

AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL HONGO COMESTIBLE ***Pleurotus afin ostreatus* (jacq. ex Fr) Kumm** **EN TINGO MARIA**

Rolando A. Ríos Ruiz *

Ladislao Ruiz Rengifo **

RESUMEN

Los hongos comestibles constituyen un gran potencial alimenticio para las regiones de la Amazonía donde abundan en forma natural. Con la finalidad de estudiar la metodología más adecuada del desarrollo de la seta comestible *Pleurotus afin ostreatus* se realizó un estudio en la región de Tingo María. Inicialmente se estudió el aislamiento y cultivo del hongo a partir de tejidos y basidiosporas y su identificación; luego se evaluó los efectos de medios de cultivos, los de luz y los de temperatura en el desarrollo micelial y de basidiocarpos.

Los resultados demostraron que el mayor promedio de desarrollo micelial se consiguió a partir de aislamiento y cultivo de tejidos del hongo previa desinfección.

Por sus características externas e internas o microscópicas se identificó al hongo como *Pleurotus afin ostreatus*. Mejor desarrollo micelial, mayor formación de basidiocarpos se tuvo mediante el medio de cultivo de trigo autoclavado. Para efectos de condiciones de luz, mayor desarrollo micelial se consiguió usando el medio de cultivo de trigo autoclavado sometido a oscuridad, mientras que para el desarrollo de basidiocarpos resultó mejor los tratamientos sometidos a luz. Ambos procesos con un rango de temperatura entre 25° a 29° C.

Palabras claves: Hongos comestibles, aislamiento, cultivo, biología, *Pleurotus afin ostreatus*, Tingo María.

* Director del Centro Regional (Ie Investigación IIAP-Tingo María.

** Ingeniero en Recursos Renovables.

INTRODUCCION

Nuestro país, al igual que la mayoría de los países del orbe tienen que enfrentar el problema cada día más agudo del incremento de la población, que está ocasionando, entre otros resultados, que los

habitantes dispongan en promedio, de menos tierra cultivable y carezcan cada vez más de productos alimenticios. Esta circunstancia nos debe estimular a incrementar la eficiencia productiva y con ello aprovechar mejor nuestros recursos naturales, así como los productos orgánicos que se derivan directa o indirectamente del sector agropecuario.

Nuestra Amazonía Peruana, está constituida por una vasta y variada cantidad de recursos naturales mitológicos; entre ellos, los hongos comestibles que poco o nada se aprovechan a pesar de su gran contenido proteico. Los análisis modernos conducen a la conclusión sin disyuntivas que las setas, en general, se pueden comparar en valor nutritivo, calorías y vitaminas con los productos hortícolas (Singer 1964). Estos hongos constituyen un recurso del bosque que, frecuentemente, no se toma en cuenta en los estudios etnobotánicos y, a menudo, son comestibles para los indígenas amazónicos y constituyen un importante alimento para algunas tribus, quienes lo denominan “Oreja de palo”, “Callampa” y que es un plato favorito por sus cualidades culinarias.

De las 600 especies de hongos comestibles conocidos hoy apenas algunas, aproximadamente 20, son utilizadas comercialmente, como por ejemplo *Lentinus edodes* Berc. (Shiitake), *leurotus* sp., *Volvariella* sp. etc. En el mundo ya existen tecnologías de cultivo de setas comestibles (Singer, 1964); Lambert, 1977; Mignucci, 1986; Botelho y Ramos, 1985), entretanto el uso de ellos y su adaptación deben ser realizados para cada hongo comestible y en cada condición y/o región.

