

Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales*

Production of mushroom Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) in synthetic blocks using agroforestry wastes

Omar Romero-Arenas¹, Marco A. Martínez Guerrero[†], Miguel A. Damián Huato^{1§}, Benito Ramírez Valverde² y J. Francisco López-Olguín¹

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Centro de Agroecología-Instituto de Ciencias. 14 sur 6301. C. U. 72570 Puebla, Pue. Tel: 222 22 95 50. (biol.ora@hotmail.com; damianhuato@hotmail.com; olguin33@hotmail.com). ²Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Carretera Federal México-Puebla km 125.5, 72760, Puebla, Puebla. (bramirez@colpos.mx). [§]Autor para correspondencia: damianhuato@hotmail.com.

Resumen

El cultivo de hongos comestibles es una alternativa importante para satisfacer las necesidades alimenticias de la población, desarrollo agrícola y formación de agroindustrias en muchos lugares del mundo. Dentro de los hongos comestibles, el Shiitake posee propiedades alimenticias y medicinales importantes para la industria al utilizar los residuos agrícolas y forestales como sustrato para su producción. El objetivo de este estudio fue evaluar las fórmulas C-Agro1, 2 y 3 en la producción del hongo Shiitake, utilizando la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes* (Pegler) en bloques sintéticos, conformados por residuos agroforestales de la Sierra Norte del estado de Puebla, como es el aserrín de encino (*Quercus* sp.), restos de tallos y hojas (rastrojo) así mismo, olote triturado de maíz (*Zea mays*). La cepa CP-CA1 demostró un adecuado crecimiento micelial sobre los bloques sintéticos, con una tasa de producción de 0.38, 0.33 y 0.31% para C-Agro1, 2 y 3 respectivamente. La mayor eficiencia biológica (EB) se obtuvo en la en la fórmula C-Agro2 a los 265 días de producción, con 100.50%. La presencia de cuerpos fructíferos fue de 85% de forma regular y con un peso aproximado entre 40 a 70 g por unidad. Los resultados demostraron la factibilidad de cultivar la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes* sobre residuos agroforestales de la sierra norte del estado de Puebla.

Abstract

The cultivation of edible mushrooms is an important alternative to meet the nutritional needs of the population, agricultural development and training of agro-industries in many parts of the world. Within edible mushrooms, the shiitake mushroom has important nutritional and medicinal properties for the industry by using agricultural and forestry wastes substrate for production. The aim of this study was to evaluate the formulas C-Agro1, 2 and 3 in the production of shiitake mushroom, using the strain CP-CA1 of *Lentinula edodes* (Pegler) in synthetic blocks, made up with agroforestry wastes of the Sierra Norte, State Puebla, such as sawdust oak (*Quercus* sp.), remnants of stalks and leaves (stover) as well as crushed corn cobs (*Zea mays*). The CP-CA1 strain showed adequate mycelial growth on the synthetic blockes, with a production rate of 0.38, 0.33 and 0.31% for C-Agro1, 2 and 3 respectively. The largest biological efficiency (EB) was obtained in the in the formula C-Agro 2, at 265 days of production, with 100.50%. The presence of fruiting bodies was 85% regularly and weighing approximately 40 to 70 g per unit. The results demonstrated the feasibility of growing the CP-CA1 of *Lentinula edodes* strain on agroforestry wastes from the northern sierra of Puebla.

* Recibido: febrero de 2015
Aceptado: junio de 2015

Palabras clave: eficiencia biológica (EB), residuos agroforestales, Shiitake, tasa de producción (TP).

Keywords: agroforestry waste, biological efficiency (EB), production rate (TP), Shiitake.

Introducción

El cultivo de hongos comestibles en América Latina ha ido en aumento en los últimos años, datos reportados por Martínez-Carrera *et al.* (2012) muestran que el período comprendido entre 1995-2001 aumentó la producción en 32%; es decir; de 49 975 a 65 951 ton de hongo fresco por año. Dentro de los países más destacados en la producción de hongos comestibles, se encuentran: México con el 58.6%, Chile con 17.6% y Brasil con 10.6% que representan 86.8% del total de la producción de hongos comestibles de América Latina. El cultivo de *Lentinula edodes* (Pegler), tuvo su origen alrededor de la década de los 80's en Guatemala, Colombia y México (Chen, 2001).

Lentinula edodes pertenece a la familia Tricholomataceae, es originario de Asia, donde Japón y China concentran la mayor producción silvestre de esta seta. Posee propiedades alimenticias y medicinales importantes para el ser humano (Stamets, 1993; Chang and Miles, 2004; Nieto *et al.*, 2012). Se destaca por sus características organolépticas, contiene el doble de proteínas que los vegetales y según Chimara (1993), tiene un componente conocido como lentinan; que ha demostrado ser un agente anti-infeccioso y anti-cancerígeno. Además, presenta glicemia, vitaminas esenciales como B1, B2, B6, B12, riboflavina, niacina, hierro y minerales que son activadores del sistema inmune y reducen el colesterol (Curvetto *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012; Suárez y Jeannette, 2013).

El cultivo del hongo Shiitake presenta ventajas económicas en su producción como: la utilización de residuos agrícolas y forestales, así como el precio en el mercado global, manejado por Japón, Taiwán y China. La explotación industrial y comercial del hongo Shiitake se ha extendido ampliamente en Europa y América, ocupando el tercer lugar en la escala de producción de hongos comestibles y medicinales del mundo (Campbell y Racjan, 1999; Moonmoon *et al.*, 2011).

