

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



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO
Y SUSTRATOS EN LA REPRODUCCIÓN DE MICELIOS Y SEMILLA DE
HONGOS COMESTIBLES (*Agaricus sp.* y *Agaricus bisporus*)**

LISETT VACA LOAYZA

La Paz – Bolivia

2009

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

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y
SUSTRATOS EN LA REPRODUCCIÓN DE MICELIOS Y SEMILLA DE HONGOS
COMESTIBLES (*Agaricus sp.* y *Agaricus bisporus*)**

*Tesis de Grado Presentado como requisito
parcial para obtener el Título de
Ingeniería Agronómica*

LISETT VACA LOAYZA

Asesores:

Ph. D. Víctor Hugo Mendoza C. _____

Ing. Abel Rojas Pardo _____

Ing. Edgar Gómez Villalba _____

Tribunal Examinador:

Ph. D. David Cruz C. _____

Dr. Alberto Figueroa Solís _____

Ing. Jorge Guzmán Calla _____

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

DEDICATORIA

*Gracias a Dios por guiar mi camino.
A mis padres Rolando e Imelda por
su confianza, constante apoyo y
dedicación. A mis hermanos Daniel,
Jackeline Pamela, David Royers y
Grace Claudia por su apoyo
incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

La conclusión de este trabajo fue posible gracias al apoyo brindado por diferentes instituciones y personas a quienes deseo expresar mi mayor agradecimiento.

Expreso mi más cordial agradecimiento a la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, Carrera de Ingeniería Agronómica a la que debo mi formación profesional.

Al Centro Internacional de la Papa / Proyecto Agricultura en el Altiplano financiado por la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional – ACIDI, en colaboración con el Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear, por patrocinar el presente trabajo de investigación.

A mis Asesores:

Ing. Abel Rojas Pardo, por su constante apoyo, de quien he recibido su valiosa orientación teórica y metodológica, así como el asesoramiento, sugerencias, revisión y correcciones en la realización y redacción del presente documento.

Dr. Víctor Hugo Mendoza e Ing. Edgar Gómez Villalba quienes me apoyaron desde el inicio de la investigación hasta su culminación, guiando procesos y metodología del presente trabajo, demostrando y expresando su capacidad profesional y su sincera amistad.

Un agradecimiento especial al comité revisor Ing. Jorge Guzmán Calla, Dr. David Cruz C. y Dr. Alberto Figueroa Solís por las sugerencias y correcciones realizadas para que el presente documento culmine acertadamente en la redacción final.

Al Ing. Juan José Vicente por su valiosa colaboración e invaluable consejos.

A mis compañeros y amigos del CIP/Altrago: Ing. Casazola, Sra. Sonia Encinas, JJ₁, JJ₂ y Cesar por su amistad y apoyo.

A mis compañeros de tesis en el IBTEN y Facultad de Agronomía: Delia, Eduarda, Ebeth, Vania, Rina, Marco Antonio N², Alan, Juan José y Daniel por los momentos compartidos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ANEXOS	ix
RESUMEN	X
SUMMARY	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.2. Objetivo general.....	3
1.3. Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Características generales de los hongos.....	4
2.2. Importancia de los hongos.....	4
2.3. Importancia económica.....	5
2.3.1. Producción y consumo a nivel mundial.....	6
2.4. Valor nutricional.....	6
2.5. Estructura somática.....	7
2.6. Forma de vida de los hongos.....	8
2.7. Taxonomía.....	9
2.7.1. Clasificación taxonómica.....	10
2.8. Reproducción de basidiomycetes.....	10
2.8.1. Ciclo de reproducción de un <i>Agaricus</i>	11
2.9. Morfología del hongo.....	12
2.10. Hongos comestibles.....	13
2.10.1. <i>Agaricus campestris</i> (J. Lange).....	13
2.10.2. <i>Agaricus bisporus</i> (J. Lange).....	14
2.11. Técnicas de aislamiento.....	14
2.11.1. Obtención del inóculo esporal.....	15
2.11.2. Obtención del inóculo vegetativo.....	16
2.12. Medios de cultivo en microbiología.....	17
2.12.1. Componentes del medio de cultivo.....	18
2.12.2. Sales inorgánicas.....	18
2.12.3. Compuestos orgánicos.....	20
2.12.4. Complejos naturales.....	21
2.12.5. Medio de soporte.....	23
2.13. Obtención de la semilla, inóculo, blanco o "spawn".....	24
2.13.1. Cereales.....	24
2.14. Factores ambientales.....	26
2.14.1. pH.....	27

2.14.2. Incubación.....	28
2.14.3. Humedad.....	28
2.14.4. Oxigenación.....	29
2.15. Esterilización.....	29
2.15.1. Calor húmedo.....	29
2.15.2. Acción de la luz ultravioleta.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Localización.....	30
3.2. Materiales.....	30
3.2.1. Material biológico.....	30
3.3. Metodología.....	30
3.3.1. Esterilización de laboratorio e instrumental de trabajo.....	32
3.3.2. Fase I: Establecimiento del inóculo.....	32
3.3.3. Fase II: Multiplicación.....	33
3.3.3.1. Preparación de diferentes medios de cultivo.....	33
3.3.3.2. Inoculación y multiplicación de la cepa matriz.....	34
3.3.3.3. Diseño experimental para la Fase II (Multiplicación de la cepa matriz).....	35
3.3.4. Fase III: Obtención de la semilla, blanco o “spawn”.....	36
3.3.4.1. Diseño experimental para la Fase III (Obtención de la semilla, blanco o “spawn”).....	37
3.3.5. Análisis económico.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Variables de respuesta estudiadas para la Fase II: Multiplicación.....	39
4.1.1. Prendimiento del micelio en días (PMD).....	39
4.1.1.1. Medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	40
4.1.1.2. Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	41
4.1.1.3. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	42
4.1.1.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	44
4.1.1.5. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio - días (PMD).....	46
4.1.1.6. Análisis de regresión para el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) en función al prendimiento del micelio en días (PMD).....	48
4.1.2. Crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	50
4.1.2.1. Medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	51

4.1.2.2. Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	53
4.1.2.3. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	54
4.1.2.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	56
4.1.2.5. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	58
4.1.2.6. Análisis de regresión lineal para el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) en función al crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	61
4.1.3. Tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	63
4.1.3.1. Medio de cultivo para tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	64
4.1.3.2. Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	66
4.1.3.3. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	67
4.1.3.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	68
4.1.3.5. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)	71
4.1.4. Biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	74
4.1.4.1. Medio de cultivo para biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	74
4.1.4.2. Análisis de varianza para contrastes ortogonales para biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	75
4.1.4.3. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo para biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	76
4.2. Variables de respuesta estudiadas para la Fase III: Obtención de la semilla, blanco o “spawn”.....	79
4.2.1. Días al prendimiento del inóculo (DPI).....	81
4.2.1.1. Tipo de hongo en días al prendimiento del inóculo (DPI) para tipo de hongo.....	82
4.2.1.2. Procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	83
4.2.1.3. Tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	84
4.2.1.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	85

4.2.1.5. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	86
4.2.1.6. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	87
4.2.1.7. Análisis de regresión lineal para el tiempo de invasión en días (TID) en función a días al prendimiento del inóculo (DPI).....	89
4.2.2. Crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	91
4.2.2.1. Tipo de hongo para crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	91
4.2.2.2. Procedencia del micelio en el crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	92
4.2.2.3. Tipo de sustrato en el crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	93
4.2.3. Tiempo de invasión en días (TID).....	95
4.2.3.1. Tipo de hongo en el tiempo de invasión en días (TID).....	96
4.2.3.2. Procedencia del micelio para tiempo de invasión en días (TID).....	97
4.2.3.3. Tipo de sustrato para tiempo de invasión en días (TID).....	97
4.2.3.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID).....	98
4.2.3.5. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID).....	100
4.2.3.6. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID).....	101
4.3. Análisis de costos parciales de producción para la Fase II: Multiplicación...	103
4.4. Análisis de costos parciales de producción para Fase III: Obtención de la semilla, blanco o "spawn".....	105
4.5. Prueba de germinación.....	106
5. CONCLUSIONES.....	109
6. RECOMENDACIONES.....	112
7. REVISIÓN DE LITERATURA.....	113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Países, producción y consumo per cápita del champiñón.....	6
Cuadro 2. Comparación nutricional del champiñón con otros alimentos de origen vegetal y animal en peso fresco.....	7
Cuadro 3. Composición de nutrientes por 100 g de grano crudo con 10 % de humedad.....	25
Cuadro 4. Análisis de varianza para prendimiento del micelio en días (PMD)....	39
Cuadro 5. Contrastes ortogonales en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	42
Cuadro 6. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	43
Cuadro 7. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	45
Cuadro 8. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	48
Cuadro 9. Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa (Y) en función del prendimiento del micelio en días (X).....	49
Cuadro 10. Estadísticas del modelo de regresión lineal.....	50
Cuadro 11. Análisis de varianza para crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	51
Cuadro 12. Contrastes ortogonales en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	54
Cuadro 13. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	55
Cuadro 14. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	58
Cuadro 15. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	60
Cuadro 16. Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa (Y) en función del crecimiento radial del micelio en cm (X).....	62
Cuadro 17. Estadísticas del modelo de regresión lineal.....	63
Cuadro 18. Análisis de varianza para tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	63
Cuadro 19. Contrastes ortogonales en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	66
Cuadro 20. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	67
Cuadro 21. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	70

Cuadro 22. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	72
Cuadro 23. Análisis de varianza para biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	74
Cuadro 24. Suma de cuadrados de contrastes ortogonales para biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	76
Cuadro 25. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	78
Cuadro 26. Análisis de varianza para días al prendimiento del inóculo (DPI).....	81
Cuadro 27. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	85
Cuadro 28. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	86
Cuadro 29. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	88
Cuadro 30. Análisis de varianza para el tiempo de invasión en días (Y) en función de los días al prendimiento del inóculo (X).....	90
Cuadro 31. Estadísticas del modelo de regresión lineal.....	90
Cuadro 32. Análisis de varianza para Crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	91
Cuadro 33. Análisis de varianza para tiempo de invasión en días (TID).....	95
Cuadro 34. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID).....	99
Cuadro 35. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID).....	100
Cuadro 36. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID).....	102
Cuadro 37. Análisis económico de la producción de inóculo master de <i>Agaricus campestris</i> y <i>Agaricus bisporus</i> en laboratorio.....	104
Cuadro 38. Análisis económico de la producción de semilla de <i>Agaricus campestris</i> y <i>Agaricus bisporus</i> en laboratorio.....	105
Cuadro 39. Porcentaje de invasión micelial a sustrato comportado.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de reproducción generalizado de basidiomycetes.....	11
Figura 2. Ciclo de reproducción de un <i>Agaricus</i>	11
Figura 3. Comparación de medias para medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	40
Figura 4. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el Prendimiento del micelio en días (PMD).....	43
Figura 5. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo el prendimiento del micelio en días (PMD).....	44
Figura 6. Interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD).....	46
Figura 7. Línea de tendencia lineal del rendimiento de BM en función de PMD.....	49
Figura 8. Comparación de medias para medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	52
Figura 9. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	55
Figura 10. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	56
Figura 11. Interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM).....	59
Figura 12. Línea de tendencia lineal del rendimiento de BM en función de CRM.....	61
Figura 13. Comparación de medias para medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS) para medio de cultivo.....	64
Figura 14. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	68
Figura 15. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	69
Figura 16. Interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS).....	71
Figura 17. Comparación de medias para medio de cultivo en biomasa del micelio g/ml de mc (BM) para medio de cultivo.....	75
Figura 18. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la biomasa del micelio g/ml de mc (BM).....	77
Figura 19. Porcentaje de humedad en las distintas etapas de la fase II.....	80
Figura 20. Comparación de medias para tipo de hongo en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	82
Figura 21. Comparación de medias para procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	83
Figura 22. Comparación de medias para tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	84
Figura 23. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	86

Figura 24. Interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	87
Figura 25. Interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI).....	89
Figura 26. Línea de tendencia lineal del tiempo de invasión en días (TID) en función de DPI.....	89
Figura 27. Comparación de medias para tipo de hongo en el crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	92
Figura 28. Comparación de medias para procedencia del micelio en el crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	93
Figura 29. Comparación de medias para tipo de sustrato en el crecimiento longitudinal en cm ² (CL).....	94
Figura 30. Comparación de medias para tipo de hongo en el tiempo de invasión en días (TID).....	96
Figura 31. Comparación de medias para procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID).....	97
Figura 32. Comparación de medias para tipo de sustrato para el tiempo de invasión en días (TID).....	98
Figura 33. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID).....	99
Figura 34. Interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID).....	101
Figura 35. Interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato tiempo de invasión en días (TID).....	102

ANEXOS

- Anexo 1.** Ficha técnica Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Técnico de Chascomús * ICFC 500/03 *Agaricus bisporus*
- Anexo 2.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)
- Anexo 3.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)
- Anexo 4.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)
- Anexo 5.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)
- Anexo 6.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)
- Anexo 7.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)
- Anexo 8.** Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la determinación de biomasa del micelio g/ml de mc (BM)
- Anexo 9.** Costo de producción para la preparación de 1 Lt de Medio de Cultivo
- Anexo 10.** Cálculo de ingresos obtenidos en la producción del inóculo master o cepa inicial
- Anexo 11.** Costos de producción e ingresos de inóculo master o cepa inicial de los hongos utilizados en el presente estudio
- Anexo 12.** Costo de producción para la producción de 30 kg de semilla de hongo o “spawn” de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*
- Anexo 13.** Cálculo de ingresos obtenidos en la producción de 30 kg de semilla “spawn” inoculada con cepa inicial de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*
- Anexo 14.** Costos de producción e ingresos de semilla de hongo o “spawn” inoculada con cepa inicial de los hongos utilizados en el presente estudio
- Anexo 15.** Medios de cultivo inoculados con *Agaricus campestris* - Procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas - Foto 1
- Anexo 16.** Medios de cultivo inoculados con *Agaricus bisporus* - Procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas - Foto 2
- Anexo 17.** Promedios de PMD, CRM, TCS y BM para *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* en la procedencia del micelio por medio de cultivo (fotos 1 - 2)
- Anexo 18.** Semilla o “spawn” de *Agaricus campestris* - Foto 3
- Anexo 19.** Semilla o “spawn” de *Agaricus bisporus* - Foto 4
- Anexo 20.** Promedios de DPI, CL y TID para *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* en la obtención de semilla o “spawn” (fotos 3 - 4)
- Anexo 21.** Prueba de germinación de semilla o “spawn” de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* *Agaricus sp.* - Foto 5
- Anexo 22.** Matriz de datos para el análisis de contrastes ortogonales

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar el efecto de la composición de diferentes medios de cultivo y sustratos en la reproducción de micelio y semilla o “spawn” de hongos comestibles de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* se evaluó la procedencia del micelio (segmentos de tejido y esporas), en cinco medios de cultivo: Em, TSC, S-M, PSC y Czk (en base a extractos vegetales, sales inorgánicas y diferentes fuentes de carbono) y la producción de semilla o “spawn” en diferentes sustratos (sorgo, cebada, avena y trigo).

Para la producción de inóculo master o cepa matriz, el hongo *Agaricus campestris* por segmentos de tejido en el medio de cultivo PSC logro un CRM de 2.05 cm con un peso seco de BM de 0.706 g/ml, para esporas los medios mas adecuados son TSC, PSC con un CRM de 2.60 y 2.08 cm con un peso seco de BM de 0.717 y 0.713 g/ml respectivamente, el costo de producción fluctúa entre Bs. 41.22 y 37.92. Para *Agaricus bisporus* por segmentos de tejido los medios mas apropiados fueron TSC y PSC con un CRM de 3.75 y 3.52 cm con un peso seco de BM de 0.875 y 0.842 g/ml, para esporas los medios con mejor desarrollo micelial fueron S-M y TSC con 3.56 y 3.44 cm con un peso seco de BM de 0.922 y 0.901 g/ml, en el primer proceso de producción los costos superan los Bs. 50 por cada caja petri con micelio completamente desarrollado, esto se debe al incremento en los costos variables por el costo de la cepa inicial, pero a partir del segundo proceso de producción los costos oscilan entre Bs. 39.36 y 38.53.

Para la producción de semilla o “spawn” los sustratos evaluados presentaron un comportamiento similar, para *Agaricus campestris* por segmentos de tejido y esporas el sustrato con menor tiempo de incubación fue trigo con 44 y 42 días con un costo de producción Bs. 51.64 y 51.34. Para *Agaricus bisporus* en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas también el sustrato trigo fue el más indicado con 28 y 23 días de incubación, con un costo de producción de Bs. 48.62 y 47.77. Ambos hongos se adaptan a sorgo, aunque el tiempo de incubación aumenta significativamente afectando los costos variables, pero no inciden en los costos de producción porque se tiene una compensación con el precio del cereal (sorgo) que es relativamente barato en comparación a trigo.

SUMMARY

In order to study the effect of the composition of different culture media and substrates in breeding mycelium and seed or “spawn” edible mushroom of *Agaricus campestris* and *Agaricus bisporus* assessed the appropriateness of the mycelium (segments of tissue and spores) in five culture media: Em, TSC, SM, PSC and Czk (based on plant extracts, inorganic salts and different carbon sources) and the production of seed or “spawn” on different substrates (sorghum, barley, oat and wheat).

For inoculum production master or parent strain, the fungus *Agaricus campestris* segment of tissue in the culture medium PSC CRM achievement of 2.05 cm with a dry weight of BM 0.706 g/ml, for spores are the most appropriate means TSC, PSC with a CRM of 2.60 and 2.08 cm with a dry weight of BM 0.717 and 0.713 g / ml respectively, the cost of production varies between Bs. 41.22 and 37.92. For *Agaricus bisporus* by tissue segments were the most appropriate means TSC and PSC with a CRM of 3.75 and 3.52 cm with a dry weight of BM of 0.875 and 0.842 g/ml, for spores the means with better development micelial were S-M and TSC with 3.56 and 3.44 cm with a dry weight of BM 0.922 and 0.901 g/ml, in the first trial production costs exceed the Bs. 50 per petri dish with fully developed mycelium, this is due to increased variable costs for the cost of the initial strain, but from the second process production costs range between Bs. 39.36 and 38.53.

For the production of seed or “spawn” substrates tested showed similar to *Agaricus campestris* by tissue segments and smaller spores with the substrate incubation time was wheat with 44 and 42 days with a production cost of Bs. 51.64 and 51.34. For *Agaricus bisporus* mycelium in the origin of the tissue segment and also the substrate spores wheat was the most indicated with 28 and 23 days of incubation, with a production cost of Bs. 48.62 and 47.77. Both fungi are adapted to sorghum, although the incubation time increases significantly affects variable costs, but no impact on production costs because there is an adjustment with the price of corn (sorghum) which is relatively cheap compared to wheat.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos comestibles como el champiñón se inició en Francia de forma casual y desde allí, se extendió hacia Oriente y Occidente. Los primeros cultivos se realizaron en los suelos de cuevas y bodegas, paulatinamente se fueron creando diferentes instalaciones donde se lograba controlar la humedad, temperatura y dióxido de carbono (CO₂), implementando estantes y recipientes para aprovechar mejor el espacio y llegar a incrementar los rendimientos de producción, hasta lograr actualmente cinco cosechas por año que varían entre 18 a 25 kg por metro cuadrado aproximadamente.

Según Jablonsky y Sasek (1997); mencionado por Grodzínskaya *et al.* (s.f.), y Pacioni (1990) indican que el consumo per cápita de hongos se incrementa anualmente, llegando en algunos países de Europa a 2.5 - 3 kg por persona, por lo tanto es importante el desarrollo de la producción, ya que la creciente demanda de consumo por parte de la población en algunos casos, no puede ser satisfecha por la producción doméstica, teniendo muchas veces que acudir a la importación de este producto de países europeos. Datos recientes indican la presencia en los hongos comestibles de compuestos biológicamente activos como anticancerígenos, estimulantes de la función hepática, inmunomoduladores y anticolesterol (Wasser y Weiss, 1999).

La producción en países europeos del cultivo de champiñones, ha llegado a constituir empresas enormes con avances tecnológicos verdaderamente impresionantes. Actualmente Holanda es un país vanguardista tanto en la producción como en la transferencia de tecnología sobre la producción del cultivo de champiñón a diferentes países (Fernández, 2000). La producción de este cultivo en Latinoamérica es relativamente nueva y poco conocida, existen algunas empresas agrícolas en México, Venezuela, Argentina y Brasil que se dedican a este rubro, pero pocas instituciones han logrado dar una capacitación adecuada. El interés comercial que se tiene sobre los hongos comestibles hoy en día, se manifiesta en algunas regiones de Bolivia, porque se ha visto en este cultivo no solamente una opción de inversión sino también que presenta un excelente valor alimenticio, actualmente el consumo de proteína en el

altiplano es bajo, por lo tanto es una alternativa nutritiva que provee de una considerable cantidad de vitaminas y proteínas, al consumidor. Se debe tomar en cuenta estas características para estimular la investigación y la elaboración de un inóculo de alta calidad para la producción de semilla que será la base de la creciente industria del champiñón u otros hongos de interés comercial. La tecnología del cultivo de hongos comestibles en el Altiplano, es poco conocida, lo cual hace que la misma sea inaccesible para los pobladores del área rural. Se ha detectado que existe interés por parte del público, ya que la producción de champiñones es considerada como un agronegocio innovador con poca competencia en el mercado local, pretendiendo establecer una estrategia efectiva de mercadeo. Con respecto a la técnica de producción de este cultivo, es poco conocida, ya que el proceso de producción que se debe desarrollar desde la obtención de la cepa, semilla o "spawn" hasta la seta comercial, difiere en gran medida de la agricultura convencional.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados parte de los problemas asociados con el proceso del cultivo de hongos, es la producción de micelio y su respectiva inoculación para la obtención de semilla, importante para favorecer el desarrollo de la agroindustria de hongos comestibles en el Altiplano. Por este motivo el Centro Internacional de la Papa / Proyecto Agricultura en el Altiplano (CIP/Altagro) en colaboración con el Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), pretenden adaptar y validar una tecnología apropiada para la reproducción y multiplicación de semilla y su posterior cultivo, para que pueda adecuarse a las condiciones agro-socioeconómicas del pequeño productor, en un proceso de transferencia de tecnología que fomente la producción de hongos comestibles en las comunidades del área rural, promoviendo su cultivo, consumo y comercialización.

De esta manera, el propósito del presente trabajo de investigación es de reproducir y multiplicar la semilla del hongo que se desee cultivar, porque esta es la etapa fundamental en todo el proceso de producción hasta la obtención de la seta comercial, de esta forma se impulsaría esta actividad, mediante una apropiada difusión, dirigida hacia los diferentes interesados, con el fin de lograr que la misma sea una fuente de ingreso adicional y posible alternativa productiva para los pobladores del área rural.

1.1 OBJETIVOS

1.2 Objetivo general

Evaluación del efecto de la composición de diferentes medios de cultivo y sustratos en la reproducción de micelios y semilla de hongos comestibles (*Agaricus sp.* y *Agaricus bisporus*) en laboratorio, como una estrategia de conservación y diversificación productiva.

1.3 Objetivos específicos

- Evaluar la reproducción de micelio de Champiñón (*Agaricus sp.* y *Agaricus bisporus*) a partir de secciones de tejido y esporas en cinco medios de cultivo: S-M, Czapek, PSC, EM y TSC.
- Comparar el efecto de cuatro sustratos para la obtención de la semilla utilizando como base sorgo (*Sorghum vulgare*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*).
- Realizar un análisis de costos de producción en laboratorio, sobre la reproducción de micelio para la obtención de semilla o “spawn” de champiñón.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características generales de los hongos

López (1988), menciona que los hongos no presentan clorofila, y por tanto no realizan fotosíntesis, por lo que su nutrición es heterotrófica, no solo con respecto al carbono o al nitrógeno. A diferencia de los animales sus células no suelen estar desnudas, sino cubiertas por una membrana protectora de quitina, también tienen la capacidad de almacenar glucógeno como sustancia de reserva.

Al respecto Edgardo (2002), indica que son en general, filamentosos y multicelulares. Sus células poseen una pared característica, cuya composición varía según los grupos, los filamentos crecen por su extremo apical y cualquier fragmento diminuto es capaz de dar origen a un nuevo individuo. El “cuerpo” o soma del hongo, esta en general constituido por un conjunto de filamentos microscópicos que se ramifican en todas direcciones, cada uno de los filamentos se denomina hifa y al conjunto de ellos micelio.

2.2 Importancia de los hongos

López (1988), indica que desde el punto de vista ecológico son importantes, actúan descomponiendo la madera (saprofitos), atacando las plantas (parásitos), al respecto Montealegre (2002), demuestra que al ser microorganismos cosmopolitas, juegan un papel trascendental y son utilizados en procesos industriales, agroindustria, medicinales y como controladores biológicos de patógenos de plantas y otros organismos, en el primer caso se trata de especies comestibles de géneros como *Agaricus* o *Pleurotus*, o de especies saprotróficas que producen sustancias alelopáticas (antibióticos), como la penicilina producida por hongos del género *Penicillium*. Las levaduras son importantes en la producción de alimentos o bebidas fermentadas, especialmente las del género *Saccharomyces* y también como organismos modelo en la investigación biológica (Wikipedia, 2006).

2.3 Importancia económica

UNSAM (2006), menciona que en contraste con los países productores de Norteamérica, Europa y Asia, la producción de hongos comestibles es una actividad relativamente nueva en Latinoamérica, fue iniciada en México en el año 1933, este primer avance fue seguido con desarrollos posteriores en otros países como Argentina (1941), Colombia (1950), Brasil (1951), Chile (1959), Guatemala (1960), Perú (1960), Ecuador (1967), Venezuela (1968), Costa Rica (1970) y Honduras (2002). En Latinoamérica, México es el productor más importante con más de 50%. Sudamérica tuvo un pico productivo en el año 1994; descendió el 2000-2001 pero logró superarse en el 2006 con 31,424 toneladas, su máxima producción histórica, el cambio productivo se basa principalmente en el gran aumento de la producción brasileña a partir del año 2004, Brasil se mantiene como el segundo productor latinoamericano con un 21% del total producido en la región (Lahmann, 2007).

Los países de la Comunidad Andina de Naciones constituyen un mercado interesante por que pueden obtener bajos costos de producción al utilizar materias primas y mano de obra barata, generando una mayor demanda que puede ser ampliada mediante la aplicación de una promoción adecuada, ya que la política arancelaria es favorable para incrementar el intercambio comercial (UNSAM, 2006). En Bolivia la producción de champiñón alcanzó 24 t/año en 2006 (Cuadro 1). Michael Stuart, es el principal productor, establecido cerca de la ciudad de la Paz, en Santa Cruz, BEXA, se localiza otra planta. Emplean una variedad tropical de *Agaricu bitorquis*, debido a problemas financieros se declaró en bancarrota en el año 2005, pero continúa aún en producción con un bajo perfil (Lahmann, 2007).

Al respecto Vedder (1996), indica que este tipo de cultivo se puede encuadrar entre los más rentables, cuando se realiza una producción bien dirigida, es de esperar que en el futuro y en condiciones normales, únicamente las empresas bien acondicionadas y dirigidas podrán obtener beneficios de una forma continua. Es un error pensar que el cultivo de champiñón, permite ganar mucho dinero de una forma fácil.

2.3.1 Producción y consumo a nivel mundial

Vedder (1996), indica que es difícil disponer de cifras exactas sobre la importancia del cultivo del champiñón en cada país o parte del mundo, no obstante, combinando las cifras que se disponen, Muñoz (2002), menciona que este cultivo se ha desarrollado considerablemente en los últimos años, donde se han generado tecnologías para el incremento en la producción, los rendimientos varían de 25 - 30 kg/m² o 120-150 kg/m² al año.

Cuadro 1. Países, producción y consumo per cápita del champiñón

País	Producción (Tonelada)	Consumo per cápita (kg)
Estados Unidos	350	4.0
Francia	220	3.5
Países Bajos	200	4.0
Inglaterra	150	6.0
Alemania	90	3.0
China	300	--
México	40	--
Bolivia	24	--

(Fuente: Muñoz, 2002)

Se destacan como los principales productores de hongos comestibles a Estados Unidos, Francia y China, países que producen más del 50 por ciento del total mundial (Cuadro1).

2.4 Valor nutricional

Muñoz (2002), menciona que el champiñón posee vitaminas esenciales para el desarrollo de una dieta adecuada; tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido ascórbico (vitamina C), ergosterina (pro-vitamina D2) común en el champiñón, se convierte en vitamina D y la biotina (vitamina H) al igual que la vitamina B12 que puede estimular la curación en muchos casos de anemia. También presenta un importante nivel de ácido fólico, escaso en las hortalizas, su contenido en proteína es elevado, alcanza del 1.5 al

6 % del peso fresco dependiendo de la especie, la edad y el lugar de recolección (Vedder, 1996).

Guzmán *et al.* (1993) y Barrientos (2004), también hace referencia que el contenido nutricional siempre vendrá condicionado por varios factores: si es silvestre o cultivado, medio en el que crece (humedad, materia orgánica y sustrato en el que se cultiva), su efecto remineralizante es muy útil en caso de personas enfermas o aquellas que no pueden comer carne (contienen proteínas fácilmente asimilables), su contenido en selenio le confiere un efecto antioxidante.

Cuadro 2. Comparación nutricional del champiñón con otros alimentos de origen vegetal y animal en peso fresco

Fuente	Agua (%)	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Minerales
Champiñón	92	4.5	0.3	4.0	1.0
Espinaca	93	2.2	0.3	1.0	1.9
Papa	75	2.0	0.1	21.0	1.1
Leche	87	3.5	3.7	4.8	0.7
Carne	68	18.0	13.3	0.5	0.5

(Fuente: Muñoz, 2002)

Lelley (2007), indica que tienen un bajo valor energético, bajo contenido en sodio, contenido elevado de manitol, proteínas y vitaminas, pueden ser recomendados ampliamente para mantener la salud y como parte de la dieta de personas con sobrepeso, diabéticas, hipertensas o con ciertos problemas metabólicos.

2.5 Estructura somática

PF-H (2005), la mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas, cuando en las hifas el protoplasma se distribuye libremente en su interior se denominan hifas cenocíticas, si las hifas están divididas por tabiques o septos, se llaman hifas celulares o septadas. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas,

resultante de este crecimiento, se denomina micelio, cuando el micelio desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos. Jimeno (2004), indica que los basidiomicetos presentan hifas con tabiques (hifas septadas) y sus esporas se forman en el exterior de unas células especiales denominadas basidios, son pluricelulares. Unos dan lugar a setas comestibles, como la seta de cardo, níscalo y champiñón, otros forman setas tóxicas, como la canaleja y el boleto de Satanás.

Bauer (1991), menciona que la pared celular está formada de quitina, es un polisacárido que se caracteriza químicamente por un grupo acetilaminico conectado a restos de glucosa, este material lo forman otros organismos como los insectos, aún cuando en los hongos esta sustancia nunca se encuentra como componente único. Este polisacárido constituye un 80 – 90%, el resto son proteínas y lípidos, la pared celular es multilaminada y las laminillas están formadas por fibrillas diversamente orientadas. (Popoff, s.f.).

2.6 Forma de vida de los hongos

Carrillo (2003), Cruz y Hermosilla (2008), indica que la energía requerida para el mantenimiento de la vida y la síntesis de los componentes celulares es obtenida por la transformación ordenada de las sustancias que ingresan a la célula, estas son modificadas por una serie de reacciones enzimáticas, a través de rutas metabólicas específicas, en la mayoría de los microorganismos, la reproducción es consecuencia del crecimiento y lleva al incremento en el número de individuos, por lo que siguen una curva de crecimiento (fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de regresión). Jimeno (2004), indica que los hongos dependen de materia orgánica elaborada para poder sobrevivir, ya que son heterotróficos, se nutren a través de enzimas y por absorción, viven en lugares húmedos y sin necesidad de luz. Popoff (s.f.), menciona que según el tipo de materia orgánica de la cual se alimentan se distinguen tres tipos:

a) Hongos saprofitos (o saprobios): son aquellos que pueden descomponer residuos orgánicos para alimentarse, restos orgánicos de la descomposición de plantas y

animales, troncos muertos, como los "Pleurotus" u hongo ostra, el Champiñón necesita sustrato elaborado como compost porque no es capaz de degradar la celulosa.

b) Hongos parásitos: se alojan sobre algún ser vivo que los hospede, viviendo a expensas de éste sin ofrecerle ningún beneficio a cambio. Los hongos parásitos pueden producir daños de muy diversa consideración, Producen enfermedades y plagas, por ejemplo las royas, el tizón y el cornezuelo del centeno que atacan a los cereales y los hongos de las tiñas, como el responsable de la enfermedad "pie de atleta".

c) Hongos micorrízicos: viven en simbiosis con alguna especie vegetal (normalmente árboles), obteniendo ambos un beneficio mutuo, estos hongos viven rodeando las partes más finas de las raíces de los árboles, envolviéndolas y alimentándose de unas sustancias que éstas segregan llamadas exudados radiculares, estos exudados radiculares aportan al hongo los glúcidos que necesita para vivir. Los más conocidos son los "Boletos" y las "Trufas".

2.7 Taxonomía

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos utilizan por lo común un sistema sencillo, que tiene la ventaja de ser cómodo de usar. Según este sistema, los cuatro filos principales son: *Oomicetes (Oomycotina)*, *Zigomicetes (Zygomycotina)*, *Ascomicetes (Ascomycotina)* y *Basidiomicetes (Basidiomycotina)* y sus respectivos individuos forman oosporas, zygosporas, ascosporas y basidiosporas.

Una gran variedad de especies se colocan, de forma arbitraria, en un quinto filo: *Deuteromicetes (Deuteromycota)*, también llamados hongos imperfectos. La razón para clasificar una especie dentro de este grupo es porque no se conoce la forma en que se producen las esporas por fusión de los núcleos. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los *Ascomycetes* (PF-H, 2005).

2.7.1 Clasificación taxonómica

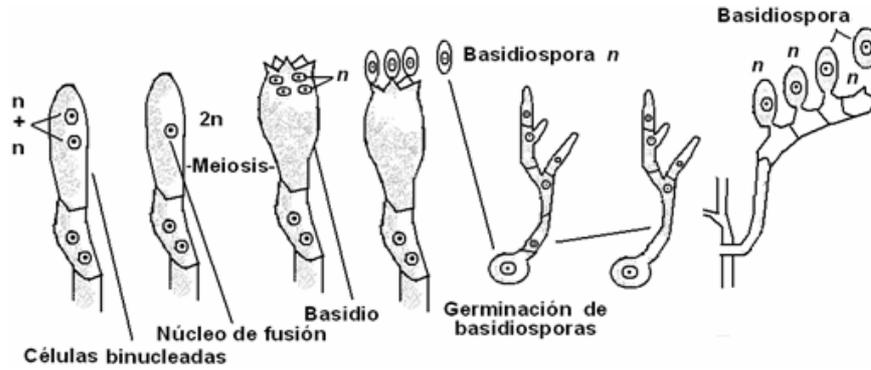
Carrillo (2003), los agrupa de acuerdo a diversos criterios que convergen en la taxonomía o sea el arte de ordenar, a los seres según sus interrelaciones fisiológicas, morfológicas o moleculares, por lo tanto realiza la siguiente clasificación: **Reino:** *Fungí*, **División:** *Eumycota*, **Subdivisión:** *Basidiomycotina*, **Clase:** *Agaricales*, **Subclase:** *Agaricomycetideae*, **Orden:** *Agaricales*, **Familia:** *Agaricaceae*, **Genero:** *Agaricus*

2.8 Reproducción de basidiomycetes

Weier *et al.* (1983), indica que se denominan basidiomycetes porque poseen basidios en el extremo de las hifas vegetativas, donde se forman las esporas en número de cuatro, este ciclo comienza con las hifas dicariotas ($n+n$), se produce primero la fusión de los núcleos y a continuación tiene lugar la meiosis que originará las basidiosporas (Figura 1). El desarrollo varía según se trate de hongos parásitos o saprofitos en general, es como sigue: al germinar una basidiospora haploide, da lugar a hifas haploides que forman un micelio, denominado *micelio primario*, que vive poco tiempo.