Para tener un cultivo comercial de hongos comestibles es necesario conocer las especies prevalecientes en la región y determinar los factores que influyen en su desarrollo y crecimiento. El escaso o nulo conocimiento de las especies de hongos comestibles y su propagación en la región de Tingo María, ha impulsado a los autores a iniciar su estudio. Este trabajo se propuso estudiar “in vitro” la metodología más adecuada de desarrollo de la seta comestible *leurotus afinostreatus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO Y RECOLECCIÓN DEL HONGO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad nacional Agraria de la Selva (UNAS), Tingo María; ubicado geográficamente a 75° 35' Oeste, 09° 09' Sur y 670 m.s.n.m.;² con una temperatura media de 24°C y una humedad relativa promedio de 82%. Dentro de la clasificación de Holdridge está ubicado como formación vegetal de bosques muy húmedo subtropical. La muestra del hongo se recolectó del Jardín Botánico y bosques adyacentes de la UNAS, observando con sumo cuidado sus características: sabor, olor, forma, tamaño, sustrato donde desarrolla, hábitat, disposición de sus láminas, etc. Con el hongo se procedió a su identificación y se estudió el efecto de diferentes condiciones de luz y temperatura sobre el crecimiento micelial y desarrollo basidiocarpos.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Se procedió en base al cultivo de basidiosporas y de tejido. para aislar esporas se tuvo que limpiar bien al hongo recolectado, luego se colocó en una placa petri dispuesto el himenio hacia la placa. De ocho a diez horas se notó en el fondo de la placa una esporada en forma de polvillo blanco. Las esporas, diluidas en hipoclorito de sodio y esporas diluidas únicamente en agua, se inocularon con una gota de dilución en el medio de cultivo de trigo autoclavado. En el cultivo de tejidos, se procedió a lavar el hongo cuidadosamente en agua corriente, enseguida se cortó en pequeños fragmentos del pleténquima del cuerpo fructificante y éstos fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio y luego sembrados en placa petri conteniendo trigo autoclavado, siempre junto a la llama de un mechero de una cámara de cultivo de flujo laminar.

La purificación de las sepas (micelio) se consiguió transfiriendo, semanalmente, discos miceliales del borde de la colonia hacia otros medios de cultivo. Todos los métodos y técnicas de laboratorio usados fueron los de Echeandi, 1967, Gonzales, 1969 y French, 1984.

IDENTIFICACIÓN

Para la identificación del hongo se tuvo que recurrir básicamente a estudiar sus características internas o microscópicas ayudadas de claves de identificación y la confirmación de otros profesionales.

COMPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

Se estudió once medios; trigo autoclavado, arroz autoclavado, aserrín semidescompuesto, extracto de ocho verduras-agar, extracto de zanahorias-agar, agar papa dextrosa, tierra humificada, estiércol de ganado vacuno, trocitos de madera, aserrín más trigo, aserrín más arroz. La preparación de estos medios de cultivos, mayormente naturales, se basó en ensayos preliminares efectuados, en cuanto al procedimiento general de su preparación y casi siempre incluido un 10% de volumen de agua agregado a un determinado - peso sustrato, a fin de que dicho medio obtenga una humedad adecuada a las exigencias del hongo. Para la siembra se usó un patrón de inóculo para todos los tratamientos, que consistió en un disco de micelio de 7 mm. de diámetro el que se obtuvo de la cepa de micelio joven purificado, mediante un sacabocado esterilizado junto a la llama de un mechero en una cámara aséptica. Luego las placas en tratamiento se las colocó en una estufa a temperatura de 27°C. Cada tratamiento constituyó cinco placas y cada placa una repetición.

EFECTO DE LA LUZ EN EL DESARROLLO DEL HONGO

Se estudió los siguientes tratamientos: luz natural del laboratorio, oscuridad total, oscuridad total más luz natural, luz natural más oscuridad total. Para este efecto se empleó el medio trigo autoclavado por ser el mejor medio según la prueba anterior.

Luego de la siembra del micelio según metodología expuesta, las placas del tratamiento luz natural de laboratorio, fueron colocadas cerca de una ventana grande, las placas sometidas a oscuridad total fueron empacadas con papel y expuestas a la estufa; las placas de los tratamientos combinados permanecieron durante 12 días en una condición y luego colocadas en la otra.

EFECTO DE A TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DEL HONGO

Se estudió cuatro tratamientos: temperatura ambiente de laboratorio, temperatura de 27°C, temperatura ambiente de laboratorio más temperatura ambiente. Para ello se usó una estufa graduada de 27 °C y el ambiente de laboratorio que registró una variación de 27 + 4°C. En cuanto al medio de cultivo empleado a la técnica de siembra, fue similar al estudio anterior.

Para todos los efectos estudiados se evaluó el diámetro de la colonia medida en centímetros durante los días en que el micelio logró invadir toda el área de la placa (9 cm. de diámetro); el número de primordios y de basidiocarpos desarrollados contados durante los primeros cuatro días desde su aparición y el período de fructificación del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO

Los resultados sobre la técnica de aislamiento y cultivo de micelio, a partir de tejidos y basidiosporas del hongo con inóculo con y sin desinfectar, se presenta en el cuadro 1.