La producción de Shiitake sigue creciendo en el mundo entero, así como las diversas técnicas de cultivo; un claro ejemplo es el método desarrollado por cultivadores holandeses, quienes pasteurizan el sustrato utilizado en la

Introduction

Cultivation of edible mushrooms in Latin America has been increasing in recent years, data reported by Martínez-Carrera *et al.* (2012) show that the period from 1995 to 2001% increased production by 32%; that is; from 49 975 to 65 951 ton of fresh mushroom per year. Among the highlights in the production of edible fungi countries are: Mexico with 58.6%, Chile with 17.6% and Brazil with 10.6% representing 86.8% of the total production of edible mushrooms in Latin America. The cultivation of *Lentinula edodes* (Pegler), originated around the mid- 80's in Guatemala, Colombia and Mexico (Chen, 2001).

Lentinula edodes belongs to the Tricholomataceae family it is native to Asia, where Japan and China account for most of this wild mushroom production. It has important nutritional and medicinal properties for humans (Stamets, 1993; Chang and Miles, 2004; Nieto *et al.*, 2012). It stands out for its organoleptic characteristics, contains twice the protein and vegetables, according to Chimara (1993), it has a component known as lentinan; which it proved to be an anti-infective and anti-cancer agent. In addition, presents glucose, essential vitamins such as B1, B2, B6, B12, riboflavin, niacin, iron and minerals that are activating the immune system and reduce cholesterol (Curvetto *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012; Suárez and Jeannette, 2013).

Shiitake mushroom cultivation has economic advantages in production such as: the use of agricultural and forestry residues, and the price in the global market, driven by Japan, Taiwan and China. Industrial and commercial exploitation of the fungus shiitake has spread widely in Europe and America, ranking third in the scale of production of edible and medicinal mushrooms in the world (Campbell and Racjan, 1999; Moonmoon *et al.*, 2011).

Shiitake production continues to grow worldwide as well as the various techniques for its production; a clear example is the method developed by Dutch growers, who pasteurize the substrate used in the production of Shiitake in beds, like the white-button mushrooms (*Agaricus* spp.), therefore

producción del Shiitake en camas como las setas de botón blanco (*Agaricus* spp.), por esta razón no existe un método ideal de cultivo, sino más bien, una gran variedad de métodos desarrollados con diferentes limitaciones en la producción (Lou, 1981; Soto *et al.*, 1992).

En México, se han adaptado y modificado las técnicas tradicionales para reducir el ciclo del cultivo y bajar los costos de producción al utilizar como substratos materiales antes no considerados, tales como la viruta y el aserrín de diferentes árboles, como el encino (*Quercus* sp.), pino (*Pinus* sp.), palo mulato (*Bursera* sp.) etc., (Mata *et al.*, 1990; Morales y Martínez, 1990; Morales y Martínez, 1991) y varios residuos agrícolas como el maíz (*Zea mays*), caña de azúcar (*Saccharum* sp.) avena (*Avena sativa*) etc., (Soto *et al.*, 1992; Mata y Guzmán, 1993; Mata y Gaitán, 1994; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Datos oficiales de 2006, establecen que en México se produjeron 75.73 millones de ton de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de ton corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón.

El resto, 15.60 millones de ton corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café (Valdez-Vázquez *et al.*, 2010). En el estado de Puebla se generan alrededor de 22 200 t de residuos generados por las actividades pesqueras, agrícolas, silvícolas, forestales, avícolas y ganaderas (SSAyOT, 2012). Los residuos agroforestales que se generan en el campo Poblano, como los del maíz, trigo, sorgo, avena, cebada y aserrín proveniente de maderas de pino, encino, sajo, ilite, etc., presentan gran cantidad de nutrientes para los hongos, que son capaces de metabolizarlos eficientemente (Shimomura y Hasebe, 2004).

En este trabajo se presenta un método para la producción del hongo Shiitake en bloques sintéticos conformados por residuos agroforestales más abundantes de la Sierra Norte del estado de Puebla; como es el aserrín de encino, rastrojo y olote triturado de maíz, además de utilizar grano de sorgo como inóculo para la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes*.

there is no ideal method of cultivation, but rather, they developed a variety of methods with different limitations in production (Lou, 1981; Soto *et al.*, 1992).

In Mexico, they have adapted and changed traditional techniques to reduce crop cycle and lower production costs by using as substrate materials not previously considered, such as chips and sawdust from different trees, such as oak (*Quercus* sp.), pine (*Pinus* sp.), palo mulatto (*Bursera* sp.) etc. (Mata *et al.*, 1990; Morales and Martínez, 1990; Morales and Martínez, 1991) and various agricultural residues such as corn (*Zea mays*), sugarcane (*Saccharum* sp.), oats (*Avena sativa*) etc., (Soto *et al.*, 1992; Mata and Guzmán, 1993; Mata and Gaitán, 1994; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Official data from 2006, state that in Mexico there were 75.73 million tons of dry material from 20 crops, of which 60.13 million tons correspond to primary waste, obtained at the time of harvest, among those: leaves and stems corn, sorghum stalks and sheath, tips and sugarcane leaves, wheat straw, barley straw and beans and cotton shell.

The remaining 15.60 million tons correspond to use of secondary waste post-harvest processing, among which are: bagasse from sugar cane, corn and cobs, bagasse maguey or agave and coffee pulp (Valdez-Vázquez *et al.*, 2010). In the state of Puebla are generated around 22 200 t of waste generated by fishing, farming, forestry, forestry, poultry and livestock activities (SSAyOT, 2012). Agroforestry waste generated in the field of Puebla, such as corn, wheat, sorghum, oats, barley and sawdust from wood of pine, oak, sajo, ilite, etc., have lots of nutrients for fungi, which are able to efficiently metabolize (Shimomura and Hasebe, 2004).