A continuación se produce la plasmogamia entre las hifas de micelio genéticamente compatible originando un *micelio secundario* cuyas hifas son dicarióticas, pues no ha habido fusión de los núcleos. Este micelio se desarrolla en una estructura organizada conocida como *basidiocarpo*, que producirá los basidios, el micelio secundario a veces es permanente y cada determinado tiempo produce un nuevo basidiocarpo. En los extremos de sus hifas se desarrolla el basidio en forma de maza. Entonces es cuando se lleva a cabo la cariogamia, seguida de la meiosis (López, 1988).

Figura 1 Ciclo de reproducción generalizado de basidiomycetes

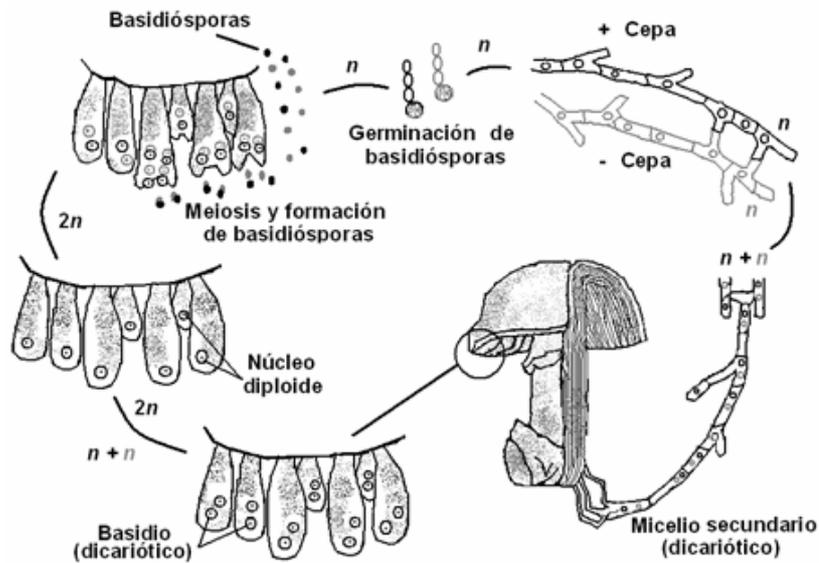


(Fuente: A. H. R. Buller, extraído por Weier *et al.*, 1983)

2.8.1 Ciclo de reproducción de un *Agaricus*

La seta - fructificación o basidiocarpo - es el cuerpo fructífero en donde se producen las esporas. Está compuesto por masas de hifas fuertemente compactas.

Figura 2. Ciclo de reproducción de un *Agaricus*



(Fuente: Costas, 2007)

En la Figura 2, Costas (2007) y Carl (1992), indica que se observa la estructura y reproducción de un *Agaricus* con una fructificación emergiendo del micelio, se esquematiza su origen a partir de las células del micelio vegetativo que contiene un núcleo simple, al respecto Weier *et al.* (1983), indica que la célula resultante contiene dos núcleos haploides ($n+n$), los dos núcleos de cada célula se fusionan inmediatamente antes de la meiosis, la fusión de los dos núcleos y la meiosis subsiguiente se producen en células especiales denominadas basidios. Las meiosporas formadas por esos basidios se llaman basidiosporas, con núcleo (+) y la otra con núcleo (-), las cuales al germinar dan origen al micelio primario que al fusionarse con otro se desarrolla un micelio secundario dicaríotico, que forma las fructificaciones. Nótese que todo el hongo está formado por hifas (uninucleadas y binucleadas), la unión de los dos micelios se llama *plasmogamia* y la de los núcleos *cariogamia*, que da como resultado cuatro esporas a través de un basidio. La reproducción asexual se lleva por medio de esporas especiales, la fructificación del hongo está compuesta por un pie o *estípite* una parte fértil o himenio y un sombrero o *pílio*. La “carne” del hongo (contexto), generalmente se forma por hifas globosas o es igual a las hifas del pie, se indican las fíbulas en las hifas, estas están únicamente en el micelio binucleado, en las de las fructificaciones y en la base del basidio (Edgardo, 2002).

2.9 Morfología del hongo

Regés (1999), indica que en un champiñón se distinguen las siguientes partes:

a) Sombrero o píleo: es la parte más carnosa del hongo; tiene forma redondeada, globosa, que recuerda a la de un paraguas; su tamaño es mayor o menor según la edad del hongo; puede alcanzar hasta unos 15 cm de diámetro, pero desde el punto de vista comercial no interesa que llegue a tener este tamaño.

b) Himenio: está situado en la parte inferior del sombrero y está formado por numerosas laminillas, dispuestas a manera de radios, que van desde el pie hasta el borde externo del sombrero. El color de las laminillas es rosado al principio y después se vuelve pardo e incluso negro, entre las laminillas se encuentran millones de esporas, que cuando germinan dan lugar a unos hilillos o filamentos que constituyen el micelio o

"blanco" del champiñón. Cuando el hongo es pequeño el himenio está protegido por una fina membrana llamada velo, que está unida al sombrero y al pie.

c) Velo: formado por un conjunto especial de células flexibles, que protegen a las esporas y el himenio, hasta que adquieren el grado de madurez óptimo, durante el periodo de desarrollo del hongo. Cuando este llega al periodo de madurez, el velo se rasga y sólo queda de él un pequeño trozo unido al pie, permitiendo así la liberación de las esporas.

d) Anillo: cuando el champiñón alcanza su completo desarrollo, este velo se rompe y sólo queda de él un pequeño trozo unido al pie, al que se denomina anillo.

e) Pie o Estípite: es la parte del hongo que sirve de soporte al sombrero; tiene forma cilíndrica, es liso, blanco y por su parte inferior está unido al micelio o filamentos del hongo que crecen en el sustrato.

f) Volva: cuando el velo se rompe para dejar pasar el sombrero, pueden pasar dos cosas; que desaparezca o que queden restos al pie. Estos restos en forma de saco o funda que envuelven la base del pie se llama volva.

2.10 Hongos comestibles

Dentro del grupo de hongos comestibles más difundidos y conocidos por su empleo en la dieta humana esta el que no se cultiva (*Agaricus campestris*), y aquellos que presentan interés comercial (*Agaricus bisporus*), a continuación se describe cada uno de ellos:

2.10.1 *Agaricus campestris* (J. Lange)

Lazarillo (2005), menciona que entre sus características macroscópicas se distingue un sombrero que va de blanco a blanquecino con fibrillas, presenta un diámetro de 3-10 cm, tiene una cutícula gruesa, separable de color blanco en la que aparecen escamas más o menos apreciables según el ejemplar de un color gris cremoso.

Al respecto Wright y Edgardo (2002), mencionan que presenta un pie 47-80 * 9-17 mm, blanco, flaqueado escamoso por debajo del anillo; cilíndrico y algo angostado hacia la base, anillo supero, delgado simple estrecho. Contexto blanco. Sabor fúngico, olor suave o nulo, agradable. Esporada 7-8 * 4-5.5 μm , ovoides, castañas y lisas. Basidios 25-27 * 5-7 μm , tetra esporados, claviformes. Fíbulas ausentes. Hábitat, aparecen de forma abundante desde el principio de primavera hasta finales de otoño en praderas de pastos, jardines y céspedes abonados. Comestibilidad: óptimo comestible.

2.10.2 *Agaricus bisporus* (J. Lange)

Juan, PD. (2005), Indica que el sombrero tiene forma globosa que evoluciona con el tiempo a convexo extendida, sus dimensiones varían entre los 3-13 cm Ø, tiene una cutícula de color blanco, en la que aparecen manchas de color crema con la edad al igual que pequeñas escamas, más apreciables en la var. *bisporus*. Wright y Edgardo (2002), menciona que el pie mide de 30-60 mm * 10-20 mm, blanquecino, rosado sobre el anillo, con base ligeramente engrosada. Anillo ínfero, grueso. Hábitat, potreros y prados.

Presenta láminas dispuestas radialmente, que tapizan el himenio constituido de células estériles (cistidios) y de basidios productores de esporas color café (Callac, 2007). Esporada 5-7,5 (10) * 4.5-5.5 (6) μm globosas a cortamente elipsoides, castañas y lisas. Basidios 15-30 * 6-8 μm , 2-esporados. Al respecto Vedder (1996), menciona que en la mayoría de las setas aparecen 4 esporas por basidio, y cada célula recibe entonces uno de los núcleos haploides, en el caso del champiñón es diferente ya que no aparecen más de dos esporas por basidio, de ahí el nombre de *Agaricus bisporus*. Ausencia de fíbulas.

2.11 Técnicas de aislamiento

Santamaría (2007), menciona que al arrancar cuidadosamente una seta, la base del pie suele arrastrar consigo unos sutiles filamentos que se asemejan a raíces, esos filamentos son pequeños trozos de micelio, esta es una estructura algodonosa, filamentosa, rizomórfica, normalmente blanca, que se extiende por el subsuelo o sobre

la madera muerta. El micelio es la parte vegetativa o perdurable del hongo. Las fibrillas que forman el entramado filamentoso del micelio se denominan hifas.

Carrillo (2003), indica que el micelio es el conjunto de filamentos y un trozo del mismo se denomina hifa, y cuando este se desarrolla en un medio nutritivo se designa con el nombre de cepa. Al respecto Edgardo (2002), denomina cepa al micelio de un hongo desarrollado en un medio de cultivo, ya sea en una caja petri o tubo de ensayo, es un conjunto de hifas de un organismo y de una especie. Una cepa es equivalente al micelio ya explicado y se considera que es un organismo que mantiene constante su pureza genética y fisiológica y del cual se pueden obtener muchas réplicas.

En el caso de los hongos superiores o macromicetos, como los champiñones, dada su biología, las cepas se pueden obtener de dos formas, por lo tanto el proceso de aislamiento se realiza con el fin de identificar características, capacidad de regeneración en diferentes medios de cultivo. Bauer (1991), indica que se han descrito e ilustrado en detalle los métodos de aislamiento y purificación de hongos más usuales, junto con otros investigadores recomiendan las siguientes técnicas:

2.11.1 Obtención del inóculo esporal

Acedo y Lence (2007), indican que la elaboración del inóculo esporal puede realizarse a partir de setas frescas o secas. Básicamente consiste en preparar una solución de esporas, con ayuda de una cuchilla se aísla el himenio del sombrero o píleo para depositarlo en un mortero y tritarlo hasta obtener una pasta homogénea, colocar en un vaso de precipitado, añadir agua destilada y remover para homogeneizar la mezcla. La proporción debe ser de 3 partes de agua por 1 de himenio machacado. Esta mezcla se filtra a través de una tela de algodón fina para eliminar los restos de tejido fúngico y reservar sólo las esporas, la solución obtenida está lista para utilizarse como inóculo esporal.

Para la obtención de la esporada, seleccionar los mejores ejemplares, seccionar el pie y colocar el sombrero con la superficie de las láminas hacia abajo sobre un papel desinfectado con alcohol. Para captar bien la esporada sobre el papel, tapan el cuerpo

fructífero con un recipiente de vidrio, que mantendrá el sombrero aislado de las corrientes de aire y de una posible desecación. Transcurrido de 4 a 5 horas, se retira del papel el sombrero del hongo y se tendrá dibujada sobre la superficie la impresión de las esporas. Se pone a secar dicha esporada dentro de una caja petri durante 24 horas a una temperatura de 28 a 30 grados centígrados (Maldonado, 2002).

Al respecto Knott (2007), menciona que los resultados son mas eficientes cuando se utiliza papel aluminio desinfectado, es necesario anotar la fecha, procedencia y características del hongo. Cuando se obtiene la impresión de esporas se corta un cuadro de 1 cm² con una navaja estéril, el cuadro se sumerge en 100 ml de agua destilada estéril, se agita, de esta forma obtenemos una dilución de 1:100. Con un gotero o jeringa se toma 0.5 ml de la dilución y se coloca en una caja de petri con el medio de cultivo seleccionado, la caja se decanta para conseguir una distribuir uniforme en toda la superficie del medio. Las condiciones de limpieza y asepsia en este primer paso deben ser controladas, el porcentaje de germinación de las esporas de champiñón es muy pequeño, porque se ven afectadas por otro tipo de microorganismos, que parecen germinar mas rápidamente (Vedder, 1996).

2.11.2 Obtención del inóculo vegetativo

Maldonado (2002), indica que se debe realizar la elección de los mejores ejemplares (fresco, turgente, joven y limpio), desinfectar el ejemplar con alcohol al 96% o formol al 5%, rociando con un aspersor manual o sumergiendo por 30 segundos en agua con carbonato de calcio (2 g/l), partir el ejemplar con la ayuda de un bisturí y extraer tejido vivo, depositar el mismo en el medio de cultivo, anotar en las cajas sembradas la fecha y la variedad o nombre del ejemplar con el que se este trabajando. La cepa cultivada se recomienda que cada seis meses se vuelva a aislar y obtener nuevas líneas sin dejar de cuidar las anteriores, con el objeto de que si alguna de las nuevas líneas se degenere, existe la posibilidad de volver a usar las más antiguas que todavía pueden poseer las características deseadas.

En ambos casos una ves que se obtiene el micelio, el mismo se multiplica por simple fragmentación, cada trozo puede dar lugar a un nuevo individuo. Gracias a ello, la

conservación rutinaria de cultivos fúngicos en laboratorio se realiza mediante subcultivos o repiques, a partir de un simple trozo de una colonia fúngica se puede obtener otra (Edgardo, 2002).

García (1998), indica que al realizar la fase de establecimiento para la obtención de un cultivo puro, también habrán crecido colonias de levaduras (de aspecto liso, generalmente graso o ceroso) o de otros hongos (de colores vistosos) y de bacterias del ambiente (que tienen aspecto filamentosos), por lo que aquello no es un cultivo puro. Para conseguirlo hay que hacer resiembras en nuevos recipientes con medios sin utilizar; es decir, hay que tomar una porción de una colonia buena, cogiendo con un asa de siembra un fragmento y sembrarla en un nuevo medio, de esta forma se hacen todos los pases o repeticiones necesarios hasta que se observa que en la placa todas las colonias son del hongo deseado y no hay allí otros microorganismos. Pero tiene el inconveniente de que tras numerosos pases las cepas puedan perder sus características o sufrir variaciones genéticas.

2.12 Medios de cultivo en microbiología

González (2002), indica que los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. UNN (2007), señala que existe gran cantidad de medios de cultivo para la propagación y estudio de hongos, pero la mayoría han sido diseñados con alguna finalidad especial, tales como la seguridad de un crecimiento óptimo o para determinar la necesidad de una sustancia específica para un moho determinado, estos son:

- Medios sintéticos o químicamente definidos: llevan fuentes de carbono, nitrógeno, sales que suplan iones (P, K, Mg, Fe, Ca), Cerito y Alonso (2006), mencionan que el medio Czapeck es utilizado para la identificación y descripción completa de microorganismos para estudiar sus características, da muy buenos resultados con fines comparativos. UNN (2007), indica que este medio se utiliza para cultivar bacterias y hongos que son capaces de utilizar nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno.

- **Medios complejos o de composición indefinida:** en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable SEDI/OEA, (s.f.). Contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa, como extracto de levadura de cerveza o malta y macerados vegetales que aportan las sustancias fundamentales para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes, que puede utilizarse para la detección, aislamiento y cultivo de hongos, levaduras y bacterias (bioMerieux, 2008).

- **Medios de mantenimiento:** suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Por ejemplo: al añadir glucosa los microorganismos la consumen y producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es preferible no utilizar glucosa en los medios de mantenimiento (González, 2002).

2.12.1 Componentes del medio de cultivo

Los componentes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes o de soporte (Hurtado *et al.*, 1994). La mayoría de los microorganismos de laboratorio son heterotróficos, es decir necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno asimilables, así como sales minerales y en ciertos casos vitaminas, pueden sintetizar todos sus constituyentes celulares a partir de un único compuesto orgánico que sirve tanto de fuente de carbono y de energía, y de una fuente inorgánica u orgánica de nitrógeno (Madigan, 2003; citado por Carrillo, 2003).

2.12.2 Sales inorgánicas

Pellizzari (2004), comenta que los elementos químicos esenciales para el cultivo de hongos son: C, H, O, S, N, P, K, Mg, Fe, etc., al respecto Crespo (1989), indica que estos influyen en el crecimiento y desarrollo normal del micelio, si no se encuentran en una proporción adecuada pueden crear carencia que puede llegar a malograr la explotación o tener menor resultado económico en la cosecha, tanto en calidad, como

en cantidad de champiñones. Cuando se prepara un medio de cultivo artificial hay que ser cuidadoso con los elementos constituidos para evitar carencias que puedan llegar a ser peligrosas, a continuación se describe como afectan estos elementos en el crecimiento y la fructificación del micelio.

- **Nitrógeno**, su presencia influye en el crecimiento del micelio, pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica, el nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular (SEDI/OEA, s.f.). Es preciso destacar que las sales amoniacaes deben estar presentes en concentraciones muy débiles, y a demás no asimilan los nitratos (Vedder, 1996).

- **Calcio**, se considera indispensable en el crecimiento y la fructificación del micelio, una de las formas de incorporar el calcio es como carbonato de calcio (caliza CO_3Ca), con el objetivo de neutralizar el exceso de acidez posterior a la fermentación, también como sulfato de calcio (yeso SO_4Ca).

- **Fósforo**, esta presente en la paja de trigo, el exceso de fósforo en el medio nutritivo no es recomendable, solo se agrega como fosfato en la preparación del medio.

- **Magnesio**, se considera imprescindible en el crecimiento y fructificación del micelio, los excesos son perjudiciales, pero solamente pueden preocupar en la preparación del medio de cultivo, se proporciona en forma de Mg Cl_2 .

- **Potasio**, los requerimientos de este macronutriente son esenciales, está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento del micelio, tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

- **Hierro**, las sales de hierro son importantes en el crecimiento y fructificación del champiñón.

- **Azufre**, los sulfatos pueden ser utilizados por casi todas las bacterias y hongos, que requieren fuentes de azufre reducido, tal como sulfatos o tiosulfato (Santamaría, 2007).

El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes (SEDI/OEA, s.f.).

Cuando el medio de cultivo es artificial, hay que integrarlos con todos los elementos que componen el cuerpo del champiñón, en caso contrario no se podrá conseguir el crecimiento y la fructificación que aseguren al productor calidad y cantidad rentable.

2.12.3 Compuestos orgánicos

Se clasifican en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas, el uso de las dos últimas sustancias es suplementado de forma indirecta con el uso de extractos o complejos naturales al medio de cultivo, estos medios son de composición indefinida, dentro de los carbohidratos se tiene como fuentes de carbono la sacarosa, se emplea en concentraciones de 2 al 3%, ocasionalmente se utiliza glucosa, fructuosa o almidón etc., (Hurtado *et al.*, 1994). Este es un componente esencial e importante, como los hongos no cumplen la función denominada fotosíntesis, por carecer de clorofila, tienen que encontrarlo sintetizado (Crespo, 1989). La sacarosa favorece el crecimiento micelial ya que es una fuente de carbono más asimilable, mientras que la glucosa es degradada cuando la sacarosa se agota e induce la síntesis de enzimas, estos cambios en el metabolismo del hongo son una respuesta al efecto del medio de cultivo que puede retardar el crecimiento (Roussos y Perraud-Gaime, 1996).

Peña Serna *et al.* (2005), indica que al evaluar el crecimiento micelial de la cepa nativa del hongo *Poliporal* utilizando diferentes fuentes de carbono (sacarosa y glucosa), determinó que los tratamientos con glucosa presentan menor concentración de azúcares residuales y a su vez menor crecimiento micelial y un bajo rendimiento de biomasa frente a la sacarosa que obtuvo mayor crecimiento micelial, el estudio demuestra un alto rendimiento en la conversión de sacarosa a biomasa, puesto que el hongo requirió menores cantidades de sacarosa para alcanzar mayor crecimiento y biomasa.

2.12.4 Complejos naturales

Muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo (Hurtado y Merino, 1994). Estos son generalmente aportados por extractos y levadura, en algunos casos son adicionados en cantidades demasiado elevadas interfiriendo en el metabolismo microbiano (Carrillo, 2003). El uso de sustancias que se encuentran en forma natural pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular (Nitsch, 1962; Lee *et al.*, 1965; Paulet, 1970; citado por García *et al.*, 2005). Muchos vegetales y extractos son especialmente adecuados como medios de cultivos con o sin agregado de sacarosa, y en algunos casos son útiles para el aislamiento y conservación de mohos (Pellizzari, 2004).

A continuación se describen algunas sustancias que se utilizan para la preparación de medios de cultivo indefinidos. Swallow (1990); citado por Moguel (2005), al estudiar la calidad fisicoquímica de la miel de abeja (*Apis mellifera*), indican que la miel es una solución sobresaturada de azúcares (fructuosa, sacarosa, glucosa y maltosa). Muñoz (2007), menciona que el contenido en minerales es muy pequeño (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, fósforo y potasio), están presentes también alrededor de la mitad de los aminoácidos existentes, ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido acético, ácido cítrico, etc.) y vitaminas del complejo B, vitamina C, D y E. Bianchi (1990), indica que la oxidación enzimática de la glucosa tiende a ser muy lenta en la miel no diluida y a velocidades mucho más acelerada a medida que ésta se diluye, por lo tanto se tiene una acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel diluida, es la causa de la mayor parte de los efectos antibacterianos no osmóticos de la miel. Mato *et al.*, citado por Moguel (2005), indican que el contenido de acidez libre es una medida indirecta de la frescura en la miel y expresa la acidez independientemente de los ácidos presentes. Se ha encontrado que el ácido glucónico es el más abundante y procede principalmente de la descomposición de la glucosa, debido a la acción de la enzima glucosa oxidasa presente de manera natural en la miel, se produce la gluconolactona, que también influye en la concentración de la acidez.

La levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) es un poderoso nutriente, para suplementar todo tipo de fermentación, ya que es fuente de aminoácidos, no contiene N_2 inorgánico y presenta otros nutrientes fácilmente disponibles. (VINOTEC CHILE, 2006). Algunos microorganismos carecen de la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos, nucleótidos o vitaminas, estos son generalmente aportados por los extractos de levadura (Carrillo, 2003). Las levaduras contienen importante cantidad de vitaminas hidrosolubles del complejo B, incluye a las vitaminas B_1 - B_2 - B_6 , niacina, ácido fólico, ácido pantoténico y biotina; sus funciones son las de participar en reacciones enzimáticas como co-enzimas (B_1 , B_6 , niacina, biotina, ácido fólico y pantotenato); en la síntesis de ácidos nucleicos (biotina y ácido fólico) y como activadores de funciones de la respiración celular (B_2 y niacina), (Markmann, 2002).

El extracto de malta o azúcar de malta es una sustancia que se obtiene dejando que el grano de cereal, ya sea trigo, avena o centeno en especial la cebada, se ablande en agua y germine. Es un disacárido formado por dos glucosas ($C_{12}H_{22}O_{11}$), que se forma por la acción de la amilasa sobre el almidón, la maltosa es soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y cristaliza en finas agujas, tiene un elevado contenido en proteínas e hidratos de carbono, y se usa para aumentar el valor nutritivo de otras bebidas (En carta, 2006).

Carrillo (2003), menciona que la levadura y el extracto de malta de cebada generalmente se suministran en concentraciones respectivas de 0.5% hasta 1% y de 0.1% v/v, estas dos sustancias se pueden considerar también como buenas fuentes de nitrógeno reducido. Al respecto Stanier *et al.* (1996), indica que la mayoría de los organismos fotosintéticos así como muchas bacterias no fotosintéticas y hongos, asimilan el nitrógeno en estado inorgánico oxidado, como nitratos; su utilización implica, una reducción preliminar. Algunos microorganismos son incapaces de realizar la reducción, por lo que es mejor una administración de este elemento en forma reducida ya que su asimilación es inmediata. Sin embargo, en otros casos, cuando el extracto de malta de cebada se utiliza como una fuente de nitrógeno reducido en los cultivos, los tejidos podrían oscurecerse y morir. Valeska *et al.* (2007), menciona que el oscurecimiento indica la madurez del tejido desarrollado en el medio de cultivo.

Otra forma de preparar los medios de cultivo, es utilizando componentes que son relativamente económicos y de fácil acceso, en forma de concentrados a partir de papas que tienen un 18% de almidón, 2,2% de proteínas, y 1% de cenizas (elementos inorgánicos), considerado una importante fuente de almidón (Encarta, 2006). Y cereales como el trigo (*Sorghum halepense* L.), que presenta 15.3% de proteína asimilable de fácil acceso para los microorganismos (Raimondi y Giaccio, 2002).

2.12.5 Medio de soporte

Hurtado y Merino (1994), mencionan que se tiene una variedad de gelificantes (agar, agargel, phytigel o agarosa) que sirven para conseguir la textura y consistencia adecuada para el medio de cultivo. Capilla (s.f.), caracteriza los tipos de medios de cultivo según su estado y composición en: medios sólidos, cuya concentración es de 1.5%; medios semisólidos, su proporción de agar suele ser inferior al 1.5%, y los medios líquidos o caldos: no contiene ningún tipo de gelificante.

Castelli (2003), menciona que la carragenina es un agente gelificante, espesante y ligante, extraído de algas marinas rojas (*Rhodophyceas*), es ampliamente usado en la industria de alimentos por sus particulares efectos. Roussos y Perraud-Gaime (1996), indica que por lo general los cultivos de microorganismos como los hongos saprófitos (*Lentinus*, *Pleurotus* y *Agaricales*), crecen muy bien en medio sólido, obteniendo mayor producción de biomasa en comparación al cultivo sumergido (líquido). La utilización de elementos menos costosos como la carragenina brindan una alternativa más económica en el proceso de introducción de material vegetal a condiciones *in vitro*. Porto (2003), indica que la carragenina está ubicada en la pared de las células y en la matriz intercelular del tejido de las algas, es un polisacárido de alto peso molecular, se distinguen tres tipos de carrageninas: Kappa (*K*), forma geles rígidos y firmes, Carragenina Iota (*I*), produce geles más elásticos, Carragenina Lambda (*L*), no gelifica pero funcionan como agente espesante.

Reeslev; citado por Moreno y Torrenegra (2000), indican que la solución de carragenina es bastante estable en los pH neutros o alcalinos, pero, los pH bajos afectan su estabilidad, especialmente a altas temperaturas, la disminución del pH causa la

hidrólisis del polímero de la carragenina, lo cual resulta en la disminución de la viscosidad y de la fuerza de gelificación. Sin embargo, una vez formado el gel, aun en los pH bajos (3,5 a 4,0) no hay más ocurrencia de hidrólisis y el gel permanece estable. La carragenina posee características hidrolíticas, requiriendo una temperatura de 60°C para disolverse en solución acuosa, lo que resulta bastante práctico en la determinación de la tasa de crecimiento específico y biomasa de los hongos filamentosos.

2.13 Obtención de la semilla, inóculo, blanco o “spawn”

Santamaría (2007), indica que debe quedar claro que los hongos en su ciclo biológico natural se reproducen por esporas y que las esporas nada tienen que ver, con lo que en el comercio se denomina “semilla de hongo”. Cardona (2001), menciona que el micelio se cultiva en un medio nutritivo partiendo de esporas o utilizando cualquier parte del cuerpo fructífero para obtener el micelio. La semilla del hongo se refiere al micelio del hongo crecido en granos de cereales (trigo, mijo, sorgo, cebada, aserrín) o sobre granulados de sustancias inertes (perlita, vermiculita), prácticamente es el equivalente a las semillas en el cultivo de plantas (Song, 2005).

2.13.1 Cereales

Carabaño (1995), indica que el valor nutritivo de los cereales, depende tanto de su contenido en principios inmediatos, como de la capacidad del microorganismo para transformarlos en nutrientes, se pueden distinguir factores internos que están relacionados con la composición química del alimento, y factores externos, relacionados con la capacidad de digerir (capacidad enzimática, tiempo de tránsito y presencia de otros compuestos que retarden o inhiban la acción enzimática).

Los carbohidratos presentes en los cereales son los productos predominantes de la fotosíntesis vegetal y son los principales nutrientes de la mayoría de los microorganismos, degradan estas macromoléculas fuera de las células por la acción de exoenzimas y esos productos son absorbidos por las mismas. La aptitud para el cultivo está en relación con la ecología de la especie, sus interacciones con los

microorganismos y su potencial enzimático para la degradación de sustratos. Todas esas características, han sido adquiridas a lo largo de la evolución (Callac, 2007).

Los hongos tienen más éxito que las bacterias en la degradación de la celulosa (celulolisis) o en la madera (lignocelulosa). Entre los Basidiomicetos que pueden degradar y digerir la celulosa están *Coprinus*, *Fomes*, *Pleurotus*, *Polyporales* y *Rhizoctonia*, en tanto que los del género *Agaricus* emplean sustratos de gran calidad obtenido a partir de la descomposición de residuos orgánicos (Carrillo, 2003). A continuación se detalla la composición de nutricional de los granos utilizados en el experimento.

Cuadro 3. Composición de nutrientes por 100 g de grano crudo con 10 % de humedad

Cereal	Proteína (%)	Fibra cruda (%)	Carbohidratos (%)	Almidón (%)
Trigo	13.05	2.8	71.0	60.0
Sorgo	11.0	2.3	70.1	75.0
Avena	12.4	13.0	65.2	45.0
Cebada	11.5	5.7	78.0	50.0

(Fuente: Lubin, 1995)

Prats *et al.* (1989), indica que la fibra representa la porción no digerible de los alimentos y por consiguiente, mientras mayor sea su concentración en un producto dado, menor será su valor alimenticio, la naturaleza química de la fibra cruda, aún cuando no está bien establecida, se considera constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina. Guardado *et al.* (2007), menciona que aproximadamente el 80% del grano de cereales está compuesto por hidratos de carbono y dentro de ellos el almidón es el que en mayor proporción se encuentra.

El contenido de fibra cruda, es el que marca la diferencia del grano de avena con los demás cereales, los granos de trigo y sorgo tienen un bajo contenido de fibra, que en general no supera el 2.8% sobre la materia seca. En contraste, la avena y cebada presentan concentraciones de fibra cruda del orden de 5 y 6% para cebada y 12 a 13%

para avena. Carabaño (1995), menciona que esta composición de fibra, se debe a que los valores más bajos corresponden a los granos vestidos, donde las cubiertas externas del grano suponen un peso más elevado (30 y 18% para la avena y cebada, respectivamente) y los más altos a los que se denominan granos desnudos (5-7% para trigo y sorgo).

Esta envoltura está compuesta casi en su totalidad, por paredes celulares que contienen un 30 a 40% de celulosa y otro tanto de hemicelulosa, las que son parcialmente digeridas, debido a la acción de las enzimas provenientes de la población microbiana. El 8% de lignina que está incluida en esta cubierta no puede ser degradado. "La fibra es enemiga de la energía", este tradicional y tan divulgado concepto, que indica que un ingrediente con mayor fibra que otro, en general aporta, menos energía, es perfectamente aplicable al grano de avena y su valor energético es inferior a otros cereales en un 15 a 30% (Campos y González, 2001).

La fabricación de micelio, semilla, inóculo, blanco de hongo o "spawn" se realiza normalmente bajo condiciones de laboratorio con instrumental desinfectado, aire ultrafiltrado, sustrato estéril, etc. La idea fundamental consiste en suministrar al cultivador un producto que esté cubierto por micelio, que sirva de alimento para el hongo y que sea fácilmente disgregable. En la siembra, cada "semilla" forma lo que se llama un núcleo de siembra, foco a partir del cual, el micelio alimentado inicialmente por los azúcares del cereal, se extenderá hacia el sustrato (Santamaria, 2007). Los productores de hongos inoculan micelio previamente crecido en granos en vez de esporas para evitar posibles variaciones y mutaciones. La calidad de la semilla es uno de los factores más decisivos para el éxito del cultivo. Por lo tanto, los productores necesitan usar una semilla certificada para la producción comercial. La semilla debe mantener las características de la cepa inicial (Song, 2005).

2.14 Factores ambientales

Mroginski y Roca (1989), indican que la asociación explante – medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), los cuales pueden

destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Por lo tanto se debe realizar un control adecuado del pH, incubación, humedad y oxigenación, estos factores determinan el crecimiento progresivo del micelio, y la invasión al sustrato (cereal).

2.14.1 pH

Carrillo (2002), menciona que el pH del medio puede influir sobre la expresión de genes y regular el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación a condiciones acídicas o básicas y aún la virulencia. Roussos y Perraud-Gaime (1996), indica que los hongos filamentosos crecen en medios ácidos y pueden tolerar importantes cambios de pH (2.5 - 7.5), mientras que los hongos ectomicorrízicos y saprófitos, necesitan para su crecimiento pH neutros y estables (6.0 hasta 7.5). Fang y Zhong citado por Peña *et al.* (2005), evaluaron la influencia del pH inicial sobre el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum*, en un rango desde 3.5 hasta 7.0, obteniendo mayor crecimiento a pH inicial 5.5, 6.5, 7.0 lo cual indica que son apropiados.

Guillén-Navarro *et al.* (1998), en el estudio de Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido, indica que el pH más indicado fluctuaba entre 5.5 – 6.5. Para ajustar el pH del sustrato García (1991); mencionado por Cisterna (2004), indica que una práctica habitual en la obtención de semilla, es la adición de 1 - 5 % de Ca CO₃ (Carbonato de Calcio) sobre el peso seco del cereal, con el fin de regular el pH, que debe ser mantenido entre 6 y 6.5. Al respecto Song (2005), indica que el pH óptimo para el sustrato (cereal) varía entre 6 y 8, dependiendo de las especies de hongos con que se trabaje. Vedder (1996), señala que el calcio es esencial, porque neutraliza el ácido oxálico segregado por el micelio, si no el medio se acidificaría con demasiada rapidez, el micelio de champiñón prefiere un pH de 7.0 a 7.5 aprox. al final del proceso el pH desciende alrededor de 6.3.

2.14.2 Incubación

Song (2005), menciona que el último factor para el crecimiento de los hongos es la provisión de un ambiente apropiado para su crecimiento tanto vegetativo como reproductivo, son fácilmente afectados, por lo tanto el éxito o fracaso del cultivo de hongos depende del control de las condiciones de incubación. Baena (2005), menciona que la temperatura depende de la cepa con la que se trabaja, el micelio pueden desarrollar bien entre 16 - 28°C, por encima de 40° C o por debajo de 4°C puede ocurrir la muerte del micelio o entrar a un estado de letargo.

Al respecto Cardona (2001), Cisterna (2004) y García *et al.* (2006), mencionan que la incubación se lleva a cabo bajo oscuridad a 25 - 28°C durante 3 - 4 semanas aproximadamente, pero si sobrepasa de los 30°C, el micelio morirá. Maldonado (2002), indica que a los ocho días de incubados se revisa cuidadosamente el sustrato (cereal) con el objeto de detectar contaminaciones, el micelio del hongo posee un agradable aroma dulzón, que recuerda a la vainilla o al coco, muy característico, que debe notarse claramente, si algún frasco con sustrato presenta alguna coloración verdusca o oscura debe ser desechado inmediatamente.

