

Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana**

Use of lignocellulosic residues to optimize spawn production and carpophore formation of the edible mushroom *Lentinula boryana*

Rigoberto Gaitán-Hernández^{1§} y Dulce Salmones¹

¹Red Manejo Biotecnológico de Recursos-Instituto de Ecología, A. C. Carretera antigua a Coatepec 351, Xalapa, 91070, Veracruz, México. Tel: 01 (228) 8 42 18 30. (dulce.salmones@inecol.mx). [§]Autor para correspondencia: rigoberto.gaitan@inecol.mx.

Resumen

Se evaluaron diferentes residuos lignocelulósicos para la producción de inóculo y carpóforos de *Lentinula boryana*. El crecimiento micelial y biomasa asociada a la actividad metabólica (AM) se estimaron a los 12 y 19 d de incubación, con 12 cepas en tres tipos de inóculo: fórmula 1 (F1), fórmula 2 (F2) y fórmula 3 (F3). El diámetro del micelio en caja Petri a los 12 y 19 d fue mayor en F1, con 61.9 a 74.8 mm y de 71.8 a 90 mm, respectivamente. La mayor AM a los 12 d de incubación se presentó en F1, fluctuando de 10.1 a 46.76 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ y a los 19 d en F1 y F2, con 6.15 hasta 36.26 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$, para ambos tipos de inóculo. Con el objetivo de identificar residuos con potencial para la fructificación de esta especie, se estimó la tasa de crecimiento (Kr) *in vitro* en paja de cebada (P), paja-madera de vid (PV), paja-bagazo de caña (PC), paja-viruta de encino (PE) y paja-viruta de madera de teca (PT). En PE se observó la mayor Kr promedio (2.64 mm d^{-1}) y la menor en PT (1.08 mm d^{-1}). En la producción de carpóforos, los parámetros de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R) fueron significativamente afectados por la cepa, sustrato y sus interacciones. La mezcla PV presentó la mayor EB (12.92%), TP (0.125%) y R (3.642%).

Palabras clave: materiales lignocelulósicos alternativos, producción de hongos, shiitake americano.

Abstract

Lignocellulosic wastes were evaluated for the production of spawn and carpophores of *Lentinula boryana*. Radial extension growth and biomass associated with the metabolic activity (MA) was estimated after 12 and 19 d of incubation with twelve strains and three types of spawn: Formula 1 (F1), Formula 2 (F2) and Formula 3 (F3). Mycelial diameter in Petri dishes at days 12 and 19 was greater in F1 formula. Colony diameters measured 61.9 to 74.8 mm and 71.8 to 90 mm, respectively. The highest MA values at 12 d of incubation were presented in F1, ranging from 10.1 to 46.76 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ and at 19 d in F1 and F2, with 6.15 to 36.26 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$, for both types of spawn. In order to identify residues with potential for the fructification of this specie, the growth rate (Kr) *in vitro* was estimated on barley straw (S), straw-vineyard pruning (SV), straw-sugar cane bagasse (SC), straw-oak shavings (SO) and straw-teak shavings (ST). The highest mean Kr was observed in SO (2.64 mm d^{-1}) and the lowest in ST (1.08 mm d^{-1}). In the carpophore formation the parameters of biological efficiency (BE), production rate (PR) and yield (Y) were significantly affected by strain, substrate and their interactions. The substrate SV presented the highest BE (12.92%), PR (0.125%) and Y (3.642%) values.

Key words: Alternative lignocellulosic materials, American shiitake, Mushroom production.

Introducción

En el país existen abundantes recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales, por lo que se debe fortalecer su conservación, estudio y utilización (Gaitán-Hernández, 2012), tan solo en México se ha registrado el consumo de alrededor de 300 especies de hongos comestibles (Garibay-Orijel *et al.*, 2010). Algunas de estas especies tienen un gran potencial para la producción comercial, tal es el caso de *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler (Gaitán-Hernández, 2012), el cual se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, confinada al neotrópico (Guzmán *et al.*, 1997; Capelari *et al.*, 2010). Diversas comunidades indígenas y campesinas la consumen y comercializan en mercados populares (Garibay-Orijel *et al.*, 2010).

Por las similitudes morfológicas entre *Lentinula boryana* y *L. edodes*, han motivado una serie de estudios (Mata y Guzmán, 1993; Soto-Velazco *et al.*, 1995; Mata *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 2013). Así también, con base en diversos estudios de entrecruzamiento genético, aloenzimas y filogenéticos, se ha reconocido que *L. boryana* y *L. edodes* son especies distintas (Thon y Royle, 1999).

En México se ha puesto especial énfasis en realizar ensayos sobre su cultivo, utilizando diferentes residuos (Mata y Gaitán-Hernández, 1992; Mata *et al.*, 2000; Gaitán-Hernández, 2001; Mata *et al.*, 2001; Salmones y Gutiérrez-Lecuona, 2008). Los residuos de paja son ampliamente utilizados para el cultivo de *A. bisporus* y *Pleurotus* spp., pero la paja de cebada evaluada aquí, prácticamente no ha sido usada como sustrato para *L. boryana*. Así también, dado el vasto potencial genético de germoplasma silvestre, en el presente estudio se planteó evaluar diferentes residuos lignocelulósicos de bajo costo, con el propósito de optimizar la producción de inóculo y formación de carpóforos de cepas mexicanas de *L. boryana* y con ello contribuir a diversificar la producción de hongos comestibles silvestres.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento

Las doce cepas de *Lentinula boryana* evaluadas en este estudio fueron las siguientes: IE-17, IE-93, IE 152, IE 154, IE 232, IE 233, IE 250, IE 268, IE 270, IE 271, IE

Introduction

Mexico has abundant genetic resources of edible and medicinal mushrooms and it is therefore important to support their conservation, study and use (Gaitán-Hernández, 2012). Consumption of around 300 species of mushrooms has been recorded in Mexico (Garibay-Orijel *et al.*, 2010) and some of these species have considerable potential for commercial production; this is the case with *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler (Gaitán-Hernández, 2012), which is found in the tropical and subtropical humid forest of America (Guzmán *et al.*, 1997; Capelari *et al.*, 2010). The Mexican population has a traditional knowledge of this species and consumes and sells this mushroom in regional markets (Garibay-Orijel *et al.*, 2010).

The morphological similarities between *L. boryana* and *L. edodes*, have prompted a series of studies (Mata and Guzmán, 1993; Soto-Velazco *et al.*, 1995; Mata *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 2013). Different genetic interbreeding experiments, allozyme profiles and phylogenetic studies have shown *L. boryana* and *L. edodes* to be different species (Thon and Royle, 1999).

In Mexico special emphasis has been given on its cultivation using different lignocellulosic residues and producing preliminary results regarding its nutritional and reproductive requirements (Mata and Gaitán-Hernández, 1992; Mata *et al.*, 2000; Gaitán-Hernández, 2001; Mata *et al.*, 2001; Salmones and Gutiérrez-Lecuona, 2008). Straw residues are widely used in the cultivation of *A. bisporus* and *Pleurotus* spp., but the barley straw evaluated here has been practically never used for *L. boryana*. Given the vast genetic potential of wild germplasm, the present study evaluated different inexpensive lignocellulosic residues, aiming to optimize the production of spawn and formation of carpophores of Mexican strains of *L. boryana* in order to contribute to the diversification of the production of wild edible mushrooms.

Materials and methods

Strains and growth conditions

The twelve strains of *Lentinula boryana* evaluated in this study were as follows: IE-17, IE-93, IE 152, IE 154, IE 232, IE 233, IE 250, IE 268, IE 270, IE 271, IE 721, and IE-735.

721 y IE-735. Las cepas IE-232 e IE-233 se obtuvieron por entrecruzamiento de la IE-93 e IE-154, respectivamente. Las cepas restantes se aislaron de ejemplares silvestres que crecían en troncos de madera de encino (*Quercus* sp.). Las cepas se encuentran almacenadas en el Cepario de Hongos del Instituto de Ecología, A. C. (INECOL, Xalapa, México) (World Data Centre for Microorganisms). Todas las cepas se mantuvieron en extracto de malta agar (BIOXON, EUA) a 25 °C.