This paper presents a method for producing synthetic shiitake mushroom, in synthetic blocks for agroforestry most abundant waste in the Sierra Norte of Puebla; such as oak sawdust, shredded stubble and corn cobs, in addition to using grain sorghum as inoculum for the CP-CA1 strain of *Lentinula edodes*.

Materials and methods

The experimental work was performed in rural fungi Factory "Nanacatlán" Snapper located in street No. 10, Peace settlement, C. P. 72160 Puebla in Mexico.

Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en la Fábrica de hongos rural “Nanacatlán” ubicada en calle Huachinango Núm. 10, colonia la Paz, C. P. 72160 en la ciudad de Puebla, México.

a) Ceba

La cepa (CP-CA-1) de *Lentinula edodes* (Pegler) empleada en el estudio, proviene de Hong Kong y se encuentran depositada y mantenida en medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa) en el Centro de Recursos Genéticos del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias de la BUAP.

b) Preparación de inóculo de la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes* Pegler

El medio de cultivo empleado para el desarrollo del micelio es agar de papa y dextrosa (PDA, Bioxon), donde se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (Veeco, México), el medio de cultivo se vertió en cajas de Petri estériles de plástico de 90 mm de diámetro, cada una con aproximadamente 20 mL de PDA. Las cajas de Petri se inocularon con rodajas de 5 mm diámetro del medio de cultivo previamente colonizado con la cepa CP-CA1 y se incubaron a 28 °C por 10 días (Romero *et al.*, 2010a).

c) Preparación de la semilla madre (Masters)

El inóculo se preparó utilizando 1 kg de semilla de sorgo (*Sorghum* sp.), se lavó con agua esterilizada hasta eliminar los restos de basura del grano, una vez limpio, se hidrato por 24 h en una bandeja de plástico con capacidad de 3 L. Al término del tiempo de hidratación, se deja escurrir 30 min hasta eliminar el exceso de agua y tener al final una humedad de 50%, la cual fue determinada mediante un higrómetro digital; posteriormente se le adicionaron 20 g de yeso y 5 g de cal comercial, se homogenizaron para alcanzar un pH de 7.5 (Romero, 2007).

Se colocaron 500 g de mezcla final en 2 frascos con capacidad de 1000 mL y se esterilizaron durante 50 minutos a 121 °C. Cuando los frascos se enfriaron (24 h después), se procedió a la inoculación con pequeños trozos de agar de 3 cm de largo x 3 cm de ancho colonizados de la cepa CP-CA1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 días.

a) Ceba

The strain (CP-CA-1) *Lentinula edodes* (Pegler) used in the study comes from Hong Kong and are deposited and maintained in culture medium PDA (Potato Dextrose Agar) at the Center for Genetic Resources Center for Agroecology Institute of Sciences of the BUAP.

b) Preparation of the strain CP-CA1 of *Lentinula edodes* (Pegler)

The culture medium used for the development of the mycelium is potato dextrose agar (PDA, Bioxon), which was prepared according to the supplier's instructions. Subsequently, under aseptic conditions in a laminar flow chamber (Veeco, Mexico), the culture medium was poured into sterile Petri dishes made of plastic, 90 mm of diameter, each containing approximately 20 mL of PDA. Petri dishes were inoculated with 5 mm diameter slices of culture medium previously colonized with CP-CA1 strain and incubated at 28 °C for 10 days (Romero *et al.*, 2010a).

c) Parental seed preparation (masters)

The inoculum was prepared using 1 kg of sorghum seed (*Sorghum* sp.), washed with sterile water to remove any remaining waste grain, once clean, hydrated for 24 h in a plastic tray with a capacity of 3 L. At the end of hydration time, allowing to drain 30 minutes to remove excess water and to have at the end a humidity of 50%, which was determined by a hygrometer; adding 20 g of plaster and 5 g of commercial lime, homogenised to reach a pH of 7.5 (Romero, 2007).

500 g of final mixture was placed in 2 flasks with a capacity of 1 000 mL and sterilized for 50 minutes at 121 °C. When the jars were cooled (24 h later), we proceeded to inoculation with small pieces of agar 3 cm long x 3 cm wide colonized the CP-CA1 strain and incubated at room temperature for 30 days.

d) Secondary seed preparation

The inoculum was prepared using 10 kg of sterile sorghum grain, using parental seeds at 30 days for inoculation, using a laminar flow hood; jars with mycelium with abundant mycelium cottony texture and stirred until compaction fragment thereof in grain sorghum. The amount of 100 g of parental seed of inoculum was placed inside bags with heat

d) Preparación de la semilla secundaria

El inóculo se preparó utilizando 10 kg de grano de sorgo estériles, se usó semilla madre de 30 días para su inoculación en una campana de flujo laminar; los frascos con micelio con textura algodonosa y micelio abundante se agitaron hasta fragmentar la compactación del mismo en los granos de sorgo. Se colocó la cantidad de 100 g de inóculo de semilla madre en el interior de bolsas termo resistente con capacidad de 2 kg, previamente preparadas como se describió anteriormente para obtener el Masters. En general, 1 kg de semilla madre, será suficiente para obtener 10 kg de semilla secundaria en un lapso de 45 días de incubación a temperatura ambiente. Al finalizar este proceso se obtiene el inóculo del sustrato que servirá para la producción de *Lentinula edodes*.

e) Preparación del sustrato con residuos agroforestales

La formulación experimental C-Agro 1, 2 y 3, consistió en una mezcla de residuos agroforestales complementados con yeso comercial, cada formulación estuvo diseñada para preparar 100 kg de sustrato fresco, que sirvió para la producción del hongo *Lentinula edodes*, como se muestra en el Cuadro 1.