2.14.3 Humedad

Baena (2005), indica que la humedad del sustrato debe mantenerse entre 60 - 75%. García *et al.* (2005), menciona que la humedad se puede uniformizar con el uso de Ca SO₄ (yeso) en una proporción de hasta 5% del peso seco del sustrato para favorecer el agarre del hongo, mejorar la textura y aireación del material y retener humedad. Al respecto García (1998), indica que cuando tienen 40 - 50% de humedad se les mezcla con Ca SO₄ (5-12 g por kg) para que los granos no se peguen unos a otros, de esta forma se puede obtener un producto disgregable y fácil de mezclar con el sustrato definitivo al momento de la siembra.

2.14.4 Oxigenación

Baena (2005), señala que otro parámetro es la falta de oxígeno ya que sin este el micelio puede ser afectado por bacterias anaerobias las cuales competirán por el sustrato, además de soportar mayores temperaturas. Cardona (2001), indica que la incubación se realiza en frascos de vidrio con una perforación en la tapa o bolsas de polipropileno transparentes, a las que se le coloca una torunda de algodón. Al respecto Cisterna (2004), indica que la práctica de cerrar los frascos o bolsas y taponarlos con algodón es para permitir algo de intercambio gaseoso.

2.15 Esterilización

Hurtado y Merino (1994), es el tratamiento por el que se elimina o destruye todo organismo vivo presente en un entorno, si se pretende hacer crecer un microorganismo concreto en un medio, hay que eliminar patógenos, microorganismos competidores, contaminantes, etc. Santamaria (2007), para efectuar una correcta esterilización térmica hay que tener en cuenta varios parámetros: temperatura, tiempo de tratamiento, cantidad de producto y características físicas del material a esterilizar

2.15.1 Calor húmedo

El procedimiento más utilizado es la esterilización por calor húmedo, a 1 atm de presión (15 lb/plg²) a 121°C por 15 minutos el medio nutritivo y de 20 a 90 minutos el sustrato (cereal), (Santamaria, 2007).

2.15.2 Acción de la luz ultravioleta

El rango de la radiación UV que más afecta a los microorganismos está entre 240 y 280 nm (nanómetros), y se utiliza para el tratamiento de superficies contaminadas pues tienen poco poder de penetración, el principal efecto de la luz UV es causar mutaciones en los residuos de tiamina del ADN, Muchas bacterias poseen un eficiente mecanismo de foto reactivación para reparar el daño causado por la radiación UV cuando se exponen inmediatamente después a la luz visible (Carrillo, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN - Viacha), dependiente del Instituto Boliviano de Ciencias y Tecnología Nuclear (IBTEN), que se encuentra a 3 km de la localidad de Viacha, Provincia Ingavi del Departamento de La Paz. Geográficamente se ubica a 16° 39' latitud Sur y 68 ° 16' longitud Oeste, a una altitud aproximada de 3869 msnm.

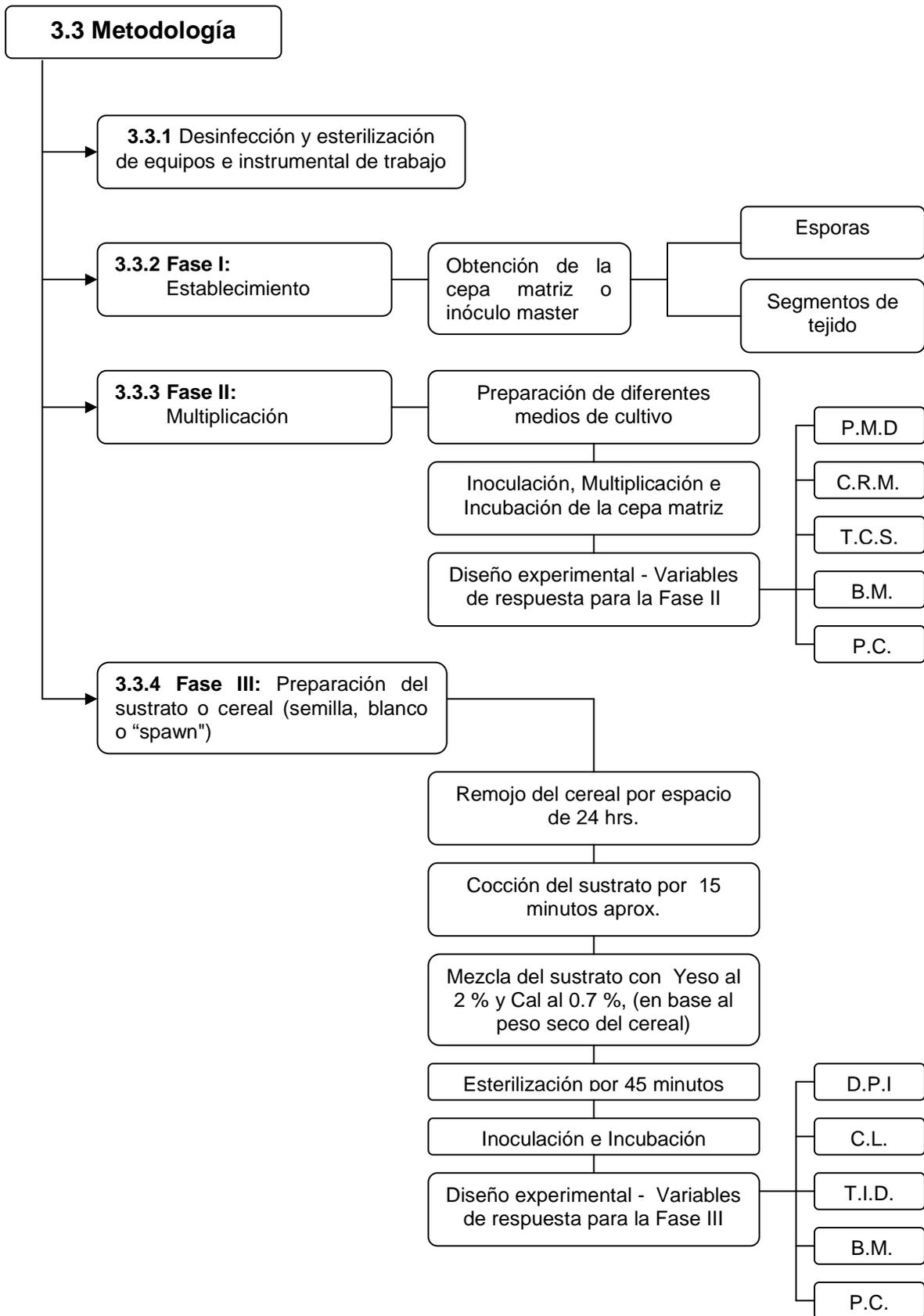
3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

El material genético que se utilizó, para el trabajo de investigación fue el Champiñón silvestre (*Agaricus campestris*) que fue colectado de la zona de Puerto Acosta identificado en el trabajo de investigación de tesis titulado "Identificación y caracterización morfológica de especies nativas de hongos comestibles en humedales y bosques de la provincia Camacho, Departamento de La Paz". La especie comercial *ICFC 500/03 *Agaricus bisporus* fue adquirida del Laboratorio INBACH Argentina (Anexo 1), este material fue entregado por la Institución CIP/Altagro (Centro Internacional de la Papa / Proyecto Agricultura en el Altiplano).

3.3 Metodología

La descripción cronológica de la metodología utilizada en el trabajo de investigación se describe en el siguiente diagrama.



3.3.1 Esterilización de laboratorio e instrumental de trabajo

Antes de realizar la introducción del material genético a condiciones *in vitro* para la reproducción y multiplicación, la cámara de flujo vertical (LABCONCO® PURIFLOR™ CLASS II SAFETY CABINOT) fue desinfectada con alcohol al 70 % (v/v), 3 veces, para luego ser esterilizado con luz ultravioleta durante 15 minutos (Hurtado y Merino, 1994). Se procedió a realizar una desinfección y esterilización constante del material de vidrio y metal, el mismo fue lavado con detergente líquido y enjuagado 4 veces, 3 con agua corriente y 1 con agua destilada, los frascos de vidrio que se utilizaron para el sustrato (cereal), previamente fueron esterilizados en el autoclave (MARKET FORGE MODEL 109-85 STERILMATIC) a 1 atm de presión y 121°C por 15 minutos. Estos procedimientos se repitieron a lo largo del trabajo de investigación para no tener problemas de contaminación (hongos patógenos y/o bacterias) (Mroginski y Roca, 1989).

3.3.2 Fase I: Establecimiento del inóculo

Para el establecimiento del inóculo por secciones y esporas, se escogieron los mejores ejemplares, se trabajó en condiciones asépticas, el medio de cultivo utilizado para ambos casos fue, PSC (Papa + Sacarosa + Carragenina). El establecimiento de la especie local *Agaricus campestris* se inició a partir de segmentos de tejido y esporas, que fueron extraídos del sombrero, en el caso de la especie comercial *Agaricus bisporus* el Dr. Edgardo Alberto del Laboratorio INBACH en la ficha técnica indicó que se proceda a realizar sub-cultivos e inducir la fructificación para poder iniciar la Fase I, por segmentos de tejido y esporas.

Para la obtención de la esporada, se colocó sobre una superficie de papel aluminio, previamente desinfectada con alcohol al 96%, el sombrero con las laminillas hacia abajo, se tapó el cuerpo fructífero con un frasco de vidrio, para mantener el sombrero aislado de las corrientes de aire y de una posible desecación durante 24 hr, de esta manera se obtuvo sobre la superficie la impresión de las esporas, que fueron cultivadas posteriormente en el medio de cultivo (Acedo y Lence, 2007 - Maldonado, 2002 – Knott, 2007).

Al realizar este procedimiento para la obtención de la cepa madre no se observó resultados, se tuvo problemas de contaminación y en algunos casos el inóculo esporal no reaccionó para ninguno de los dos tipos de hongos. De forma análoga se seleccionó setas o fructificaciones en un estado de madurez avanzada, se procedió a cultivar fragmentos de himenio (laminillas de tejido estéril) cargadas con esporas viables que reaccionaron con el medio de cultivo formando las primeras hifas de forma acelerada que conformaron la cepa matriz. En el establecimiento del inóculo por segmentos de tejido se quitó la capa externa o cutícula del sombrero para realizar diversos cortes longitudinales y transversales, y sacar secciones, que fueron cultivados en el medio de nutritivo.

Se proporcionó a las especies de estudio las condiciones artificialmente apropiadas (físicas, químicas y ambientales con el uso de una incubadora ASTELL MODEL N° IBI 044) siguiendo las recomendaciones hechas por Cardona (2001), Cisterna (2004) y García *et al.* (2006), para que sus células expresen su potencial de regeneración, por lo tanto fue necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. El desarrollo de la cepa matriz demoró 20 días para la especie comercial y 42 días para la especie local.

3.3.3 Fase II: Multiplicación

Para esta fase primero se procedió a la preparación de 5 medios de cultivo diferentes para poder realizar la multiplicación de la cepa matriz, para todos los casos se utilizó carragenina como gelificante por que representa un menor costos y tienen las mismas características que el agar.

3.3.3.1 Preparación de diferentes medios de cultivo

a) Medio Sabouraud-miel (S-M): compuesto por extracto de levadura de cerveza 20 gr. - miel de abejas 80 g - carragenina 20 g – 1 litro de agua destilada (modificado por Saenz Peña, 1998 citado por Carrillo, 2003).

b) Medio Em: compuesto por extracto de malta 15 g – glucosa 20 g – sacarosa 5 g carragenina 20 g (Jarvis y Williams, 1987 citado por Carrillo, 2003 - modificado).

c) Medio PSC: compuesto por 400 g de papas – 30 g de sacarosa – 10 g de carragenina (Sifert, 2000 citado por Carrillo, 2003).

d) Medio TSC: compuesto por 100 g de trigoillo - 30 g de sacarosa – 10 g de carragenina (elaboración propia).

e) Medio Czapek: compuesto por 30 g de sacarosa - nitrato de sodio 3 g - fosfato de potasio 1 g - cloruro de potasio 0,5 g - sulfato de magnesio 0,5 g - sulfato ferroso 0,01 g - carragenina 15 g (Pitt, 1988 citado por Carrillo, 2003).

Los componentes de los medios **a**, **b** y **e** se mezclan por separado en 1 Lt. de agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con OH Na y H Cl a 0.1 N, se adiciono la carragenina y se llevó al horno microondas para que se disuelva por completo. Para los medios **c** y **d** se hizo hervir la papa y el trigoillo por separado durante 3 min, se filtró con una gasa y se agregó la sacarosa, para ajustar el pH se procedió de la misma forma que los medios a, b y e. Se procedió a fraccionar cada medio de cultivo en cajas petri de 95 mm de Ø, a cada una se le colocó 25 ml de medio, posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos (Capilla, s.f. y Carrillo, 2003).

3.3.3.2 Inoculación y multiplicación de la cepa matriz

En condicione asépticas, se procedió a inocular la cepa matriz obtenida en la fase anterior, con la ayuda de una espátula de metal, se tomó secciones de 0.5 cm² para inocularlas en la parte central de cada caja petri con medio de cultivo previamente esterilizado, luego se flameó el borde de cada caja y se selló de forma hermética con papel plástico. Se tuvo 5 medios de cultivo con 5 repeticiones, se incubaron a 25°C ± 1 en completa oscuridad.

3.3.3.3 Diseño experimental para la Fase II (Multiplicación de la cepa matriz)

Se utilizó un diseño completamente al azar tri factorial, con 5 repeticiones (Calzada, 1982).

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha_i\beta_j + \alpha_i\gamma_k + \beta_j\gamma_k + \alpha_i\beta_j\gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

X_{ijk}	= observación cualquiera	$\alpha_i\beta_j$	= interacción entre el factor A y B
μ	= media general	$\alpha_i\gamma_k$	= interacción entre el factor A y C
α_i	= efecto del i-ésimo factor A	$\beta_j\gamma_k$	= interacción entre el factor B y C
β_j	= efecto del j-ésimo factor B	$\alpha_i\beta_j\gamma_k$	= interacción entre el factor A, B y C
γ_k	= efecto del k-ésimo factor C	ϵ_{ijk}	= error experimental

Factores de estudio para la Fase II

Factor A: tipo de hongo

A_1 : Local (*Agaricus campestris*) A_2 : Comercial (*Agaricus bisporus*)

Factor B: procedencia del micelio

B_1 : Inóculo por segmentos de tejido B_2 : Inóculo esporal

Factor C: medios de cultivo

C_1 : Medio Em C_2 : Medio TSC C_3 : Medio de Czapek,
 C_4 : Medio S-M C_5 : Medio PSC

Variables de respuesta para la Fase II

a) Prendimiento del micelio en días (PMD): tiempo en días que tardó en prender y desarrollar las primeras hifas en los diferentes medios de cultivo.

b) Crecimiento radial del micelio en cm (CRM): el cálculo del crecimiento radial del micelio sobre la superficie de los diferentes medios de cultivo, se realizó marcando en el reverso de las cajas petri una cruz para indicar el centro donde se inóculo la cepa

matriz, se identificó con un número y se marcó el radio, esto con la finalidad de sacar un promedio del crecimiento del micelio. Esta técnica tradicional es recomendada por Frech y Hebert (1980); citada por Noruby *et al.*, (2005).

c) Tiempo de cobertura superficial (TCS): tiempo en días, que tardó el micelio en cubrir la superficie de la caja petri que contenía el medio de cultivo previamente esterilizado.

d) Biomasa del micelio (BM): se calentó el medio de cultivo a una temperatura de 60°C para disolver la carragenina, realizando diversos enjuagues con agua destilada caliente para separar el medio de cultivo del micelio, lo que resultó bastante práctico en la determinación de la biomasa, las muestras se colocaron en papel filtro previamente pesado y se llevaron a secarse a una estufa a 70°C hasta obtener peso constante.

e) Porcentaje de contaminación (PC): para la Fase II no se observó ningún tipo de contaminación, por lo tanto esta variable no fue evaluada.

3.3.4 Fase III: Obtención de la semilla, blanco o “spawn”

Se realizó la comparación del efecto de cuatro sustratos para la obtención de la semilla o “spawn” se utilizó sorgo (*Sorghum vulgare*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*). El procedimiento utilizado para esta fase esta dividido por etapas, las cuales se describen a continuación:

Etap 1 (E-1): cada cereal se pesó y remojó por separado en agua por espacio de 24 hr, luego se realizó una precocción del sustrato por 15 minutos aprox., para luego escurrir y dejar orear por 30 minutos. Se mezcló individualmente el cereal con yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 2 % y cal (CaCO_3) al 0.7 %, (en base al peso seco), luego se procedió a distribuirlos en frascos de vidrio de 500 ml hasta llenar 2/3 del envase, y esterilizarlos por espacio de 45 minutos.

Etap 2 (E-2): una vez esterilizado el sustrato en condiciones asépticas se procedió a remover los sellos de los frascos, con la ayuda de una espátula de metal se inóculo la cepa procedente de los diferentes medios de cultivo al cereal, luego se flameó los bordes del frasco para sellarlos nuevamente, los frascos fueron llevados a la incubadora

a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ en completa oscuridad. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

Etapa 3 (E-3): se realizaron evaluaciones constantes hasta que el micelio inoculado prendió al sustrato, luego las mismas se realizaron cada 4 días, donde se midió el crecimiento del micelio en el sustrato en centímetros. Esta etapa es necesaria, para simplificar la siembra posterior del micelio sobre el sustrato definitivo (compost). En cada etapa se tomaron muestras de 100 g para realizar pruebas de humedad, de esta forma se obtuvo un mayor control en el procedimiento para la obtención de la semilla. Las muestras fueron colocadas en sobres de papel sabana y se tomó el peso de cada una de ellas antes y después de llevarlas a la mufla a 70°C hasta obtener peso constante.

3.3.4.1 Diseño experimental para la Fase III (Obtención de la semilla, blanco o “spawn”)

Se utilizó un diseño completamente al azar tri factorial, con 10 repeticiones (Calzada, 1982).

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha_i\beta_j + \alpha_i\gamma_k + \beta_j\gamma_k + \alpha_i\beta_j\gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

X_{ijk}	= observación cualquiera	$\alpha_i\beta_j$	= interacción entre el factor A y B
μ	= media general	$\alpha_i\gamma_k$	= interacción entre el factor A y C
α_i	= efecto del i-ésimo factor A	$\beta_j\gamma_k$	= interacción entre el factor B y C
β_j	= efecto del j-ésimo factor B	$\alpha_i\beta_j\gamma_k$	= interacción entre el factor A, B y C
γ_k	= efecto del k-ésimo factor C	ϵ_{ijk}	= error experimental

Factores de estudio para la Fase III

Factor A: tipo de hongo

A_1 : Local (*Agaricus campestris*)

A_2 : Comercial (*Agaricus bisporus*)

Factor B: procedencia del micelio

B₁: Micelio por esporas

B₂: Micelio por segmentos de tejido

Factor C: medios de inoculación

C1: Sorgo (*Sorghum vulgare*)

C2: Cebada (*Hordeum vulgare*)

C3: Avena (*Avena sativa*)

C4: Trigo (*Triticum aestivum*)

Variables de respuesta para la Fase III

a) Días al prendimiento del inóculo (DPI): tiempo en días en que tardo en desarrollar y prender la cepa inoculada en el sustrato (cereal).

b) Crecimiento longitudinal en cm² (CL): se evaluó el desarrollo de la cepa sobre la superficie del frasco en cm².

c) Tiempo de invasión en días (TID): tiempo en días que tardo en invadir la cepa el sustrato.

d) Biomasa del micelio (BM): esta variable de respuesta se obtuvo realizando una resta, donde BM es igual a PFCi (Peso final del cereal inoculado), PICi (Peso Inicial del Cereal inoculado). Esta variable de respuesta no pudo ser evaluada, ya que al final del experimento no se registró incremento en el PICi, porque se tuvo pérdida de humedad en el sustrato, es por esta razón que no se pudo sacar resultados de la biomasa desarrolla en el sustrato (cereal).

e) Porcentaje de contaminación (PC): para la Fase III no se observó ningún tipo de contaminación, por lo tanto esta variable no fue evaluada.

3.3.5 Análisis económico

Se realizó un análisis de costos parciales de producción en laboratorio, sobre la reproducción de micelio y la obtención de semillas de champiñón, estos valores se derivaron de acuerdo a las recomendaciones de CIMMYT, (1988).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Variables de respuesta estudiadas para la Fase II: Multiplicación

Aplicando el método y procedimientos experimentales descritos anteriormente, en la procedencia del micelio de dos hongos (*Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*) derivado de esporas y segmentos de tejido en diferentes medios de cultivo, los cuales fueron evaluados estadísticamente. Las variables estudiadas son: Prendimiento del micelio en días (PMD), Crecimiento radial del micelio en cm (CRM), Tiempo de cobertura superficial (TCS), Biomasa del micelio (BM).

4.1.1 Prendimiento del micelio en días (PMD)

El Cuadro 4, de análisis de varianza para el prendimiento del micelio en días (PMD), se determinaron efectos altamente significativos ($P < 0.01$), el coeficiente de variación es 12.80, indica que los datos cumplen con los requerimientos y se encuentran dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 4. Análisis de varianza para prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	22,09	22,09	77,51	0.0001	**
Procedencia del micelio (B)	1	39,69	39,69	139,26	0.0001	**
A*B	1	13,69	13,69	48,04	0.0001	**
Medio de Cultivo (C)	4	586,06	146,52	514,09	0.0001	**
A*C	4	185,86	46,47	163,04	0.0001	**
B*C	4	39,86	9,97	34,96	0.0001	**
A*B*C	4	10,06	2,51	8,82	---	---
Error	80	22,80	0,29			
Total	99	920,11				

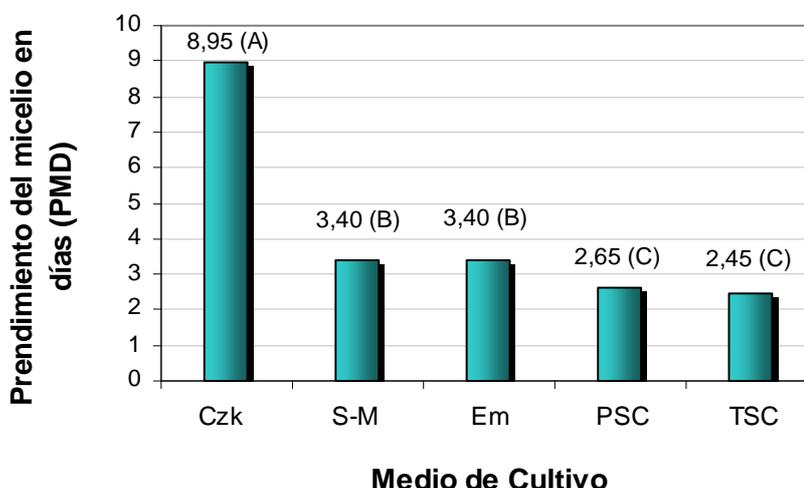
CV = 12.80

** Significativo al nivel de 1 %

En el análisis de varianza se observa efectos altamente significativos para los tres factores de estudio, tipo de hongo (A), procedencia del micelio (B) y medio de cultivo (C); incluyendo las interacciones A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio), A*C (tipo de hongo*medio de cultivo), B*C (procedencia del micelio*medio de cultivo).

4.1.1.1 Medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

En la Figura 3, de la prueba de Duncan se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) en el PMD, se evaluaron 5 medios de cultivo, estos fueron Czk, S-M, Em, PSC y TSC. Se puede apreciar que se constituyen 3 grupos de los cuales el formado por TSC y PSC son los más eficientes al presentar los menores tiempos de prendimiento con 2.45 y 2.65 días, estos son promedios significativamente superiores frente a, Em y S-M ambos con 3.40 días, en tanto que el medio Czk con 8.95 días no reportó significancia, por que el promedio de PMD fue el más alto.



Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); Em (Extracto de malta); PSC (Papa); TSC (Triguillo)

Figura 3. Comparación de medias para medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

Hurtado *et al.* (1994), menciona que el desarrollo *in vitro* esta determinado por los componentes del medio de cultivo, estos comprenden sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes o de soporte, al respecto Madigan (2003); citado por Carrillo (2003), indica que estos microorganismos de laboratorio son heterotróficos, es decir necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno asimilable, así como sales minerales. Estos elementos que componen el medio nutritivo son determinantes para disminuir el periodo de adaptación del microorganismo a las condiciones que es expuesto. Cerito y Alonso (2006), mencionan que el medio Czk es

utilizado para la identificación y descripción completa de microorganismos para estudiar sus características con fines comparativos. bioMerieux (2008), señala que los medios complejos o de composición indefinida como TSC, PSC, Em y S-M contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa. Pero aportan las sustancias fundamentales para el cultivo, ya que son nutrientes sintetizados y fácilmente asimilables en comparación al medio Czka que reportó el promedio más alto para PMD, por que la actividad catabólica fue más lenta.

Al respecto Carrillo (2003), Cruz y Hermosilla (2008) indican que se tiene una fase de latencia, por lo tanto no hay crecimiento visible y de hecho puede haber una reducción en el número de microorganismos, este es un periodo de adaptación, con alta actividad metabólica. Esta fase de latencia esta representada por el PMD, en ella no se verifica un crecimiento de las hifas pero si el tiempo que tarda en adaptarse al medio de cultivo.

4.1.1.2 Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el prendimiento del micelio en días (PMD)

En el Cuadro 5, de análisis de varianza de contrastes ortogonales en el PMD, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para la comparación 1 (C1 - Czka - todos), esto se debe a que obtuvo el promedio más elevado para PMD, en comparación a los otros tratamientos, al ser un medio utilizado para la identificación y descripción de microorganismos (Cerito y Alonso, 2006). En la comparación 2 (C2 - PSC - TSC), no se aprecian diferencias significativas pero si se observan diferencias estadísticas en el PMD en la prueba de Duncan (figura 3), esto se debe a que ambos aportan independientemente al medio de cultivo 18% de almidón aprox. (Encarta, 2006), en el caso de PSC 2.2% de proteína y 15.3% de proteína asimilable de fácil acceso para los microorganismos en TSC (Raimondi y Giaccio, 2002).

Cuadro 5. Contrastes ortogonales en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 (Czk - todos)	1	571,21	571,21	2004,25	0,0001	**
C2 (PSC - TSC)	1	0,40	0,40	1,40	0,2396	ns
C3 (S-M - Em)	1	0,00	0,00	0,00	1,0000	ns
C4 (PSC/TSC-Em/S-M)	1	14,45	14,45	50,70	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En la comparación 3 (C3 - S-M - Em), no se aprecian diferencias significativas pero si diferencias estadísticas en los promedios de PMD de la prueba de Duncan, Carrillo (2003), indica que estos medios de cultivo al estar compuestos de levadura de cerveza y extracto de malta respectivamente, se los considera como fuente de nitrógeno reducido, Stanier *et al.* (1996), menciona que al administrar este elemento en forma reducida su asimilación es inmediata. Por último en la comparación 4 (C4 - PSC/TSC-Em/S-M), se encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), en el caso de PSC/TSC aportan como fuente de carbono sacarosa de asimilación inmediata mientras que Em/S-M aportan nitrógeno reducido, debido a la alta actividad metabólica que se tiene en esta fase, la sacarosa es consumida de forma inmediata por el microorganismo, el nitrógeno empieza a ser asimilado cuando el inóculo se fija al medio de cultivo y lo utiliza para la síntesis de ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular y empezar su crecimiento.

4.1.1.3 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD)

El Cuadro 6, de análisis de la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD), se pueden apreciar diferencias significativas ($P < 0.01$) para *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* en la procedencia del micelio y el factor tipo de hongo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido, pero no así para tipo de hongo en procedencia del micelio por esporas.

Cuadro 6. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	F	P > F	Sig.
Proced. del micelio en <i>A.cam.</i>	1	50,00	50,00	175,44	0,000	**
Proced. del micelio en <i>A.bisp.</i>	1	3,38	3,38	11,86	0,001	**
Error	80	22,80	0,29			

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En el Cuadro 6 y la Figura 4, se observa que existe dependencia del factor obtención del micelio para tipo de hongo, lo que indica que existen diferencias altamente significativas en el PMD. Para tipo de hongo, *Agaricus bisporus* demostró los mejores promedios en el PMD para la obtención de micelio por segmentos de tejido y esporas con 3.96 y 3.44 días al ser menores que *Agaricus campestris* que obtuvo los mayores promedios con 5.64 y 3.64 días respectivamente.

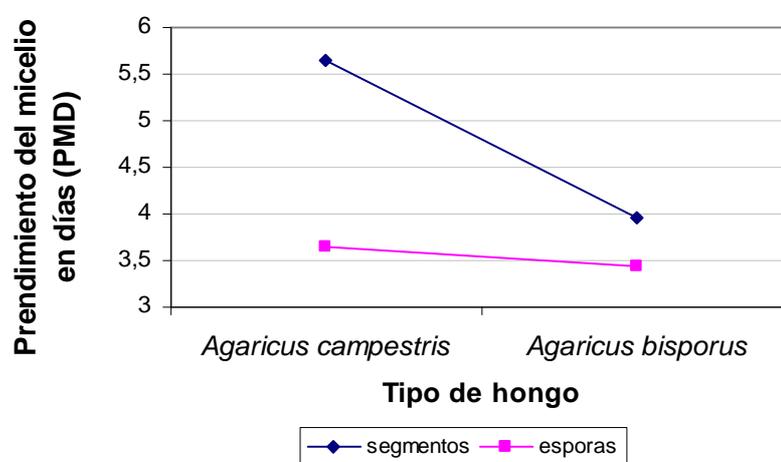
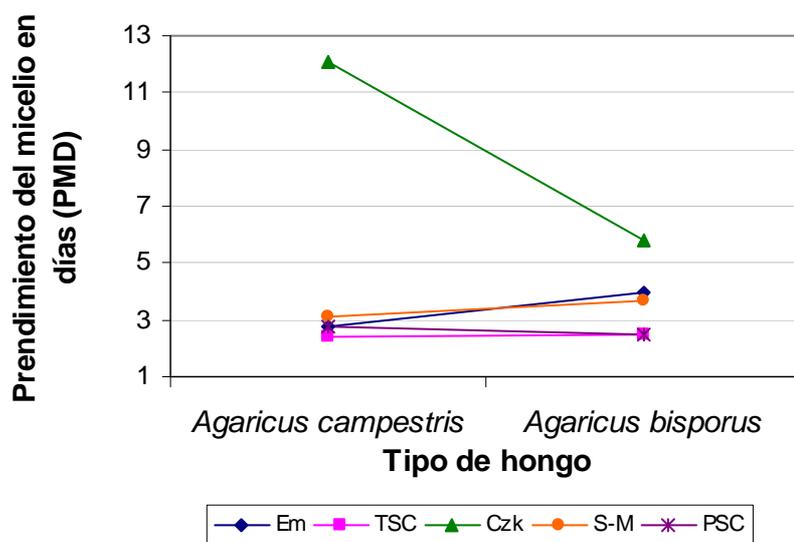


Figura 4. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el prendimiento del micelio en días (PMD)

Al respecto Buswell y Col. (1993); citado por Mata y Savoie (2007), mencionan que la capacidad de un hongo para crecer está relacionada con el vigor micelial al igual que la capacidad de activar mecanismos fisiológicos necesarios para aprovechar adecuadamente el medio nutritivo.

4.1.1.4 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

En el Anexo 2 y la Figura 5, del análisis de la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el PMD, se pueden apreciar diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para el factor tipo de hongo en los siguientes medio de cultivo: Em, Cz k y para S-M al 5% de significancia, pero no se observan diferencias para TSC y PSC.



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Cz k (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 5. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

La Figura 5, indica que existe dependencia del factor medio de cultivo en el tipo de hongo utilizado, demostrando que se tienen diferencias significativas para el PMD. *Agaricus campestris* obtuvo los mayores promedios en el PMD en comparación al otro hongo. El medio Cz k presentó la fase de latencia más larga con 12.1 días, demostrando un retraso significativo en el PMD, en comparación con S-M (3.1 días), Em y PSC ambos con 2.8 días, mientras que TSC mostró el mejor promedio con 2.4 días, superior al resto por presentar el menor tiempo en el PMD, por que presenta 15.3% de proteína asimilable (aprox.), de fácil acceso para los microorganismo (Raimondi y Giaccio, 2002). *Agaricus bisporus* demostró los menores promedios en el PMD para

medio de cultivo, pero dentro de estos los mayores promedios para esta variable fueron Czk, S-M y Em con 5.8, 4.0, 3.7 días respectivamente, en comparación a PSC y TSC ambos con 2.5 días significativamente diferentes al resto, al tener un PMD menor.

En el Cuadro 7, de contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el PMD se observan efectos significativos en la comparación 1 (C1) - *A.camp.*(Czk-todos), porque presentó el mayor promedio, exponiendo la demora en el PMD, la comparación 2 (C2) - *A.camp.*(PSC-TSC) y 3 – (C3) - *A.camp.*(SM-Em) no mostraron significancia alguna porque presentaron promedios similares, pero al realizar la comparación de C2 y C3 en C4 - *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM), se presenta diferencias significativas, esto probablemente se debe a la adaptación y asimilación de los nutrientes en el medio de cultivo por parte del hongo, en el caso de Czk esta compuesto de sales inorgánicas, mientras que TSC, PSC, Em y S-M son medios enriquecidos con extractos naturales que aportan diversas fuentes de carbono de asimilación inmediata.

Cuadro 7. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - <i>A.camp.</i> (Czk-todos)	1	695,65	695,65	2440,86	0,0001	**
C2 - <i>A.camp.</i> (PSC-TSC)	1	0,80	0,80	2,81	0,0978	ns
C3 - <i>A.camp.</i> (SM-Em)	1	0,45	0,45	1,58	0,2126	ns
C4 - <i>A.camp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	1,23	1,23	4,30	0,0414	*
C5 - <i>A. bisp.</i> (Czk-todos)	1	55,13	55,13	193,42	0,0001	**
C6 - <i>A. bisp.</i> (PSC-TSC)	1	0,00	0,00	0,00	1,0000	ns
C7 - <i>A. bisp.</i> (SM-Em)	1	0,45	0,45	1,58	0,2126	ns
C8 - <i>A. bisp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	18,23	18,23	63,95	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

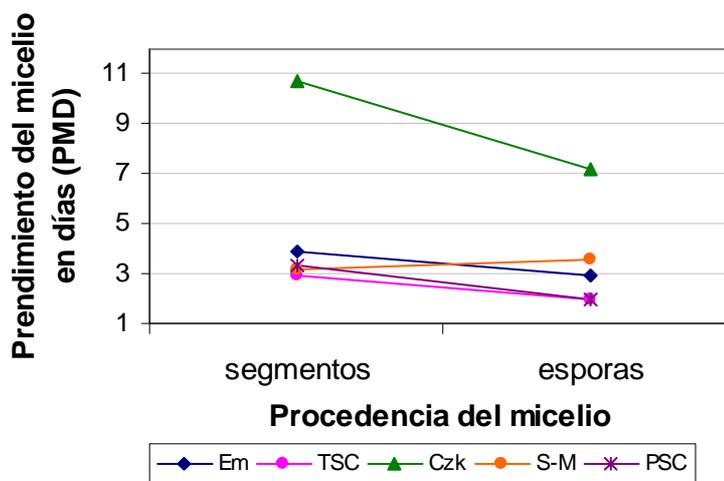
ns No significativo

En la comparación 5 (C5) - *A. bisp.*(Czk-todos), se observan efectos significativos porque presentó el promedio mas elevado, indicando un retraso en el PMD, las comparaciones 6 y 7, (C6) - *A. bisp.*(psc-tsc) – (C7) - *A. bisp.*(sm-em) no mostraron significancia alguna porque presentaron promedios similares en el PMD, pero la

comparación 8 (C8) - *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) presentó efectos significativos por que Em/SM demoró mas en el PMD en comparación a PSC/TSC. Esto se debe principalmente a la disposición y la capacidad de asimilación de los nutrientes presentes en los medios de cultivo por parte del hongo.