Determinación del crecimiento micelial radial y actividad metabólica

Preparación del sustrato y formulaciones de inóculo. Se obtuvo pulpa de café de un beneficio de café cercano al INECOL. La pulpa fresca se secó con aire, hasta que alcanzó 20% de humedad, posteriormente se almacenó hasta su uso. La paja de cebada y el mijo (*Panicum miliaceum* L.) fueron adquiridos de un centro forrajero local. La pulpa de café (*Coffea arabica* L.), paja de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y peat moss (*Sphagnum* sp.) se pulverizaron con un molino doméstico. Para la preparación del inóculo, los granos de mijo se hidrataron hasta un contenido de humedad del 55%, posteriormente se mezclaron con el resto de los ingredientes, de acuerdo a cada formulación. Se midió el pH de cada condición con un potenciómetro digital (Orion, modelo 230A, EUA). Los ingredientes de cada formulación de inóculo fueron como sigue: F1 mijo (88.5%), paja de cebada (8.8%), peat moss (1.3%) y CaSO₄ (1.3%); F2 mijo (88.5%), pulpa de café (8.8%), peat moss (1.3%) y CaSO₄ (1.3%); F3 (testigo) mijo (100%). La mezcla de ingredientes se embolsó y se esterilizó durante 90 min a 121 °C. Cuando el sustrato se enfrió, de cada formulación se colocaron 20 g en cajas Petri y se inocularon con implante de micelio crecido en PDA. Las muestras se incubaron a 25 °C en oscuridad.

Determinación de la extensión radial de crecimiento. El crecimiento micelial de las doce cepas y tres formulaciones de inóculo se midió a los 12 y 19 d de incubación. La estimación del crecimiento se realizó con base en la medición sobre dos líneas (Plano Cartesiano) trazadas en la tapa de la caja. Cada condición se evaluó por quintuplicado.

Estimación de la actividad metabólica. La biomasa fúngica asociada a la actividad metabólica micelial (AM) para las diferentes formulaciones de inóculo se determinó en muestras frescas, con la técnica de hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma Chemical Col. / por sus siglas en inglés) (Inbar *et al.*, 1991; modificado por Mata *et al.*, 2002). El experimento se llevó a cabo con 1 g de muestra

Strains IE-232 and IE-233 were obtained through genetic interbreeding of IE-93 and IE-154, respectively (IE-93 x IE-154 mating). The remaining strains were isolated from wild specimens that grow on oak wood logs (*Quercus* sp.). The strains were deposited in the Fungi Strain Collection at the Institute of Ecology (INECOL, Xalapa, Mexico) (World Data Centre for Microorganisms). All strains were maintained in malt agar extract (BIOXON, USA) at 25 °C through experiment.

Determination of radial extension growth and metabolic activity

Substrate preparation and spawn formulations. The coffee pulp (*Coffea arabica* L.) was supplied by a coffee processing plant near the INECOL laboratory (Coatepec, Mexico). The coffee pulp was air-dried to a moisture content of 20%, and stored under ambient conditions. Dry barley straw (*Hordeum vulgare* L.) and millet (*Panicum miliaceum* L.) were acquired from a local feed supplier. The coffee pulp, barley straw and peat moss (*Sphagnum* sp.) were pulverized using a domestic blender. For the preparation of the spawn, the millet grains were hydrated to a moisture content of approximately 55% and then the remaining ingredients added. All ingredients were mixed and the moisture content adjusted to 65%. The pH of each condition was measured with a digital pH meter (Orion, model 230A, USA). Spawn formulations contained basal ingredients as follows, F1: millet (88.5%), barley straw (8.8%), peat moss (1.3%) and CaSO₄ (1.3%); F2: millet (88.5%), coffee pulp (8.8%), peat moss (1.3%) and CaSO₄ (1.3%); F3 (control): millet (100%). The mixed substrates were bagged and sterilized for 90 min at 121 °C. Once cooled, 20 g of each substrate were placed in Petri dishes and inoculated with one agar plug colonized with mycelia from each strain pre-cultured in potato dextrose agar (PDA). Samples of each strain-formula combination were incubated at 25 °C in darkness.

Determination of radial extension growth. Mycelial growth of the twelve different strains and three spawn formulations was measured at 12 and 19 d of incubation. Mycelial growth was estimated based upon two measurements (Cartesian plane) of the culture mycelial diameter. Each condition was evaluated in quintuplicate.

Estimation of metabolic activity. Fungal biomass associated with mycelial metabolic activity (MA) for different spawn formulas was determined through fluorescein diacetate hydrolysis (FDA, Sigma, Chemical Col.) on fresh spawn

por cepa, por sustrato y por periodo de incubación, en tubos de vidrio estériles. Para iniciar la reacción, 3 mL de FDA (10 mg L⁻¹) se añadieron a la muestra, posteriormente los tubos se agitaron manualmente y se colocaron en baño maría por 30 min a 30 °C. Al término, la reacción se detuvo al añadir 10 mL de acetona. Esta suspensión se filtró (Whatman No. 1) y la cantidad de FDA hidrolizado contenido en la solución se detectó con un espectrofotómetro a 490 nm (Spectronic Genesys 5). Una unidad de AM se definió como el equivalente de 1 µMol de FDA hidrolizado min⁻¹ g⁻¹ (peso seco) para cada formulación dada. Los resultados fueron los promedios de tres réplicas.

Tasa de crecimiento micelial en paja de cebada suplementada y formación de carpóforos

Estimación de la tasa de crecimiento. Se utilizó inóculo F1 seleccionado del ensayo anterior y se preparó como se ha citado previamente, colocando 50 g de la mezcla de ingredientes en frascos de vidrio de boca ancha de 100 mL. El sustrato se esterilizó durante 90 min a 121 °C y en condiciones de asepsia se inocularon con micelio de cada cepa de 15 d de crecimiento en PDA. La tasa de inoculación fue de 5%, con base al peso fresco, posteriormente se incubaron en oscuridad a 25 °C. Una vez preparado el inóculo, para estimar la tasa de crecimiento, se usaron cinco combinaciones de sustrato, con paja de cebada como sustrato base.

La paja se fragmentó a un tamaño de partícula de 0.5 a 1 cm. Los suplementos utilizados fueron polvos de madera de encino (*Quercus* sp.), de madera de vid (*Vitis vinifera* L.), de madera de teca (*Tectona grandis* Linn F.) y bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Inicialmente, los suplementos se hidrataron por separado durante 12 h por inmersión en agua. Después de eliminar el exceso de humedad a todos los ingredientes, cada suplemento se mezcló de manera homogénea con la paja y se les agregó CaSO₄ (0.25%) y Ca(OH)₂ (0.25%), haciendo un total de cinco sustratos: paja-encino (PE), paja-vid (PV), paja-teca (PT), paja-caña (PC) y paja (P) como testigo. Se tomaron muestras de los sustratos para determinar el pH y humedad inicial. Posteriormente, se colocaron 25 g húmedos de cada sustrato en tubos de vidrio (25 x 150 mm).

Se prepararon siete tubos por cada condición, haciendo un total de 175 muestras. Los tubos se esterilizaron durante 90 min a 121 °C. A cada tubo se le colocó 1.5 g de inóculo previamente preparado (F1) y se taparon con algodón estéril para permitir el intercambio gaseoso. Finalmente, los tubos

samples (Inbar *et al.*, 1991); modified by Mata *et al.* (2002). This test was conducted by placing 1 g of material per strain per substrate per collection stage into sterile test tubes. To initiate the reaction, 3 ml of FDA (10 mg L⁻¹) were added and the test tubes shaken in a warm water bath for 30 min at 30 °C. The reaction was halted by the addition of 10 mL of acetone. The resulting suspension was filtered (Whatman No. 1) and the quantity of hydrolyzed FDA in the remaining solution was determined with a spectrophotometer at 490 nm (Spectronic Genesys 5). A unit of MA was defined as the equivalent of 1 µMol of hydrolyzed FDA min⁻¹ g⁻¹ (dry weight) for a given formulation. Results were the averages of three technical replicates.