Una vez obteniendo las diferentes formulaciones, se llenaron bolsas de poli papel termo resistentes de 4 kg, se introdujo un tubo distribuidor de calor fabricado de PVC de 2 pulgadas de largo y 2.5 pulgadas de ancho (diámetro), colocando al final del tubo un tapón de espuma que permitió una mejor distribución de vapor en el proceso de esterilización por 60 min a 121 °C. Se dejó reposar por 24 h. Se inoculó en el sustrato, semilla secundaria con 45 días de incubación en una campana de flujo laminar; en proporción de 4 kg de sustrato por 1/2 kg de inóculo, se homogenizo y se incubo a 28 °C durante un periodo de 4 meses en condiciones de oscuridad.

Al término del periodo de incubación, los bloques sintéticos con las diferentes formulaciones se dejaron secar a sombra durante 12 h para ayudar a la compactación y aireación del mismo; una vez transcurrido el tiempo, se estimuló la aparición de cuerpos fructíferos a través de una inducción en frío por 24 h a una temperatura de 5 °C en un refrigerador industrial. Posteriormente las bolsas se trasladaron al cuarto de fructificación, donde se propiciaron condiciones apropiadas de humedad (70-80%), temperatura (26-28 °C), luz diurna indirecta y aeración (extracción de aire por

resistant capacity of 2 kg, previously prepared as described above for obtaining the Masters. In general, 1 kg of parental seed will be enough for 10 kg of secondary seed within 45 days of incubation at room temperature. After this process the substrate that will serve inoculum for shiitake production is obtained.

e) Substrate preparation with agroforestry wastes

The experimental formulation C-Agro 1, 2 and 3 consisted of a mixture of agroforestry residues supplemented with commercial plaster, each formulation was designed to prepare 100 kg fresh substrate, which served for the production of *Lentinula edodes* fungus, as shown in Table 1.

Cuadro 1. Formulación experimental de los tratamientos C-Agro 1, 2 y 3, para la producción del hongo *Lentinula edodes*.

Table 1. Experimental treatments Formulation C-Agro 1, 2 and 3, for the production of shiitake mushroom.

Ingredientes	U	Cantidad Agregada a 100 kg de sustrato Fresco		
		C-Agro 1	C-Agro 2	C-Agro 3
Aserrín de encino (<i>Quercus</i> sp.)	kg	40	60	80
Rastrojo de Maíz (<i>Zea mays</i>)	kg	20	10	0
Olote de maíz (<i>Zea mays</i>)	kg	38.5	28.5	18.5
Yeso [CaSO ₄]	kg	1.5	1.5	1.5
Agua	L	150	150	150
pH del sustrato sin esterilizar	pH	8.2	8.2	8.2
pH del sustrato estéril	pH	7.5	7.5	7.5

U= unidades.

After getting the different formulations, 4 kg poly paper thermo resistant bags, introducing a heat spreader made of PVC pipe, 2 inches long and 2.5 inches wide (diameter) at the end of the tube placing a cap made of foam, allowing a better distribution of vapour in the sterilization process, 60 min at 121 °C. Allowing to stand for 24 h, inoculating in the substrate, secondary seed with 45 days of incubation in a laminar flow hood; in the 4 K of substrate with 1/2 kg of inoculum, was homogenized and incubated at 28 °C for a period of 4 months in dark conditions.

At the end of the incubation period, the synthetic blocks with different formulations were allowed to dry for 12 h, for helping the compaction and aeration; the time elapsed after

1 h, cada 8 h), en total se prepararon 75 bloques sintéticos distribuidos en 3 tratamientos, utilizando 300 kg de sustrato fresco y 37.5 kg de semilla secundaria de la cepa CP-CA1.

f) Análisis estadístico

Los datos de producción considerados fueron: peso fresco de hongos colectados, así como el número de cosechas alcanzadas. Se evaluó la eficiencia biológica (EB= gramos de hongos frescos * 100 g de sustrato seco) (Tschierpe y Hartmann, 1977) y la tasa de producción (TP= EB * tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la última cosecha) (Reyes *et al.*, 2004). Para obtener la tasa de biodegradación se aplicó la fórmula: TB= (peso seco del sustrato inicial - el peso seco del sustrato final / por el peso seco del sustrato inicial * 100), la productividad se expresó en términos de gramos de hongos frescos por el número de cosechas totales (Stamets, 1993; Romero *et al.*, 2010b; Martínez *et al.*, 2012). El rendimiento del porcentaje de utilidad, se calcula si se dividen los g totales del peso fresco de hongos entre los K del peso total del sustrato y se multiplican por 100, esto dará el porcentaje útil. Se utilizó el paquete estadístico SPSS Statistics versión 17 (Statistical Package for the Social Sciences), los datos obtenidos se procesaron con el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar las diferencias entre los tratamientos.

Resultados y discusión

Producción total de la Fórmula experimental C-Agro

La producción de la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes* Pegler, en los tratamientos evaluados, se efectuó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente y duró entre 265 a 300 días en las diferentes formulaciones; desde la siembra del micelio en cajas de Petri, hasta la obtención de la tercera cosecha. En el Cuadro 2 se puede observar la duración de cada una de las etapas del ciclo de vida del cultivo del hongo Shiitake.