4.1.1.5 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

En el Anexo 3 y la Figura 6, del análisis de la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el PMD, se pueden apreciar diferencias significativas ($P < 0.01$) para el factor medio de cultivo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas, al igual que para el factor procedencia del micelio en Em, TSC, Czk y PSC; pero no se observa diferencias significativas para S-M.



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 6. Interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

La Figura 6, demuestra que se tiene dependencia del factor medio de cultivo en la procedencia del micelio, exponiendo diferencias significativas para el PMD. La procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas mostró un comportamiento similar para este factor, el medio CzK obtuvo el mayor promedio con 10.7 días, donde se puede ver claramente un retardado PMD en comparación con Em (3.9 días), S-M y PSC ambos con 3.2 días, y por último TSC con 2.9 días con el promedio mas significativo, al presentar el menor tiempo en el PMD. Mientras que en la procedencia del micelio por esporas expuso los menores promedios, esto nos indica que el PMD fue mas rápido en comparación al cultivo de segmentos de tejido, el medio CzK presentó el mayor promedio con 7.2 días, S-M con 3.6 días y Em con 2.9 días; PSC y TSC ambos exhibieron los menores promedios con 2.5 días, significativamente superiores al resto ya que el PMD fue en menor tiempo reduciendo la fase de latencia.

En el Cuadro 8 de contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el PMD se observan efectos significativos en la comparación 1 (C1) - Seg. tej. (CzK-todos), porque presentó el mayor promedio, exhibiendo la tardanza en el PMD, la comparación 2 (C2) - A.camp.(PSC-TSC) no mostró significancia por que ambos medios presentan como fuente de carbono sacarosa de asimilación inmediata, en la comparación 3 (C3) - Seg. tej. (SM-Em) se denota significancia por que S-M tiene como fuente de carbono miel (solución sobre saturada de azúcares) en comparación a Em con dos fuentes de carbono (sacarosa y glucosa). En la comparación 4 (C4) - Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a las fuentes de carbono que componen el medio de cultivo, en el caso de PSC/TSC la asimilación es inmediata favoreciendo el PMD en menor tiempo en comparación a Em/SM por que el hongo debe generar diferentes exoenzimas para favorecer el metabolismo lo que retarda el PMD y alarga la fase de latencia.

Cuadro 8. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - Seg. tej.(Czk-todos)	1	435,13	435,13	1526,75	0,0001	**
C2 - Seg. tej.(PSC-TSC)	1	0,80	0,80	2,81	0,0978	ns
C3 - Seg. tej.(SM-Em)	1	2,45	2,45	8,60	0,0044	**
C4 - Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM)	1	2,03	2,03	7,11	0,0093	**
C5 - Esp.(Czk-todos)	1	167,45	167,45	587,53	0,0001	**
C6 - Esp.(PSC-TSC)	1	0,00	0,00	0,00	1,0000	ns
C7 - Esp.(SM-Em)	1	2,45	2,45	8,60	0,0044	**
C8 - Esp.(PSC/TSC-Em/SM)	1	15,63	15,63	54,82	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En la comparación 5 (C5) - Esp.(Czk-todos), se observan efectos significativos porque presentó el promedio mas elevado, esto indicando un mayor tiempo en el PMD, la comparación 6 (C6) - *A. bisp.*(PSC-TSC) no mostraron diferencias significativas porque los promedios de PMD fueron similares, en la comparación 7 (C7) -Esp.(SM-Em) se aprecian efectos significativas, en la comparación 8 (C8) - *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a la capacidad de absorción y asimilación de los nutrientes presentes en los medios de cultivo por parte del inóculo esporal que exhibió mayor capacidad de adaptación, demostrando un menor tiempo de PMD.

4.1.1.6 Análisis de regresión lineal para el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) en función al prendimiento del micelio en días (PMD)

Se realizó el análisis de regresión lineal considerando el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) como la variable dependiente (Y) y el prendimiento del micelio en días (PMD) como la variable independiente (X).

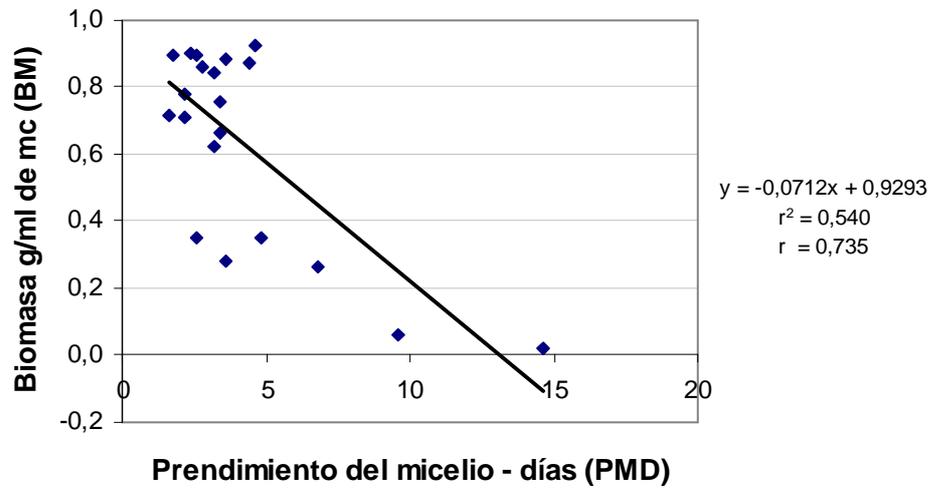


Figura 7. Línea de tendencia lineal del rendimiento de BM en función de PMD

De acuerdo a la Figura 7, se aprecia que cuanto más demore el prendimiento del micelio (fase de latencia) existe una reducción en el rendimiento de 0.0712 g por cada día que tarda el prendimiento, de modo que cuando termina la fase de latencia en el día 5 se produce un mayor rendimiento de BM al finalizar la fase exponencial, y a medida que la fase de latencia se prolonga se produce un decremento en el rendimiento, porque el desarrollo micelial es limitado, influyendo en la producción de BM. Para determinar si estos cambios en el rendimiento de BM son significativos debido al PMD se estudia el análisis de varianza.

Cuadro 9. Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa (Y) en función del prendimiento del micelio en días (X)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Signif.
Regresión	1	0,91	0,91	21,13	0,0002	**
Residual	18	0,77	0,04			
Total	19	1,68	0,09			

Coefficiente de correlación $r = 0,735$

Coefficiente de determinación $r^2 = 0,54\%$

El coeficiente de correlación, indica una fuerte asociación lineal positiva entre el prendimiento del micelio en días y el rendimiento de biomasa ($r = 0,735$), el signo positivo de este coeficiente significa que a medida que la fase de latencia disminuye en tiempo se tendrá un incremento en el rendimiento de BM, en tanto que el coeficiente de determinación ($r^2 = 0,54 \%$), indica que el modelo de regresión explica el 54 % de la variación en el rendimiento de BM por efecto de la variación en el prendimiento del micelio en días. De acuerdo al análisis de varianza se observa que el coeficiente de regresión presenta alta significancia ($P < 0.01$), esto quiere decir que mientras menor sea la fase de latencia en el PMD se producirá un cambio significativo en el rendimiento de BM.

Cuadro 10. Estadísticas del modelo de regresión lineal

	Coeficiente	Error Estándar	t c	P	Signif.
Intercepción (a)	0,9293	0,0795	11,6919	0,0000	*
PMD (X)	-0,0712	0,0155	-4,5970	0,0002	*

El intercepto y la variable independiente que forman parte del modelo de regresión son significativos según la estadística t de Student ($P < 0.05$), lo que indica que ambos términos contribuyen significativamente en la construcción del modelo.

4.1.2 Crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

En el Cuadro 11, de análisis de varianza para crecimiento radial del micelio en cm (CRM), se determinaron efectos significativos. El coeficiente de variación es de 13.76 indica que los datos son aceptables y están dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 11. Análisis de varianza para crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	31,01	31,01	268,52	0,0001	**
Procedencia del micelio (B)	1	1,07	1,07	9,29	0,0031	**
A*B	1	1,99	1,99	17,24	0,0001	**
Medio de Cultivo (C)	4	19,31	4,83	41,80	0,0001	**
A*C	4	1,29	0,32	2,80	0,0315	*
B*C	4	7,14	1,79	15,46	0,0001	**
A*B*C	4	8,50	2,13	18,40	---	---
Error	80	9,24	0,12			
Total	99	79,56				

CV = 13.76

** Significativo al nivel de 1 %

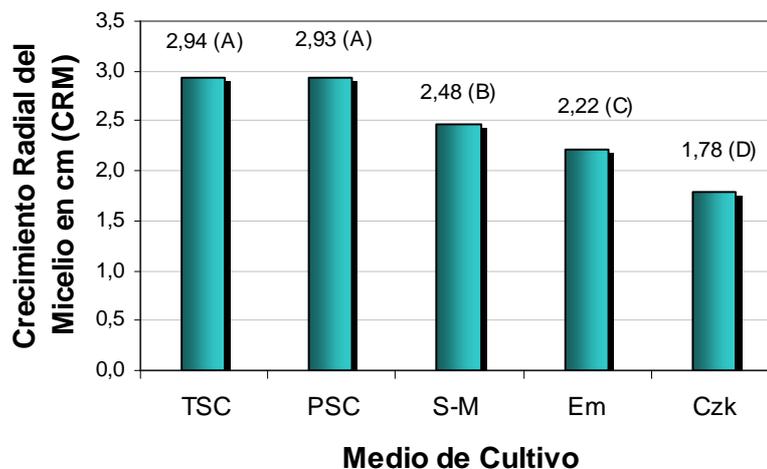
* Significativo al nivel de 5 %

En el análisis de varianza se observan efectos altamente significativos ($P < 0.01$) para los tres factores de estudio, tipo de hongo (A), obtención del micelio (B) y medio de cultivo (C); incluyendo las interacciones A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio), B*C (procedencia del micelio*medio de cultivo) y efectos significativos ($P < 0.05$) para la interacción A*C (tipo de hongo*medio de cultivo).

Carrillo (2003), Cruz y Hermosilla (2008), mencionan que después de haber sembrado los microorganismos en un medio óptimo comienzan a dividirse en forma constante, el número aumenta en progresión geométrica y la resultante es una línea recta ascendente, esta progresión terminará debido a la disminución de los nutrientes disponibles. Esta fase de crecimiento exponencial está representada por el CRM.

4.1.2.1 Medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

En la Figura 8, de la prueba de Duncan se aprecia diferencias significativas ($P < 0.05$) para medio de cultivo, se establecieron 4 grupos, el primero el formado por TSC - PSC con 2.94 y 2.93 cm de radio micelial presentando promedios significativamente superiores al resto, mientras que S-M forma el segundo grupo con 2.48 cm y el tercer grupo Em con 2.22 cm. En tanto que CzK no mostró significancia porque alcanzó el desarrollo mas bajo, con 1.78 cm comparado con los demás tratamientos, formando el cuarto grupo.



TSC (Triguillo); **PSC** (Papa); **S-M** (Sabouraud-miel); **Em** (Extracto de malta); **Czk** (Cazapek: sales inorgánicas)

Figura 8. Comparación de medias para medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el efecto medio de cultivo para CRM, SEDI/OEA (s.f.), indica que los medios complejos son aquellos que en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal, pero son químicamente indefinidas y de constitución variable, dentro de esta categoría están los medios TSC y PSC que presentaron un desarrollo micelial superior al resto por que aportan sustancias nutritivas fácilmente asimilables, estos medios tienen como única fuente de carbono sacarosa al 3% (p/v), favoreciendo el crecimiento, metabolismo y estructura del microorganismos, ambos medios nutritivos desarrollaron un micelio espeso y compacto de aspecto vigoroso en toda la superficie del medio de cultivo al igual que en Em, pero algunos sectores del micelio conformado en este medio se tornaron café al terminar las evaluaciones, al respecto Stanier *et al.* (1996) y Valeska *et al.* (2007), indican que el uso de extracto de malta de cebada en el medio de cultivo provoca la maduración acelerada del tejido y en algunos casos el final o muerte del microorganismo.

Mientras que el medio de cultivo S-M lleva como fuente de carbono miel de abeja 8% (p/v), esta es una solución sobresaturada de azúcares (fructuosa, sacarosa, glucosa y maltosa), en tanto que en Em se utilizó glucosa al 2% (p/v) y sacarosa 0.5% (p/v), Roussos y Perraud-Gaime (1996), indican que la sacarosa favorece el crecimiento

micelial ya que es una fuente de carbono más asimilable, mientras que la glucosa es degradada cuando la sacarosa se agota y provoca la síntesis de enzimas, estos cambios en el metabolismo del hongo son una respuesta al efecto del medio de cultivo que puede retardar el crecimiento, por lo tanto se puede afirmar que este efecto incide en el CRM. El micelio desarrollado por S-M presentó un aspecto denso y tupido en algunos sectores del medio, mientras que en otros era delgado y tenue, no exteriorizaba una apariencia homogénea en toda la superficie del medio de cultivo.

Pellizzari (2004), comenta que los elementos esenciales para el cultivo de hongos son: C, H, O, S, N, P, K, Mg, Fe, etc. Al respecto Crespo (1989), indica que estos influyen en el crecimiento y desarrollo normal del micelio, por ejemplo el nitrógeno actúa en la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos que intervienen en el crecimiento del micelio. UNN (2007), indica que el medio Czka se utiliza para cultivar bacterias y hongos que son capaces de utilizar nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno al respecto Vedder, 1996 menciona que los hongos del género *Agaricus* no asimilan los nitratos, esta puede ser la razón para que el CRM no sea significativo para el medio de cultivo Czka al presentar los promedios más bajos en comparación a TSC, PSC, S-M y Em. El medio Czka desarrolló un micelio tenue y delgado.

4.1.2.2 Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

El análisis de varianza (Cuadro 12) de la suma de cuadrados para contrastes ortogonales en el CRM, encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para la comparación 1 (C1 - Czka - todos), esto se debe a que obtuvo el promedio más bajo para CRM, en comparación a los otros tratamientos. El medio Czka está compuesto de sales inorgánicas, que son esenciales para la síntesis de aminoácidos, coenzimas y participan en el crecimiento micelial, K y Mg son incorporados en forma de sales como fosfatos y sulfatos, como fuente de nitrógeno se utilizó nitrato de sodio (NaNO_3). Vedder (1996), indica que este compuesto no puede ser asimilable por hongos del género *Agaricus*, por lo tanto esto influye en el desarrollo del micelio, retrasando la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular, que se

expresa en el CRM de forma limitada y se refleja en la morfología de la cepa. En la comparación 2 (C2 - PSC - TSC), no se aprecian diferencias significativas, porque estos medios de cultivo son de origen vegetal, por lo tanto incorporan al medio nutrientes que son absorbidos con facilidad por los microorganismos, presentando un desarrollo superior en comparación al resto de los tratamientos.

Cuadro 12. Contrastes ortogonales en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 (Czk - todos)	1	11,79	11,79	102,29	0,0001	**
C2 (PSC - TSC)	1	0,00	0,00	0,00	0,9593	ns
C3 (SM - Em)	1	0,64	0,64	5,55	0,0209	*
C4 (PSC/TSC-Em/SM)	1	6,86	6,86	59,54	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En la comparación 3 (C3 - SM - Em), se aprecian diferencias significativas ($P < 0.05$), porque ambos medios de cultivo están compuestos de extractos de origen vegetal que aportan nitrógeno reducido favoreciendo el crecimiento del micelio, la diferencia radica en la fuente de carbono que se utilizó. En la comparación 4 (C4 - PSC/TSC-Em/SM) se tiene diferencias altamente significativas, la divergencia esta en la fuente de carbono que se utiliza para la preparación de estos medios nutritivos.

4.1.2.3 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

El Cuadro 13, de análisis de la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM), se observa diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para procedencia del micelio en *Agaricus bisporus* y para el factor tipo de hongo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas, pero no así para procedencia del micelio en *Agaricus campestris*.

Cuadro 13. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	F	Prob > Fc	Signif.
Procedencia del micelio en <i>A.cam.</i>	1	0,07	0,07	0,61	0,439	ns
Procedencia del micelio en <i>A.bisp.</i>	1	3,00	3,00	25,94	0,000	**
Error	80	9,24	0,12			

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En el Cuadro 13 y la Figura 9, se observa que existe dependencia del factor tipo de hongo en la procedencia del micelio, lo que indica que se tiene diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para el CRM. La procedencia del micelio en *Agaricus campestris* para segmentos de tejido y esporas obtuvo promedios de 1.95 y 1.88 cm de crecimiento micelial en comparación a *Agaricus bisporus* con 2.78 y 3.76 cm denotando los mejores promedios en el CRM. Esto se debe a la adaptabilidad y desarrollo que presentaron las primera hifas en el PMD, lo que permitió alcanzar un radio micelial mayor en *Agaricus bisporus* en comparación a *Agaricus campestris*.

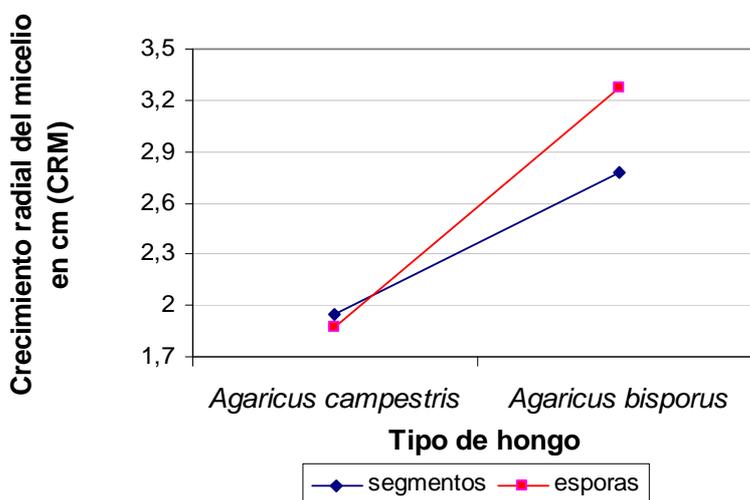
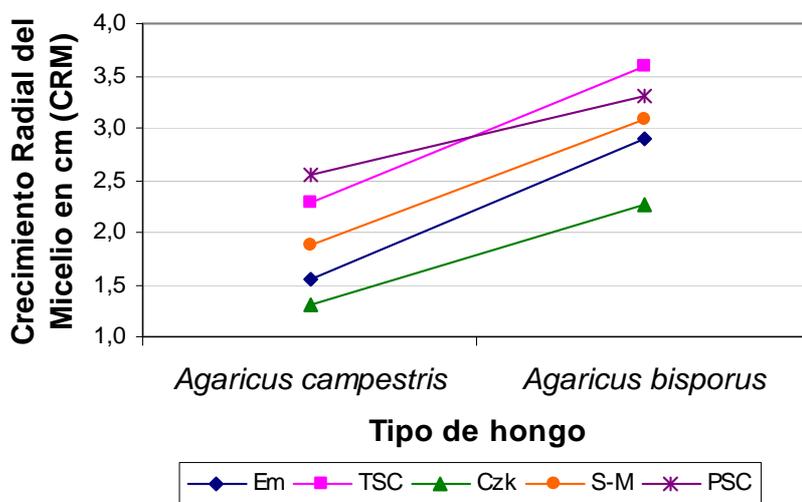


Figura 9. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

4.1.2.4 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

Como se puede apreciar en el Anexo 4 y la Figura 10, del análisis de la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el CRM, se observa diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para medio de cultivo en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*, al igual que el factor tipo de hongo en los medio de cultivo: Em, TSC, Czk, S-M y PSC. En el CRM se llevan a cabo varias reacciones químicas que definen el metabolismo del microorganismo, estas reacciones son realizadas por enzimas que son sustancias orgánicas especializadas compuestas por polímeros de aminoácidos, que actúan como catalizadores en el metabolismo que regulan la velocidad de muchas reacciones químicas implicadas en este proceso, que dependerá de cada organismo (Encarta, 2006).



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 10. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

La Figura 10 indica que existe dependencia del factor medio de cultivo en el tipo de hongo utilizado, demostrando que se tienen diferencias significativas para el CRM. *Agaricus campestris* expuso un desarrollo pobre en los promedios de CRM en

comparación al hongo comercial. Los medios de cultivo PSC y TSC con 2.56 – 2.28 cm de crecimiento micelial, con los mayores promedios, indicando la adaptación del hongo al medio nutritivo en comparación a S-M y Em con un desarrollo intermedio de 1.88 – 1.55 cm respectivamente, Czk por el contrario mostró el menor desarrollo micelial con 1.31 cm, el limitado desarrollo micelial que se tiene por parte del hongo local se debe a la poca adaptabilidad que presentó, porque esta fue la primera introducción del material de condiciones *in vivo* a condiciones *in vitro* (Anexo 1). En el caso de *Agaricus bisporus* expuso los mayores promedios en el crecimiento micelial para medio de cultivo, los medios nutritivos TSC, PSC y S-M denotaron los mayores promedios en el CRM con 3.60, 3.31 y 3.07 cm respectivamente, Em y Czk con 2.90 y 2.26 cm demostrando los menores promedios para el CRM, estos datos son similares a los reportados por García *et al.* (2006), en la caracterización de hongos ectomicorrízicos con el uso de extracto de malta con un crecimiento micelial de 21.90 ± 2.96 mm.

En el cuadro 14 de la prueba de contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el CRM se aprecia efectos significativos en la comparación 1 (C1) *A.camp.* (Czk-todos), porque presentó el menor promedio de CRM, la comparación 2 (C2) *A.camp.* (PSC-TSC) no muestra significancia alguna porque ambos medios de cultivo alcanzaron promedios similares de desarrollo micelial, en la comparación 3 (C3) *A.camp.*(SM-Em) se observan diferencias significativas. En la comparación 4 (C4) *A.camp.*(PSC/TSC-Em/SM) se tiene diferencias altamente significativas, esto se debe esencialmente a la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo, en el caso de PSC/TSC presenta carbohidratos de asimilación inmediata que aportan energía favoreciendo el metabolismo de las células lo que provoca un desarrollo acelerado del micelio, para Em/SM el proceso es mas lento.

Al respecto Cruz y Hermosilla (2008), indican que el microorganismo debe generar exoenzimas que son sintetizadas al interior de la célula para ejercer su función son exportadas al espacio periplásmico, donde degradan las macromoléculas, las que por su tamaño no atraviesan las capas superficiales de la células, estas acciones anabólicas y catabólicas favorecen el metabolismo, pero al producirse tantas reacciones el microorganismo presenta un crecimiento pausado y limitado.

Cuadro 14. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - <i>A.camp.</i> (Czk-todos)	1	4,61	4,61	40,04	0,0001	**
C2 - <i>A.camp.</i> (PSC-TSC)	1	0,38	0,38	3,33	0,0718	ns
C3 - <i>A.camp.</i> (SM-Em)	1	0,53	0,53	4,64	0,0343	*
C4 - <i>A.camp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	4,96	4,96	43,00	0,0001	**
C5 - <i>A. bisp.</i> (Czk-todos)	1	7,33	7,33	63,61	0,0001	**
C6 - <i>A. bisp.</i> (PSC-TSC)	1	0,41	0,41	3,60	0,0614	ns
C7 - <i>A. bisp.</i> (SM-Em)	1	0,16	0,16	1,39	0,2419	ns
C8 - <i>A. bisp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	2,19	2,19	18,96	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %

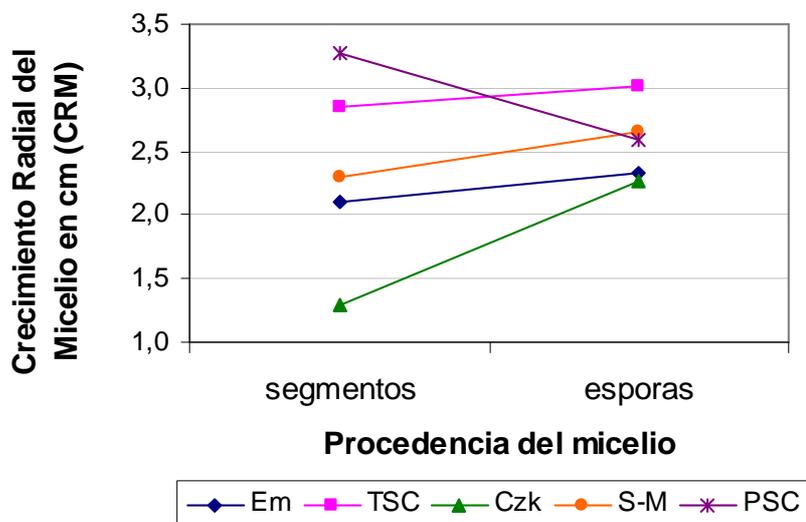
* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En la comparación 5 (C5) - *A. bisp.*(Czk-todos), se observa efectos significativos porque presentó los menores promedio en el CRM, las comparaciones 6 y 7, (C6) *A. bisp.*(PSC-TSC) – (C7) *A. bisp.*(S-M-Em) no mostraron significancia porque presentaron promedios de crecimiento micelial similares, la comparación 8 (C8) *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) presentó efectos significativos, porque el hongo absorbe los nutrientes a través de las paredes y membranas de las hifas, las moléculas resultantes de la digestión externa, internamente son utilizadas para el crecimiento del micelio, se ha definido a los hongos como heterótrofos por absorción (Costas, 2007).

4.1.2.5 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

En el Anexo 5 y la Figura 11, del análisis de la interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el CRM, se aprecia diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para medio de cultivo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas, al igual que para el factor procedencia del micelio en el medio de cultivo Czk y efectos significativos ($P < 0.05$) para S-M y PSC; pero no se observan diferencias significativas Em y TSC.



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 11. Interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

Se demuestra que se tiene dependencia del factor medio de cultivo en la procedencia del micelio, exponiendo diferencias significativas para el CRM. La procedencia del micelio por segmentos de tejido en el medio PSC presentó el mayor promedio con 3.28 cm seguido de TSC con 2.86 cm, mientras que los medios S-M – Em con un desarrollo intermedio de 2.30 y 2.11 cm de CRM, sin embargo el medio Czk obtuvo los menores promedios de desarrollo micelial con 1.30 cm.

Al respecto Sáez *et al.* (2004), indica que elaboró un medio de cultivo a partir del fruto del árbol de *Prosopis juliflora* como fuente nutricional, presentando un buen crecimiento cubriendo la totalidad de la caja petri, mayor al observado en el medio de control agar Sabouraud que obtuvo un desarrollo tenue y lento. Esto nos indica que la adición de complejos naturales al medio de cultivo favorece en gran medida el desarrollo de microorganismos heterotróficos. También se observa diferencias significativas para la procedencia del micelio por esporas el CRM exponiendo los mayores promedios, el medio TSC obtuvo un desarrollo significativamente superior con 3.02 cm, para S-M – PSC con 2.66 y 2.59 cm, los promedio más bajos fueron para Em - Czk con 2.34 y 2.27 cm significativamente inferiores al resto.

En el Cuadro 15, de contrastes ortogonales para la interacción obtención del micelio por medio de cultivo en el CRM se observan efectos significativos en la comparación 1 (C1) Seg. tej.(Czk-todos), porque presentó los menores promedios en el CRM, la comparación 2 (C2) *A.camp.*(PSC-TSC) mostró significancia por que ambos medios presentan como fuente de carbono sacarosa y almidón como sustancia de reserva, en el medio PSC el almidón fue asimilado de forma inmediata, pero en el caso de TSC al presentar lípidos en su estructura no se absorben con facilidad, expresando un menor CRM y demandando un mayor tiempo para cubrir la superficie de la caja petri. La comparación 3 (C3) Seg. tej.(SM-Em) no demuestra significancia por que ambos tienen promedios similares en el desarrollo micelial, en la comparación 4 (C4) Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a las fuentes de carbono que componen el medio de cultivo, en el caso de PSC/TSC la asimilación es inmediata reduciendo el tiempo de latencia para iniciar el crecimiento micelial en comparación a Em/SM por que el hongo debe realizar la biosíntesis de diferentes exoenzimas para favorecer el metabolismo, esta retardaría la fase de latencia y demarca el CRM.

Cuadro 15. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - Seg. tej.(Czk-todos)	1	14,31	14,31	2004,25	0,0001	**
C2 - Seg. tej.(PSC-TSC)	1	0,89	0,89	7,73	0,0068	**
C3 - Seg. tej.(SM-Em)	1	0,18	0,18	1,57	0,2144	ns
C4 - Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM)	1	7,52	7,52	65,22	0,0001	**
C5 - Esp.(Czk-todos)	1	1,15	1,15	9,98	0,0022	**
C6 - Esp.(PSC-TSC)	1	0,94	0,94	8,13	0,0055	**
C7 - Esp.(SM-Em)	1	0,50	0,50	4,33	0,0406	*
C8 - Esp.(PSC/TSC-Em/SM)	1	0,93	0,93	8,05	0,0058	**

** Significativo al nivel de 1 %
 * Significativo al nivel de 5 %
 ns No significativo

En la comparación 5 (C5) Esp.(Czk-todos), se pueden observar diferencias significativas porque el medio Czk presentó el menor desarrollo micelial en comparación al resto de los medios de cultivo evaluados, la comparación 6 (C6) *A. bisp.*(PSC-TSC)

muestra diferencias significativas para el CRM, ambos medios presentan como sustancia de reserva almidón, para PSC este nutriente fue asimilado con celeridad precipitando el crecimiento micelial, en el caso de TSC el almidón que aporta tiene en su composición lípidos de asimilación lenta que retrazan el crecimiento, pero se queda como fuente de reserva para que continúe su desarrollo, en la comparación 7 (C7) Esp.(SM-Em) se aprecian diferencias significativas ya que ambos medios utilizan diferentes fuentes de carbono incluyendo sacarosa, al respecto Peña *et al.* (2005), evaluó el crecimiento micelial de la cepa nativa del hongo *Polipora*, determinó que el hongo presentó mayor crecimiento cuando se empleo sacarosa como fuente de carbono en comparación a la glucosa. En la comparación 8 (C8) *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a la capacidad de adaptación, absorción y asimilación de los nutrientes presentes en los medios de cultivo por parte del inóculo demostrando un mayor promedio de CRM.

4.1.2.6 Análisis de regresión lineal para el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) en función al crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

Se realizó el análisis de regresión lineal considerando el rendimiento de biomasa del micelio g/ml de mc (BM) como la variable dependiente (Y) y el crecimiento radial del micelio en cm (CRM) como la variable independiente (X).

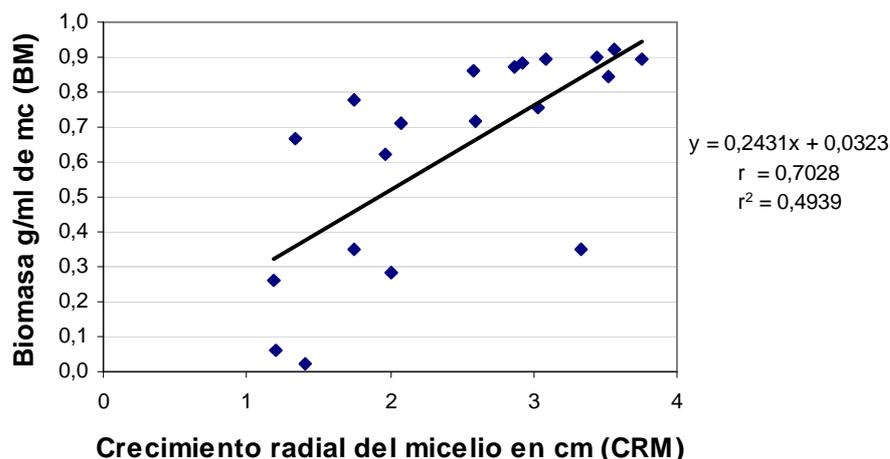


Figura 12. Línea de tendencia lineal del rendimiento de BM en función de CRM

En la Figura 12, se observa que a medida que aumenta el crecimiento micelial (fase de exponencial) existe un aumento en el rendimiento de BM de 0.2431g por cada cm que se expande el micelio, de modo que cuando termina la fase exponencial los tratamientos que alcanzaron un radio a partir de 2.58 cm tendrán un mayor incremento de BM en comparación a los demás tratamientos que no alcanzaron este radio y detuvieron su crecimiento al entrar a una fase estacionaria, al respecto Cruz y Hermosilla (2008), indican que la actividad metabólica reduce debido a la disminución de los nutrientes en el medio de cultivo por lo tanto los microorganismos dejan de multiplicarse reduciendo el crecimiento. A medida que el micelio se desarrolla sobre la superficie del medio de cultivo alcanzara un mayor radio, produciendo un incremento en el rendimiento de BM. Para determinar si estos cambios en el rendimiento de BM son significativos debido al CRM se realizó el análisis de varianza.

Cuadro 16. Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa (Y) en función del crecimiento radial del micelio en cm (X)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Regresión	1	0,83	0,83	17,57	0,0005	**
Residual	18	0,85	0,05			
Total	19	1,68	0,09			

Coefficiente de correlación $r = 0,7028$

Coefficiente de determinación $r^2 = 0,4939 \%$

El coeficiente de correlación indica una fuerte asociación lineal positiva entre el crecimiento radial del micelio en cm y el rendimiento de biomasa ($r = 0,7028$), el signo positivo de este coeficiente indica que cuanto mayor sea el crecimiento micelial se tendrá un incremento en el rendimiento de BM, en tanto que el coeficiente de determinación ($r^2 = 0,4939 \%$), indica que el modelo de regresión explica el 49.39% de la variación en el rendimiento de BM esta afectado por la variación del crecimiento radial del micelio en cm. De acuerdo al análisis de varianza se observa que el coeficiente de regresión presenta alta significancia ($P < 0.01$), esto quiere decir que mientras mayor sea el radio micelial producirá un cambio significativo en el rendimiento de BM.

Cuadro 17. Estadísticas del modelo de regresión lineal

	Coefficiente	Error Estándar	t c	P	Signif.
Intercepción (a)	0,9293	0,0795	11,6919	0,0000	*
PMD (X)	-0,0712	0,0155	-4,5970	0,0002	*

El intercepto y la variable independiente que forman parte del modelo de regresión son significativos según la estadística t de Student ($P < 0.05$), lo que indica que ambos términos contribuyen significativamente en la construcción del modelo.