Mycelia growth rate in supplemented barley straw and evaluation of carpophore formation

Estimation of growth rate. Spawn F1 was used, as selected by the previous assay, and prepared as described previously, placing 50 g of the mixed ingredients in 100 mL wide-mouthed glass jars. The substrate was sterilized for 90 min a 121 °C. Under sterile condition, each strain (of 15 days growth in PDA) was inoculated onto the substrate. The inoculation rate was 5%, based on fresh weight. Then, the inoculated substrate was incubated at 25 °C in darkness. Once prepared the spawn, to estimate the growth rate, five combinations of substrate (with barley straw as the base substrate) were used.

The straw was fragmented to a particle size of 0.5 to 1 cm. The supplements used were oak shavings (*Quercus* sp.), vineyard pruning (*Vitis vinifera* L.) and teak shavings (*Tectona grandis* Linn F.) sawdust and sugar cane bagasse (*Saccharum officinarum* L.). These supplements were hydrated separately by immersion for 12 h in water. The excess of water was drained and each supplement was homogeneously mixed with the barley straw and CaSO₄ (0.25%) and Ca(OH)₂ (0.25%) added, making a total of five substrates: Straw-Oak (SO), Straw-Vineyard Pruning (SV), Straw-Teak (ST), Straw-Sugar Cane Bagasse (SC), and Straw (S) as control. Samples were taken from each substrate to determine pH and initial moisture content. Glass "race-tubes" (25 diameter, 150 mm height) were uniformly filled with 25 g of each substrate.

Seven tubes were prepared for each condition, making a total of 175 samples. The tubes were sterilized for 90 min at 121 °C. Inoculation was performed by transferring 1.5 g of the previously prepared spawn (F1) onto the exposed

se incubaron en oscuridad a 25 °C. La tasa de crecimiento (Kr) se calculó con la función de crecimiento lineal $y = kr x + c$ (donde y es la distancia, x es el tiempo y c el factor constante) y se expresó en milímetros por día (mm d^{-1}). Para ello, en cada tubo se trazaron dos líneas longitudinales opuestas, A y B. Sobre las líneas se midió el crecimiento del micelio cada día durante 15 d. Con los datos obtenidos, se estimó el crecimiento del micelio promedio por día.

Formación de carpóforos y métodos de cultivo. Inicialmente se preparó inóculo con semillas de mijo, de la misma forma descrita en el ensayo de tasa de crecimiento, sólo que en bolsas de polietileno resistente a la alta temperatura (20 x 15 cm). Para la producción de carpóforos se emplearon los dos sustratos con mayor tasa de crecimiento de micelio *in vitro* (PE, PV) y para su preparación se siguió el mismo método descrito en el ensayo anteriormente citado, sólo que la paja de cebada se fragmentó a un tamaño de partícula de 3-6 cm de longitud, mientras que la vid y la viruta de encino se utilizaron a un tamaño de 1 a 3 cm. A cada sustrato se le estimó el pH y porcentaje de humedad. De cada sustrato se colocaron 1.8 kg (peso húmedo) en bolsas de polipropileno de 19.5 x 48 cm con un filtro microporo (Unicorn Import and Manufacturing Commerce, TX).

Las bolsas con sustrato se esterilizaron durante 90 min a 121 °C. Bajo condiciones de asepsia, a cada bolsa se le colocó 180 g (10%) de inóculo de cada una de las cepas. Se prepararon cinco muestras por cada condición (= 50 muestras). Las bolsas se incubaron en oscuridad a 25°C. Cuando el micelio de las cepas de *Lentinula* cubrieron completamente el sustrato, las muestras se transfirieron al cuarto de producción, con condiciones favorables para fructificación, donde se les retiró la bolsa de polipropileno. La temperatura ambiental se mantuvo a 16-19 °C, con una humedad relativa de 85 a 90%. Se aplicó recirculación de aire para mantener una distribución uniforme del mismo y niveles bajos de CO_2 (< 500 ppm). Se mantuvo un fotoperiodo de 12 h con 350 lux de iluminación con lámparas durante el día. La producción se evaluó con base en los datos de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R). También se registró el periodo de producción (PP) y número de cosechas. De igual manera, se evaluó el tamaño de las fructificaciones obtenidas, de acuerdo al diámetro del píleo: grupo 1 (G1) <5 cm, grupo 2 (G2) 5-9.9 cm y grupo 3 (G3) >10 cm, como lo citado en Gaitán-Hernández *et al.* (2006).

surface of the substrate. All tubes were capped with sterile cotton to permit gaseous exchange, and incubated at 25 °C in darkness. The mycelium growth rate (Kr) was calculated by fitting the growth function $y = kr x + c$ (where y is the distance, x is the time, and c is the constant factor) and was expressed in mm per day. To facilitate measurement, two opposite longitudinal lines (A and B) were drawn on each tube. Mycelial linear growth was recorded daily in two perpendicular directions. The extension rate (mm d^{-1}) was calculated after the mycelium had reached more than 15 days of growth. .

Carpophore formation and cultivation methods. A spawn was first prepared with millet seeds, in the same manner as described for the growth rate assay. The spawn substrate was packed in high temperature resistant polythene bags (20 x 15 cm). For the production of carpophores, the two substrates with the highest mycelial growth rates were used (SO, SV) following the same method described in the previously cited assay, except that the barley straw was fragmented to a particle size of 3-6 cm in length, while the vineyard pruning and the oak wood shavings were utilized at a size of 1-3 cm. The pH and moisture content were estimated for each substrate. From each substrate, 1.8 kg (moist weight) were taken and placed in polypropylene bags (19.5 x 48 cm) with a micropore filter (Unicorn Import and Manufacturing Commerce, TX).

The bags with substrate were sterilized for 90 min at 121 °C. After cooling, 180 g (10%) of spawn of each strain were placed in each bag under sterile conditions. Five samples were prepared for each condition (= 50 samples). The inoculated bags were incubated at 25 °C in darkness. When the mycelium of the *Lentinula* strains completely covered the substrate, the samples were transferred to a production room with favorable conditions for fructification. There, the polypropylene bags were removed. The temperature was maintained at 16-19°C, with a relative humidity of 85 to 90%. The air was circulated to maintain uniform humidity and low levels of CO_2 (<500 ppm). A photoperiod of 12h was provided with 350 lx illumination with light lamps during the day. Production data were evaluated based on biological efficiency (BE), production rate (PR) and yield. Also considered were the production period (PP), number of crops, and size of the mushrooms produced, according to pileus diameter: group 1 (G1) <5 cm, group 2 (G2) 5-9.9 cm and group 3 (G3) >10 cm, according to Gaitán-Hernández *et al.* (2006).

Diseño experimental y análisis estadístico

A los valores de diámetro de crecimiento micelial, actividad metabólica y tasa de crecimiento se les aplicó un diseño factorial completamente aleatorizado. El análisis factorial también se aplicó a los valores de producción. Un análisis de varianza se aplicó a todos los valores, además de una comparación de medias de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico Statistica V7.0.