Para cuantificar el peso fresco de los carpóforos producidos, se realizaron tres cosechas en un lapso de 60 a 105 días de fructificación. La mayor producción total obtenida por cada 100 kg de sustrato orgánico en bloques sintéticos, se obtuvo en la fórmula C-Agro2 con 50.25 kg de hongo fresco, el segundo mejor corte se obtuvo en la fórmula C-Agro3 con 44.31 kg y la menor producción se observó en la fórmula

the appearance of fruiting bodies were stimulated through an induction cold for 24 h, at a temperature of 5 °C in an industrial refrigerator. Subsequently the bags are moved to fourth fruiting, where appropriate humidity (70-80%), temperature (26-28 °C), indirect daylight and aeration (air extraction for 1 h, every 8 h) conditions led, total synthetic blocks 75 distributed in 3 treatments were prepared using fresco substrate 300 kg and 37.5 kg of secondary seed strain CP-CA1.

f) Statistical analysis

Production data considered were: fresh weight of mushrooms collected, and the number of harvests reached. Biological efficiency (EB= grams of fresh mushrooms*100 g of dry soil) (Tschierpe and Hartmann, 1977) and the production rate (TP= EB * time from inoculation to last harvest) (Reyes *et al.*, 2004). For the biodegradation rate applied formula TB= (dry weight/final substrate by dry weight of the starting substrate*100 initial substrate dry weight) the productivity is expressed in terms of grams of fresh mushrooms * the number of total harvests (Stamets, 1993; Romero *et al.*, 2010b; Martínez *et al.*, 2012). The profit percentage yield is calculated if the total g of fresh weight mushroom among K total weight of the substrate are divided and multiplied by 100, this will give the useful percentage. The Statistics SPSS program, version 17 was used (Statistical Package for the Social Sciences), the data obtained were processed using analysis of variance (ANOVA) and then the multiple comparison test of Tukey ($p \leq 0.05$) was applied to determine the differences between treatments.

Results and discussion

Total production of the experimental formula C-Agro

Production of the CP-CA1 *Lentinula edodes* Pegler, strain of shiitake mushroom in the treatments evaluated was conducted according to the methodology described above and lasted between 265-300 days on the different formulations; from planting mycelium in petri dishes, until obtaining the third harvest. The Table 2 shows the duration of each stage of the life cycle of the shiitake mushroom cultivation.

In order to quantify the fresh weight of fruiting bodies produced three crops were conducted over a period of 60-105 days fruiting. The highest total production obtained per 100 kg synthetic organic substrate block was obtained

C-Agro1 con 41.78 kg (Figura 1). Bernabé *et al.* (2006) obtuvieron una producción de 291.64 g en sustrato elaborado a base de pulpa de café, utilizando la cepa IE-40 de *L. edodes* y 232.5 g en el sustrato elaborado a base de bagazo de caña de azúcar con la cepa IE-105 de *L. edodes*, Martínez *et al.* (2012) obtuvieron 1 836.2 g de hongo fresco de la cepa CP-163 de *L. edodes* en el sustrato elaborado a base de 70% aserrín de *Quercus* sp. 10% de maíz, 10% de rastrojo de maíz, 7% de salvado de trigo y 3% de harina de arroz. Valores por debajo a los presentados en esta investigación.

Cuadro 2. Duración del ciclo de producción de la cepa CP-CA1 de *Lentinula edodes* Pegler en los diferentes tratamientos.

Table 2. Duration of the production cycle of the strain CP-CA1 *Lentinula edodes* (Pegler) in the different treatments.

Etapa	Duracion en días		
	C-Agro 1	C-Agro 2	C-Agro 3
Crecimiento del micelio en cajas Petri	10	10	10
Crecimiento del micelio en los Masters	30	30	30
Obtención de la semilla	45	45	45
Colonización de la semilla en la fórmula C-Agro	160	120	130
Fructificación de la primera cosecha	20	15	17
Fructificación de la segunda cosecha	35	20	22
Fructificación de la tercera cosecha	50	25	30
Total	300	265	284

El mayor rendimiento en peso fresco del hongo Shiitake se obtuvo en la primera cosecha con 63.13% (2,762 g/kg) en la formula C-Agro3. En el segundo corte disminuyó para todos los tratamientos, no obstante la formula C-Agro1 presento un rendimiento de 35.08% (1 762 g/kg). Por último, la formulación C-Agro1 del tercer corte obtuvo un rendimiento de 10.03% (5 040 g/kg), del total de la producción (Figura 2), no obstante el mejor rendimiento por los tres cortes del hongo Shiitake se obtuvo en la formula C-Agro2 con 50 025 g de hongos frescos entre 100 kg total de sustrato.

Cuantificación de la eficiencia biológica (EB), tiempo de producción (TP) y tasa de biodegradación (TB).

La presente investigación, obtuvo valores de EB de 100.50, 88.63 y 83.55% en la formula C-Agro2, 3 y 1, respectivamente, superiores a los reportados por Morales y Martínez-Carrera,

in the formula C-Agro2, with 50.25 K of fresh mushrooms, the second best cut was obtained in the formula C-AGRO3 with 44.31 kg and, the lowest production was observed in the formula C-Agro1, with 41.78 kg (Figure 1). Bernabé *et al.* (2006) obtained a production of 291.64 g substrate made from coffee pulp, using the IE-40 strain of *L. edodes* and, 232.5 g in the substrate made from sugar cane bagasse with the strain IE-105 of *L. edodes*, Martínez *et al.* (2012) obtained 836.2 g of fresh fungus with the CP-163 strain of *L. edodes* in the substrate made from 70% sawdust *Quercus* sp., 10% of corn, 10% of corn stover, 7% wheat bran and 3% rice flour. Values below those presented in this research.

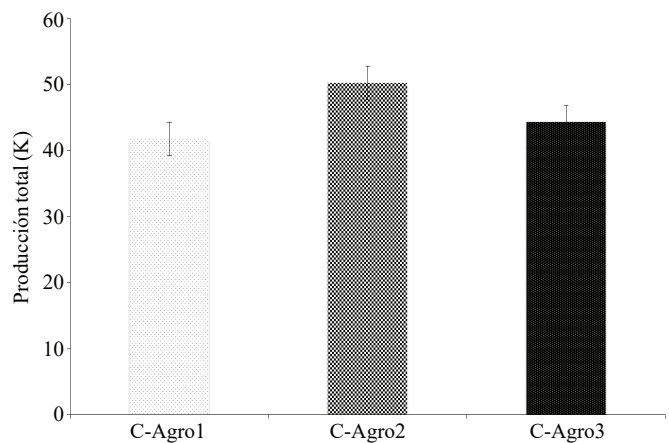


Figura 1. Producción total de la cepa CP-CA1 de *L. edodes* en bloques sintéticos con la fórmula C-Agro1, 2 y 3.
Figure 1. Total production of the strain CP-CA1 of *L. edodes* in synthetic blocks with the formula C-Agro1, 2 and 3.