4.1.3 Tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

En el Cuadro 18, de análisis de varianza para tiempo de cobertura superficial en días (TCS), se determinaron efectos altamente significativos, el coeficiente de variación es de 4.55% lo que demuestra que los datos son altamente confiables y se encuentran dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 18. Análisis de varianza para tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	723,61	723,61	442,57	0.0001	**
Procedencia del micelio (B)	1	146,41	146,41	89,55	0.0001	**
A*B	1	858,49	858,49	525,07	0.0001	**
Medio de Cultivo (C)	4	467,46	116,86	71,48	0.0001	**
A*C	4	518,74	129,69	79,32	0.0001	**
B*C	4	329,94	82,49	50,45	0.0001	**
A*B*C	4	313,86	78,47	47,99	---	---
Error	80	130,80	1,64			
Total	99	3489,31				

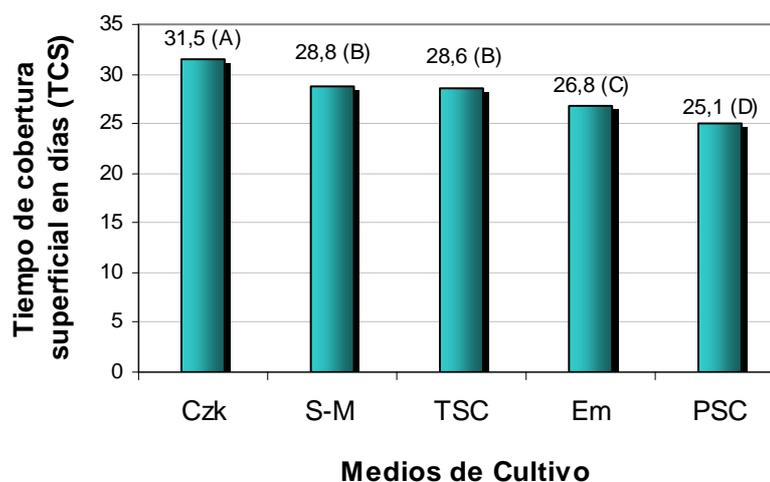
CV = 4.55

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En el análisis de varianza se observan efectos altamente significativos ($P < 0.01$) para tipo de hongo (A), procedencia del micelio (B) y medio de Cultivo (C); incluyendo todas las interacciones A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio), A*C (tipo de hongo*medio de cultivo) B*C (procedencia del micelio*medio de cultivo).

4.1.3.1 Medio de cultivo para tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

En la Figura 13, de la prueba de Duncan se aprecian diferencias significativas ($P < 0.05$) para medio de cultivo, Czk con 31.5 días exhibiendo el mayor tiempo, S-M y TSC con 28.8 – 28.6 días respectivamente no se aprecian diferencias significativas pero si diferencias estadísticas, Em con 26.8 días y PSC con 25.1 días con el menor tiempo de cobertura.



TSC (Triguillo); S-M (Sabouraud-miel); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); Em (Extracto de malta); PSC (Papa)

Figura 13. Comparación de medias para medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

El análisis de la prueba de Duncan para TCS en el efecto medio de cultivo, indica que el medio PSC mostró el mejor promedio por que el micelio cubrió la superficie del medio nutritivo en menor tiempo en comparación al resto de los tratamientos, esto se debe a la acción enzimática y la asimilación de nutrientes por parte de los microorganismos estudiados, el medio PSC aporta sacarosa, almidón y proteínas favoreciendo el desarrollo micelial, por que al degradarse y consumirse la sacarosa el almidón quedo como un polisacárido de reserva alimenticia, al producirse la hidrólisis constituyó la mayor parte de los carbohidratos digestibles para el consumo de forma inmediata, dando como resultado la aceleración del crecimiento micelial en menor tiempo.

Para Em se tiene la presencia de tres fuentes de carbono: sacarosa, glucosa y la adición de extracto de malta que es un disacárido formado por dos glucosas con un elevado contenido de hidratos de carbono favoreciendo el valor nutritivo del medio de cultivo. Mientras que TSC presentó los mejores promedios para PMD y CRM, pero demostró promedios intermedios en el TCS, esto se debe posiblemente a la composición del almidón aportado por el cereal (triguillo), los almidones de los cereales contienen pequeñas cantidades de lípidos que necesitan disolventes como el metanol-agua, para su extracción. Generalmente el nivel de lípidos que contiene el almidón de cereal está entre 0.5 y 1%, los almidones no cereales no contienen esencialmente lípidos (Encarta, 2006). Esto indica que su asimilación no es de forma directa y alargaría el TCS.

El medio S-M esta compuesto por extracto de levadura de cerveza y como única fuente de carbono presenta miel de abeja (compuesto de sacarosa 7%, maltosa 16%, glucosa 35% y fructuosa 42% aprox.), el crecimiento retardado que presentó el micelio con este medio de cultivo es por los cambios metabólicos que afronta a lo largo de la fase exponencial, cuando la sacarosa se consume totalmente provoca la síntesis de otras enzimas para la degradación de los otros compuestos retardando el crecimiento, otro factor importante ha destacar son sus propiedades antimicrobianas y antisépticas, al respecto Bianchi (1990), indica que la oxidación enzimática de la glucosa tiende a ser muy lenta en la miel no diluida y a velocidades mucho mas aceleradas a medida que ésta se diluye, por lo tanto se tiene una acumulación de peroxido de hidrógeno que le confieren propiedades terapéuticas, este podría ser otro factor que retardaría y limita el crecimiento micelial y alargaría el TCS. El medio Czk esta preparado en base a sales inorgánicas y sacarosa como fuente de carbono, Vedder (1996), mencionó que el genero *Agaricus* no asimila los nitratos, pero este medio aporta con sales de sulfato y fosfatos que favorecen e intervienen en el aumento de la cadena de RNA y la síntesis de aminoácidos de las células que influye de forma directa sobre el desarrollo y la velocidad de crecimiento del micelio.

4.1.3.2 Análisis de varianza para contrastes ortogonales en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

El análisis de varianza (Cuadro 19) de la suma de cuadrados para contrastes ortogonales en el TCS, encontró diferencias significativas ($P < 0.05$), para la comparación 1 (C1) - (Czk - todos), el medio Czk presentó el mayor TCS en comparación al resto de los tratamientos. En la comparación 2 (C2) - (PSC - TSC) se aprecian diferencias altamente significativas al ($P < 0.01$), porque ambos medios nutritivos (PSC-TSC), presentaron diferencias en el TCS, esto se debe a la disponibilidad de los nutrientes en el medio, en ambos casos tienen como única fuente de carbono sacarosa lo que determinó un PMD y CRM acelerado, pero al consumirse la sacarosa el micelio empezó la producción de enzimas para la degradación del almidón, en el caso de PSC fue fácilmente asimilado reduciendo el TCS, pero el almidón que presenta el medio TSC contiene lípidos que limitan su absorción y prolonga el TCS.

Cuadro 19. Contrastes ortogonales en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 (Czk - todos)	1	283,92	283,92	173,65	0,0001	**
C2 (PSC - TSC)	1	122,50	122,50	74,92	0,0001	**
C3 (S-M - Em)	1	42,03	42,03	25,70	0,0001	**
C4 (PSC/TSC-Em/SM)	1	19,01	19,01	11,63	0,0010	**

** Significativo al nivel de 1 %

En la comparación 3 (C3), se observan diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), esto se debe a que S-M obtuvo un TCS de 28.8 días en promedio en comparación a Em con 26.8 días, ambos medios contienen elementos que aportan al medio nutritivo nitrógeno reducido asimilable para la síntesis de aminoácidos y proteínas que influyen en el desarrollo del micelio, como fuentes de carbono, S-M lleva miel que al ser diluida precipita la degradación de la glucosa formando peróxidos que le confieren propiedades terapéuticas lo que limita el desarrollo y alarga el TCS. Al respecto Mato *et al.*; citado por Moguel *et al.* (2005), indica que el ácido glucónico es el más abundante y procede principalmente de la descomposición de la glucosa, debido a la acción de la enzima

glucosaoxidasa presente de manera natural en la miel, que produce la gluconolactona, que influye en la concentración de la acidez y de forma indirecta en el pH del medio volviéndolo más ácido, estas dos reacciones retrasarían el desarrollo micelial teniendo un mayor TCS. Mientras Em con dos fuentes de carbono el hongo tiene que producir enzimas para su asimilación, retrasando el metabolismo del micelio alargando el TCS.

4.1.3.3 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

El Cuadro 20, de análisis de la interacción tipo de hongo y procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS), se aprecia diferencias significativas ($P < 0.01$) para procedencia del micelio en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* y el factor tipo de hongo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido, pero no así para tipo de hongo en procedencia del micelio por esporas.

Cuadro 20. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Procedencia del micelio en <i>A.camp.</i>	1	856,98	856,98	524,1	0,000	**
Procedencia del micelio en <i>A.bisp.</i>	1	147,92	147,92	90,5	0,000	**
Error	80	130,8	1,64			

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En el Cuadro 20 y la Figura 14, se observa que existe dependencia del factor procedencia del micelio para tipos de hongo, lo que indica que existen diferencias altamente significativas para el TCS. Para tipo de hongo, *Agaricus campestris* obtuvo promedios de 34.96 y 26.68 para segmentos de tejido y esporas en el TCS, en *Agaricus bisporus* los promedios fueron 23.72 y 27.16 días.

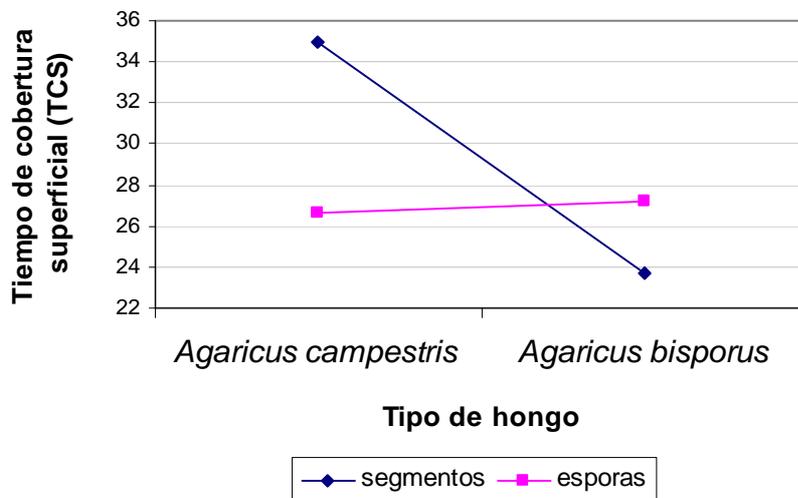
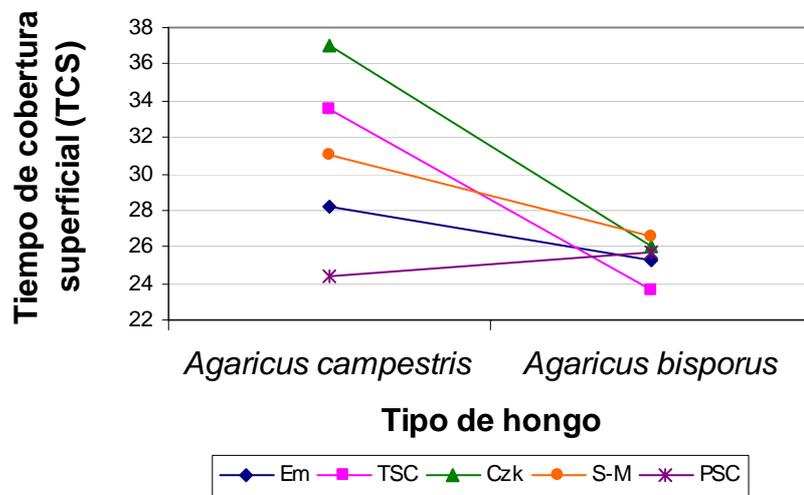


Figura 14. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

Esto se debe a que la reproducción vegetativa por fragmentación del micelio o sexualmente a través de las basidiosporas, en los cuales los núcleos son producto de la meiosis, generalmente no presentan diferencias en el TCS ya que pueden cumplir las mismas funciones para la formación de las primeras hifas hasta completar el desarrollo del micelio. Al respecto Callac (2007), menciona que el papel de las esporas no está todavía bien comprendido y el papel del micelio dicho “vegetativo” es probablemente subestimado porque potencialmente puede participar en la diseminación, la interfecundación y aún la recombinación conocida como somática.

4.1.3.4 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

Como se observa en el Anexo 6 y la Figura 15, del análisis de la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el TCS, se aprecian diferencias significativas ($P < 0.01$) para medio de cultivo en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*, al igual que el factor tipo de hongo en los siguientes medios de cultivo: Em, TSC, CzK, S-M y PSC.



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 15. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

La Figura 15, indica la dependencia del factor medio de cultivo en el tipo de hongo utilizado, demostrando que se tienen diferencias significativas para el TCS. *Agaricus campestris* obtuvo los mayores promedios en el TCS en comparación *Agaricus bisporus*. El medio Czk presentó el promedio más elevado con 37 días, TSC con 33.5, S-M - Em con 31 y 28.2 días, mientras que PSC mostró el mejor promedio con 24.4 días al presentar el menor tiempo. También se puede observar diferencias significativas para *Agaricus bisporus* demostrando un desarrollo acelerado disminuyendo el TCS en comparación al hongo local, los medios de cultivo S-M y Czk con 26.6 – 26 días respectivamente, PSC y Em con 25.7 – 25.3 y TSC con 23.6 días.

Estas diferencias se deben principalmente a la capacidad de adaptación y generación de exoenzimas por parte del microorganismo para poder captar los nutrientes necesarios. La bioquímica ha determinado la forma en que se entretajan algunas de las rutas anabólicas, pero muchos de los aspectos más complejos no se conocen, en esencia (Encarta, 2006). Estas vías utilizan la energía que se obtiene en las reacciones catalizadas por las exoenzimas y se orientan hacia la producción de compuestos finales específicos, que se utilizarán para el crecimiento y desarrollo del microorganismo.

En el Cuadro 21, de contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el TCS se observan efectos significativos ($P < 0.01$) en la comparación 1 (C1) - *A.camp.*(Czk-todos), porque Czk presentó el mayor promedio en el TCS, las comparaciones 2 y 3, (C2) *A.camp.*(TSC - PSC-) – (C3) - *A.camp.*(SM-Em) mostraron significancia porque presentaron tiempos de cobertura diferentes, esto se debe a la composición del medio de cultivo y al material genético. En la comparación 4 (C4) *A.camp.*(TSC/PSC-Em/SM) no se observan diferencias significativas, pero si mínimas diferencias estadísticas, TSC/PSC tienen un promedio de 28.95 días, Em/SM con 29.6 días, se puede observar que ambos grupos presentan promedios similares.

Cuadro 21. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo y medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - <i>A.camp.</i> (Czk-todos)	1	477,41	477,41	291,99	0,0001	**
C2 - <i>A.camp.</i> (PSC-TSC)	1	414,05	414,05	253,24	0,0001	**
C3 - <i>A.camp.</i> (SM-Em)	1	39,20	39,20	23,98	0,0001	**
C4 - <i>A.camp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	4,23	4,23	2,58	0,1119	ns
C5 - <i>A. bisp.</i> (Czk-todos)	1	3,92	3,92	2,40	0,1255	ns
C6 - <i>A. bisp.</i> (PSC-TSC)	1	22,05	22,05	13,49	0,0004	**
C7 - <i>A. bisp.</i> (SM-Em)	1	8,45	8,45	5,17	0,0257	*
C8 - <i>A. bisp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	16,90	16,90	10,34	0,0019	**

** Significativo al nivel de 1 %

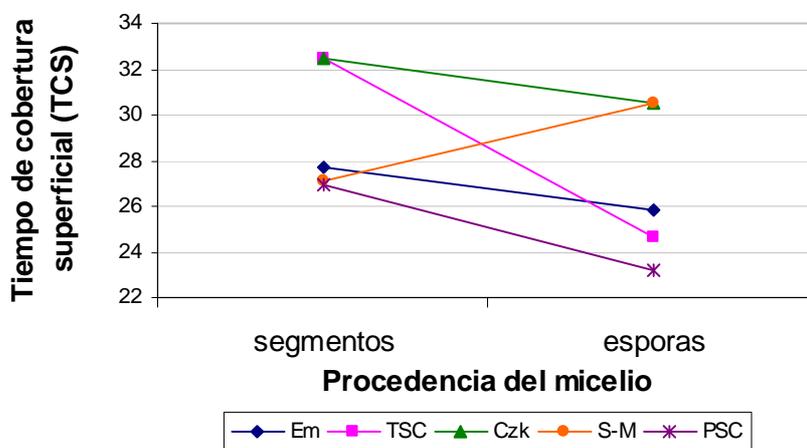
* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

Para *Agaricus bisporus* en la comparación 5 (C5) - *A.camp.*(Czk-todos), el medio Czk no mostró significancia porque tiene un promedio de TCS de 26 días en comparación al resto de los tratamientos con 25.3 días, a pesar de ser un promedio similar no presentó significancia alguna en el PMD y CRM al exhibir el menor desarrollo micelial, en las comparaciones 6 y 7, (C6) - *A. bisp.*(PSC-TSC) – (C7) - *A. bisp.*(S-M-Em) se pueden apreciar diferencias significativas, la comparación 8 (C8) *A.camp.*(TSC/PSC-Em/SM) mostró diferencias significativas porque PSC-TSC presentó promedios de 24.65 días y S-M-Em con 25.95 días teniendo un mayor TCS, estas diferencias se deben a la disponibilidad de los nutrientes en el medio y a la capacidad del hongo de absorberlos.

4.1.3.5 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio y medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

Como se observa en el Anexo 7 y la Figura 16, del análisis de la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el TCS, se aprecian diferencias significativas ($P < 0.01$) para medio de cultivo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas, al igual que para el factor procedencia del micelio en Em, TSC, Czk, S-M y PSC.



Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 16. Interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

La Figura 16, demuestra que se tiene dependencia del factor medio de cultivo en la procedencia del micelio, exponiendo diferencias significativas para el TCS. Para la procedencia del micelio por segmentos de tejido TSC y Czk ambos con 32.5 días, Em y S-M con 27.7 – 27.10 días respectivamente, mientras que PSC obtuvo el menor promedio con 26.9 días para TCS. La procedencia del micelio por esporas, indica que se tienen diferencias significativas, Czk y S-M ambos con 30.5 días, Em – TSC con 25.8 y 24.6 días respectivamente, el menor promedio registrado fue para PSC con 23.2 días. Para ambos casos (segmentos de tejido y esporas), el medio PSC es el que menor TCS presentó, al respecto Carrillo (2003), indica que las reacciones anabólicas y catabólicas

que realizan estos organismos siguen lo que se llaman rutas metabólicas; ambos tipos de rutas se combinan unas con otras para producir compuestos específicos y esenciales, estas rutas facilitarían la asimilación y disponibilidad de fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo, para el medio PSC una vez absorbida la sacarosa se generan enzimas para degradar el almidón aportado por la papa, de esta forma el crecimiento micelial fue acelerado en comparación a los otros tratamientos.

En el Cuadro 22, de contrastes ortogonales para la interacción obtención del micelio por medio de cultivo en el TCS se observan efectos significativos en la comparación 1 (C1) - Seg. tej. (Czk-todos), porque presentó el mayor promedio en el TCS y exhibió el menor desarrollo micelial sobre la superficie del medio de cultivo, la comparación 2 (C2) - Seg. tej. (PSC-TSC) mostró diferencias significativas porque PSC logró el menor TCS en relación a TSC, pero este medio presentó los promedios más altos en el CRM. En la comparación 3 (C3) - Seg. tej. (SM-Em) no se denota efectos significativos pero se observan diferencias estadísticas. En la comparación 4 (C4) - Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a los promedios individuales de cada medio de cultivo en el TCS.

Cuadro 22. Contrastes ortogonales para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - Seg. tej.(Czk-todos)	1	124,82	124,82	76,34	0,0001	**
C2 - Seg. tej.(PSC-TSC)	1	156,80	156,80	95,90	0,0001	**
C3 - Seg. tej.(SM-Em)	1	1,80	1,80	1,10	0,2972	ns
C4 - Seg. tej.(PSC/TSC-Em/SM)	1	52,90	52,90	32,35	0,0001	**
C5 - Esp.(Czk-todos)	1	160,21	160,21	97,98	0,0001	**
C6 - Esp.(PSC-TSC)	1	9,80	9,80	5,99	0,0165	*
C7 - Esp.(SM-Em)	1	110,45	110,45	67,55	0,0001	**
C8 - Esp.(PSC/TSC-Em/SM)	1	180,63	180,63	110,47	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %
 * Significativo al nivel de 5 %
 ns No significativo

En la comparación 5 (C5) - Esp.(Czk-todos); se observaron diferencias significativas, la comparación 6 (C6) - Esp.(PSC-TSC), comparación 7 (C7) - Esp.(SM-Em) y la comparación 8 (C8) - *A. bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) las diferencias significativas se deben a los promedios obtenidos por PSC/TSC con 23.9 días significativamente menor a Em/SM con 28.15 días de TCS. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el medio Czk en el PMD demostró un prendimiento retardado y en el CRM presentó un desarrollo limitado con un TCS relativamente largo en comparación al resto de los tratamientos, Buitrago *et al.* (2005), mencionó que obtuvo mayores parámetros de crecimiento y masa de micelio seco con el uso del medio Czapek para el cultivo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae*, pero añadiendo como fuente de carbono extracto de tubérculo de ñame, indicando que la implementación de un complejo natural ayudo a cubrir los requerimientos del patógeno y observar el desarrollo de factores característicos de los mecanismos de infección que podían participar en la patogenicidad. Cerito y Alonso (2006), indican que este medio de cultivo es utilizado para la identificación y descripción completa de microorganismos para estudiar sus características con fines comparativos.

En el caso de PSC, TSC, Em y S-M presentaron los menores promedios de tiempo en el PMD y promedios de CRM significativamente elevados que influyen el TCS en comparación al medio Czk. Las variables PMD, CRM y TCS están en función a los componentes del medio de cultivo y a la capacidad de absorción y asimilación de los nutrientes por parte de los hongos utilizados en el presente estudio. Las pautas de crecimiento y degradación de un organismo son consecuencia del equilibrio entre las fuerzas opuestas del anabolismo (síntesis) y el catabolismo (destrucción). Ambos procesos actúan durante toda la vida del organismo. Las primeras fases de la vida constituyen un periodo de adaptación y de crecimiento, caracterizado por el predominio de la actividad anabólica sobre la catabólica. Cuando anabolismo y catabolismo se igualan se estabiliza, pero cuando el catabolismo supera al anabolismo el organismo se marchita y muere (Encarta, 2006).

4.1.4 Biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

El Cuadro 23, de análisis de varianza para biomasa del micelio g/ml de medio de cultivo (mc) (BM), se determinaron efectos significativos, el coeficiente de variación es de 7.06% indica que los datos son aceptables y están dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 23. Análisis de varianza para biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	1,847	1,847	926,49	0.0001	**
Procedencia del micelio (B)	1	0,060	0,060	30,14	0.0001	**
A*B	1	0,001	0,001	0,34	0.5625	ns
Medio de Cultivo (C)	4	5,826	1,457	730,55	0.0001	**
A*C	4	0,631	0,158	79,06	0.0001	**
B*C	4	0,013	0,003	1,68	0.1624	ns
A*B*C	4	0,036	0,009	4,50	---	---
Error	80	0,160	0,002			
Total	99	8,574				

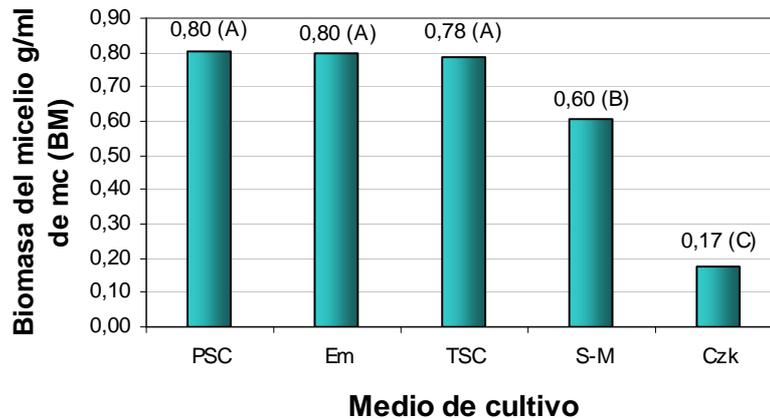
CV = 7.06

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

Se puede observar efectos altamente significativos ($P < 0.01$), para los tres factores de estudio: tipo de hongo (A), obtención del micelio (B) y medio de cultivo (C) y las interacciones A*C (tipo de hongo*medio de cultivo), pero no así para A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio) y B*C (procedencia del micelio*medio de cultivo).

4.1.4.1 Medio de cultivo para biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

En la Figura 17, de la prueba de Duncan se aprecian diferencias significativas ($P < 0.05$) para medio de cultivo, se observa que se establecieron 3 grupos, el primero conformado por PSC – Em ambos con 0.80 g de micelio seco en 25 ml de mc y TSC con 0.78 g. En el segundo grupo esta S-M con 0.60 g/ml de mc, y por último el medio Czk produciendo 0.17 g/ml de mc, que no mostró significancia en la producción de BM en comparación al resto de los tratamientos.



PSC (Papa); Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); S-M (Sabouraud-miel); Czk (Cazapek: sales inorgánicas)

Figura 17. Comparación de medias para medio de cultivo en biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

Carrillo (2003), indica que el micelio es el conjunto de filamentos y un trozo del mismo se denomina hifa, y cuando este se desarrolla en un medio nutritivo se designa con el nombre de cepa. Por lo tanto se puede afirmar que el PMD y el CRM están estrechamente relacionados en la formación de biomasa, cuanto mas rápido sea el prendimiento y desarrollo de las primeras hifas, el micelio alcanzara un mayor radio en menor tiempo expresando mayor peso por unidad de área y volumen, siendo inversamente proporcional.

4.1.4.2 Análisis de varianza para contrastes ortogonales para biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

En el análisis de varianza (Cuadro 24 y Figura 17) de la suma de cuadrados de contrastes ortogonales para biomasa del micelio g/ml de mc (BM), se encontró diferencias altamente significativas para la comparación 1(C1) – Czk – todos, esto se debe a que obtuvo el promedio más bajo para CRM, lo que influye de forma indirecta en el peso seco del micelio en comparación a los otros tratamientos.

**Cuadro 24. Suma de cuadrados de contrastes ortogonales
para biomasa del micelio g/ml de mc (BM)**

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 (Czk – todos)	1	5,27	5,27	2644,32	0,0001	**
C2 (PSC – TSC)	1	0,00	0,00	1,37	0,2447	ns
C3 (SM – Em)	1	0,38	0,38	193,00	0,0001	**
C4 (PSC/TSC-Em/SM)	1	0,17	0,17	83,31	0,0001	**

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

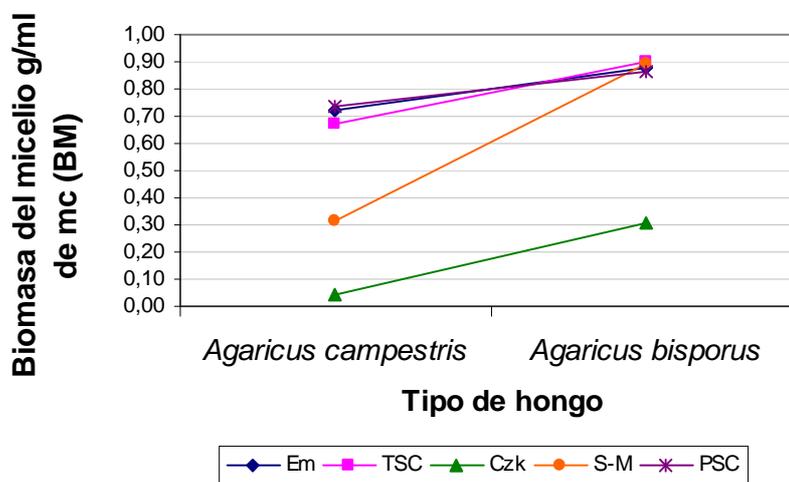
En la comparación 2 (C2) – PSC – TSC, no se aprecian diferencias significativas porque ambos medios de cultivo tienen promedios similares, en la comparación 3 (C3) – SM – Em, se establecen diferencias significativas porque Em mostró una mayor conversión de biomasa. Para la comparación 4 (C4 – PSC/TSC-Em/SM) se tiene diferencias significativas porque el promedio de PSC/TSC es de 0.79 g/ml de mc, superior a Em/SM con 0.70 g/ml de mc.

4.1.4.3 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo para biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

Como se observa en el Anexo 8 y la Figura 18, del análisis de la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en BM, se aprecian diferencias significativas ($P < 0.01$) para medio de cultivo en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*, al igual que el factor tipo de hongo en el medio de cultivo: Em, TSC, Czk, S-M y PSC.

La Figura 18, indica que existe dependencia del factor medio de cultivo en el tipo de hongo utilizado, demostrando que se tienen diferencias significativas para BM. *Agaricus campestris* obtuvo los menores promedios en comparación a *Agaricus bisporus*. El medio Czk presentó el promedio más bajo con 0.04 g/ml de mc esto se debe a la morfología externa que presentó el micelio al tener un aspecto tenue casi translucido en comparación al resto. El medio S-M con 0.32 g/ml de mc seguido de TSC con 0.67 g/ml de mc presentando un promedio intermedio, PSC y Em, ambos no presentaron

diferencias significativas pero si diferencias estadísticas con 0.73 y 0.72 g/ml de mc demostrando superioridad en comparación a los otros medio de cultivo para BM.



Em (extracto de malta); TSC (Triguillo); Czk (Cazapek: sales inorgánicas); S-M (Sabouraud-miel); PSC (Papa)

Figura 18. Interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

Se observa para *Agaricus bisporus* en la interacción tipo de hongo por medio de cultivo para BM, que el medio de cultivo TSC presentó un promedio de 0.90 g/ml de mc significativamente superior en comparación al resto de los medios de cultivo, al producir un mayor promedio de biomasa, seguido de S-M, Em y PSC cada uno con 0.89, 0.88 y 0.87 g/ml de mc, el medio Czk con 0.31 g/ml de mc demostrando el menor promedio, pero significativamente superior al de *Agaricus campestris* esto indica la capacidad de adaptación y asimilación de nutrientes por parte de *Agaricus bisporus*.

En el Cuadro 25, de contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo para BM se observan efectos significativos en la comparación 1 (C1) *A.camp.*(Czk-todos), porque presentó el menor promedio, exponiendo la demora en el PMD que desfavoreció el CRM y afecto de forma directa en la producción de micelio seco, las comparaciones 2 y 3, (C2) *A.camp.*(PSC-TSC) – (C3) - *A.camp.*(SM-Em) muestran diferencias significativas debido a la morfología externa que presentaron en el CRM. En la comparación 4 (C4) *A.camp.*(PSC/TSC-Em/SM) también se aprecian

diferencias significativas PSC/TSC tiene un promedio de 0.70 g/ml de mc en comparación a Em/SM con 0.52 g/ml de mc demostrando un rendimiento más bajo.

Cuadro 25. Contrastes ortogonales para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
C1 - <i>A.camp.</i> (Czk-todos)	1	2,61	2,61	1308,89	0,0001	**
C2 - <i>A.camp.</i> (PSC-TSC)	1	0,02	0,02	10,16	0,0020	**
C3 - <i>A.camp.</i> (SM-Em)	1	0,82	0,82	411,72	0,0001	**
C4 - <i>A.camp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	0,01	0,01	169,19	0,0001	**
C5 - <i>A.bisp.</i> (Czk-todos)	1	2,66	2,66	1335,50	0,0001	**
C6 - <i>A.bisp.</i> (PSC-TSC)	1	0,00	0,00	2,34	0,1299	ns
C7 - <i>A.bisp.</i> (SM-Em)	1	0,00	0,00	0,41	0,5214	ns
C8 - <i>A.bisp.</i> (PSC/TSC-Em/SM)	1	0,00	0,00	0,01	0,9213	ns

** Significativo al nivel de 1 %
ns No significativo

En la comparación 5 (C5) - *A.bisp.* (Czk-todos) se observa efectos significativos porque presentó los menores promedios de BM, las comparaciones 6 y 7, (C6) *A.bisp.*(PSC-TSC) – (C7) - *A.bisp.*(SM-Em) no muestran diferencias significativas porque los promedios de BM son similares. En la comparación 8 (C8) *A.bisp.*(PSC/TSC-Em/SM) tampoco se aprecian diferencias significativas, porque el promedio de PSC/TSC es 0.89 g/ml de mc equivalente al de Em/SM.

Según los datos obtenidos las diferencias que se registran en la variable BM se deben a la composición del medio de cultivo y la capacidad de producir exoenzimas en la biosíntesis del anabolismo que esta determinado por el tipo de hongo y la procedencia del micelio, es importante mencionar que uno de los factores para el PMD, CRM, TCS y BM es la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, al respecto Fang y Zhong (2002); citado por Peña *et al.* (2005), indican que la incorporación de sacarosa al medio de cultivo presenta valores máximos de biomasa de 10 g/L⁻¹ al día 3 con el tratamiento de sacarosa y al día 4 con los tratamientos de glucosa, determinando mayor rendimiento en la conversión de sacarosa en biomasa que de glucosa en biomasa.

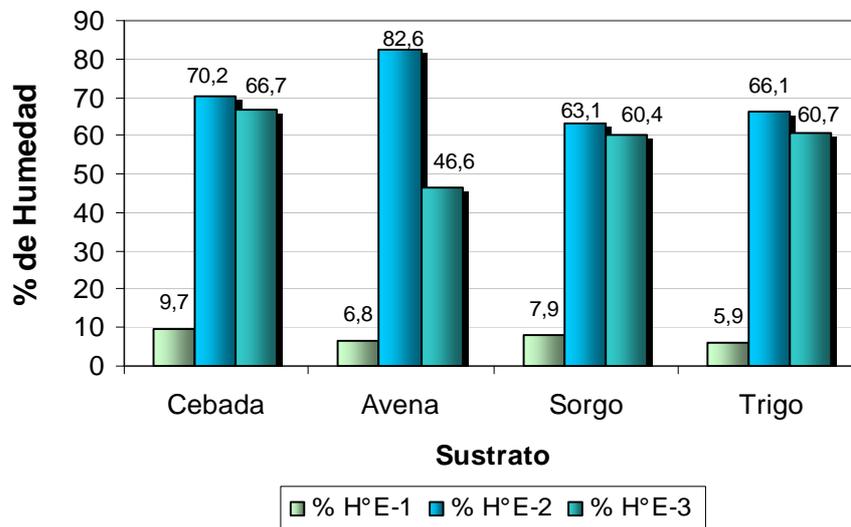
Cabe destacar que para ambos cultivos se utilizó un pH de 6.5 al respecto Roussos y Perraud-Gaime (1996), indica que los hongos ectomicorrízicos y saprófitos, necesitan para su crecimiento pH neutros y estables (6.0 hasta 7.5). Fang y Zhong, (2002) evaluaron la influencia del pH inicial sobre el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum*, en un rango desde 3.5 hasta 7.0, obteniendo mayor crecimiento a pH inicial 5.5, 6.5, 7.0 lo cual indica que son apropiados.

El uso de carragenina como gelificante en los diferentes medios de cultivo no tuvo ningún problema, al respecto Castelli (2003), menciona que la carragenina es un agente gelificante, espesante y ligante, extraído de algas marinas rojas (*Rhodophyceas*), es ampliamente usado en la industria de alimentos por sus particulares efectos. Roussos y Perraud-Gaime (1996), indica que por lo general los cultivos de microorganismos como los hongos saprófitos (*Lentinus*, *Pleurotus* y *Agaricales*), crecen muy bien en medio sólido, obteniendo mayor producción de biomasa en comparación al cultivo sumergido (líquido). Una vez realizada la inoculación todos los tratamientos fueron sometidos a las mismas condiciones de incubación (temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, en completa oscuridad), este es un factor determinante para que el micelio se desarrolle en la superficie del medio nutritivo en menor tiempo, al respecto Song (2005), menciona que el último factor para el crecimiento de los hongos es la provisión de un ambiente apropiado para su crecimiento tanto vegetativo como reproductivo, son fácilmente afectados, por lo tanto el éxito o fracaso del cultivo de hongos depende del control de las condiciones de incubación.