Resultados

Determinación del crecimiento micelial radial. El crecimiento micelial de las cepas a los 12 y 19 d de incubación se muestra en el Cuadro 1. Los diámetros desarrollados por las cepas en el inóculo suplementado con paja de cebada (F1) midieron entre 61.9 (IE-735) a 74.8 mm (IE-152); en F2 entre 54.5 (IE-721) a 75.5 mm (IE-93) y para la F3 de 23.1 (IE-233) a 64.2 mm (IE-93). A los 19 d de incubación, los diámetros miceliales de las cepas variaron de 71.8 (IE-154 e IE-232) a 90 mm (IE-93). Ésta última cepa fue la única en lograr cubrir el diámetro total de las cajas Petri. En la formulación con pulpa de café (F2), los diámetros fluctuaron entre 64.5 (IE-152) a 87.2 mm (IE-93), mientras que la formulación con mijo (F3), los valores promedio fueron de 32.1 (IE-233) a 81.1 mm (IE-93). El análisis estadístico aplicado a los promedios de las formulaciones a los 12 d de incubación determinó diferencias significativas entre las formulaciones, correspondiendo a F1 los valores más altos, mientras que a los 19 d no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los promedios de las formulaciones suplementadas con paja y pulpa de café, pero éstas sí presentaron diferencias con la formulación testigo. En general, las cepas tuvieron mayor crecimiento micelial en F1 y F2, que en el testigo.

Actividad metabólica. La AM de los micelios en las diferentes formulaciones evaluadas se observan en el Cuadro 2. A los 12 d de incubación, las cepas provenientes del inóculo preparado con paja de cebada (F1) presentaron una AM de 10 (IE-154) hasta 46.8 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ (IE-93), correspondiendo a las cepas IE-93, IE-232, IE-735 e IE-233 los valores más altos, mientras que la IE-154, IE-250 e IE-17 tuvieron los más bajas actividades. A los 19 d de incubación, las cepas presentaron un comportamiento variable, ya que mientras para la cepa IE-154 el valor de AM fue similar a la medición anterior, en siete cepas disminuyó y en las cuatro

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized design with factorial arrangement was applied to mycelial growth diameter, metabolic activity, and linear growth rate values. A completely randomized design with factorial arrangement was also applied to the production values. Analysis of variance was conducted for all values and a comparison of means performed using Tukey's test ($p < 0.05$) in the statistical package Statistica, version 7.0.

Results

Determination of radial extension growth. The mycelial growth of the strains at 12 and 19 d of incubation is shown in Table 1. The diameters produced by the strains in the spawn supplemented with barley straw (F1) measured between 61.9 (IE-735) and 74.8 mm (IE-152); while in F2 they reached between 54.5 (IE-721) and 75.5 mm (IE-93) and in F3 they ranged from 23.1 (IE-233) to 64.2 mm (IE-93). At 19 d of incubation, the colony diameters of the strains cultured on barley straw varied from 71.8 (IE-154 and IE-232) to 90 mm (IE-93). This latter strain was the only one found to cover the entire diameter of the Petri dishes. In the formulation with coffee pulp (F2), mean diameter values ranged from 64.5 (IE-152) to 87.2 mm (IE-93), while in the formulation with millet (F3), the values ranged from 32.1 (IE-233) to 81.1 mm (IE-93). The statistical analysis of the data corresponding to 12 days of incubation found significant differences between formulations, with F1 presenting the highest values, while no significant differences ($p > 0.05$) were found at 19 d between the means of formulations supplemented with straw and coffee pulp. Any significant differences that were found were between these and the control formulation. In general, the strains presented higher mycelial growth in F1 and F2 than in the control.

Metabolic activity. The MA of the mycelia in the different formulations evaluated are presented in Table 2. At 12 d of incubation, the strains from the spawn prepared with barley straw (F1) presented activities of 10 (IE-154) to 46.8 $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ (IE-93), with the strains IE-93, IE-232, IE-735 and IE-233 presenting the highest values, while IE-154, IE-250 and IE-17 presented the lowest MA. At 19 d of incubation, the strains presented variable trends: strain IE-154 presented a MA value similar to that measured previously, but activity declined in seven strains

restantes aumentó la AM. Los valores promedios alcanzados en esta formulación fluctuaron entre 9 (IE-268) hasta 39.4 (IE-735) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

and increased in the remaining four. Mean values obtained in this formulation ranged from 9 (IE-268) to 39.4 (IE-735) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

Cuadro 1. Crecimiento de las cepas de *Lentinula boryana* (mm) en diferentes formulaciones de inóculo y periodos de incubación. Table 1. Radial extension growth of *Lentinula boryana* strains) (mm) grown in different formulations and incubation time.

Cepa	Días de incubación					
	12			19		
	F1 ¹	F2	F3	F1	F2	F3
IE-17	74±6.3 ^{a2}	59.3±5.7 ^{cd}	56.3±3.8 ^d	78.5±4.1 ^b	69.1±11.2 ^{de}	74±9.2 ^c
IE-93	73.9±8.6 ^{ab}	75.5±9.2 ^a	64±2.2 ^{bc}	90.0±0 ^a	87.2±5.9 ^a	81.1±5.0 ^{abc}
IE-152	74.8±7.6 ^a	60.9±3.7 ^{cd}	52.3±3.3 ^{de}	81.9±4.5 ^{abc}	64.5±1.9 ^{def}	74.1±8.8 ^c
IE-154	66.5±5.6 ^{abc}	70±12.8 ^{ab}	42±5.1 ^f	71.8±3.6 ^d	77.6±10.0 ^b	55.9±3.7 ^{ef}
IE-232	64.4±6.4 ^{bc}	62.6±5.1 ^c	25.1±3.4 ^g	71.8±4.1 ^d	72.9±5.2 ^d	32.9±2.6 ^g
IE-233	71.4±6.6 ^{ab}	60.8±6.7 ^{cd}	23.1±2.9 ^g	79.8±7.0 ^{abc}	72.7±5.6 ^d	32.1±1.9 ^g
IE-250	71.7±3.9 ^{ab}	72.2±3.2 ^{ab}	52.1±3.6 ^{de}	81.8±3.9 ^{abc}	83.8±3.9 ^{ab}	76.3±5.7 ^c
IE-268	67.4±3.8 ^b	69.8±6.6 ^{ab}	40.8±5.0 ^f	78.8±5.6 ^b	77.3±7.4 ^b	54.2±4.9 ^f
IE-270	65.3±4.6 ^b	69.1±3.7 ^{abc}	39.6±4.8 ^f	73.5±5.4 ^d	74.9±2.5 ^c	65.7±2.7 ^e
IE-271	68.6±4.2 ^{abc}	62±8.9 ^c	53.4±4.6 ^{de}	81.5±5.6 ^{abc}	72.7±10.4 ^d	79.1±6.2 ^b
IE-721	68.6±4.2 ^{abc}	54.5±4.4 ^d	48.5±3.7 ^e	81.3±5.5 ^{abc}	78.3±8.7 ^b	67.3±4.5 ^{de}
IE-735	61.9±9.6 ^c	66.5±4.2 ^{abc}	55.5±3.2 ^d	84.0±7.8 ^{ab}	82.3±4.9 ^{ab}	77.8±7.4 ^b
Promedio	69.0±4.2 ^a	65.3±6.2 ^b	46.1±12.4 ^c	79.6±5.3 ^a	76.1±6.4 ^a	64.2±17.1 ^b

¹F1= mijo (88.5%), paja de cebada (8.8%), peat moss (1.3%) y CaSO₄ (1.3%); F2= mijo (88.5%), pulpa de café (8.8%), peat moss (1.3%) y CaSO₄ (1.3%); F3 (testigo): mijo (100%). ²Valores son promedios ± desviación estandar de cinco réplicas. Valores dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 2. Actividad metabólica de las cepas de *Lentinula boryana* ($\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$), en las diferentes formulaciones de inóculo, a los 12 y 19 días del incubación. Table 2. Metabolic activity for *Lentinula boryana* strains ($\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$) grown in different spawn formulations, at 12 and 19 days of incubation.