The highest yield in fresh weight of the fungus shiitake was obtained in the first crop with 63.13% (2,762 g/kg) with the formula C-AGRO3. In the second cutting decreased for all treatments; however, the formula C-Agro1 presented 35.08% yield (1762 g/kg). Finally, the formulation C-Agro1 at the third cut, posted a return of 10.03% (5040 g/kg) of the total production (Figure 2); however, the best yield by the three courts was obtained with C-Agro2 formula, with 50 025 g of fresh mushrooms between 100 kg of the whole substrate.

Biological efficiency quantification (EB), production time (PT) and of biodegradation rate (TB).

This research, obtained values of EB of 100.50, 88.63 and 83.55% in the formula C-Agro 2, 3 and 1, respectively, higher than those reported by Morales and Martínez-Carrera, (1990) found that, the biological efficiencies achieved on supplemented sawdust *Quercus* sp., and *Bursera* sp., 53.8 and 49.9%, with the strain COP-7. Likewise, Bernabé *et al.* (2006)

(1990) que encontraron eficiencias biológicas obtenidas en aserrín suplementado de *Quercus* sp. y *Bursera* sp. de 53.8 y 49.9%, con la cepa CP-7. Así mismo Bernabé *et al.* (2006) reportan eficiencias biológicas de 55.5% en sustrato elaborado a base de pulpa de café, utilizando la cepa IE-40 de *L. edodes* y 44.2% en el sustrato elaborado a base de bagazo de caña de azúcar utilizando la cepa IE-105 de *L. edodes*, menores a lo reportado en esta investigación.

La fórmula C-Agro2 presentó la eficiencia biológica más alta, valores similares a los reportados por Martínez-Guerrero *et al.* (2012) donde obtuvieron EB de 103.02% en sustrato elaborado a base de 70% aserrín de *Quercus* sp., 10% de maíz, 10% de rastrojo de maíz, 7% de salvado de trigo y 3% de harina de arroz. En el Cuadro 3, se presenta la eficiencia biológica (EB) obtenida de la cepa CP-CA-1 de *Lentinula edodes* para 100K de sustrato en bloques sintéticos con la fórmula C-Agro1, 2 y 3.

La tasa de producción (TP) obtenida en la presente investigación es de 0.38%, valores inferiores a los reportados por Martínez-Guerrero *et al.* (2012) donde obtuvieron TP de 1.30% en sustrato elaborado a base de 70% aserrín de *Quercus* sp., 10% de maíz, 10% de rastrojo de maíz, 7% de salvado de trigo y 3% de harina de arroz. La mayor tasa de biodegradación (TB) se establece en la fórmula C-Agro2 (49.85%), seguido de la fórmula C-Agro1 (49.6%).

El mayor número de cuerpos fructíferos se encuentran entre 40 a 70 g (G2) representando 60% de la producción en cuanto a la calidad y peso de los hongos en fresco en la fórmula C-Agro2 (Cuadro 3). Valores similares a los reportados por Bernabé *et al.* (2006) para la cepa IE-40, donde predominó el G2 (60.2%), seguido por la fórmula C-Agro1 (55%) superiores a lo reportado por Mata y Hernández, (1994) para la cepa IE-105 (43.0%) y IE-40 (52.3%) obtenidos en la pulpa de café, pero inferiores a lo reportado por Salmones *et al.* (1999) en bagazo y en las hojas de caña de azúcar, donde predominó el G2 (57 y 63%, respectivamente) y en las brácteas de la corona de piña predominó el G3 (45%) similares para la fórmula C-Agro1 (40%). Las condiciones rurales de la planta experimental no afectaron la TP, TB y EB de la CP-CA1, ya que se obtuvieron cuerpos fructíferos de calidad de forma regular (85%) y solo 15% representa cuerpos fructíferos irregulares (Cuadro 3), en la fórmula C-Agro2.

reported biological efficiencies of 55.5% in substrate made from coffee pulp, using the strain IE-40 of *L. edodes* and, 44.2% in the substrate made from sugar cane bagasse, using the strain IE-105 of *L. edodes*, lower than that reported in this research.

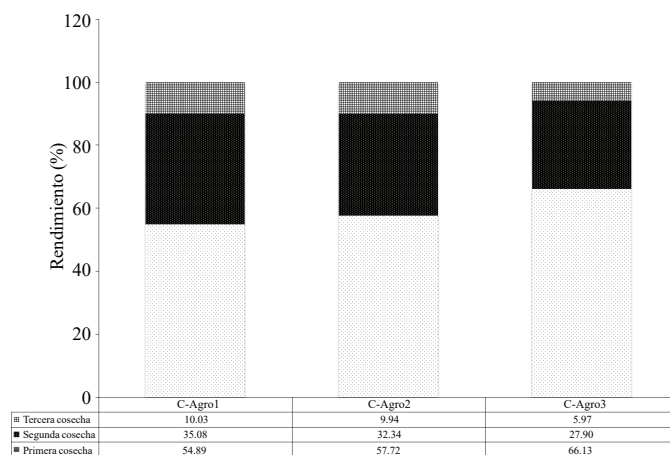


Figura 2. Rendimiento de producción de la cepa CP-CA1 en bloques sintéticos con la fórmula C-Agro1, 2 y 3.