4.2 Variables de respuesta estudiadas para la Fase III: Obtención de semilla blanco o “spawn”

En la preparación del sustrato se distinguen tres etapas, antes de iniciar la E-1 y la E-2 se tomaron muestras de 100 g de cada cereal para realizar pruebas de humedad, para la E-3 las muestras fueron analizadas al final del experimento. Como se observa en la Figura 19, el porcentaje de humedad de cada cereal en la E-1 para cebada, avena, sorgo y trigo es de 9.7, 6.8, 7.9 y 5.9 respectivamente, en la E-2 es de 70.2% para cebada, avena con 82.6% con el mas alto porcentaje de humedad, sorgo con 63.1% y

trigo con 66.1%. Para E-3 el porcentaje de humedad fue de 66.7% para cebada, avena con 46.6%, sorgo con 60.4% y trigo con 60.7% de humedad.



% de humedad Etapa 1; % de humedad Etapa 2; % de humedad Etapa 3

Figura 19. Porcentaje de humedad en las distintas etapas de la fase III

Al respecto Baena (2005), indica que la humedad del sustrato debe mantenerse entre 60 - 75%. García *et al.* (2005), menciona que la humedad se puede uniformizar con el uso de Ca SO_4 (yeso) en una proporción de hasta 5% del peso seco del sustrato para favorecer el agarre del hongo, mejorar la textura y aireación del material y retener humedad. La avena presentó un descenso significativo de 36% de humedad al finalizar la E-3 en comparación al trigo con 5.4%, sorgo 2.7% y cebada 3.5%, esto no permitió un desarrollo normal del micelio sobre el sustrato demorando el prendimiento del inóculo. Guardado *et al.* (2007), menciona que el contenido de fibra cruda, es el que marca la diferencia del grano de avena con los demás cereales, los granos de trigo y sorgo tienen un bajo contenido de fibra, que en general no supera el 2,8% sobre la materia seca, en la avena representa concentraciones de fibra cruda de 12 a 13%. Campos y González (2001), mencionan que la envoltura de la avena está compuesta casi en su totalidad por paredes celulares que contienen un 30 a 40% de celulosa y otro tanto de hemicelulosa, las que son parcialmente digeridas, debido a la acción de las enzimas provenientes de la población microbiana, el 8% de lignina que está incluida en esta cubierta no puede ser degradada.

En el experimento, el inóculo una vez que prendió solo se extendió sobre la superficie del cereal y no se observó en ninguna de las repeticiones un crecimiento longitudinal, porque no pudo absorber los nutrientes adecuados para desarrollarse. Los granos utilizados no son únicamente un vehículo para la dispersión del micelio, sino que constituyen el principal elemento nutritivo para que el hongo se desarrolle en esta etapa (Mata y Savoie, 2007). Por lo tanto el tratamiento de avena se excluyó y no se tomó en cuenta en el experimento y solo se evaluó los tratamientos de cebada, sorgo y trigo.

Aplicando el método y procedimientos experimentales descritos anteriormente, en la preparación del sustrato o cereal para la obtención de semilla (blanco o “spawn”) procedente de dos hongos (*Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*) derivado de esporas y segmentos de tejido, los cuales fueron evaluados estadísticamente. Las variables estudiadas fueron: Días al prendimiento del inóculo (DPI), Crecimiento longitudinal en cm² (CL), Tiempo de invasión en días (TID).

4.2.1 Días al prendimiento del inóculo (DPI)

En el Cuadro 26, de análisis de varianza para días al prendimiento del inóculo (DPI), se determinaron efectos significativos, el coeficiente de variación es 13.80 indica que, los datos son aceptables porque se encuentran dentro del rango permitido, menores a 30%.

Cuadro 26. Análisis de varianza para días al prendimiento del inóculo (DPI)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	6360,06	6360,06	528,42	0,0001	*
Procedencia del micelio (B)	1	60,06	60,06	4,99	0,0272	*
A*B	1	73,67	73,67	6,12	0,0146	*
Tipo de Sustrato (C)	2	2949,88	1474,94	122,54	0,0001	**
A*C	2	246,38	123,19	10,23	0,0001	**
B*C	2	234,54	117,27	9,74	0,0001	**
A*B*C	2	374,60	187,30	15,56	---	---
Error	132	1588,75	12,04			
Total	143	11887,94				

CV = 13.80

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

Se observa efectos altamente significativos ($P < 0.01$) para el factor tipo de sustrato (C) y las interacciones A*C (tipo de hongo*tipo de sustrato), B*C (procedencia del micelio*tipo de sustrato) y efectos significativos para los factores de estudio, tipo de hongo (A), procedencia del micelio (B) y la interacción A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio).

4.2.1.1 Tipo de hongo en días al prendimiento del inóculo (DPI)

Según el análisis de varianza (Cuadro 26) en días al prendimiento del inóculo (DPI), se encontró diferencias significativas para los tres factores de estudio incluyendo sus interacciones respecto al tipo de hongo. Estas diferencias se ven reflejadas en el tiempo de prendimiento del micelio al sustrato, que es menor en *Agaricus bisporus* con respecto a *Agaricus campestris*.

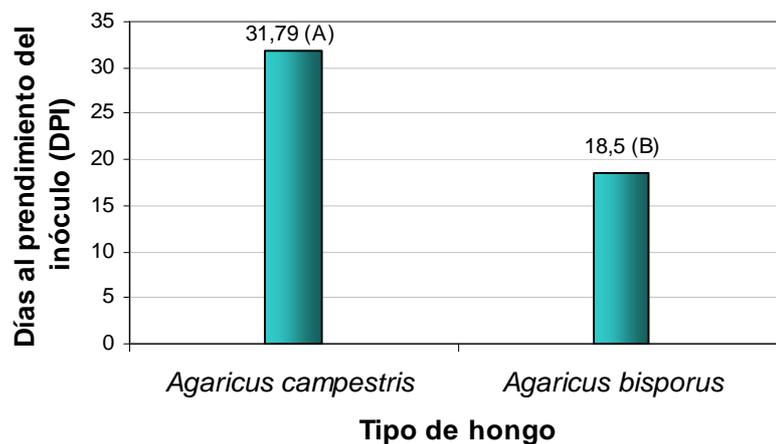


Figura 20. Comparación de medias para tipo de hongo en días al prendimiento del inóculo (DPI)

En la Figura 20, de la prueba de Duncan se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) para el efecto tipo de hongo, se aprecia que el prendimiento del inóculo se realizó en 18.50 días para *Agaricus bisporus* presentando una menor fase de latencia con respecto a *Agaricus campestris* que fue de 31.79 días. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que el efecto tipo de hongo en DPI se debe a la capacidad del hongo en adaptarse a estas nuevas condiciones, este periodo de adaptación está representado por una fase de latencia donde no se puede evidenciar ningún tipo de desarrollo, al respecto Carrillo (2003), Cruz y Hermosilla (2008), indican que se tiene

alta actividad metabólica, no hay crecimiento visible y de hecho puede haber una reducción en el número de microorganismos.

Callac (2007), menciona que la aptitud para el cultivo en el género *Agaricus* esta relacionada con la ecología de la especie y su potencial enzimático para la degradación de sustratos, estas características han sido adquiridas a lo largo de la evolución y no es sorprendente que algunas especies cercanas puedan ser cultivables y otras no, pero no es una regla absoluta.

4.2.1.2 Procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI)

Se observa en la Figura 21, de la prueba de Duncan diferencias significativas ($P < 0.05$) para procedencia del micelio en DPI, por esporas con 25.79 días y segmentos de tejido con 24.50 días.

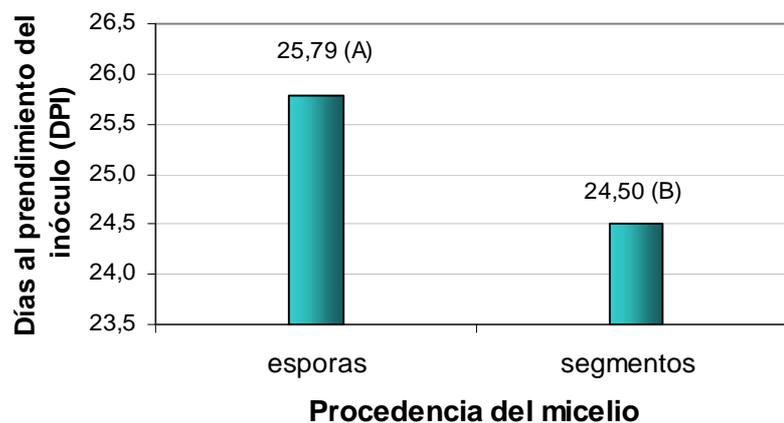


Figura 21. Comparación de medias para procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI)

Para la procedencia del micelio en DPI Callac (2007), menciona que el papel del micelio proveniente de esporas no está aun bien comprendido y el papel del micelio dicho “vegetativo” es probablemente subestimado porque potencialmente puede participar en la diseminación, la interfecundación y aún la recombinación conocida como somática.

4.2.1.3 Tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

En la Figura 22, de la prueba de Duncan se observa diferencias significativas ($P < 0.05$) en DPI, se evaluaron 3 cereales como sustrato para la reproducción de semilla de hongo, estos fueron cebada, trigo y sorgo. Se puede ver la formación de 2 grupos, en el primer grupo solo se encuentra cebada con 31.54 días teniendo el mayor tiempo en comparación al segundo grupo conformado por trigo con 22.17 días y 21.73 para sorgo.

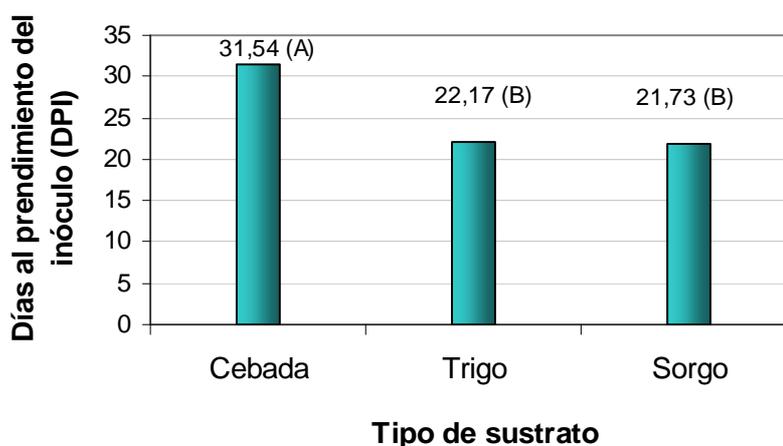


Figura 22. Comparación de medias para tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el efecto tipo de sustrato para DPI se observa en el Cuadro 3, que la cebada tiene un contenido de fibra cruda de 5.7% superior a trigo con 2.8% y sorgo con 2.3%, Prats *et al.* (1989), indica que la fibra representa la porción no digerible de los alimentos y por consiguiente, mientras mayor sea su concentración en un producto dado, menor será su valor alimenticio, esta constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina.

Entre los Basidiomicetos que pueden degradar y digerir la celulosa están *Coprinus*, *Fomes*, *Pleurotus*, *Polyporales* y *Rhizoctonia*, en tanto que los del género *Agaricus* emplean sustratos de gran calidad obtenido a partir de la descomposición de residuos orgánicos (Carrillo, 2003).

4.2.1.4 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI)

En el Cuadro 27, de análisis de la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI), no se observan diferencias significativas para procedencia del micelio en *Agaricus campestris*, pero sí diferencias significativas ($P < 0.05$) para procedencia del micelio en *Agaricus bisporus* y diferencia altamente significativas ($P < 0.01$) para tipo de hongo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y espora.

Cuadro 27. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Proced. del micelio en <i>A.cam.</i>	1	0,34722	0,3472	0,029	0,865	ns
Proced. del micelio en <i>A.bisp.</i>	1	133,389	133,39	11,08	0,001	*
Error	132	1588,75	12,04			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En el Cuadro 27 y la Figura 23, se observa que existe dependencia del factor obtención del micelio para tipos de hongo, lo que indica que existen diferencias significativas para DPI. Para tipo de hongo, *Agaricus campestris* demostró los promedios mas elevados con 31.86 y 31.72 días para la obtención de micelio por segmentos de tejido y esporas, *Agaricus bisporus* obtuvo promedios menores, significativamente superior con 17.14 y 19.86 días, por lo tanto se puede señalar que la capacidad de prendimiento del hongo esta relacionado con el vigor micelial, al respecto Mata y Savoie (2007), indican que esta capacidad se define como su habilidad saprófita competitiva, esta capacidad está determinada por la característica genética propia de cada una de las cepas y especifica para cada sustrato.

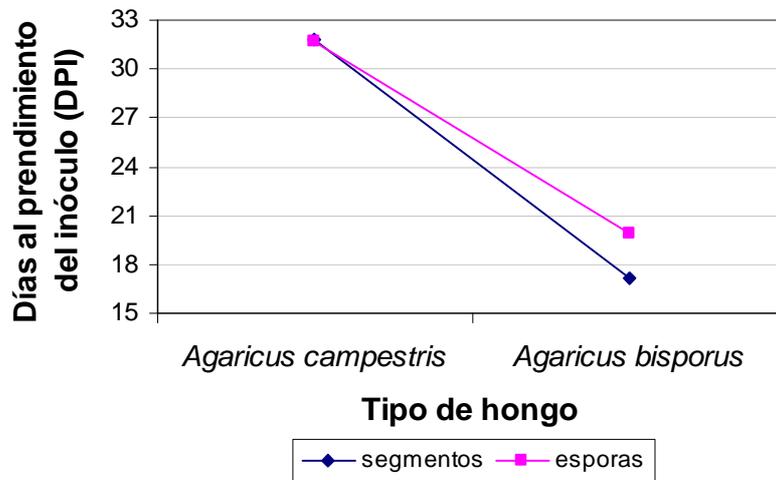


Figura 23. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en días al prendimiento del inóculo (DPI)

4.2.1.5 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

El Cuadro 28, de análisis de la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI), se aprecian diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para sustrato en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* y el factor tipo de hongo en tipo de sustrato: sorgo, cebada y trigo.

Cuadro 28. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de hongo en sorgo	1	3185,02	3185,02	264,62	0,000	**
Tipo de hongo en cebada	1	1180,08	1180,08	98,05	0,000	**
Tipo de hongo en trigo	1	2241,33	2241,33	186,22	0,000	**
Error	132	1588,75	12,04			

** Significativo al nivel de 1 %

En el Cuadro 28 y la Figura 24, se observa que existe dependencia del factor tipo de hongo en el factor tipo de sustrato, lo que indica que existen diferencias significativas en

DPI. Para tipo de hongo, *Agaricus campestris* demostró los promedios mas elevados para esta variable, trigo y sorgo con 29 - 29.88 días, cebada con 36.5 días. *Agaricus bisporus* obtuvo los menores promedios para sorgo con 13.58 días, trigo con 15.33 días y cebada con 26.58 días.

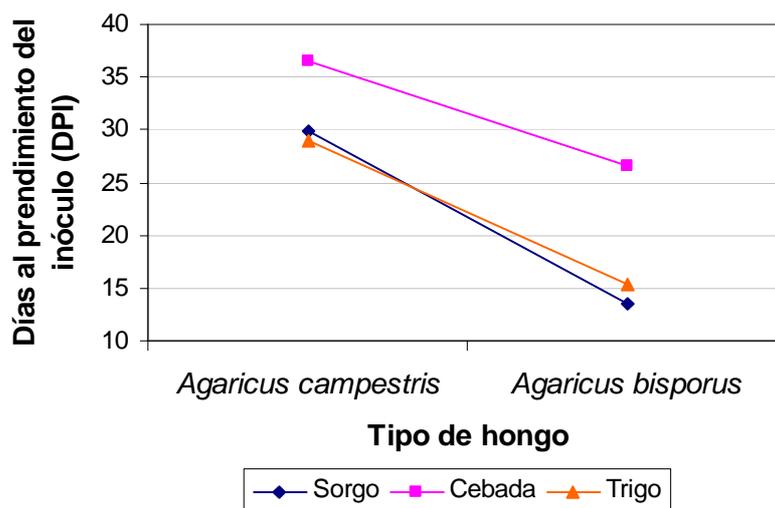


Figura 24. Interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

Estas diferencias se atribuyen a la capacidad de adaptación del hongo al nuevo sustrato, ha este periodo de adaptación Carrillo (2003), lo denomina fase de latencia, al respecto Mata y Savoír (2007), mencionan que en esta fase se observara la capacidad del hongo para poder crecer en un sustrato lignocelulósico que esta directamente relacionado con el vigor micelial, así como la capacidad de activar mecanismos enzimáticos que le permitan aprovechar adecuadamente los diferentes nutrientes del sustrato.

4.2.1.6 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

El Cuadro 29, de análisis de la interacción procedencia del micelio por tipo de hongo en días al prendimiento del inóculo (DPI), se pueden apreciar diferencias significativas ($P < 0.05$) para sustrato en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y

diferencias altamente significativa ($P < 0.01$) para sustrato en la procedencia del micelio por espora, pero no se observan diferencias significativas para procedencia del micelio en sorgo, cebada y trigo, pero si diferencias estadísticas.

Cuadro 29. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Procedencia del micelio en Sorgo	1	0,44	0,44	0,04	0,849	ns
Procedencia del micelio en Cebada	1	47,01	47,01	3,91	0,040	*
Procedencia del micelio en Trigo	1	3,70	3,70	0,31	0,580	ns
Error	132	1588,75	12,04			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En el Cuadro 29 y la Figura 25, se observa que existe dependencia del factor procedencia del micelio en tipos de sustrato, lo que indica que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) para el sustrato cebada en la procedencia del micelio por segmento de tejido y esporas con 29.17 y 33.92 días respectivamente por que presentaron promedios elevados en el DPI en comparación al resto de los tratamientos.

Para segmentos de tejido en sorgo, fue de 21.5 días y por espora 21.96 días, para trigo por segmentos y espora es 22.83 y 21.50 días respectivamente, en estos dos últimos casos no se observa diferencias significativas pero si diferencias estadísticas.

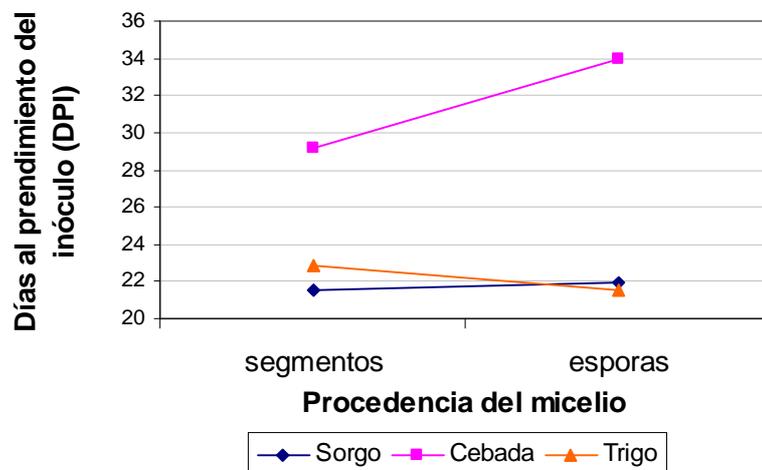


Figura 25. Interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en días al prendimiento del inóculo (DPI)

4.2.1.7 Análisis de regresión lineal para el tiempo de invasión en días (TID) en función a días al prendimiento del inóculo (DPI)

Se realizó el análisis de regresión lineal considerando el tiempo de invasión en días (TID) como la variable dependiente (Y) y días al prendimiento del inóculo (DPI) como la variable independiente (X).

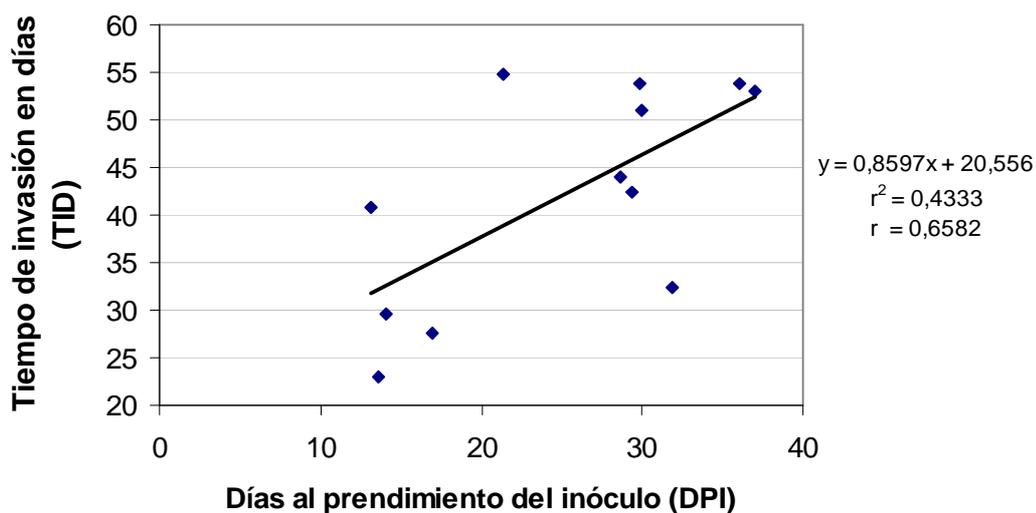


Figura 26. Línea de tendencia lineal del tiempo de invasión en días (TID) en función de DPI

De acuerdo a la Figura 26, se aprecia que cuanto más se retrase el prendimiento del inóculo (fase de latencia) se tendrá una mayor demora en el tiempo de invasión y desarrollo del micelio, de modo que cuando termina la fase de latencia entre el día 10 y 20, el tiempo de invasión del micelio en el sustrato será menor e inversamente proporcional. Para determinar si estos cambios en el TID son significativos debido a DPI, se estudió el análisis de regresión lineal.

Cuadro 30. Análisis de varianza para el tiempo de invasión en días (Y) en función de los días al prendimiento del inóculo (X)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Regresión	1	634,33	634,33	7,64	0,0184	*
EE	10	829,78	82,98			
Total	11	1464,10	133,10			

Coefficiente de correlación $r = 0.6583$
 Coeficiente de determinación $r^2 = 0.4333\%$

El coeficiente de correlación, indica una fuerte asociación lineal positiva entre los días al prendimiento del inóculo y el tiempo de invasión en días ($r = 0.6583$), el signo positivo de este coeficiente indica que a medida que la fase de latencia disminuye en tiempo, el desarrollo del micelio será en menor tiempo, en tanto que el coeficiente de determinación ($r^2 = 0.4333\%$), demuestra que el modelo de regresión explica el 43.33% de la variación en el TID por efecto de la variación en los días al prendimiento del inóculo (DPI). De acuerdo al análisis de varianza se observa que el coeficiente de regresión presenta significancia ($P < 0.05$), esto quiere decir que mientras menor sea la fase de latencia en DPI se producirá un cambio significativo en el tiempo que demora el hongo en invadir todo sustrato.

Cuadro 31. Estadísticas del modelo de regresión lineal

	Coefficiente	Error Estándar	t c	Prob > Fc	Signif.
Intercepción (a)	20,5558	8,2491	2,4919	0,0319	*
DPI (X)	0,8597	0,3109	2,7649	0,0191	*

El intercepto y la variable independiente que forman parte del modelo de regresión son significativos según la estadística t de Student ($P < 0.05$), lo que indica que ambos términos contribuyen significativamente en la construcción del modelo.

4.2.2 Crecimiento longitudinal en cm^2 (CL)

En el Cuadro 32, de análisis de varianza para crecimiento longitudinal en cm^2 (CL), se determinaron efectos significativos ($P < 0.05$), para tipo de hongo (A), pero no se observan efectos significativos para los factores procedencia del micelio (B) y medio de cultivo (C); incluyendo sus interacciones. El coeficiente de variación es 7.70 indica que, los datos son altamente confiables y están dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 32. Análisis de varianza para crecimiento longitudinal en cm^2 (CL)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	1537,12	1537,12	9,29	0,0028	*
Procedencia del micelio (B)	1	57,57	57,57	0,35	0,5555	ns
A*B	1	64,11	64,11	0,39	0,5340	ns
Tipo de Sustrato (C)	2	105,13	52,57	0,32	0,7289	ns
A*C	2	165,91	82,96	0,50	0,6101	ns
B*C	2	767,56	383,78	2,32	0,1019	ns
A*B*C	2	226,38	113,19	0,68	---	---
Error	132	21828,86	165,37			
Total	143	24752,65				

CV = 7.70

* Significativo al nivel de 5 %

Al no presentar diferencias significativas en el factor B, C y sus interacciones se confirma que las etapas E-1, E-2 y E-3 presentaron las mismas condiciones en todo el proceso de preparación del sustrato e inoculación, el cereal preparado se distribuyó en frascos de vidrio de 500 ml hasta llenar 2/3 del envase, por lo tanto el crecimiento micelial fue uniforme para todos los casos (cebada, sorgo y trigo), esto se ve reflejado en el cuadro de Análisis de varianza para crecimiento longitudinal en cm^2 (CL).

4.2.2.1 Tipo de hongo en el crecimiento longitudinal en cm^2 (CL)

Según el análisis de varianza Cuadro 32 y la Figura 27, de la prueba de Duncan para tipo de hongo en el crecimiento longitudinal en cm^2 (CL), se encontró diferencias

significativas ($P < 0.05$), *Agaricus bisporus* presentó un crecimiento longitudinal de 170.26 cm en comparación a *Agaricus campestris* con 163.72 cm.

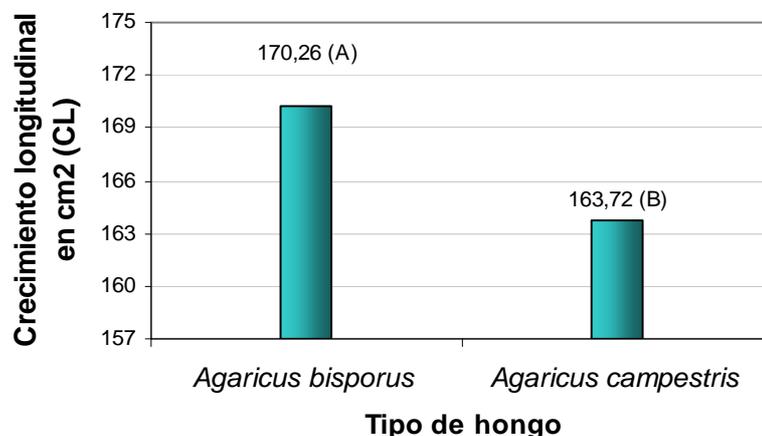


Figura 27. Comparación de medias para tipo de hongo en el crecimiento longitudinal en cm² (CL)

Se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) para el efecto tipo de hongo, esto se debe a la forma de crecimiento del micelio sobre el cereal, en la mayoría de los casos el desarrollo del micelio fue uniforme, de forma horizontal por estratos llegando hasta la base del frasco para *Agaricus campestris*, pero en algunas repeticiones de *Agaricus bisporus* el crecimiento inicio en los costados del frasco demostrando un desarrollo cóncavo, por lo tanto se tuvo que tomar en cuenta para las mediciones la base de los frascos, causando diferencias significativas entre los 2 tipos de hongo para el crecimiento longitudinal en cm² (CL) para tipo de hongo.

4.2.2.2 Crecimiento longitudinal en cm² (CL) para procedencia del micelio

En la Figura 28, de la prueba de Duncan no se encuentran diferencias significativas ($P < 0.05$) para procedencia del micelio en el CL, pero si se pueden ver diferencias estadísticas, la procedencia del micelio por esporas y segmentos de tejido demuestran un crecimiento de 167.62, 166.36 cm respectivamente.

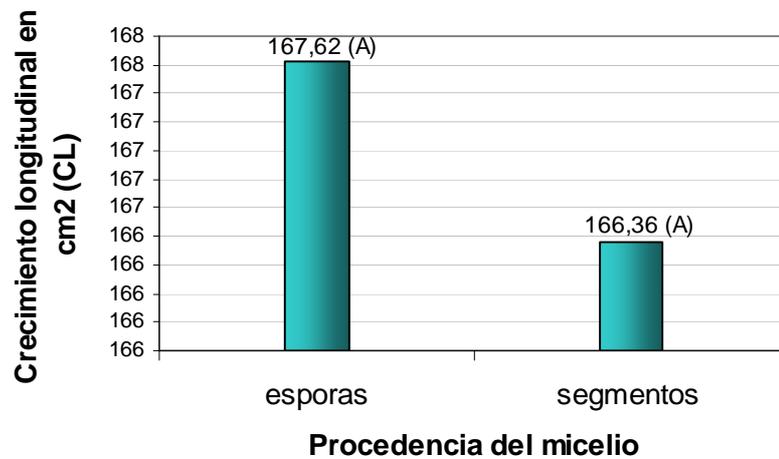


Figura 28. Comparación de medias para procedencia del micelio en el crecimiento longitudinal en cm² (CL)

Al respecto Baena (2005), señala que otro parámetro que perturba el crecimiento es la falta de oxígeno, el micelio puede ser afectado por bacterias anaerobias las cuales competirán por el sustrato, además de soportar mayores temperaturas. Al respecto Cisterna (2004), indica que la práctica de cerrar los frascos o bolsas y taponarlos con algodón es para permitir algo de intercambio gaseoso. De acuerdo a los resultados obtenidos en el efecto procedencia del micelio en el CL, se comprueba que las condiciones fueron homogéneas, una de las condiciones para el CL es la oxigenación que debe tener el cultivo a lo largo de su desarrollo, el intercambio gaseoso se logra haciendo un orificio en la tapa de cada frasco y sellarlo con algodón a manera de filtro y cubrirlo con papel madera para evitar cualquier tipo de contaminación.

4.2.2.3 Tipo sustrato en el crecimiento longitudinal en cm² (CL)

En la Figura 29, de la prueba de Duncan no se tienen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el CL para el factor tipo de sustrato, pero se pueden apreciar en los 3 cereales evaluados diferencia estadística, cebada con 168.04 días, trigo con 166.99 cm y sorgo con 165.95 cm para el CL.

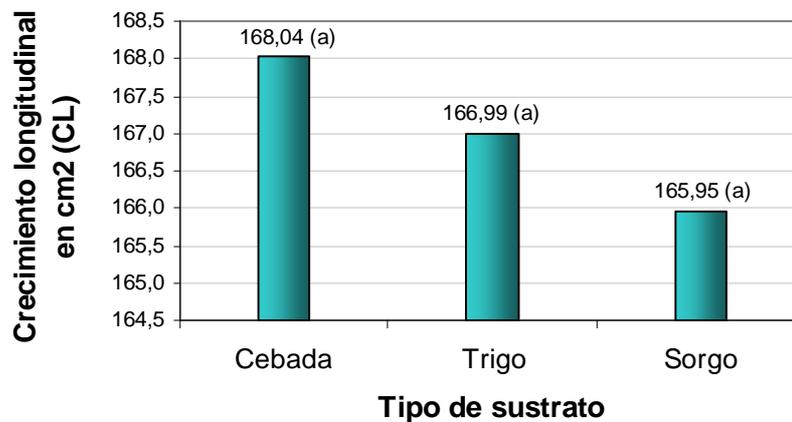


Figura 29. Comparación de medias para tipo de sustrato en el crecimiento longitudinal en cm² (CL)

El Crecimiento longitudinal en cm² (CL) para sustrato no presentó efectos significativos, esto se debe al control adecuado del pH en el sustrato, para tal efecto se utilizó yeso (CaSO₄·2H₂O) al 2 % y Cal (CaCO₃) al 0.7 %, (en base al peso seco de cada cereal), Cisterna (2002), indica que una práctica habitual en la obtención de semilla, es la adición de 1 - 5 % de Ca CO₃ (Carbonato de Calcio) sobre el peso seco del cereal, con el fin de regular el pH, que debe ser mantenido entre 6 y 6,5 para el desarrollo del micelio, al respecto Song (2005), indica que el pH óptimo para el sustrato (cereal) varía entre 6 y 8, dependiendo de las especies de hongos con que se trabaje. Vedder (1996), señala que el calcio es esencial, porque neutraliza el ácido oxálico segregado por el micelio, si no el medio se acidificaría con demasiada rapidez, el micelio de champiñón prefiere un pH de 7.0 a 7.5 aprox. al final del proceso el pH desciende alrededor de 6.3.

La incubación de la semilla, es otro factor importante para el desarrollo micelial, la semilla inoculada fue incubada en completa oscuridad a 25°C (± 1). Song (2005), menciona que el último factor para el crecimiento de los hongos es la provisión de un ambiente apropiado para su crecimiento tanto vegetativo como reproductivo, son fácilmente afectados, por lo tanto el éxito o fracaso del cultivo de hongos depende del control de las condiciones de incubación. Baena (2005), menciona que el micelio puede desarrollar bien entre 16 - 28°C, por encima de 40° C o por debajo de 4°C puede ocurrir la muerte del micelio o entrar a un estado de letargo. Para regular la humedad y evitar

que el cereal se seque, se colocaron frascos con agua destilada estéril dentro de la incubadora, de esta forma la humedad del cereal a lo largo del proceso de CL se mantuvo estable, al finalizar el desarrollo se realizó una prueba de humedad al sustrato (Cuadro 27) y se verificó que se mantuvo entre los 60.4 y 66.7%, Baena (2005), indica que la humedad del sustrato debe mantenerse entre 60 - 75%.

4.2.3 Tiempo de invasión en días (TID)

En el Cuadro 33, de análisis de varianza para tiempo de invasión en días (TID), se determinaron efectos altamente significativos ($P < 0.01$), el coeficiente de variación es 13.56 indica que los datos son aceptables y están dentro del rango permitido menores a 30%.

Cuadro 33. Análisis de varianza para tiempo de invasión en días (TID)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de Hongo (A)	1	8025,17	8025,17	245,25	0,0001	**
Procedencia del micelio (B)	1	1314,06	1314,06	40,16	0,0001	**
A*B	1	1620,06	1620,06	49,51	0,0001	**
Tipo de Sustrato (C)	2	5086,10	2543,05	77,71	0,0001	**
A*C	2	492,93	246,47	7,53	0,0008	**
B*C	2	414,29	207,15	6,33	0,0024	**
A*B*C	2	616,62	308,31	9,42	---	---
Error	132	4319,42	32,72			
Total	143	21888,66				

CV = 13,56

** Significativo al nivel de 1 %

Se determinaron efectos significativos ($P < 0.01$), para los tres factores de estudio, tipo de hongo (A), procedencia del micelio (B) y medio de cultivo (C); incluyendo sus interacciones A*B (tipo de hongo*procedencia del micelio), A*C (tipo de hongo*tipo de sustrato), B*C (procedencia del micelio*tipo de hongo).

4.2.3.1 Tipo de hongo en el tiempo de invasión en días (TID)

Según el análisis de varianza (Cuadro 33) para tiempo de invasión en días (TID), se encontró diferencias altamente significativas para los tres factores de estudio incluyendo sus interacciones respecto al tipo de hongo. Estas diferencias se ven reflejadas en el tiempo de invasión del micelio, que es menor en *Agaricus bisporus* con respecto a *Agaricus campestris*.