Se observa mejor crecimiento micelial cuando se aísla de tejidos de basidiocarpos debidamente desinfectados. Botelho y Ramos (1985), recomienda hacer aislamientos y cultivos a partir de tejidos de basidiocarpos previamente desinfectados, por ser un método más diciente. Asimismo, no es posible obtener cultivos puros a partir de basidiosporas y tejidos sin antes lograr una técnica adecuada de desinfección, ya que al recolectar los basidiocarpos del campo, éstos vienen contaminados de otros microorganismos, especialmente de bacterias que desarrollan con mayor rapidez en el medio inhibiendo el desarrollo del hongo. Cultivos puros se los obtiene sólo cuando rigurosamente se trabaja con total asepsia. Cuando algunos de estos cultivos se los mantuvo en el laboratorio, se notó una degeneración a partir de los 3 - 4 meses de edad. Leal (1981); ello indica que existe en los hongos comestibles, el fenómeno de senescencia después de un largo almacenamiento.

IDENTIFICACION

Según sus características externas el pileo del hongo comestible en estudio mide de 3 a 7 cm de ancho, presenta una coloración blanco cremoso y marrón claro hacia la base. Su forma flasdiforme es semejante a pétalos de flor, con láminas blanquecinas no divididas longitudinalmente y no muy apretadas entre sí, sin fragilidad apreciable; su piel lateral es corta y consistente; es suhcaroso con olor y sabor agradable; crece solitario o en conjunto sobre troncos podridos en los bosques; su estructura es sólida y al envejecer se putrefacta, es efímera. Según sus características internas las esporas vistas al microscopio son completamente hialinas. En grandes acumulaciones aparecen de color blanco y, por lo tanto, no cambian el color de las laminillas cuando las setas están en sazón; las esporas son binucleadas y elipsoida, miden de 4 a 5 micras. Las

características arriba mencionadas coinciden con las especificadas para el género *Pleurotus afin ostreatus* (Guzmán 1977). Muestras de micelio, basidiocarpos secos y conservados en solución de formol-alcohol-agua (FAA), fueron enviados a la Dra Pavlich, especialista en taxonomía micología de la Universidad Cayetano Heredia, que confirmó pertenecer este hongo al género *Pleurotus* y a la especie *afin ostreatus*. Muestras en FAA y en seco fueron depositadas en el herbario micológico del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía y el Herbario Botánico del Departamento de Biología de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Muestras del hongo en estudio fueron enviadas al Laboratorio de Nutrición de la UNAS, donde se realizó el análisis de su valor nutritivo (cuadro 2), resaltando su alto valor proteico.

COMPARACION DE MEDIOS DE CULTIVOS

Existe alta significación estadística entre los medios de cultivo estudiados (cuadro 3). Los medios de cultivo de extracto de ocho verduras y extracto de zanahoria son superiores estadísticamente respecto a los demás, entretanto ¿éstas presentaron un crecimiento micelial muy superficial. En cambio los medios de cultivo de aserrín, trocitos de madera, tierra humificada, trigo, arroz más trigo y arroz más aserrín, tuvieron un crecimiento micelial semejante entre sí, apreciable por la colonización interna del medio, que es requisito indispensable para la producción de basidiocarpos. Por ello además del crecimiento debe tomarse en cuenta la robustez y buena conformación del micelio en los medios que lo estudian.

En relación al número de primordios y de basidiocarpos el medio de cultivo de trigo autoclavado fue superior estadísticamente respecto a los demás seguidos de los medios de arroz y arroz más trigo (cuadro 3). Ello se debe a que estos cereales contienen alto porcentaje de carbohidratos de los que puede disponer con facilidad el micelio del hongo (Singer 1964). Por otro lado, los medios de extracto de ocho verduras y de zanahoria no han tenido capacidad de producir primordios y menos basidiocarpos por la consistencia de los medios y de su colonización.

Referente a los medios de cultivos de aserrín y trocitos de madera, a pesar de tener un desarrollo micelial regular no brotaron primordios, debido posiblemente a que dichos sustratos no estuvieron descompuestos totalmente como refiere la literatura (Leal, 1981; Botelho y Ramos, 1985). Referente al medio de tierra humificada, se notó desarrollo micelial, pero no emergió

primordios, debido que este hongo es lignocelulósico en gran medida y el contenido de lignina en este medio es insuficiente para la inducción a la formación de basidiocarpos. Leal (1981), menciona que los géneros *Pleutos* sp. *Lentinus* edodes se encuentran en los troncos de los árboles, pero sin embargo pueden ser cultivados en ciertos tipos de desperdicios lignocelulósicos, tal como el caso de *Pleutos* sp. que se puede cultivar en olotes y maíz y diversos tipos de pajas. Asimismo, en el medio estiércol de ganado vacuno tampoco se obtuvo primordios, posiblemente debido a que dicho estiércol estuvo un poco fresco y el contenido de amoníaco era relativamente alto, el cual inhibe el crecimiento del micelio (Singer 1964).