Cepa	Días de incubación					
	12			19		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
IE-17	16.8±0.4 ^{f1}	43.4±6.5 ^b	11.4±4.4 ^f	20.5±7.7 ^b	33.8±2.9 ^{ab}	18.5±8 ^c
IE-93	46.8±14.8 ^b	56.9±14.4 ^a	18.9±3.6 ^{de}	18.6±6.7 ^c	29.2±10.2 ^b	16.9±4.2 ^c
IE-152	32.7±17.9 ^c	17.6±6.2 ^e	13.6±0.9 ^f	22.8±1 ^b	23.4±6.8 ^b	21.9±6.6 ^b
IE-154	10.0±0.3 ^g	34.6±6.4 ^{bc}	14.9±8 ^f	10.3±3.3 ^d	11.7±6.6 ^d	9.0±3.8 ^d
IE-232	42.7±8.3 ^b	17.9±6.2 ^c	15.1±1.4 ^f	17.3±1.5 ^c	29.0±2.2 ^b	25.1±2.8 ^b
IE-233	40.9±10.2 ^{bc}	20.3±2.2 ^d	16.9±3.8 ^c	33.0±8.1 ^{abc}	19.9±6.6 ^b	36.3±5.3 ^{ab}
IE-250	15.1±5.3 ^f	6.4±3.4 ^h	6.9±2.6 ^h	31.9±7.8 ^{ab}	5.5±0.4 ^e	6.2±2.8 ^e
IE-268	23.2±3.9 ^c	21.5±4.5 ^d	14.6±10 ^f	9.0±8.2 ^d	9.6±1.3 ^d	19.6±11 ^b
IE-270	22.5±8.5 ^d	13.9±1.8 ^f	9.4±4.1 ^g	35.4±6.1 ^{ab}	13.4±5 ^{cd}	17.9±0.4 ^c
IE-271	18.4±4.4 ^e	19.9±4.5 ^d	10.2±4.2 ^g	14.9±1.6 ^c	23.6±13.9 ^b	13.9±6.2 ^c
IE-721	28.6±13.5 ^c	17.9±7.9 ^e	9.1±0.7 ^g	38.5±7.4 ^a	16.7±7.1 ^c	10.8±4.2 ^d
IE-735	43.4±12.1 ^b	23.8±4 ^c	11.9±2.4 ^f	39.4±3.8 ^a	24.0±7.7 ^b	12.3±2.8 ^{cd}
Promedio	28.4±12.6 ^a	24.5±13.9 ^a	12.7±3.5 ^b	24.3±10.9 ^a	19.9±8.7 ^{ab}	17.4±8.1 ^b

¹Valores son promedios ± desviación estándar de cinco réplicas. Valores dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

En la formulación preparada con pulpa de café (F2), los valores promedio de AM fluctuaron entre 6.4 (IE-250) a 56.9 (IE-93) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ a los 12 d de incubación; y de 5.5 (IE-250) a 33.8 (IE-17) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ a los 19 d. Las cepas que presentaron mayor AM a los 12 d fueron la IE-93 e IE-17. A igual que los resultados mostrados en F1, el comportamiento de los micelios desarrollados en pulpa de café fue variable a los 19 d de incubación, ya que mientras para las cepas IE-17, IE-93, IE-154 e IE-268 las AM fueron menores respecto a la medición anterior, las cepas IE-152, IE-232 e IE-271 presentaron mayor AM a los 19 d y en las cepas restantes los valores fueron similares entre los días detectados. En la formulación testigo (F3), la AM cuantificada a los 12 d fueron de 6.9 (IE-250) a 18.9 (IE-93) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$, y de 6.2 (IE-250) a 36.3 (IE-233) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ a los 19 d de incubación. Con excepción de las cepas IE-93, IE-154 e IE-250, el resto mantuvo o incrementó su AM a los 19 d, contrariamente a lo observado en las otras formulaciones.

Estimación de la tasa de crecimiento en residuos lignocelulósicos. La tasa de crecimiento (Kr) difirió significativamente entre la cepa ($F= 10.42$), sustrato ($F= 202.95$) y sus interacciones ($F= 3.00$). Todas las cepas presentaron su mejor crecimiento en el sustrato de paja-encino (PE) y el sustrato que no favoreció el desarrollo del micelio fue el de paja-teca (PT). Los valores promedio indican que la cepa IE-233 fue la de mayor Kr (2.06 mm d^{-1}), estadísticamente diferente a las otras cepas ($p < 0.05$), mientras que la IE-93 fue la de menor Kr (1.79 mm d^{-1}). En cada tratamiento hubo diferencias significativas, a excepción de las cepas IE-93 e IE-232, que presentaron los mismos resultados ($p > 0.05$) en PE y PV; y las cepas IE-233 e IE-735 que fueron estadísticamente similares en el sustrato PC y P (paja de cebada); pero en general, todas las cepas manifestaron el mismo patrón de selectividad por los sustratos; alcanzaron el mayor crecimiento de micelio en PE, y el menor en PT (Cuadro 3).

In the coffee pulp formulation (F2), the mean values of MA ranged from 6.4 (IE-250) to 56.9 (IE-93) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ following 12 d of incubation, and from 5.5 (IE-250) to 33.8 (IE-17) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ following 19 d of incubation. The strains that presented the highest MA following 12 d of incubation were IE-93 and IE-17. In common with the F1 results, the trend of the mycelia developed in coffee pulp was variable following 19 d of incubation: strains IE-17, IE-93, IE-154 and IE-268 presented lower MA compared to those measured at 12 d of incubation, while strains IE-152, IE-232 and IE-271 presented increased activity at 19 d of incubation and the detected values were similar between the two incubation times in the remaining strains. In the control formulation (F3), the MA quantified ranged from 6.9 (IE-250) to 18.9 (IE-93) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ at 12 d of incubation, and from 6.2 (IE-250) to 36.3 (IE-233) $\mu\text{Mol FDA min}^{-1}\text{g}^{-1}$ at 19 d of incubation. With the exception of strains IE-93, IE-154 and IE-250, the strains maintained or increased their MA at 19 d, in contrast to that observed in the other formulations.

Estimation of growth rate in lignocellulosic residues. Growth rates differed significantly between the strain ($F= 10.42$), substrate ($F= 202.95$) and their interactions ($F= 3.00$). All strains presented highest growth in the straw-oak substrate (SO) while the combination that least favored mycelial development was straw-teak (ST). The mean values indicate that hybrid strain IE-233 presented the highest Kr (2.06 mm d^{-1}), differing statistically in this regard to the other strains ($p < 0.05$), while IE-93 presented the lowest Kr (1.79 mm d^{-1}). There were significant differences in each treatment, apart from strains IE-93 and IE-232, which presented statistically similar results ($p > 0.05$) in SO and SV substrates; and strains IE-233 and IE-735, which were statistically similar in SC and S (barley straw). In general, however, all of the strains presented the

Cuadro 3. Tasa de crecimiento lineal (mm d^{-1}) de las cepas de *Lentinula boryana* en diferentes sustratos, incubadas a 25 °C en oscuridad.

Table 3. Linear growth rate (mm d^{-1}) of *Lentinula boryana* strains in different substrates, incubated at 25 °C in darkness.

Sustrato	Cepa					Promedio
	H (%)	IE-93	IE-232	IE-233	IE-735	
PE	76	2.56±0.11 ^l	2.53±0.22 ^l	2.66±0.21 ^l	2.80±0.19 ^m	2.64 ^d
PV	75	2.10±0.19 ⁱ	2.03±0.31 ⁱ	2.45±0.23 ^l	2.26±0.13 ^k	2.2 ^c
PC	80	1.88±0.18 ^h	1.19±0.07 ^c	2.19±0.12 ^j	2.19±0.20 ^j	2.05 ^c
P	78	1.34±0.33 ^e	1.55±0.19 ^f	1.71±0.32 ^g	1.75±0.14 ^g	1.59 ^b
PT	76	1.05±0.29 ^b	1.17±0.16 ^c	1.30±0.32 ^d	0.78±0.28 ^a	1.08 ^a
Promedio		1.79 ^a	1.84 ^b	2.06 ^d	1.96 ^c	

H=humedad; PE=paja-encino; PV: paja-vid, PC=paja-bagazo de caña; P=paja de cebada, PT=paja-teca. Valores representan el promedio± desviación estándar. Promedios que no tienen al menos una letra en común en cada cepa y en los sustratos, son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Se observó una disminución del pH en todos los sustratos conforme transcurrió el tiempo de crecimiento. El valor inicial varió de 5.35 (PE) a 6.18 (PT), con un pH final promedio de 2.9 a 3.28, respectivamente, por efecto del crecimiento de las cepas. La cepa IE-232 favoreció una mayor disminución del pH del sustrato, con un valor final de 2.1, mientras que la IE-735 fue la que ejerció menor efecto en la disminución del pH, presentando un valor final de 3.3. Por otra parte, en general, los sustratos manifestaron una pérdida de 0.7 a 3.3% de humedad del valor final respecto al inicial.