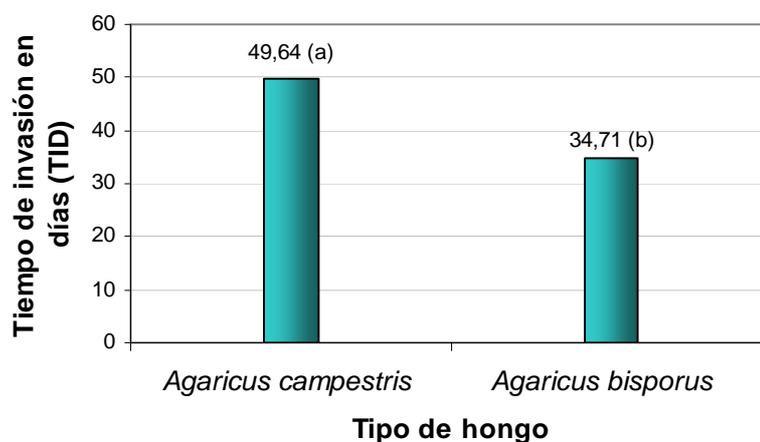


Figura 30. Comparación de medias para tipo de hongo en el tiempo de invasión en días (TID)

En la Figura 30, de la prueba de Duncan se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) para el efecto tipo de hongo, muestra que el desarrollo micelial fue de 49.64 días para *Agaricus campestris* teniendo un promedio elevado en comparación a *Agaricus bisporus* con 34.71 días superior al hongo local.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que el efecto tipo de hongo en el TID esta relacionado directamente con los días al prendimiento del inóculo (DPI), porque *Agaricus campestris* obtuvo un mayor tiempo de latencia con 31.79 días en DPI lo que retardó el crecimiento longitudinal del micelio en el sustrato, mientras que *Agaricus bisporus* obtuvo un prendimiento mas rápido con 18.5 días acortando su fase de latencia, permitiendo que el desarrollo del micelio sea inmediato. Esto indica que cuanto menor sea la fase de latencia, empezara de forma inmediata la fase exponencial (crecimiento micelial), por lo tanto esto será inversamente proporcional.

4.2.3.2 Procedencia del micelio para tiempo de invasión en días (TID)

En la Figura 31, de la prueba de Duncan se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) para procedencia del micelio en el TID, por segmentos de tejido y esporas, fue de 45.19 y 39.15 días respectivamente.

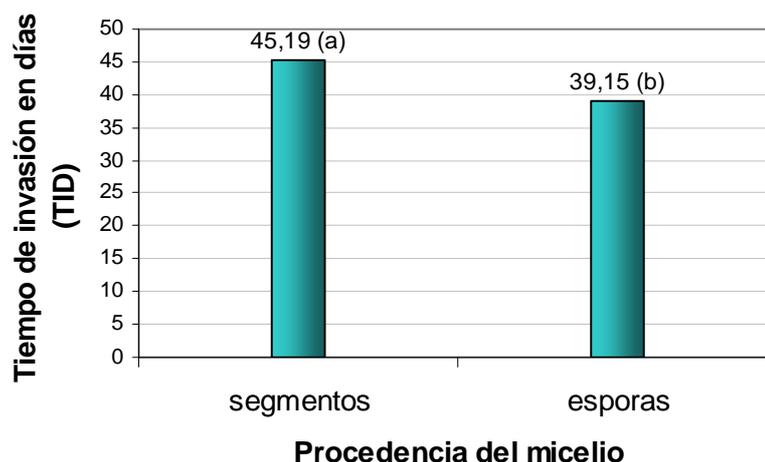


Figura 31. Comparación de medias para procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el efecto procedencia del micelio en el TID, las diferencias se deben a la aptitud del inóculo a adaptarse al sustrato (fase de latencia) y la capacidad de generar exoenzimas para llevar a cabo procesos metabólicos, de esta forma realizar una asimilación de nutrientes mas provechosa y generar un crecimiento y desarrollo exponencial del micelio.

4.2.3.3 Tipo de sustrato para el tiempo de invasión en días (TID)

En el la Figura 32, de la prueba de Duncan se distinguen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el TID. La cebada presentó un tiempo total de 48.48 días exhibiendo el mayor promedio, sorgo con un promedio de 43.83 días y trigo con 34.21 días significativamente superior al resto al presentar un menor tiempo y obtener el mismo crecimiento longitudinal.

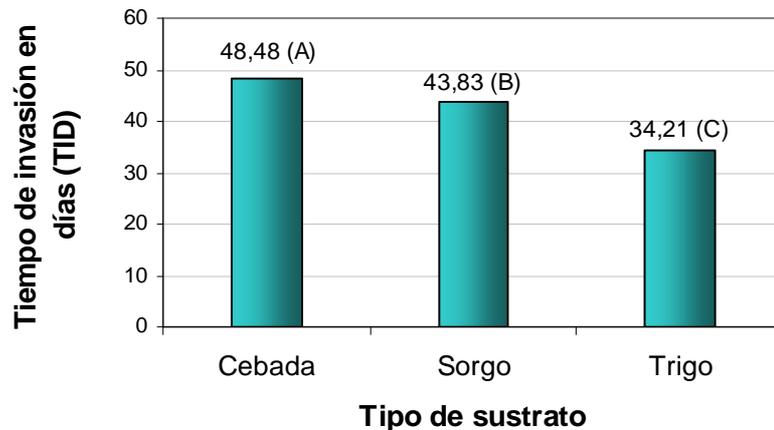


Figura 32. Comparación de medias para tipo de sustrato para el tiempo de invasión en días (TID)

Estas diferencias se deben al contenido de nutrientes y su disponibilidad para ser fácilmente absorbidas por el micelio. Carabaño (1995), indica que el valor nutritivo de los cereales, depende tanto de su contenido en principios inmediatos, como de la capacidad del microorganismo para transformarlos en nutrientes, se pueden distinguir factores internos que están relacionados con la composición química del alimento, y factores externos, relacionados con la capacidad de digerir (capacidad enzimática, tiempo de tránsito y presencia de otros compuestos que retarden o inhiban la acción enzimática). Los carbohidratos presentes en los cereales son los productos predominantes de la fotosíntesis vegetal y son los principales nutrientes de la mayoría de los microorganismos, degradan estas macromoléculas fuera de las células por la acción de exoenzimas y esos productos son absorbidos por las mismas.

4.2.3.4 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID)

El Cuadro 34, de análisis de la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID), se observa que no se tienen diferencias significativas para procedencia del micelio en *Agaricus campestris*, pero si diferencias ($P < 0.05$) para procedencia del micelio en *Agaricus bisporus* y diferencias ($P < 0.01$) para tipo de hongo en la procedencia del micelio por segmentos y esporas.

Cuadro 34. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de hongo en proced*seg	1	1216,889	1216,89	37,19	0,000	**
Tipo de hongo en proced*esp	1	8428,347	8428,35	257,57	0,000	**
Error	132	4319,417	32,72			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

En el Cuadro 34 y la Figura 33, se observa que existe dependencia del factor obtención del micelio para tipos de hongo, lo que indica que existen diferencias altamente significativas para *Agaricus bisporus* que demostró los mejores promedios en el TID para la obtención de micelio por segmentos de tejido y esporas con 41.08 y 28.33 días al ser menores que *Agaricus campestris* que obtuvo los mayores promedios con 49.31 y 49.97 días para segmento de tejido y esporas respectivamente.

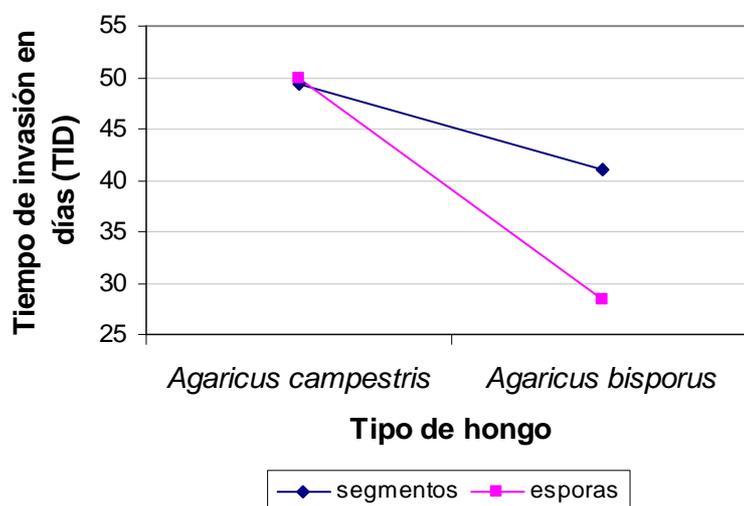


Figura 33. Interacción tipo de hongo por procedencia del micelio en el tiempo de invasión en días (TID)

4.2.3.5 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

En el Cuadro 35 y la Figura 34, del análisis de la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el TID, se presenta diferencias significativas ($P < 0.01$) para tipo de sustrato en *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*, al igual que el factor tipo de hongo en los siguientes sustratos: sorgo, cebada y trigo.

Cuadro 35. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Tipo de hongo en Sorgo	1	3570,75	3570,75	109,12	0,000	**
Tipo de hongo en Cebada	1	1131,02	1131,02	34,56	0,000	**
Tipo de hongo en Trigo	1	3816,33	3816,33	116,63	0,000	**
Error	132	4319,42	32,72			

** Significativo al nivel de 1 %

En el Cuadro 35 y la Figura 34, se observa que existe dependencia del factor obtención del micelio para tipos de hongo, lo que indica que existen diferencias altamente significativas para el TID. Para tipo de hongo, *Agaricus campestris* demostró los promedios mas elevados, para cebada con 53.33 días, sorgo con 52.46 días y trigo con 43.13 días, mostrando el menor promedio en contraste con el resto de los tratamientos para el hongo local. *Agaricus bisporus* obtuvo los mejores promedios para cebada, sorgo y trigo con 43.63, 35.21 y 25.29 días respectivamente.

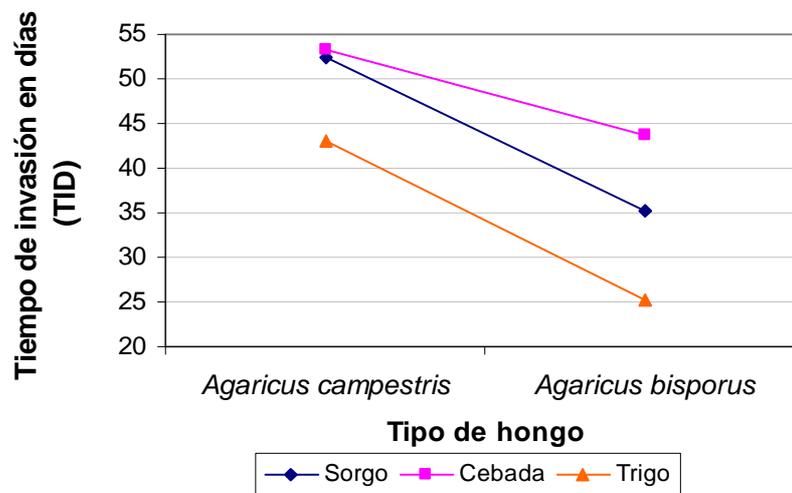


Figura 34. Interacción tipo de hongo por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

Guardado *et al.* (2007), menciona que aproximadamente el 80% del grano de cereales está compuesto por hidratos de carbono y dentro de ellos el almidón es el que en mayor proporción se encuentra, trigo con 60%, sorgo con 75% y cebada con 50% teniendo el contenido mas bajo. Campos y González (2001), mencionan que “la fibra es enemiga de la energía”, este tradicional y tan divulgado concepto, que indica que un ingrediente con mayor fibra que otro, en general aporta, menos energía, es perfectamente aplicable al grano de cebada y su valor energético es inferior a otros cereales en un 15 a 30%. Por este motivo en cada variable de respuesta el desarrollo y crecimiento micelial se ve desfavorecido con el uso de cebada.

4.2.3.6 Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

En el análisis de la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID), se aprecia diferencias significativas ($P < 0.05$) para tipo de sustrato en procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas al igual que para procedencia del micelio en cebada, pero no así para sorgo y trigo.

Cuadro 36. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

FV	GL	SC	CM	Fc	Prob > Fc	Signif.
Procedencia del micelio en Sorgo	1	37,63	37,63	1,15	0,286	ns
Procedencia del micelio en Cebada	1	242,63	242,63	7,41	0,007	*
Procedencia del micelio en Trigo	1	19,81	19,81	0,61	0,438	ns
Error	132	4319,42	32,72			

* Significativo al nivel de 5 %
 ns No significativo

En el Cuadro 36 y la Figura 35, se observa que existe dependencia del factor procedencia del micelio para tipos de sustrato, en el cultivo de segmentos de tejido se obtienen promedios de 53.88, 45.96 y 35.75 días para cebada, sorgo y trigo. Para el caso del cultivo por esporas los promedio son significativamente superiores al presentar un menor TID cebada con 43.08 días, sorgo con 41.71 días y trigo con 32.67 días.

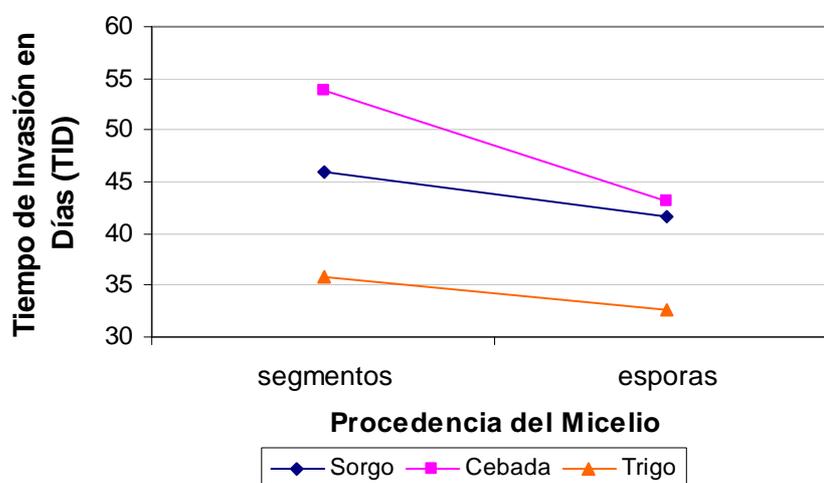


Figura 35. Interacción procedencia del micelio por tipo de sustrato en el tiempo de invasión en días (TID)

El contenido de fibra cruda, es el que marca la diferencia del grano de cebada con los demás cereales, los granos de trigo y sorgo tienen un bajo contenido de fibra, que en general no supera el 2.8% sobre la materia seca, en contraste, la cebada presenta

concentraciones de fibra cruda del orden de 5 y 6%. Carabaño (1995), menciona que esta composición de fibra, se debe a que los valores más bajos corresponden a los granos vestidos, donde las cubiertas externas del grano suponen un peso más elevado (18% para la cebada) y los más altos a los que se denominan granos desnudos (5 - 7% para trigo y sorgo). En el caso de la cebada este contenido de fibra cruda lo hace menos asimilable y digerible para ambos hongos, el uso de cebada para la obtención de semilla o “spawn” alarga la fase de latencia y retrasa el crecimiento micelial en ambos tipos de hongo.

4.3 Análisis de costos parciales de producción para la Fase II: Multiplicación

Se realizó un análisis de costos de producción sobre la reproducción de micelio para la obtención de inóculo master de champiñón en base al tipo de hongo, procedencia del micelio y los diferentes medios de cultivo utilizados en el experimento. En el Cuadro 37, se observa el presupuesto parcial que se utilizaría para la producción de inóculo master o cepa matriz de *Agaricus sp.* en un litro de medio de cultivo (MC), en base a los resultados obtenidos en el trabajo de investigación de tesis.

La 1ª columna nos indica los tipos de hongo utilizados en el experimento, la 2ª columna hace referencia a la procedencia del micelio, la 3ª a los diferentes medios de cultivo utilizados, donde se expresa el costo de producción de cada uno de ellos que se describen en el Anexo 9. La 4ª columna indica el rendimiento medio (R-M) que se obtendría al preparar un litro de MC, lo que equivale a 40 cajas petri, en la 5ª columna se realizó un ajuste del 10% de decremento al rendimiento, con el fin de eliminar la sobreestimación del producto de acuerdo a las recomendaciones de CIMMYT (1988).

La 6ª y 7ª columna indican el crecimiento radial del micelio (CRM) y la biomasa del micelio g/ml de mc (BM) obtenidas en el experimento, estas dos características son esenciales para poder discernir con cual de los diferentes MC se obtendría un inóculo master o cepa matriz con buenas características. La 8ª columna nos indica el beneficio bruto (BB) que se obtendría de los rendimientos ajustados por la venta del producto con un precio referencial que da Alave (2008), de 60 Bs. por cada caja petri que contenga inóculo master (Anexo 10). En la siguiente columna se observa el total de los costos

variables (Anexo 11), para cada caso se tomó en cuenta el tiempo de incubación al ser una variable concluyente, por que cuanto mayor sea el tiempo de incubación mayor será el costo de alquiler del equipo.

Cuadro 37. Análisis económico de la producción de inóculo master de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* en laboratorio

		MC	R-M	R-A	CRM	BM	BB	CV	B/N	CP
<i>Agaricus campestris</i>	Seg. de tejido	Em	40	36	1,34	0,666	2160	1422,56	737,44	39,52
		TSC	40	36	1,96	0,625	2160	1482,18	677,82	41,17
		Czk	40	36	1,41	0,020	2160	1484,00	676,00	41,22
		S-M	40	36	2,01	0,282	2160	1427,61	732,39	39,66
		PSC	40	36	2,05	0,706	2160	1429,05	730,95	39,70
	Esporas	Em	40	36	1,75	0,778	2160	1393,56	766,44	38,71
		TSC	40	36	2,60	0,717	2160	1397,18	762,82	38,81
		Czk	40	36	1,20	0,060	2160	1434,00	726,00	39,83
		S-M	40	36	1,75	0,351	2160	1437,61	722,39	39,93
		PSC	40	36	2,08	0,713	2160	1365,05	794,95	37,92
<i>Agaricus bisporus</i>	Seg. de tejido	Em	40	36	2,87	0,873	2160	1966,76	760,44	38,88
		TSC	40	36	3,75	0,895	2160	1954,38	772,82	38,53
		Czk	40	36	1,18	0,263	2160	1956,20	771,00	38,58
		S-M	40	36	2,58	0,860	2160	1965,81	761,39	38,85
		PSC	40	36	3,52	0,842	2160	1957,25	769,95	38,61
	Esporas	Em	40	36	2,92	0,883	2160	1965,76	761,44	38,85
		TSC	40	36	3,44	0,901	2160	1960,38	766,82	38,70
		Czk	40	36	3,34	0,351	2160	1986,20	741,00	39,42
		S-M	40	36	3,56	0,922	2160	1989,81	737,39	39,52
		PSC	40	36	3,09	0,894	2160	1984,25	742,95	39,36

PSC (Papa); Em (Extracto de malta); TSC (Triguillo); S-M (Sabouraud-miel); Czk (Cazapek: sales inorgánicas)

De acuerdo a las dos últimas columnas de beneficio neto (B/N) y costo de producción (CP), tomando en cuenta un crecimiento micelial \geq a 2.6 cm y con un peso de micelio seco \geq a 0.700 g/ml de mc. Se observa para *Agaricus campestris* en la procedencia del micelio por segmentos de tejido el medio PSC presentó las mejores características con un CP de 39.70 Bs. cada caja petri, para procedencia del micelio por esporas se tomó en cuenta el medio TSC con 38.81 Bs. En el caso del hongo comercial la relación B/N y CP para la 1ª producción es elevada en comparación a *Agaricus campestris*, los beneficios se ven reducidos debido al incremento en los costos de producción por la adquisición de la cepa *ICFC 500/03 *Agaricus bisporus*, estos valores solo se

presentarían en el primer proceso de producción, por que una vez que se tiene el inóculo master se realiza la duplicación y renovación del mismo, de esta forma no se necesitaría comprar nuevamente el material genético. Por este motivo en el Cuadro 37 se muestran los B/N y CP de la 2ª producción, para la procedencia del micelio por segmentos de tejido los medios de cultivo TSC y PSC son los mas aconsejables porque presentan un buen desarrollo micelial y biomasa, con un CP de 38.53 y 38.61 Bs. Para procedencia del micelio por esporas los medios más aptos son S-M y TSC con 39.52 y 38.70 Bs. de costos de producción.

4.4 Análisis de costos parciales de producción para Fase III: Obtención de semilla blanco o “spawn”

Se realizó un análisis de costos de producción para la obtención de semillas de champiñón en base al tipo de hongo, procedencia del micelio y los diferentes sustratos (cereal) utilizados en el experimento.

Cuadro 38. Análisis económico de la producción de semilla de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* en laboratorio

		Sustrato	R-M	R-A	TID	BB	CV	BN	CP
<i>Agaricus campestris</i>	Seg. de tejido	Sorgo	30	27	51	2025	1383,31	641,69	51,23
		Cebada	30	27	53	2025	1392,31	632,69	51,57
		Trigo	30	27	44	2025	1394,31	630,69	51,64
	Esporas	Sorgo	30	27	54	2025	1396,81	628,19	51,73
		Cebada	30	27	54	2025	1396,81	628,19	51,73
		Trigo	30	27	42	2025	1386,31	638,69	51,34
<i>Agaricus bisporus</i>	Seg. de tejido	Sorgo	30	27	41	2025	1331,81	693,19	49,33
		Cebada	30	27	55	2025	1401,81	623,19	51,92
		Trigo	30	27	28	2025	1312,81	712,19	48,62
	Esporas	Sorgo	30	27	30	2025	1275,81	749,19	47,25
		Cebada	30	27	32	2025	1289,81	735,19	47,77
		Trigo	30	27	23	2025	1289,81	735,19	47,77

En el Cuadro 38 se observa los costos de producción que se utilizaría para producir 30 kg de semilla de hongo o “spawn” del género *Agaricus sp.* en base a los resultados obtenidos en el trabajo de investigación de tesis. La 1ª columna indica los tipos de hongo utilizados en el experimento, la 2ª columna hace referencia a la procedencia del

micelio, la 3ª a los diferentes sustratos (cereal) utilizados, el costo de producción de cada uno de ellos se describe en el Anexo 12. La 4ª columna nos indica el rendimiento medio (R-M) que se obtendría al utilizar una arroba (@) de sustrato lo que equivale a 30 kg de semilla de hongo o "spawn", en la 5ª columna se realizó un ajuste del 10% de decremento al rendimiento, con el fin de eliminar la sobreestimación del producto de acuerdo a las recomendaciones de CIMMYT (1988). La 6ª indica el tiempo de invasión en días (TID) que tardó el inóculo en prender y desarrollarse por completo sobre el sustrato, por que cuanto mayor sea el tiempo de incubación mayor será el costo de alquiler del equipo, incrementando los costos variables que inciden en los costos de producción reduciendo el beneficio neto. La 7ª columna nos muestra el beneficio bruto (BB) que se obtendría de los rendimientos ajustados por la venta del producto, con un precio de 75 Bs por cada kg de sustrato inoculado con cepa matriz de *Agaricus sp.* (Anexo 13). En la siguiente columna se observa el total de los costos variables (Anexo 14).

De acuerdo a las dos últimas columnas de beneficio neto (B/N) y costos de producción (CP), se observa para *Agaricus campestris* por segmentos de tejido y esporas, el sustrato con menor tiempo de incubación es trigo, con 44 y 42 días respectivamente, pero presentó CP similares a sorgo y cebada que varían entre 51.23 y 51.73 Bs. porque el precio del cereal de trigo tiene un costo elevado que incrementa los costos de producción reduciendo el B/N. En el caso del hongo comercial *Agaricus bisporus* en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas también el sustrato trigo fue el mas indicado con 28 y 23 días de incubación, con un CP de 48.62 y 47.77 Bs. respectivamente, *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* se adaptan a sorgo, aunque el tiempo de incubación aumenta significativamente afectando los costos variables, pero no afectan los costos de producción porque se tiene una compensación con el precio del cereal sorgo que es relativamente barato en comparación a trigo.

4.5 Prueba de germinación

Se realizó pruebas de germinación en ambientes controlados a las semillas obtenidas en el trabajo de investigación en la planta de producción *Agaricus S.R.L.* en la ciudad de Tarija, el 26 de abril del año en curso. La siembra se realizó en compost elaborados

a base de desechos agroindustriales que fueron pasteurizados por tres días, cuando la temperatura bajo a 20°C se procedió a distribuir el compost en bañadores de plástico, la siembra se realizó por capas, tres de semilla o “spawn” y cuatro de compost, posteriormente se identificaron los bañadores plásticos, luego de la siembra se cubrieron los recipientes con papel periódico remojado en agua, previamente desinfectado en hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v), para luego llevarlos a la cámara de incubación, la temperatura promedio en este ambiente fue de 20°C con una humedad relativa de 60%.

Para la evaluación de invasión y desarrollo micelial en el compost se utilizó una escala del 1 al 4; donde: 1 = 0-25% de desarrollo, 2 = 26-50% de desarrollo, 3 = 51-75% de desarrollo y 4 = 76-100% de desarrollo. Se realizaron 2 evaluaciones, la primera fue el día 11 después de la siembra, donde se pudo observar un desarrollo superior al 50% y en la segunda evaluación se realizó después de 4 días con un porcentaje de invasión del 100%, los resultados se muestran a continuación:

Cuadro 39. Porcentaje de invasión micelial a sustrato compostado

Tipo de hongo	Procedencia	Sustrato	Código	% de desarrollo micelial	
<i>Agaricus campestris</i>	Segmentos	Avena	TL-1	3 (60%)	4 (100%)
	Esporas	Sorgo	TL-2	3 (65%)	4 (100%)
	Segmentos	Trigo	TL-3	3 (70%)	4 (100%)
<i>Agaricus bisporus</i>	Esporas	Cebada	TL-4	4 (78%)	4 (100%)
	Segmentos	Cebada	TL-5	3 (73%)	4 (100%)
	Segmentos	Sorgo	TL-6	4 (76%)	4 (100%)

Una vez que se observo la invasión del micelio al sustrato se procedió a colocar tierra de cobertura (es una mezcla de turba y cal) el día 16 después de la siembra, todos los tratamientos fueron trasladados a los ambientes de fructificación, el día 20 después de la siembra se pudo observar la formación de los primeros primordios y el día 24 la formación de las setas comestibles (Anexo 19).

La producción de un inóculo matriz y semilla o “spawn” es una de las etapas más importantes en el proceso del cultivo de hongos, se debe aclarar que la preparación del

inóculo y la semilla para este proceso productivo no es complicada, pero ambas actividades son delicadas y por lo tanto se precisa de una inversión preliminar considerable para construir un laboratorio que cuente con el equipo necesario, y el personal capacitado para realizar las labores adecuadas para la producción de inóculo y semilla. Buena parte del éxito del cultivo de hongos comestibles reside en la utilización de un inóculo de alta calidad que será la base progresiva de una creciente industria, pero se debe considerar que para los productores a pequeña y mediana escala la obtención del inóculo se convierte en un “cuello de botella” que en ocasiones es dificultoso de salvaguardar.

5. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo de investigación se llegaron a las siguientes conclusiones para la reproducción de micelio de champiñón (*Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*).

a) Para tipo de hongo:

El factor tipo de hongo en el PMD, CRM, TCS y BM se ven afectados por la procedencia del material, la cepa matriz para *Agaricus campestris* se inició a partir de muestras colectadas en campo, esta fue la primera introducción del material de condiciones *in vivo* a condiciones *in vitro*, mientras que en *Agaricus bisporus* se trabajo a partir de una cepa matriz ya establecida a la que se indujo la fructificación demostrando una mayor adaptabilidad.

b) Para procedencia del micelio:

El 54% de la variación en el rendimiento de BM se ve afectado por el PMD que está estrechamente relacionado al CRM, cuanto mas rápido sea el prendimiento y desarrollo de las primeras hifas, el micelio alcanzará un mayor radio en menor tiempo, obteniendo un mayor rendimiento de BM, tanto para el hongo local como el comercial el micelio procedente de esporas presentó un aspecto denso y tupido en toda la superficie de la caja petri, demostrando un prendimiento menor a 3.54 días con un desarrollo micelial superior a 2.82 cm incrementando por encima de 0.657 g/ml de mc de BM, esto es inversamente proporcional al procedente de segmentos de tejido.

c) Para medio de cultivo:

Los medios de cultivo TSC (triguillo) y PSC (papa) presentaron un desarrollo micelial superior al resto, ambos medios desarrollaron un micelio espeso y compacto de aspecto vigoroso en toda la superficie de la caja petri, por lo tanto la adición de sacarosa al medio de cultivo favorece el desarrollo micelial al ser de asimilación inmediata que beneficia el PMD, CRM y TCS que se expresa en la producción de BM.

- En la comparación de tres sustratos para la obtención de la semilla o “spawn” se llegó a las siguientes conclusiones:

a) Para tipo de hongo:

El efecto tipo de hongo en DPI esta relacionado directamente con TID, en el caso de *Agaricus campestris* se presentó mayor tiempo de latencia que retardó el CL del micelio en el sustrato, mientras que *Agaricus bisporus* tuvo un prendimiento mas rápido que acorto su fase de latencia permitiendo que el desarrollo del micelio sea inmediato.

b) Para procedencia del micelio:

Las diferencias que se tienen en DPI se atribuyen a la capacidad del inóculo proveniente de esporas a adaptarse al sustrato y a la de generar exoenzimas para una asimilación de nutrientes mas provechosa, mostrando un crecimiento y desarrollo exponencial del micelio, reduciendo el TID en comparación al inóculo proveniente de segmentos de tejido.

c) Para tipo de sustrato:

El sustrato trigo es el que presentó un menor tiempo de incubación, con 43 días para *Agaricus campestris* y con 25 días para *Agaricus bisporus*, estas diferencias se deben al contenido de fibra cruda del cereal que no superan el 2.8% sobre la materia seca, lo que acorta la fase de latencia y la fase exponencial presentando un desarrollo micelial en menor tiempo.

- Para el análisis de costos de producción, sobre la reproducción de micelios para la obtención de semillas o “spawn” de champiñón se llegó a las siguientes conclusiones:

- Para la producción de inóculo master o cepa matriz

Para los dos tipos de hongo en la procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas es aconsejable el uso de TSC (triguillo) y PSC (papa) ambos con un costo de producción entre Bs. 38 y 39 la caja petri.

- Para la producción de semilla de hongo o “spawn”

Para ambos hongos el sustrato que presenta menor tiempo de incubación es trigo, pero por el precio elevado del cereal tiende a incrementar los costos de producción, dichos costos son similares a los de sorgo, en este caso el tiempo de incubación aumenta afectando los costos variables, pero no inciden en los costos de producción porque se tiene una compensación con el precio del cereal (sorgo) que es relativamente barato en comparación a trigo, para ambos casos fluctúa entre Bs. 47.25 – 47.77.

6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados logrados por la presente investigación:

- Se recomienda realizar trabajos de investigación similar pero con diferentes hongos de interés comercial que se puedan adaptar a las diferentes condiciones climáticas del Altiplano.
- Se recomienda realizar trabajos de investigación en la fase de establecimiento para facilitar la obtención de nuevos híbridos con capacidad de resistencia a las diferentes zonas del Altiplano, con alta productividad, con calidad visual y organoléptica.
- Se recomienda realizar trabajos de investigación para aumentar la diversidad genética de las cepas de champiñón utilizadas para la producción comercial con cepas nativas que le confieran la capacidad de adaptación específica a diferentes condiciones de cultivo, lo que permitiría reducir los costos de producción.

7. REVISIÓN DE LITERATURA

- Alave, Paola. 2008. Evaluación del crecimiento de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* y *Agaricus muril blasei*) en tres cereales como Sustrato. Tesis de Grado - UMSA.
- Bauer, Lurdes. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. S.A. d C.V., México, D. F., p.49 – 53, 61.
- Bianchi, EM. 1990. Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de servicios agrícolas de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, p. 26 – 27.
- Buitrago Hurtado, G; Bustamante Rodriguez, SL; Cerón Rincon, LE; Guzmán Borney, MM; Dalloz, M; Raz, L; Rodríguez Burgos, PA; Tirado Perea, A. 2005. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. durante su cultivo en medio líquido. Progtama para el mejoramiento del ñame y la calidad de vida de los pequeños productores, Universidad Nacional de Colombia, p. 29, 45-78.
- Bianchi, EM. 1990. Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de servicios agrícolas de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, p. 26 – 27.
- Calzada, J. 1982. Métodos estadísticos para la investigación. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. 233 p.
- Callac, Philippe. 2007. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus* - El Genero *Agaricus*kk. ECOSUR, El Colegio de la frontera Sur, p. 19-33.
- Carabaño Luengo, Rosa. 1995. Valor nutritivo de los cereales. Departamento de Producción Animal (DPA), Madrid, Barcelona, p. 35, 38 – 41.
- Carl Wilson, L. 1992. Botánica. Editorial Limusa S. A. de C. V., Buenos Aires –Argentina, p. 503 – 509.
- Carrillo, Leonor. 2003. Microbiología Agr. – Vida y muerte de microorganismos. (Cap. 2), Actividad Microbiana (Cap. 3), Estructura de los Hongos (Cap. 4) y Hongos (Cap. 7), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Salta (UNASa)
- CIMMYT. 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. México.

- Crespo, Mario. 1989. Cultivo comercial de champiñón. Editorial Albatros, Buenos Aire – Republica de Argentina. Cáp. IV y XI.
- Edgardo, Alberto. 2002. Manual práctico para el cultivo intensivo del hongo comestible Shiitake: *Lentinus edodes*. Buenos Aires-Argentina, p. 3 - 4.
- Fernández, Michel Francisco. 2000. Manual Práctico de Producción Comercial de Champiñón. Apuntes, Recopilación de Datos y Experiencias Adquiridas en el Cultivo Comercial de Champiñones, Guadalajara, Jalisco - México, p. 4 – 6, 25 – 28.
- García, JM¹; Gonzalo Hernández, R²; Santos, BD²; Esteves, Maylin³; Echevarria, Y³; Cruz Lazo, R² y León, L². 2005. Algunas experiencias en la utilización del *Aloe vera* L. en la preparación de medios de cultivo. Departamento de Biología¹, Departamento Agropecuario² de la Universidad de Pinar del Río; Biofábrica de Pinar del Río³, Cuba, p. 8 – 19.
- García, Rodríguez, JL.; Pérez – Moreno, J; Aldrete, A; Cetina – Alcalá, VM. y Vaquera Huerta, H. 2006. Caracterización del hongo Silvestre Ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. Rev. Agrociencia vol. 40: 665 - 676.
- García, RM. 1998. Cultivo de setas y trufas. Editorial Mundi-Prensa, 5ta Edición, p. 44, 47, 53, 62.
- Guillén-Navarro, GK; Márquez-Rocha, FJ y Sanchez-Vázquez, J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Revista Iberoamericana de Micología, p. 302– 305.
- González Suárez, Sergio. 2002. Tema 5: Medios de Cultivo. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana – Cuba, p. 1 – 14.
- Guzmán, G; Mata, G; Salmenes, D; Soto - Velasco, L.; Guzmán - Dávalos, L; .1993. El cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y sub tropicales en esquilmos y residuos agro – industriales. 1ª ed. México, Instituto Politécnico Nacional. p. 24, 233.
- Hurtado, VD y Merino, EM. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, S. A. de C. V., México D. F., p. 67 – 86.