Figure 2. Yield of the strain CP-CA1 in synthetic blocks with the formula C-Agro1, 2 and 3.

The formula C-Agro2 presented the highest biological efficiency, similar to those reported by Martínez-Guerrero *et al.* (2012) where they obtained EB 103.02% in substrate made from 70% sawdust *Quercus* sp., 10% of corn, 10% of corn stover, 7% wheat bran and 3% rice flour. In the Table 3, the biological efficiency (EB) was obtained from the CP-CA-1 strain of shiitake for 100K in synthetic blocks with substrate formula C-Agro1, 2 and 3.

The production rate (TP) obtained in this research is 0.38% lower than those reported by Martínez-Guerrero *et al.* (2012) where they obtained TP of 1.30% in substrate made from 70% sawdust of *Quercus* sp., 10% of corn, 10% of corn stover, 7% wheat bran and 3% rice flour. The highest rate of biodegradation (TB) is set to the formula C-Agro 2 (49.85%) followed by the formula C-Agro 1 (49.6%).

The largest number of fruiting bodies is among 40-70 g (G2) representing 60% of production in terms of quality and weight of fresh mushrooms in the formula C-Agro2 (Table 3). Similar to those reported by Bernabé *et al.* (2006) for the IE-40 strain, which predominated G2 (60.2%), followed by higher than reported by Mata and Hernández,

Cuadro 3. Datos generales para la evaluación de la fórmula experimental C-Agro1, 2 y 3 en la producción de Shiitake (*L. edodes*).
Table 3. General data for the evaluation of the experimental formula C-Agro1, 2 and 3 in the production of Shiitake (*L. edodes*).

Fórmula	EB* (%)	TP* (%)	TB* (%)	Calidad del cuerpo fructífero			Forma	
				Hongo fresco (%)			Regular (%)	Irregular (%)
				G1 (< 40 g)	G2 (40 a 70 g)	G3 (> 70 g)		
C-Agro1	83±55 c	0±38 a	49±6 c	40	55	5	75	25
C-Agro2	100±50 a	0±33 b	49±85 a	25	60	15	85	15
C-Agro3	88±63 b	0±31 c	43±86 b	68	25	7	60	40

EB= eficiencia biológica; TP= tasa de producción; TB= tasa de biodegradación; G1= cuerpo fructífero <40 g, G2= Cuerpo fructífero >40 g y <70 g y G3= cuerpo fructífero >70 g. *Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$).

Conclusiones

La fórmula experimental C-Agro2 como sustrato alternativo para la producción del hongo Shiitake (CP-CA1 de *L. edodes* Pegler) conformada por residuos agroforestales, pueden producir 100.48% de EB en 100 K de sustrato húmedo en 265 días de producción.

La fórmula experimental C-Agro2 a través el cálculo de la tasa de biodegradación indica que la CP-CA-1 de *L. edodes*, es capaz de convertir hasta 49.85% en alimento para el consumo humano.

La calidad de los hongos en frescos está representada por 60% de la producción total, obteniendo hongos de tamaño mediano entre los 40 y 60 g al utilizar la fórmula experimental C-Agro2. Calidad que busca el mercado local.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Ciencias por el apoyo brindado para realizar la presente investigación; así mismo, al Centro de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la BUAP por brindar el apoyo y registro en trámite de patente ante el IMPI de la fórmula C-Agro2, con número de solicitud MX-E-2013-071800, además los autores brinda un reconocimiento al Dr. Marco A. Martínez Guerrero, por su trayectoria en la producción de hongos comestibles a través de la fábrica de hongos rural "Nanacatlán" y ser pionero en el cultivo de Shiitake en Puebla-México, dejando enseñanzas en sus amigos, estudiantes y colaboradores; siempre le recordaremos como investigador y amigo. Descansa en paz Dr. Martínez-Guerrero (2014).

for the strain C-Agro1 (55%), (1994) for strain IE-105 (43.0%) and IE-40 (52.3%) obtained in coffee pulp, but lower than those reported by Salmones *et al.* (1999) in bagasse and leaves of sugarcane, which dominated the G2 (57 and 63%, respectively) and in the bracts of pineapple crown predominated G3 (45%) similar to the formula C-Agro1 (40%). Rural conditions of the experimental plant did not affect the TP, TB and EB of the CP-CA1 as quality fruiting bodies on a regular basis (85%) were obtained and only 15% is irregular fruiting bodies (Table 3), in the C-Agro2 formula.

Conclusions

The experimental formula C-Agro2 as an alternative substrate to produce shiitake mushroom (CP-CA1 of *L. edodes* Pegler) consistent of agroforestry residues, can produce 100.48% of EB in 100 K of wet substrate at 265 days of production.

The experimental formula C-Agro2 thought calculating the biodegradation rate indicates that the CP-CA-1 of *L. edodes* is able to convert up to 49.85% in food for human consumption.

The quality of fresh mushrooms is represented by 60% of the total production, obtaining medium-sized fungi, between 40 and 60 g by using the experimental formula C-Agro2. Quality wanted in the local market.