Formación de carpóforos. Todas las cepas fructificaron en PE y PV, excepto la IE-93 cuya producción de hongos fue mínima por lo que no se consideró en el análisis de la producción. Las cepas IE-232 e IE-735 formaron fructificaciones de tamaño G1 y G2 en ambos sustratos, solo que la IE-735 logró hongos G3 en PV, una característica importante a destacar para esta cepa. Las cepas produjeron principalmente hongos del G1 en PV, excepto la IE-735 donde el G2 fue el mayoritario. En el promedio general, el sustrato PE produjo más hongos del G2, mientras que PV produjo más G1 (Cuadro 4). La producción de hongos se distribuyó en dos cosechas, excepto para las cepas híbridas IE-232 e IE-233 que produjeron sólo una cosecha en PE.

same pattern of selectivity in terms of substrate, producing highest mycelial growth in straw-oak (SO), and lowest in straw-teak (ST) (Table 3).

The pH decreased in all substrates over time. Initial pH values of the substrates ranged from 5.35 (SO) to 6.18 (ST), with average final pH values of 2.9 to 3.28, respectively, due to the effect of the growth of the fungal growth. Hybrid strain IE-232 produced the greatest decrease in substrate pH, with a final value of 2.1, while IE-735 had the least effect on the decrease of pH, presenting a final value of 3.3. In general, this study revealed that the substrates presented a decrease in moisture content of 0.7 to 3.3 % relative to the initial value.

Carpophore formation. All strains produced carpophores in substrates SO and SV. The strain IE-93 produced a minimal number of mushrooms and was therefore excluded from the production analysis. Strains IE-232 and IE-735 produced carpophores of sizes G1 and G2 in both substrates, but IE-735 produced size G3 mushrooms on SV, a characteristic that is important to highlight in this strain. The predominant production corresponded to G1 on SV, except for IE-735 where most were of size G2. In general, the substrate SO produced more mushrooms of size G2 while SV produced more of size G1 (Table 4). Mushroom production was

Cuadro 4. Tamaño de los hongos de *Lentinula boryana* cosechados de PE y PV.

Table 4. Size of *Lentinula boryana* mushrooms harvested from SO and SV.

Cepa ¹	Distribución de la producción por grupo de tamaño (g) ² (%) ³					
	Paja-encino			Paja-vid		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
IE-232	10.06 (70.34)	4.24 (29.65)	-	13.30 (60.84)	8.56 (39.15)	-
IE-233	2.98 (36.43)	5.20 (63.56)	-	6.22 (100)	-	-
IE-735	11.92 (39.36)	18.36 (60.63)	-	18.90 (28.82)	38.54 (58.78)	8.12 (12.38)
Promedio	48.71	51.28	-	63.22	32.64	4.12

¹Grupo de tamaño asignado de acuerdo al diámetro del píleo: G1 <5 cm; G2 5 - 9.9 cm; G3 >10 cm. ²Peso obtenido de los hongos en seis réplicas de 1.8 kg (peso húmedo) cada una. ³Porcentaje de producción por grupo de tamaño para cada cepa.

Con respecto a los días de incubación, la cepa IE-232 tuvo una formación temprana de primordios en ambos sustratos, a 66 (PE) y 70 d (PV), pero no todos lograron alcanzar su etapa adulta, lo que podría indicar que las condiciones ambientales que se establecieron durante este periodo no le fueron favorables. La cepa IE-233 requirió de 72 y 74 d para la formación de primordios y la IE-735 de 80 y 76 d en PE y PV, respectivamente (Cuadro 5).

distributed across two harvests, except for hybrid strains IE-232 and IE-233, which produced only one harvest in SO. It was observed that production (g) of the strains diminished in the second harvest.

Regarding the incubation period, strain IE-232 presented an early stage of *L. boryana* primordia development in both substrates, at 66 (SO) and 70 d (SV). However, not all of

Cuadro 5. Distribución de la producción total de hongos frescos (g) de *Lentinula boryana*, en los sustratos PE y PV, durante dos cosechas.

Table 5. Distribution of total production of fresh mushrooms (g) of *Lentinula boryana* in the SO and SV substrates for two harvests.

Cepa	³ Producción por cosecha (g)(%)									
	Paja-encino					Paja-vid				
	PI ¹	PP ²	Primera	Segunda	Peso total	PI ¹	PP ²	Primera	Segunda	Peso total
IE-232	66	53	14.3(100)	-	14.3	70	49	17.10(78.22)	4.76(21.77)	21.86
IE-233	72	49	8.18(100)	-	8.18	74	31	5.42(87.1)	0.80(12.86)	6.22
IE-735	80	59	21.54(72.84)	8.74(27.16)	30.28	76	37	57.34(87.46)	8.22(12.53)	65.56

¹Periodo de incubación (tiempo necesario para la formación de primordios). ²Periodo de producción (tiempo transcurrido desde la formación de primordios hasta la última cosecha). ³Peso fresco promedio y porcentaje de producción de hongos de cada cepa durante cada cosecha en seis réplicas de 1.8 kg (peso fresco).

La EB, TP y R fueron significativamente afectados por la cepa ($F= 94.17, 90.33, 94.17$, respectivamente), el sustrato ($F= 29.50, 51.07, 29.50$, respectivamente) y sus interacciones ($F= 19.82, 34.84, 19.82$, respectivamente). Los valores promedio de EB, TP y R, indican que la cepa IE-735 fue estadísticamente mejor a las otras cepas ($p<0.05$) y presentó en PV los mejores resultados de EB (12.92%), TP (0.125%) y R (3.642%), en tanto que en PE se observaron valores de 5.96%, 0.041% y 1.682%, respectivamente. La cepa híbrida IE-232 fue estadísticamente similar en los valores de TP y R ($p> 0.05$) en PE y PV, mientras que la cepa IE-233 produjo los valores más altos de EB y R en PE, aunque la TP fue similar ($p> 0.05$) en ambos sustratos. En el promedio general, el sustrato PV fue significativamente mejor que el sustrato PE ($p< 0.05$) (Figura 1).

these reached the adult stage, which could indicate that the environmental conditions established during this period were unfavorable. Strain IE-233 required 72 and 74 d for primordial formation, and IE-735 required 80 and 76 d of incubation in SO and SV, respectively (Table 5).