- Lahmann, Oscar. 2007. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus* - Evolución de la Industria del Champiñón *Agaricus bisporus* en Latinoamérica. ECOSUR, El Colegio de la frontera Sur, p. 162.
- Lelley, JI. 2007. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus* - Aspectos saludables al consumir hongos. GAMU Ltd Institut for Mushroom, ECOSUR, El Colegio de la frontera Sur, p. 114 - 119.
- López, Ranz. 1988. Auto Didáctica 2000. Ciencias Naturales, Editorial Cultura, S.A. De Ediciones, Madrid – España, p. 253 – 256.
- Mata, Gerardo y Savoir, MJ. 2007. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus* – Producción de semilla y conservación de cepas de *Agaricus bisporus*. GAMU Ltd Institut for Mushroom, ECOSUR, El Colegio de la frontera Sur, p. 37 - 41.
- Moguel Ordóñez, YB; Echazarreta Gonzalezb; Carlos y Mora Escobedoc, Rosalva. 2005. Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. México, p. 323 – 327.
- Montealegre, JR. 2002. Cátedra de Microbiología General. Depto. de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, p. 1, 3, 5.
- Muñoz, Rony. 2002. Producción De Champiñones. Fundación Para La Innovación Tecnológica Agropecuaria, p. 3 – 6.
- Mroginski, AL y Roca, MW. 1989. Cultivo de tejidos en Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (Cap.2) - Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación (Cap. 3), Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Noreste, Corrientes Argentinas – Unidad de investigación de Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali – Colombia, p. 25 – 27, 60.
- Pacioni, Giovanni .1990. Cultivo Moderno del Champiñón. Editorial de Vecchi S.A. Barcelona España. p. 6 -7.
- Peña Serna, Carolina; Sierra Cadavid, Andrea; Sáez Vega, Armando y Rojano Alberto, B. 2005. Establecimiento de un medio de cultivo sumergido para una cepa nativa de un hongo *Poliporal*. Rev. Colombiana de Biotecnología, vol. VIII, número 001, Univ. Nacional de Colombia, Bogota – Colombia, p. 5 - 13.

- Raimondi, Miguel y Giaccio, Gustavo. 2002. Evaluación del silaje de maíz en el engorde a corral de novillos. Convenio INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) – Ministerio de Asuntos Agrarios – Pcia. de Buenos Aires – Argentina, p. 3.
- Roussos, S. y Perraud – Gaime, I. 1996. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. Laboratorio de Biotecnología PMC, Centre ORSTOM - Francia, Traducido por Dr. Enrique Galindo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, p. 341 -344.
- Sáez Vega, AA; Solarte Vásquez FJ y Martínez Moreno, MA. 2004. Evaluación de un medio de cultivo a partir del fruto de *Prosopis juliflora*, Universidad Eafit, Rev. Univ. EAFIT vol. 40, numero 135, Medellín Colombia, p. 1 – 6.
- Santamaría, MA. 2007. Introducción al Cultivo del Hongo *Pleurotus Ostreatus*. Edita: Publicaciones INEA, Imprime: Gráficas Santa María. Valladolid, p. 11 – 13, 21, 31 -35, 45 – 53.
- Stanier, Roger; Villanueva RJ y Guerreo, Ricardo. 1996. The microbial World. Editorial Reverte-Amazon, p. 33 – 34.
- Valeska Villegas, E; Pérez Milena Ana y Arredondo. 2007. Evaluación del Crecimiento *Lentinula edodes* en medios de cultivo solidó para la producción como inóculo. Rev. Colombiana – Biotecnología, vol. IX N° 2, p. 56 - 63.
- Vedder JPC. 1996. Cultivo Moderado del Champiñón, Ediciones Mundi Prensa, Madrid – España, p. 35, 87 – 89.
- Wasser, SP y Weis, A.L. 1999. Efectos terapéuticos en el cultivo de *Basidiomycetes* y su desarrollo rápido como perspectiva moderna. p. 19, 65.
- Weier, ET; Stacking, Ralph C; y Rarbour, Michael G. 1983. Botánica. Universidad de California, Editorial Limusa, S.A., México D.F. p. 526 - 530.
- Wright, EJ. y Edgardo A. 2002. Guía de los hongos de la región pampeana I. Hongos con laminilla. Editorial L.O.L.A. (Literatura of Latin América), Buenos Aires – Argentina, p. 208 - 210.

En Internet:

- Acedo, C. y Lence, C. 2007. Elaboración de Medios de para el Cultivo de Hongos Ectomicorrizicos - Guión de Prácticas de Botánica Forestal., ITF Explotaciones Forestales. ULE., Botánica en la web, Disponible en: <http://www3.unileon.es/personal/wwdbvcac/Fuentes.htm>
- Baena Gonzáles, Armando. 2005. Aprovechamiento del bagazo de Maguey verde en la producción de hongos comestibles. San Luís Potosí – México. Disponible en: http://www.Sipicyt.ipicyt.edu.mx:7779/web/curriculaInvestigadiringnew2.Portada?p_cvePresonal=48-
- Barrientos, Carla. 2004. Propiedades del Champiñón Salud, Nutrientes, Vitaminas, Alimentación y nutrición. Disponible en: <http://www.vitadelia.com/2007/10/13-propiedades-del-champiñón>
- bioMerieux. 2008. Catálogo de Medios de Cultivo, bioMérieux Chile s.a., p. 12, 15, 27. Disponible en: <http://www.biomerieux.es>
- Cardona Urrea, FL. 2001. Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Rev.Crónica forestal y del Medio Ambiente Nº 16, p. 107 – 114. Disponible en línea: <http://74.125.47.132/search?q=cache:cNUXH9BrW7Kj:gárgolas.unlugar.com/Articulo6FeenadiCardona.pdf+Cardona+urrea+cultivo+de+hongos&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=bo>
- Castelli Victoria María. 2003. Carrageninas y su aplicación, Investigación y Desarrollo División Alimentos, Granotec Argentina S.A. Disponible en línea: <http://www.agargel.com.br/carragenina-tec.html>
- Campos Darío N. y Guillermo González O. 2001. El grano de avena en la Alimentación - Área de Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Disponible en línea: http://www.produccionbovina.com/Información_técnica/suplementacion/61-el_grano_de_avena_en_la_alimentacion.htm
- Capilla M, RA. (s.f.) Diseño y elaboración de los medios de cultivo micro biológicos - Diferenciación en los medios de cultivo. Disponible en línea: http://www.wikilearning.com/monografía/diseño_y_elaboracion_de_los_medios_de_cultivo_microbiologicos/17561
- Cerito, HY y Alonso, BS. 2006. Aislamiento y caracterización de Hongos. Archivo Nacional de la Republica de Cuba, Biblioteca Nacional “José Martín”, p. 5. Disponible en línea: <http://www.bnjm.cult.cu/revbiblioteca2006/pages/articulo6.htm>

- Cisterna L, CD. 2004. Cultivo de Hongo Ostra (*Pleurotas ostreatus*). Chile. Disponible en línea: <http://www.micotec.cl/Libro%20Cultivo%20Hongo%20Ostra%20en%20Chile.pdf>.
- Costas, Joaquín. 2007. Biología, Capítulo 29. Los hongos (fungí). El Cuarto en Blanco - Biblioteca Web. Disponible en: <http://www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeovarios/BiologiaCurtis/Seccion%205/5%20-%20Capitulo%2029.htm>.
- Cruz, Maria A. y Herмосilla, Germán D. 2008. biología de los microorganismos, Capitulo 3, p. 16 – 23. Disponible en: http://www.u-cursos.cl/medicina/2009/0/MAGVIVO03/1/material_docente/objetivo/210853
- Encarta. 2006. Malta – Maltosa Agricultura_ Metabolismo. (CD-ROM). Enciclopedia multimedia Encarta CD-ROM.
- Guardado Yordi, Estela; Hernández Sariego, T; Castellanos Sariego, Marbelis; 2007. LosAlmidones Nativos. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/Almidones/almidones2.shtml>
- Grodzinskaya, AA; Infante, HD; Nickolai, M; (s.f.). Cultivo de Hongos comestibles utilizando desechos agrícolas e industriales, Instituto de Botánica N. G. Jolodni de la Academia Nacional de Ciencias. p. 2 - 3. Disponible en línea: http://www2.bvs.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002
- Jimeno, A. 2004. Tecnologías Informáticas a la enseñanzas de la Biología y la Geología. Tema 12. Reino Protistas y Reino Hongos, p. 4 - 6. Disponible en: <http://www.aula2005.com/html/cn1eso/12protocistetes/12protocisteteses.htm>
- Juan, PD. 2005. *Agaricus bisporus*, Seta francesa, champiñón de París Disponible en línea: <http://elmochuelopuntocon.iespana.es/setas/BISPORUS.HTML>
- Knott, Shirley. 2007. Manual ilustrado de obtención de esporas Disponible en línea: <http://www.trokkel.net/setas/Manual.pdf>
- Lazarillo, José Manuel. 2005. *Agaricus campestris*, Disponible en línea: http://www.micologia.net/g3/Agaricuscampestris/Agaricus_campetris_lazarillo
- Lubin, David. 1995. El sorgo y el mijo en la nutrición humana – Cap. 4: Composición Química y Valor Nutritivo, Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 27, Roma – Italia. Disponible en línea: http://www.cd3wd.com/CD3WD_40/INPHO/VLIBRARY/T0818/E/ES/T0818S00.HTM#CONTEN
- Maldonado Robles, Arnulfo. 2002. Esquema general del cultivo del hongo seta. Editado por la Dirección General de Desarrollo Económico y Rural de la Delegación de Tláhuac, AGROTLÁHUAC, Ciudad de México, p. 2-9, 18-19. Disponible en línea: <http://www.geocities.com/agrotlahuac/esquemahongo.html>

- Markmann, Carlos. 2000. La levadura de Cerveza. Disponible en línea: http://www.alimentariaonline.com/desplegar_notas.asp?did=150
- Moreno, Astrid Z. y Torrenegra, Rubén. 2000. Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico en el medio PDC-X-4910 de hongos filamentosos aislados de partes aéreas de la planta *Espeletia barclayana*. Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. p. 9– 11. Disponible en línea: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencia/gifuj/Medios%20procedimientos%20artEDculos.PDF>
- Muñoz, Alberto. 2007. Propiedades terapéuticas de la Miel, de Wikipedia, la enciclopedia libre. Disponible en línea: <http://es.wikipedia.org/wiki/Miel>
- Noruby M, Suárez A; Xiomara, M; Mesa M, Luz; León – Pinto Gladys. 2005. Crecimiento de *Trichoderma reesei* en medio con base en el exudado gomoso de *Enterolobium cyclocarpum*. Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Venezuela, Volumen Centro Invest. Biol. v.39 n.1 Maracaibo. Disponible en línea: <http://www.serbi.luz.edu.S0375-538X2005004000004&lng=es&nrm=iso>
- Pellizzari, Esther. 2004. Estructuras Fúngicas - Lecciones Hipertextuales de Botánica, Departamento de Biología, Universität Hamburg. Disponible en línea: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/hongos0.htm>
- Popoff, Orlando. (s.f.) Reino Fungí. Instituto de Botánica del Noreste, Corriente Argentina, p. 1 - 10, 12. Disponible en línea: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungi.htm>
- Porto, Samuel. 2003. Carragenina – estructura. Sao Paulo – Brasil. Disponible en línea: <http://www.agargel.com.br/carragenina-tec.html>
- Prats Jacques, M; Climent - Grandcourt; Vega, JI. 1989. Los Cereales. Publicado por Mundi - Prensa Libros, S. A., Disponible en línea: <http://books.google.com.bo/books?id=jwKhAAAACAAJ&dq=cereales>
- Regés, Ramón. 1999. Curso Básico Sobre El Cultivo del Champiñón. C.D.E.E.A., 3 – 4 p. Disponible en línea: <http://www.cdeea.com/champinon1.htm>
- SEDI/OEA, Secretaría Ejecutiva para el Desarrollo Integral (SEDI) de la Organización de los Estados Americanos. (s.f.). Capítulo 4 - Medios de Fermentación, p. 27 – 39. Disponible en línea: http://www.sedi.oas.org/espanol/http://www.science.oas.org/Simbio/mbioind/cap4_mi.pdf
- PF - H (Proyecto Forestal - Hongos). 2005. Documentación sobre Hongos, p. 2, 4, 8 - 11, 30. Disponible en línea: <http://146.83.41.79/pforestal/files/hongos.doc>

Song, Baek Cho. 2005. Manual del cultivador de Hongos I, Cultivo de hongo Ostra. Disponible en línea: http://www.girgolas.unlugar.com/chapter01-01_p.1.pdf

UNN (Universidad Nacional del Nordeste). 2007. Fac. de Agroindustrias y Ciencias Agrarias, Trabajo Práctico, 13_micología.pdf, República Argentina p. 2-5. Disponible en: http://www.biologia.edu.ar/micologia/archivospdf/13_micologia.pdf

UNSAM (Universidad Nacional de San Martín). 2006. Industrialización de hongos comestibles. Instituto de investigaciones Biologías, Fuente: Laboratorio de Micología y Cultivo de Hongos Comestibles, p. 1 – 5. Disponible en línea: <http://www.iib.unsam.edu.ar/>

VINOTEC CHILE. 2006. Centro Tecnológico del Vino. T 154® Extracto de Levadura. Extracto de levaduras para suplementar todo tipo de mostos. p. 1. Disponible en línea: www.vinotec.com

Wikipedia. 2006. marca registrada de la organización sin ánimo de lucro Fundación Inc. Disponible en línea: http://es.wikipedia.org/wiki/Medio_de_cultivo

ANEXOS

Anexo 1

Ficha técnica Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Técnico de Chascomús * ICFC 500/03 *Agaricus bisporus*



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHASCOMÚS**

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
Universidad Nacional de General San Martín.**

Chascomús, 5 de Diciembre de 2007.

**Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Agronomía
BOLIVIA**

Normalmente no entregamos las cepas en las condiciones que viajan ahora, generalmente procuramos asegurarnos un crecimiento total en el tubo y por duplicado. Ocurre que los envíos los realizamos por correo cuando se cumplan esas condiciones. En esta oportunidad no pudimos contar con el tiempo suficiente para ello debido a que urgía la entrega en mano de las mismas. No obstante, creo que no tendrá ningún inconveniente. Mantenga las cepas a 25 °C en oscuridad hasta completar el crecimiento de la caja y después haga los repiques a tubos para preservar la cepa. Si llegara a tener algún inconveniente por favor avisenos y le hacemos un envío por correo. Una vez que haga fructificar vuelva a aislar la cepa de algún ejemplar seleccionado por su calidad.

Lo saludo Atte

***ICFC 500/03**

ESPECIE: *Agaricus bisporus*.

PROCEDENCIA: Dep. of Plant Pathology. University Pennsylvania State University.

FECHA: 2003.

COLECTOR: Sin datos.

AIOLÓ: M. Abas.

DETERMINÓ: sin datos.

MEDIOS DE CULTIVO: APG, AM, MCA (medio completo para agaricos).

OBSERVACIONES: ejemplares de 25-35 mm de diámetro. Color blanco puro.

DATOS PARA CULTIVO

Temperatura óptima de Incubación: 25 °C.

Rango de temperaturas para incubación: 23-27 °C.

Temperatura óptima de fructificación: 15 °C.

Rango de temperaturas para fructificación: 14-17 °C.

Rendimientos alcanzado 20 kg /m² de sup de cultivo (base 100 kg de compost).

Sede Chascomús. Cam. Circunv. Lag. Km 6. CC 164.
(B7130IWA) Chascomús. Provincia de Buenos Aires. ARGENTINA.
Tel. 02241-424049/ 430323/424045. Fax: +54(2241)-424048.

Anexo 2

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Tipo de hongo en Em	1	7,20	7,20	25,26	0,000	**
Tipo de hongo en TSC	1	0,05	0,05	0,18	0,676	ns
Tipo de hongo en Czk	1	198,45	198,45	696,32	0,000	**
Tipo de hongo en S-M	1	1,80	1,80	6,32	0,014	*
Tipo de hongo en PSC	1	0,45	0,45	1,58	0,213	ns
Error	80	22,80	0,29			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

Anexo 3

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el prendimiento del micelio en días (PMD)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Procedencia del micelio en Em	1	5,00	5,00	17,54	0,000	**
Procedencia del micelio en TSC	1	4,05	4,05	14,21	0,000	**
Procedencia del micelio en Czk	1	61,25	61,25	214,91	0,000	**
Procedencia del micelio en S-M	1	0,80	0,80	2,81	0,098	ns
Procedencia del micelio en PSC	1	8,45	8,45	29,65	0,000	**
Error	80	22,80	0,29			

** Significativo al nivel de 1 %

ns No significativo

Anexo 4

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Tipo de hongo en Em	1	9,06	9,06	78,44	0,0000	**
Tipo de hongo en TSC	1	8,69	8,69	75,21	0,0000	**
Tipo de hongo en Czk	1	4,57	4,57	39,57	0,0000	**
Tipo de hongo en S-M	1	7,18	7,18	62,14	0,0000	**
Tipo de hongo en PSC	1	2,84	2,84	24,55	0,0000	**
Error	80	9,24	0,12			

** Significativo al nivel de 1 %

Anexo 5

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el crecimiento radial del micelio en cm (CRM)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Procedencia del micelio en Em	1	0,27	0,27	2,37	0,128	ns
Procedencia del micelio en TSC	1	0,13	0,13	1,14	0,290	ns
Procedencia del micelio en Czk	1	4,74	4,74	41,07	0,000	**
Procedencia del micelio en S-M	1	0,65	0,65	5,61	0,020	*
Procedencia del micelio en PSC	1	2,40	2,40	20,79	0,000	*
Error	80	9,24	0,12			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

Anexo 6

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Tipo de hongo en Em	1	42,05	42,05	25,72	0,000	**
Tipo de hongo en TSC	1	490,05	490,05	299,72	0,000	**
Tipo de hongo en Czk	1	605	605,00	370,03	0,000	**
Tipo de hongo en S-M	1	96,8	96,80	59,20	0,000	**
Tipo de hongo en PSC	1	8,45	8,45	5,17	0,026	**
Error	80	130,8	1,64			

** Significativo al nivel de 1 %

Anexo 7

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción procedencia del micelio por medio de cultivo en el tiempo de cobertura superficial en días (TCS)

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig.
Procedencia del micelio en Em	1	18,05	18,05	11,04	0,001	**
Procedencia del micelio en TSC	1	312,05	312,05	190,86	0,000	**
Procedencia del micelio en Czk	1	20	20,00	12,23	0,001	**
Procedencia del micelio en S-M	1	57,8	57,80	35,35	0,000	**
Procedencia del micelio en PSC	1	68,45	68,45	41,87	0,000	**
Error	80	130,8	1,64			

** Significativo al nivel de 1 %

* Significativo al nivel de 5 %

ns No significativo

Anexo 8

Análisis de varianza de efectos simples para la interacción tipo de hongo por medio de cultivo en la determinación de biomasa del micelio g/ml de mc (BM)

FV	GL	SC	CM	F	P>F	Sig.
Tipo de hongo en Em	1	0,12	0,12	61,41	0,000	**
Tipo de hongo en TSC	1	0,26	0,26	129,86	0,000	**
Tipo de hongo en Czk	1	0,36	0,36	179,06	0,000	**
Tipo de hongo en S-M	1	1,65	1,65	827,83	0,000	**
Tipo de hongo en PSC	1	0,09	0,09	44,59	0,000	**
Error	80	0,16	0,00			

** Significativo al nivel de 1 %

Anexo 9

Costo de producción para la preparación de 1 Lt de Medio de Cultivo

Tipo de cambio para todos los cálculos 7,07 Bs/U\$

Concepto	Unidad	Cantidad	Total Bs	Total \$us
Cepa*ICFC 500/03 <i>Agaricus bisporus</i>	Pza.	1	567,2	80,23
Em			1,87	0,26
Ext. de malta	g	15	0,45	0,064
Glucosa	g	20	0,4	0,057
Sacarosa	g	5	0,03	0,004
Carragenina	g	15	0,99	0,140
TSC			1,49	0,21
Triguillo	g	100	0,33	0,05
Sacarosa	g	30	0,17	0,02
Carragenina	g	15	0,99	0,14
Czapek			3,31	0,47
NaNO ₃	g	2,5	0,06	0,01
K ₂ HPO ₄	g	2,5	1,75	0,25
KCl	g	2,5	0,25	0,04
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	g	2,5	0,05	0,01
FeSO ₄	g	2,5	0,04	0,01
Sacarosa	g	30	0,17	0,02

Carragenina	g	15	0,99	0,14
S-M			6,92	0,98
Ext. de levadura de cerveza	g	20	1,67	0,24
Miel	g	80	4,27	0,60
Carragenina	g	15	0,99	0,14
PSC			4,36	0,62
Papa	g	400	3,20	0,45
Sacarosa	g	30	0,17	0,02
Carragenina	g	15	0,99	0,14
Materiales			692,69	97,98
Cajas petri	Pza.	25	450,00	63,65
Tubos de ensayo	Pza.	25	75,00	10,61
Papel plástico	Pza.	1	24,60	3,48
Papel aluminio	Pza.	1	25,60	3,62
Papel sabana	Pliego	20	1,00	0,14
Algodón 400 g	Pza.	1	21,29	3,01
Alcohol	Lt.	10	80,00	11,32
Lavandina	Pza.	8	15,20	2,15
Equipos de Laboratorio (alquilado)			450,00	63,65
Autoclave	meses	1	150,00	21,22
Cámara de flujo laminar	meses	1	150,00	21,22
Otros 30 %	meses	1	150,00	21,22
Mano de obra			128,00	18,10
Preparación del MC	Hr.	8	64,00	9,05
Inoculación	Hr.	8	64,00	9,05

Anexo 10

Cálculo de ingresos obtenidos en la producción del inóculo master o cepa inicial

Ingresos	Unidad	Em	TSC	Czk	S-M	PSC
Producción	Lt/cp	40	40	40	40	40
Perdida de 10%	Lt/cp	4	4	4	4	4
Rend. ajustado	Lt/cp	36	36	36	36	36
Precio	Bs/cp	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Total		2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00

Anexo 11

Costos de producción e ingresos de inóculo master o cepa inicial de los hongos utilizados en el presente estudio

<i>Agaricus campestris</i> por Segmentos de tejido						<i>Agaricus campestris</i> por Esporas				
Totales	Em	TSC	Czk	S-M	PSC	Em	TSC	Czk	S-M	PSC
Mano de obra	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00
Costo del MC	1,87	1,49	3,31	6,92	4,36	1,87	1,49	3,31	6,92	4,36
Materiales	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69
Equipos de laboratorio	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00
Incubación	150,00	210,00	210,00	150,00	154,00	132,00	125,00	160,00	160,00	90,00
Costos variables	1422,56	1482,18	1484,00	1427,61	1429,05	1404,56	1397,18	1434,00	1437,61	1365,05
Beneficio bruto	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00
Beneficio neto	737,44	677,82	676,00	732,39	730,95	755,44	762,82	726,00	722,39	794,95
Costos de producción	39,52	41,17	41,22	39,66	39,70	39,02	38,81	39,83	39,93	37,92

<i>Agaricus bisporus</i> por Segmentos de tejido						<i>Agaricus bisporus</i> por Esporas				
Totales	Em	TSC	Czk	S-M	PSC	Em	TSC	Czk	S-M	PSC
Cepa <i>Agaricus bisporus</i>	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20	567,20
Mano de obra	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00	128,00
Costo del MC	1,87	1,49	3,31	6,92	4,36	1,87	1,49	3,31	6,92	4,36
Materiales	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69	692,69
Equipos de laboratorio	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00
Incubación	127,00	115,00	115,00	121,00	115,00	126,00	121,00	145,00	145,00	142,00
Costos variables	1966,76	1954,38	1956,20	1965,81	1957,25	1965,76	1960,38	1986,20	1989,81	1984,25
Beneficio bruto	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00	2160,00
Beneficio neto 1*	193,24	205,62	203,80	194,19	202,75	194,24	199,62	173,80	170,19	175,75
Costos de producción 1*	54,63	54,29	54,34	54,61	54,37	54,60	54,45	55,17	55,27	55,12
Beneficio neto 2*	760,44	772,82	771,00	761,39	769,95	761,44	766,82	741,00	737,39	742,95
Costos de producción 2*	38,88	38,53	38,58	38,85	38,61	38,85	38,70	39,42	39,52	39,36

1* Primera producción; 2* Segunda producción

Anexo 12

Costo de producción para la producción de 30 kg de semilla de hongo o “spawn” de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*

Tipo de cambio para todos los cálculos 7,07 Bs/U\$

Concepto	Unidad	Cantidad	Total Bs	Total \$us
Materia prima				
Sustrato 1			148,92	21,06
Sorgo	@	1	28	3,96
Yeso	g	226,80	0,68	0,10
Cal	g	79,38	0,24	0,03
Cepa <i>Agaricus sp.</i>	cp	2	120,00	16,97
Sustrato 2			148,92	21,06
Cebada	@	1	28	3,96
Yeso	g	226,80	0,68	0,10
Cal	g	79,38	0,24	0,03
Cepa <i>Agaricus sp.</i>	cp	2	120,00	16,97
Sustrato 3			195,92	27,71
Trigo	@	1	75	10,61
Yeso	g	226,80	0,68	0,10
Cal	g	79,38	0,24	0,03
Cepa <i>Agaricus sp.</i>	cp	2	120,00	16,97
Materiales			208,89	29,55
Frascos de vidrio	Pza.	50	75,00	10,61
Papel madera	Pliego	10	15,00	2,12
Ligas de goma	Bolsa ¼	1	10,00	1,41
Algodón 400 g	Pza.	1	21,29	3,01
Alcohol	Lt.	10	80,00	11,32
Lavandina	Pza.	4	7,60	1,07
Equipo de Laboratorio (alquilado)			450,00	63,65
Autoclave	meses	1	150,00	21,22
Cámara de flujo laminar	meses	1	150,00	21,22
Otros 30 %	meses	1	150,00	21,22
Mano de obra			320,00	45,26
Preparación del sustrato	Hr.	24	192,00	27,16
Inoculación	Hr.	16	128,00	18,10

Anexo 13

Cálculo de ingresos obtenidos en la producción de 30 kg de semilla o “spawn” inoculada con cepa inicial de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus*

Ingresos	Unidad	Sustrato 1 (Sorgo)	Sustrato 2 (Cebada)	Sustrato 3 (Trigo)
Producción	kg	30,00	30,00	30,00
Perdida de 10%	kg	3,00	3,00	3,00
Rend. ajustado	kg	27,00	27,00	27,00
Precio	Bs/kg	75,00	75,00	75,00
Total		2025,00	2025,00	2025,00

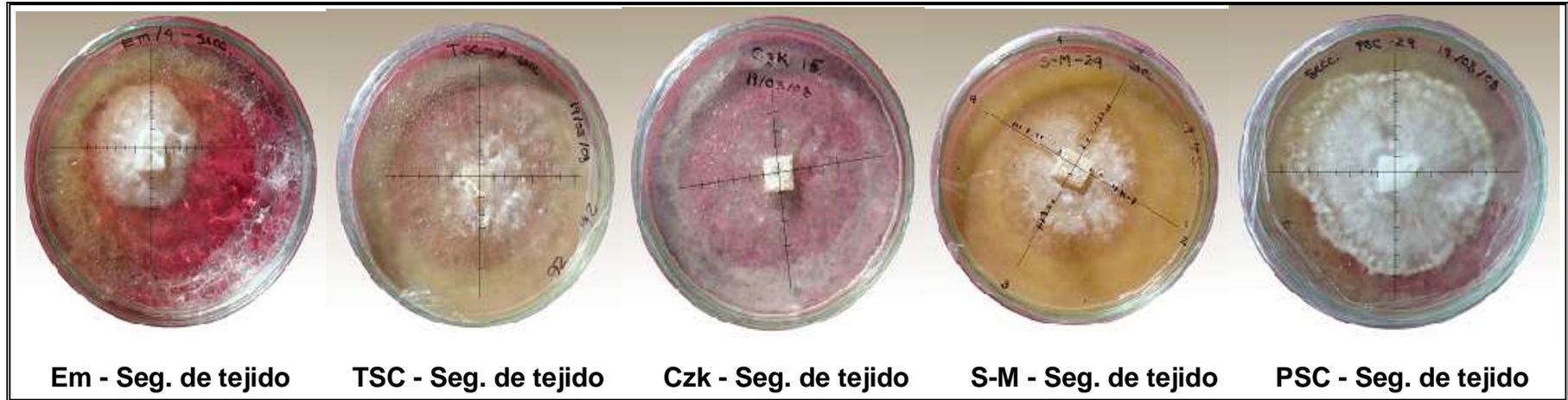
Anexo 14

Costos de producción e ingresos de semilla de hongo o “spawn” inoculada con cepa inicial de los hongos utilizados en el presente estudio

<i>Agaricus campestris</i> por Segmentos de tejido				<i>Agaricus campestris</i> por Esporas		
Totales	Sustrato 1 (Sorgo)	Sustrato 2 (Cebada)	Sustrato 3 (Trigo)	Sustrato 1 (Sorgo)	Sustrato 2 (Cebada)	Sustrato 3 (Trigo)
Materia prima	148,92	148,92	195,92	148,92	148,92	195,92
Materiales	208,89	208,89	208,89	208,89	208,89	208,89
Equipos de laboratorio	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00
Mano de obra	320,00	320,00	320,00	320,00	320,00	320,00
Incubación	255,50	264,50	219,50	269,00	269,00	211,50
Costos variables	1383,31	1392,31	1394,31	1396,81	1396,81	1386,31
Beneficio neto	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00
Costos de producción	51,23	51,57	51,64	51,73	51,73	51,34

<i>Agaricus bisporus</i> por Segmentos de tejido				<i>Agaricus bisporus</i> por Esporas		
Totales	Sustrato 1 (Sorgo)	Sustrato 2 (Cebada)	Sustrato 3 (Trigo)	Sustrato 1 (Sorgo)	Sustrato 2 (Cebada)	Sustrato 3 (Trigo)
Materia prima	148,92	148,92	195,92	148,92	148,92	195,92
Materiales	208,89	208,89	208,89	208,89	208,89	208,89
Equipos de laboratorio	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00	450,00
Mano de obra	320,00	320,00	320,00	320,00	320,00	320,00
Incubación	204,00	274,00	138,00	148,00	162,00	115,00
Costos variables	1331,81	1401,81	1312,81	1275,81	1289,81	1289,81
Beneficio neto	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00	2025,00
Costos de producción	49,33	51,92	48,62	47,25	47,77	47,77

Anexo 15. Medios de cultivo inoculados con *Agaricus campestris* - Procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas - Foto 1



Anexo 16. Medios de cultivo inoculados con *Agaricus bisporus* - Procedencia del micelio por segmentos de tejido y esporas - Foto 2



Anexo 17. Promedios de PMD, CRM, TCS y BM para *Agaricus campestris* en la procedencia del micelio por medio de cultivo (fotos 1)

	Em		TSC		Czk		S-M		PSC	
	Seg. de Tejido	Esporas								
PMD	3,40	2,20	3,20	1,60	14,60	9,60	3,60	2,60	3.40	2,20
CRM	1,34	1,75	1,96	2,60	1,41	1,20	2,01	1,75	2.05	2,08
TCS	30.00	26.40	42.00	25.00	42.00	32.00	30.00	32.00	30.80	18.00
BM	0,666	0,778	0,625	0,717	0,020	0,060	0,282	0,351	0,706	0,713

Promedios de PMD, CRM, TCS y BM para *Agaricus bisporus* en la procedencia del micelio por medio de cultivo (fotos 2)

	Em		TSC		Czk		S-M		PSC	
	Seg. de Tejido	Esporas								
PMD	4,40	3,60	2,60	2,40	6,80	4,80	2,80	4,60	3,20	1,80
CRM	2,87	2,92	3,75	3,44	1,18	3,34	2,58	3,56	3,52	3,09
TCS	25.40	25.20	23.00	24.20	23.00	29.00	24.20	29.00	23.00	28.40
BM	0,873	0,883	0,895	0,901	0,263	0,351	0,860	0,922	0,842	0,894

Anexo 18. Semilla o "spawn" de *Agaricus campestris* - Foto 3



Sorgo – Seg. de Tejido



Sorgo - Esporas



Cebada – Seg. de Tejido



Cebada - Esporas



Trigo – Seg. de Tejido



Trigo - Esporas

Anexo 19. Semilla o "spawn" de *Agaricus bisporus* - Foto 4



Sorgo – Seg. de Tejido



Sorgo - Esporas



Cebada – Seg. de Tejido



Cebada - Esporas



Trigo – Seg. de Tejido



Trigo - Esporas

Anexo 20. Promedios de DPI, CL y TID para *Agaricus campestris* en la obtención de semilla o “spawn” (fotos 3)

	Sorgo		Cebada		Trigo	
	Seg. de Tejido	Esporas	Seg. de Tejido	Esporas	Seg. de Tejido	Esporas
DPI	29,92	29,83	161,90	165,48	51,08	53,83
CL	37,00	36,00	162,79	167,69	52,92	53,75
TID	28,67	29,33	162,58	161,91	42,92	42,33

Promedios de DPI, CL y TID para *Agaricus bisporus* en la obtención de semilla o “spawn” (fotos 4)

	Sorgo		Cebada		Trigo	
	Seg. de Tejido	Esporas	Seg. de Tejido	Esporas	Seg. de Tejido	Esporas
DPI	13,08	14,08	164,88	171,54	40,83	29,58
CL	21,33	31,83	169,38	172,29	54,83	32,42
TID	17,00	13,67	176,63	166,83	27,58	23,00

Anexo 21. Prueba de germinación de semilla o “spawn” de *Agaricus campestris* y *Agaricus bisporus* - Foto 5



Anexo 22. Matriz de datos para el análisis de contrastes ortogonales

```
options ls=80 ps=80 nodate nonumber;
DATA MEDIO;
INPUT rep A$ B$ C$ PMD;
CARDS;

DATOS

;
PROC GLM;
CLASS A B C;
MODEL PMD=A B C A*B A*C B*C A*B*C/ss3;

contrast 'czk-todos'      C 1 1 -4 1 1;
contrast 'psc-tsc'        C 0 1 0 0 -1;
contrast 'sm-em'          C 1 0 0 -1 0;
contrast 'psc/tsc-em/sm'  C 1 -1 0 1 -1;

contrast "ac:czk-todos"   C 1 1-4 1 1 A*C 1 1-4 1 1 0 0 0 0 0;
contrast "ac:psc-tsc"    C 0 1 0 0-1 A*C 0 1 0 0-1 0 0 0 0 0;
contrast "ac:sm-em"      C 1 0 0-1 0 A*C 1 0 0-1 0 0 0 0 0 0;
contrast "ac:psc/tsc-em/sm" C 1-1 0 1-1 A*C 1-1 0 1-1 0 0 0 0 0;

contrast "ab:czk-todos"  C 1 1-4 1 1 A*C 0 0 0 0 0 1 1-4 1 1;
contrast "ab:psc-tsc"    C 0 1 0 0-1 A*C 0 0 0 0 0 0 1 0 0-1;
contrast "ab:sm-em"      C 1 0 0-1 0 A*C 0 0 0 0 0 1 0 0-1 0;
contrast "ab:psc/tsc-em/sm" C 1-1 0 1-1 A*C 0 0 0 0 0 1-1 0 1-1;

contrast "s:czk-todos"   C 1 1-4 1 1 B*C 1 1-4 1 1 0 0 0 0 0;
contrast "s:psc-tsc"    C 0 1 0 0-1 B*C 0 1 0 0-1 0 0 0 0 0;
contrast "s:sm-em"      C 1 0 0-1 0 B*C 1 0 0-1 0 0 0 0 0 0;
contrast "s:psc/tsc-em/sm" C 1-1 0 1-1 B*C 1-1 0 1-1 0 0 0 0 0;

contrast "e:czk-todos"   C 1 1-4 1 1 B*C 0 0 0 0 0 1 1-4 1 1;
contrast "e:psc-tsc"    C 0 1 0 0-1 B*C 0 0 0 0 0 0 1 0 0-1;
contrast "e:sm-em"      C 1 0 0-1 0 B*C 0 0 0 0 0 1 0 0-1 0;
contrast "e:psc/tsc-em/sm" C 1-1 0 1-1 B*C 0 0 0 0 0 1-1 0 1-1;

MEANS A B C / DUNCAN TUKEY;
MEANS A B C A*B A*C B*C A*B*C;
RUN;
QUIT;
```