EFEECTO DE LA LUZ EN EL DESARROLLO DEL HONGO

En cuanto al desarrollo micelial se encontré alta significación estadística entre los tratamientos de luz estudiados (cuadro 4). Los tratamientos, oscuridad total más luz natural de laboratorio y oscuridad total, son superiores estadísticamente a los demás. Nos indica, por lo tanto, que el micelio de este hongo desarrolla mejor en condiciones de oscuridad, siendo su comportamiento similar a su condición natural, donde el hongo coloniza primero en un ambiente poco iluminado. Características de la influencia de la oscuridad en el crecimiento micelial de los hongos, son tratados por Leal (1981 y Singer (1964). A diferencia de lo anterior la mayor producción de primordios y basidiocarpos se obtuvo con los tratamientos sometidos a la luz (cuadro 4), determinándose que la luz influye en la fase reproductiva del hongo en estudio. Leal (1981), manifiesta que las condiciones que favorecen la propagación vegetativa no son las mismas que propician el cambio a la fase reproductiva (fructificación).

EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DEL HONGO

Se encontró alta significación estadística entre los tratamiento; temperaturas estudiadas para el parámetro desarrollo micelial. Los tratamientos con temperaturas constantes de 27°C fueron superiores estadísticamente al de las temperaturas variables de ambiente de laboratorio. En cambio para el número de primordios y el de carpos, en términos generales, sucedió lo contrario alcanzando mayores números las temperaturas variables de ambiente de laboratorio (cuadro 5).

Esto significa que de 25 a 29 grados centígrados de temperatura el rango óptimo para el crecimiento y desarrollo del hongo *Pleurotus afin ostreatus*. Leal (1981) manifiesta que existe una influencia significativa de la temperatura sobre

el desarrollo vegetativo de cada hongo; por ejemplo la *Volvariella volvacea* tiene optimo de 35°C y *Agaricus hiporus* de 25°C.

Tanto para el efecto de luz como el de temperatura aquellos tratamiento lo hicieron en menor tiempo (28 días), a diferencia de los demás tratamientos que desarrollaron en mayor tiempo (33 días). Esto nos indica que una combinación de factores favorables permite una producción de basidiocarpos también prematuramente.

Estudios iniciales con hongos comestibles en nuestra región son de necesidad prioritaria ya que permitirán por un lado conocer sus características de desarrollo, lo que permitirá la producción de inóculo necesario para su propagación en mayor escala comercial y por otro iniciar estudios sobre la propagación en diferentes sustratos y/o subproductos así como en diferentes especies forestales.

CONCLUSIONES

Por sus características externas e internas se determinó que el hongo comestible en estudio pertenece al género *Pleurotus* afin *ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm; obteniéndose buen desarrollo cuando se aísla de tejidos de basidiocarpos desinfectados y se cultiva en medios de trigo y arroz autoclavado.

El crecimiento micelial es abundante bajo tratamientos sometidos a oscuridad; mientras que para el desarrollo de primordios y basidiocarpos es necesario la influencia de la luz.

El desarrollo micelial mostró eficiencia cuando fue sometida a temperatura de 27°C, mientras que el desarrollo de primordios y basidiocarpos necesita de temperatura de entre 25 a 28°C.

BIBLIOGRAFIA

- BOTELHO, T.S. y RAMOS, B.V. 1985. "Cogumelos comestiveis" Sao Paulo Brasil, Ed. Icome. 83 p.
- BOYCE, J.S. 1961. *Forest Patthology*. McGraw Hill Book Co. 3 Ed. London-New York. 300 p.