End of the English version



Literatura citada

- Ashrafuzzaman, M.; Kamruzzaman, A.; Razi-ismail, M.; Shahidullah, S. and Fakir, S. 2009. Substrate affects growth and yield of shiitake mushroom. *Afr. J. Biotechnol.* 8(1):2999-3006.
- Bernabé, G. T.; Mata, G.; Cayetano, C. and Gutiérrez, R. 2006. Cultivo experimental del hongo Shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México. *Rev. Mex. Micol.* 23:63-68.
- Campbell, A.C. and Racjan, M. 1999. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (Shiitake). *Int. Bio. Biodeg.* 43(3):101-107.
- Chang, S. T. and Miles, P. G. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact (Second Edition). Boca Raton, FL: CRC Press. 451 p.
- Chen, A. 2001. Cultivation of *Lentinula edodes* on Synthetic Logs. The mushroom growers' Newsletter. 10(4):3-9.
- Chimara, G. 1993. Aspectos medico de lentinan aislado de *Lentinus edodes* (Berk). Singer, en *Mushroom Biology, concise Basics and current developments*. Primera edición. Miles Philip & Chang Shu-Ting. World Scientific. Singapore. 114-116 pp.
- Curvetto, N.; Figlas D. and Delmastro, S. 2002. Sunflower seed hulls as substrate for the cultivation of Shiitake mushrooms. *Hort Technol.* 12(4):652-655.
- Lou, L. 1981. Production of black mushroom (*Lentinus edodes*). Beijing Agricultural University; Popular Science Publishing House; Beijing- China. 31-37 pp.
- Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of biotechnology in Latin Mushroom America. *Micol. Apl. Int.* 14(2):61-74.
- Martínez, G. M. A.; Sihuanca, D.; Macías, L. A.; Pérez, L.; Martínez, M. D and López O. 2012. Characterization and production of Shiitake (*Lentinula edodes*) in Mexico using supplemented sawdust. *Afr. J. Biotechnol.* 11(46):10582-10588.
- Mata, G. and Gaitán-Hernández, R. 1994. Avances en el cultivo del Shiitake en pulpa de café. *Revista Iberoamericana de Micología* 11:90-91.
- Mata, G. and Guzmán, G. 1993. Cultivation of *Lentinus boryanus* in wood shaving in Mexico. *Cryptogamic Bot.* 4(1):47-49.
- Mata, G.; Salmones, D. and Guzmán, G. 1990. Cultivo del Shiitake japonés, *Lentinus edodes*, en bolsas con viruta de madera. *Rev. Mex. Micol.* 6(1):245-251.
- Moonmoon, M.; Jahan, N. S.; Asaduzzaman, K. M. D.; Nazim, U.; Hossain, K.; Tania, M. and Ahmed S. 2011. Effects of different levels of wheat bran, rice bran and maize powder supplementation with saw dust on the production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Singer). *Saudi J. Biol. Sci.* 18:323-328.
- Morales, P. and Martínez-Carrera, D. 1991. Bursera sawdust as a substrate for shiitake cultivation. *Micol. Neotrop. Apl.* 4:41-47.
- Morales, P. and Martínez-Carrera, D. 1990. Cultivation of *Lentinula edodes* in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 3:13-17.
- Nieto, R. J.; Rocío, R. L. and Suárez, A. C. 2012. Evaluación del estípito de Shiitake como aportante de fibra y bioactivos con miras a su empleo en alimentos funcionales. *Vitae.* 19(1):S331-S333.
- Reyes, G. R.; Abella, A. E.; Eguchi, F.; Iijima, T.; Higaki, M. and Quimio, T. H. 2004. Growing paddy straw mushroom. *In: mushroom grower's handbook 1; oyster mushroom cultivation*. Mushroom World. Corea. 262-269 pp.
- Romero-Arenas O.; Tello, S. I.; Huerta, L.; Damián, H.; García, A.; Parraguirre L.C.; Hernández, T.; Macías, L.; and Juárez, H. 2010a. Preparation of inoculum of *Pleurotus ostreatus* in laminar flow hood rustic. *Sci. Res. Essays.* 5(24):992-2248.
- Romero-Arenas, O. 2007. Desarrollo tecnológico para controlar el moho verde (*Trichoderma* spp.) durante el cultivo comercial de los hongos comestibles (*Pleurotus* y *Lentinula*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Puebla. 136 p.
- Romero-Arenas, O.; Huerta, L.; Damián H.; Macías, L. A.; Tapia, A.; Parraguirre L. C. and Juárez, H. 2010b. Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., cv. Roatan) deshidratada, en relación con otros sustratos Agrícolas. *Agron. Costarricense.* 34(1):53-63.
- Salmones, D.; Mata, G.; Ramos, L. M. and Waliszewski, K. N. 1999. Cultivation of Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie.* 19:13-19.
- Secretaría de Sustentabilidad Ambiental y Ordenamiento Territorial Puebla (2012). Programa de Prevención y Gestión Integral de Residuos para el Estado de Puebla 2011-2017. En www.puebla.gob.mx. 10 p.
- Shimomura, N. and Hasebe, K. 2004. Estimation of viability of inner bark tissue of *Quercus serrata*, a substrate for log cultivation of *Lentinula edodes*, using the TTC assay method. *Mycoscience.* 45:362-365.
- Soto, V.C.; Fausto, S. and Guzmán-Dávalos, L. 1992. Cultivo del hongo de encino (*Lentinus* spp.) sobre una mezcla de bagazo de maguey tequilero y bagazo de caña de azúcar. *In: Memorias I Congreso Centroamericano de Micología*. Guatemala, C. A.
- Stamets, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Hong Kong. 343-350 pp.
- Suárez, A.C. y Jeannette, N. I. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *El Servier. Rev. Iberoam. Micol.* 30(1):1-8.
- Tschierpe, H. and Hartmann K. 1977. A comparison of different growing methods. *Mushroom J.* 60:404-416.
- Valdez-Vazquez, I.; Acevedo-Benitez, J. A. and Hernandez-Santiago, C. 2010. Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14:2147-2153.
- Yen, Ming-Tsung M.; Jeng-Leun. 2007. Selected physical properties of chitin prepared from Shiitake stipes. *El Servier "LWT - Food Sci. Technol."* 40(3):558-563.