The parameters of BE, PR and Y were significantly affected by strain ($F= 94.17, 90.33, 94.17$, respectively), substrate ($F= 29.50, 51.07, 29.50$, respectively) and their interactions ($F= 19.82, 34.84, 19.82$, respectively). In general, based on BE, PR, and Y, the best strain was IE-735 with significant difference from the rest of the strains ($p< 0.05$) and in SV presented the highest BE (12.92%), PR (0.125%) and Y (3.642%) values, while in SO values of 5.96%, 0.041% and 1.682% were observed, respectively. Hybrid strain IE-232

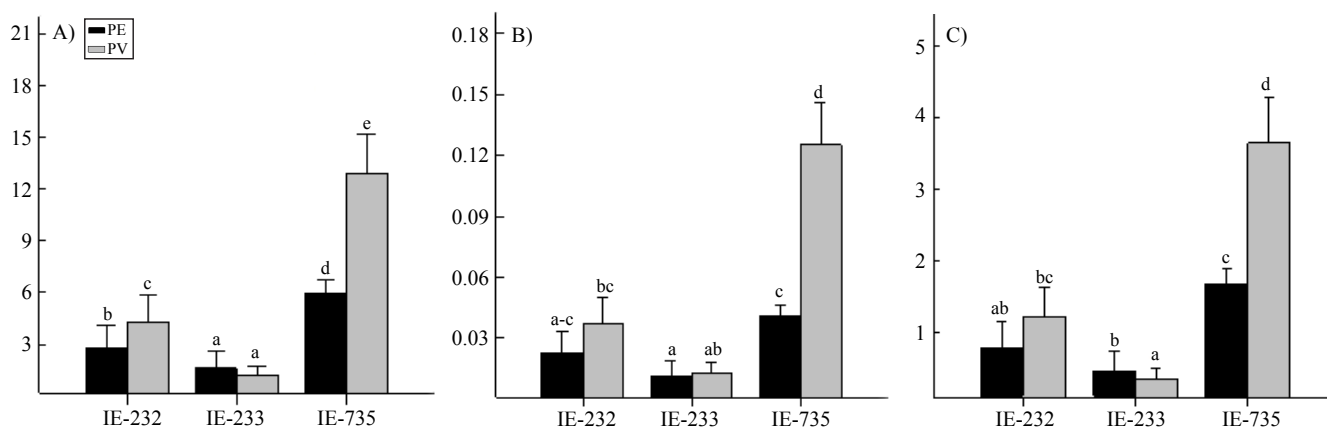


Figura 1. Eficiencia biológica (%) (A), tasa de producción (%) (B) y rendimiento (%) (C) de *Lentinula boryana* cultivado en paja-encino (PE) y paja-vid (PV). Valores representan el promedio de cinco réplicas. Promedios que no tienen al menos una letra en común en cada cepa y sustrato, son significativamente diferentes ($p< 0.05$, Tukey).

Figure 1. Biological efficiency (%) (A), Rate of production (%) (B), and Yield (%) (C) of *Lentinula boryana* cultivated on straw-oak shavings (SO) and straw-vineyard pruning (SV). Values represent the mean of five values. Means that do not have at least one letter in common in each strain and in the substrates are significantly different ($p< 0.05$, Tukey).

Discusión

Se ha demostrado que la aplicación de suplementos en la preparación del inóculo de shiitake puede incrementar su vigorosidad y mejorar su resistencia ante la presencia de mohos antagonistas (Mata *et al.*, 2002). No existen estudios previos de suplementación de inóculo para *L. boryana*, pero debido a que ambos hongos crecen de manera natural en madera en descomposición de encino y que además, la fructificación de la especie americana se ha logrado con técnicas y sustratos utilizados para *L. edodes*, se podría esperar un comportamiento similar entre ambas especies a nivel micelial. Los resultados de esta etapa mostraron que la adición de paja de trigo o pulpa de café a las semillas de mijo incrementan el crecimiento micelial y la producción de biomasa en las cepas de *L. boryana*, debido probablemente a la presencia de elementos químicos que favorecen una mayor actividad enzimática del hongo.

De acuerdo a Beltrán García *et al.* (2001), los compuestos flavonoides y fenólicos presentes en cultivos líquidos de *L. edodes* podrían ser los responsables del incremento en la producción de biomasa. Sin embargo, cuando se cultiva un hongo en un sustrato de composición química compleja como es la pulpa de café, el organismo requiere primeramente detoxificar el medio a través de la secreción de enzimas que degraden los compuestos inhibitorios del desarrollo micelial y posteriormente, incrementar su biomasa; esto podría explicar porque las cepas de *L. boryana* evaluadas presentaron mayor biomasa en paja de trigo que en la pulpa de café, comportamiento previamente observado en cultivos de *Pleurotus* spp. (Salmones *et al.*, 2005).

Con base a la experimentación *in vitro*, tanto el sustrato como la cepa utilizados son variables que influyen en los resultados de la *Kr* de *L. boryana*. También se observó, que la adición de madera de encino, madera de vid o bagazo de caña a la paja de cebada (1:1) estimuló el crecimiento de *L. boryana*, mientras que la adición de madera de teca (1:1) no lo incrementó.

La disminución de pH en los sustratos durante el período de incubación en las especies de pudrición blanca, como la aquí estudiada, tienden a acidificar el sustrato de crecimiento. En el presente estudio, específicamente con la cepa IE-232, se observó una relación entre la disminución del pH y la temprana aparición de primordios. Esta disminución del pH por *L. boryana* también había sido citada por Hermann *et al.* (2013) después de 30 días de incubación en cultivo sumergido. Los

was statistically similar in terms of PR and Y values ($p > 0.05$) on SO and SV, while strain IE-233 produced higher BE and Y values on SO, although PR was similar ($p > 0.05$) in both substrates. In general, SV produced significantly better results than SO ($p < 0.05$) (Figure 1).

Discussion

It has been demonstrated that the application of supplements in the preparation of the shiitake inoculum can increase vigor and improve resistance to antagonistic molds (Mata *et al.*, 2002). There have been no previous studies of inoculum supplementation in *L. boryana*; however, given the fact that both mushrooms grow naturally on decomposing oak wood and that fructification of the American species has been achieved with techniques and substrates used for *L. edodes*, similar behavior could be expected from the two species at mycelial level. The results of this stage show that the addition of barley straw or coffee pulp to the millet seeds increases mycelial growth and biomass production in strains of *L. boryana*, probably due to the presence of elements that favor a higher enzymatic activity in the mushroom.

According to Beltrán-García *et al.* (2001), the flavonoid and phenolic compounds present in liquid cultures of *L. edodes* could be responsible for increased biomass production. However, when a fungus is cultured in a substrate of complex chemical composition such as coffee pulp, the organism must first detoxify the medium by secreting enzymes to degrade the compounds that inhibit mycelial development and only then increase biomass; this could explain why the strains of *L. boryana* evaluated presented higher biomass in barley straw than in coffee pulp, a behavior also observed in cultures of *Pleurotus* spp. (Salmones *et al.*, 2005).

Based on the *in vitro* experimentation, both substrates and strains are variables that influence the *L. boryana* mycelial growth rates. It was also observed that the addition of oak wood, vine wood or sugar cane bagasse to the barley straw (1:1) stimulated *L. boryana* growth while the addition of teak wood (1:1), did not increase mushroom growth.

The decrease in substrate pH during the incubation period on the white rot fungi such as *L. boryana* tend to acidify the growth substrate. In the present study, specifically with strain IE-232, a relationship was observed between the decrease in pH and the early appearance of primordia.

mejores resultados de *Kr* fueron en PE, esto está relacionado con el hecho de que esta especie crece de manera natural en troncos en descomposición de *Quercus*. La cepa híbrida IE-233 presentó la mayor *Kr*, posiblemente debido a mejor asimilación de los componentes de los sustratos probados. La *Kr* del micelio no se correlacionó con la formación de carpóforos ($r^2 = 0.33$), por ejemplo, la cepa IE-233 que presentó mejor crecimiento de micelio, no manifestó los mayores valores de producción; mientras que la cepa IE-735 tuvo una menor *Kr* que la IE-233 pero presentó la mayor EB.

Sobre la producción de *L. boryana* en paja de cebada y madera de vid, no existe referencia previa; no obstante, los mejores valores de EB en este estudio, fueron los de la cepa IE-735 en PV (12.92%). Estos valores no superan los reportados por Gaitán-Hernández (2001) quien probó el bagazo de caña y una mezcla de este sustrato con viruta de *Pinus* spp. (EB=36.82%) y de *P. montezumae* (EB=25.45%) para la fructificación de esta especie, ni los reportados por Salmones y Gutiérrez Lecuona (2008) (EB= 15.02%).

En este estudio, el mejor sustrato para la producción de *L. boryana* fue la combinación PV; la madera de vid ha resultado ser un sustrato excelente para la fructificación de *Lentinula edodes* (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006), es probable que la combinación de la composición química del mismo y la adición de salvado de trigo, influyeron considerablemente en la estructura física y disponibilidad de nutrientes necesarios para el desarrollo de la especie aquí estudiada.