- ECHEANDI, E. 1967. "Manual de Laboratorio para Fitopatología General". Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. Lima Perú. 51 p.
- FRENCH, E.B. y HERBERT, T.T. 1982. *Métodos de Investigación Fitopatológica*. San José. Costa Rica. 290 p.
- GONZALES, F.R. y ABAD, C.J. 1969. "Técnicas y métodos de laboratorio para el estudio de los Hongos Xilófagos". Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú; 34 p.
- GUZMAN, H.D. 1977. *Identificación de los hongos comestibles venenosos, alucinantes y destructores de la madera*. Ed. Limusa S.A. Mexico. 236 p.
- GILMAN, J.C. 1963. Manual de los hongos del suelo. 2da. Ed. Compañía Editora Continental SA. Mexico 130 p.
- LAMBERT, E.B. 1977. 'El cultivo del Champiñón'. Centro Regional de Ayuda Técnica. Mexico/Buenos Aires. 12 p.
- LEAL, L.H. 1981. "Producción de hongos comestibles". ROY y VINIEGRA, D.F. Ed. A.G.T. S.A. 10 p.
- MIGNUCCI, J. 1986. "Perspectivas para el cultivo de setas en Puerto Rico y el Caribe". Recinto Universitario de Mayaguez. Puerto Rico. 24 p.
- SINGER, L. 1964. *Las setas y las trufas, la botánica, el cultivo y la utilización*. Ed. Continental. Mexico. 470p.

CUADRO 1

**DIÁMETRO PROMEDIO DE LA COLONIA DEL AISLAMIENTO DE
TEJIDOS Y BASIDIOSPORAS DEL HONGO
COMESTIBLE *Pleurotus* *afin* *Ostreatus***

Aislamiento	Inóculo	Diámetro de la colonia (cm)				
		1d	2d.	3d.	4d.	5d.
Tejido	Sin desinfección	1.0	1.2	x	x	x
	Con desinfección	1.3	2.7	4.0	5.4	7.2
Basidiosporas	Sin desinfección	x	x	x	x	x
	Con desinfección	0.8	1.2	x	x	x

x = medios de cultivos contaminados

CUADRO 2

ANÁLISIS DEL VALOR NUTRITIVO DEL HONGO
Pleurotus afim ostreatus

Componentes	Valor nutritivo (%)
Proteínas	18.90
Grasa	1.59
Fibra	25.0
Humedad	17.85

CUADRO 3

CRECIMIENTO MICELIAL, NUMERO DE PRIMORDIOS Y DE
BASIDIOCARPOS DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus afim Ostreatus*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS

Medio de cultivo	Crecimiento Micelial (cm)1/	Número de Primordios 2/	Número de Basidiocarpo
Extracto de 8 verduras	8.9 a	1.6e	1.0 e
Extracto de zanahoria	8.7 ab	1.3 e	1.0 e
Aserrín molido	8.6 ab	1.0 e	1.0 e
Tierra humificada	8.6 ab	1.0 e	1.0 e
Trocitos de madera	8.6 ah	1.0 e	1.0 e
Trigo autoclavado	8.5 abc	7.5 a	2.2 a
Arroz sin cáscara	8.4 bc	3.4 b	1.7 bc
Aserrín más trigo	8.3 bc	2.9 be	1.7 bc
Aserrín más arroz	8.2 c	2.2 d	1.4 d
Agar papa dextrosa	5.5 d	1.0 e	1.0 e
Estiércol de ganado	4.5 e	1.0 e	1.0 e
C.V. (%)	2.8	19.4	10.3

1/ En cada columna los promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente entre sí (Tukey, P-0.05)

2/ para el análisis de varianza de los datos fueron transformados a $\sqrt{x + 1}$

CUADRO 4**CRECIMIENTO MICELIAL, NÚMERO DE PRIMORDIOS Y DEBASIDIOCARPOS DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus* afin *Ostreatus* EN DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ**

Condición de luz	Crecimiento Micelial (cm)1/	Número de Primordios 2/	Número de Basidiocarpo
Oscuridad total + luz natural de laboratorio	8.2 a	6.1 e	1.8 b
Oscuridad total	8.2 ab	3.9 e	1.4 b
Luz natural de labor. + oscuridad total	6.4 e	7.0 ab	1.9 ab
Luz natural de labor.	6.4 e	7.5 a	2.2 a
CV. (%)	1.7	6.1	19.1

CUADRO 5**CRECIMIENTO MICELIAL, NÚMERO DE PRIMORDIOS Y DE BASIDIOCARPOS DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus* afin *Ostreatus* EN DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA**

Condición de luz	Crecimiento Micelial (cm)1/	Número de Primordios 2/	Número de Basidiocarpo
27° C	8.3a	4.0 d	1.7 a
27° C + T° ambiente	8.2 b	7.1 a	1.9 ab
T ° ambiente + 27 °C	6.3 c	6.0 c	1.5 c
T ° ambiente	6.3 c	7.7 a	2.1 a
C.C. > (%):	2.0	8.3	11.6

