía Familiar. "Programa Nacional de Promoción de Cultivo de los Hongos Comestibles" Centro de Genética Forestal. Univ. Ver. México.
- Deschamps, 1996. Documentos de Trabajo Hongos silvestres comestibles del Mercosur con valor gastronómico. Argentina. Consultado 5-8-2007. Disponible en <http://www.ub.edu.ar>
- García Mendoza. 1999. Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos. Centro de Investigaciones Biológicas. Departamento de Microbiología Molecular. Madrid. Consultado 15-12-2006. Disponible en: www.cib.csic.es/microbio.html
http://semicro.es/hongos/personal/concepción_garcía_mendoza.html
- Michael T. Madigan. John M. Martinko. Jack Parker. 1999. Brock Biología de los microorganismos. 8ª Ed. Prentice Hall Iberia. España. pp 464, 776.
- J Pemán, E Martín-Mazuelos, MC Rubio Calvo. 2001. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de

- Micología. Bilbao. España. Consultado 10-1-2008. Disponible en:
<http://www.guia.reviberoammicol.com>
- José E. Sánchez. 2001. Crecimiento y fructificación de *Pleurotus* spp. Consultado 10-10-2006. Disponible en:
http://200.23.34.74/Libros_Digitales/Libro%20Pleurotus/Cap.3.pdf
 - Jaumecarles. 2003. Taxonomía de los hongos superiores. Consultado 22-8-2006. Disponible en:
http://www.terra.es/personal2/jaumecarles/pagina_nueva_13.htm
 - E.Guerra V. Sancho F. Villavicencio. 2003. Agroned on line. Data Base. Consultado 6-6-2005. Disponible en: <http://agronlin.tripod.com>
 - J.Plac, 2004. Los hongos (PDF). España. Consultado 8-1-2008. Disponible en
<http://uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/hongos.pdf>
http://64.233.169.104/search?q=cache:D--tVh_eKYgJ:uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/hongos.pdf
 - Ramírez, 2004. Publicaciones ilustradas. Código ISPN de la Publicación Consultado 12-9-2008. Disponible en:
<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpZyVkyPkEhybwpBZW.php>
 - Saenz Peña. 2004. Hipertextos del área de la Biología. Universidad Nacional del Nordeste. FAC. de Agroindustrias, FAC. Ciencias Agrarias. Corrientes. Argentina. Consultado 3-4-2007. Disponible: <http://www.biologia.edu.ar>
<http://www.unne.edu.ar>