Conclusión

La suplementación del inóculo de *L. boryana* con paja de cebada favoreció el incremento en la actividad metabólica y el crecimiento radial micelial *in vitro* de las cepas. La suplementación con la pulpa de café favoreció una mayor actividad pero no tuvo efecto sobre un mayor crecimiento micelial, debido probablemente a la presencia de compuestos químicos (polifenoles, cafeína y ácido cafeico) presente de manera natural en este sustrato, que pudieron haber interferido con el desarrollo micelial. En general, los mayores valores de crecimiento correspondieron al inóculo suplementado con paja de cebada. La evaluación de *Kr* y la formación de carpóforos reveló que el sustrato y la cepa utilizados tuvieron una influencia en el crecimiento y producción de hongos de esta especie.

Reduction in pH caused by *L. boryana* has also been reported by Hermann *et al.* (2013), following 30 days of incubation in submerged culture. The best results for *Kr* assay were found on SO. This is related to the fact that this species grows naturally on decomposing trunks of *Quercus*. Hybrid strain IE-233 presented the highest *Kr*, possibly due to greater assimilation of the components of the test substrates. The *Kr* of the mycelium did not correlate with the formation of carpophores ($r^2=0.33$); for example, strain IE-233 presented greater mycelial growth but this did not manifest in higher production, while strain IE-735 had a lower *Kr* than IE-233 but presented greater BE.

There are no previous studies exploring *L. boryana* production in barley straw and vineyard pruning; however, the best BE values obtained in this study were those of strain IE-735 in the SV combination (12.92 %). These values do not exceed those reported by Gaitán-Hernández (2001), who tested sugar cane bagasse and a mixture of this substrate with shavings of *Pinus* spp. (BE= 36.82%) and *P. montezumae* (BE= 25.45%) for fructification of this species, or those reported by Salmones and Gutiérrez-Lecuona (2008) (BE= 15.02%).

In the present study, the best substrate for production of *L. boryana* was the combination SV; vine wood has proved to be an excellent substrate for the fructification of *Lentinula edodes* (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006), and it is possible that the combination of the chemical composition of this combination and the addition of wheat bran, had a considerable influence on the physical structure and availability of nutrients necessary for the development of the species studied here.

Conclusion

In conclusion, supplementation of the *L. boryana* spawn with barley straw favored an increase in the metabolic activity and radial extension growth of the strains *in vitro*. Supplementation with coffee pulp favored a higher metabolic activity but did not have an effect in terms of greater mycelial growth; this was probably due to the presence of chemical compounds (polyphenols, caffeine and caffeic acid) naturally present in this substrate that may have interfered with the mycelial development. In general, the highest values of growth corresponded to the inoculum

La adición de viruta de madera de encino, madera de la poda de vid o de bagazo de caña de azúcar a la paja de cebada, favoreció el crecimiento del micelio, mientras la adición de viruta de la madera de teca fue perjudicial. Las combinaciones de los sustratos PE y PV representan residuos lignocelulósicos potenciales para la formación de carpóforos de *L. boryana*.

Este estudio es una contribución a la optimización del proceso de cultivo de una especie comestible susceptible de ser comercializada, la cual es consumida regionalmente y representa un recurso genético importante para la diversificación de germoplasma de interés comercial. Sin embargo, se requieren de más estudios para caracterizar cepas, determinar su capacidad para biodelignificar el sustrato y para seleccionar otras características adecuadas para su producción en sustratos alternativos. De igual manera, el trabajo aporta información relevante en el potencial uso de residuos lignocelulósicos, para la producción del inóculo y la formación de carpóforos del “shiitake americano” *Lentinula boryana*.

Agradecimientos

Se agradece a la M. C. Rosalía Pérez, Biólogo Carlos Ortega y Biólogo Víctor H. Márquez por su colaboración en la parte experimental, así como al Instituto de Ecología, A. C. y al CONACYT, por el apoyo financiero.

Literatura citada

- Beltrán-García, M. J.; Orozco Samayoa, A. I. and Ogura, T. 2001. Lignin degradation products from corn stalks enhance notably the radical growth of basidiomycete mushroom mycelia. Mexico. Rev. Soc. Quím. Méx. 45:77-81.
- Capelari, M.; Asai, T. and Ishikawa, N. K. 2010. Occurrence of *Lentinula raphanica* in Amazonas State, Brazil. Mycotaxon 113:355-364.
- Gaitán-Hernández, R. 2001. Use of brown-rot fungus degraded substrate for the cultivation of *Lentinula* spp. and *Pleurotus* spp. Mush. Res. 10(1):13-21.
- Gaitán-Hernández, R. 2012. Especies de hongos comestibles, recurso genético nativa para la generación de una alternativa productiva en México. In: los microorganismos y su importancia biotecnológica y ecológica. Carreón- Abud, Y.; Mendoza de Gives, P. y Rodríguez- Guzmán, M. P. (Eds.). SUBNARGEM-SAGARPA-UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 55-585 pp.
- Gaitán-Hernández, R.; Esqueda, M.; Gutiérrez, A.; Sánchez, A.; Beltrán-García, M. and Mata, G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:432-439.

supplemented with barley straw. Similarly, the evaluation of *Kr* and carpophore formation revealed that the substrate and the strain utilized had an influence on the growth and production of mushrooms of this species.

Addition of oak wood shavings, vineyard pruning or sugar cane bagasse to the barley straw favored mycelial growth while the addition of teak wood shavings was prejudicial. The combinations of the straw-oak and straw-vineyard substrates represent lignocellulosic residues with potential for the formation of *L. boryana* carpophores.

This study is a contribution to the optimization of the cultivation process of an edible species that is consumed regionally, has potential for commercialization and represents an important genetic resource for the diversification of germplasm of commercial interest. However, further studies are required to characterize these strains, determine their capacity for substrate biodelignification and to select other features amenable to their production on alternative wastes. Equally, the present study provides information that is relevant for the potential use of lignocellulosic residues for the production of inoculum and formation of carpophores of the “American shiitake” *Lentinula boryana*.

End of the English version



- Garibay-Orijel, R.; Ruán-Soto, F. y Estrada-Martínez, E. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el desarrollo del aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. In: hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. Martínez-Carrera, D.; Curvetto, N.; Sobal, M.; Morales, P. and Mora, V. M. (Eds.). COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla, Puebla, México. 243-270 pp.
- Guzmán, G.; Salmones, D. and Tapia, F. 1997. *Lentinula boryana*: morphological variations, taxonomic position; distribution and relationships with *Lentinula edodes* and related species. Rep. Tottori Mycol. Inst. 3:1-2.
- Hermann, K. L.; Costa, A.; Helm, C. V.; De Lima, E. A. and Tavares, L. B. B. 2013. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentation. An. Acad. Bras. Cienc. 85:965-973.
- Inbar, Y.; Boehm, M. J. and Hoitink, H. A. J. 1991. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Phytophthora ultimum*. Soil. Biol. Biochem. 23:479-483.
- Mata, G. y Gaitán-Hernández, R. 1992. Utilización de pulpa de café mezclada con viruta de madera de para el crecimiento micelial de *Lentinula boryana* y *L. edodes*. Rev. Mex. Mic. 8:125-129.
- Mata, G. and Guzmán, G. 1993. Cultivation of *Lentinula boryana* in wood shavings in Mexico. Crypt. Bot. 4:47-49.

- Mata, G.; Salmones, D. and Ortega, P. M. 2000. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* strains (Fungi: Basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:283-287.
- Mata, G.; Savoie, J. M. and Delpech, P. 1997. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in the presence of soluble lignin derivatives in solid media. *Material u Organismen.* 31:109-122.
- Mata, G.; Delpech, P. and Savoie, J. M. 2001. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. *Rev. Iberoam. Mic.* 18:118-122.
- Mata, G.; Gaitán-Hernández, R.; Pérez-Merlo, R. and Ortega, C. 2002. Improvement of shiitake spawn for culturing on pasteurized wheat straw. *In: mushroom biology and mushroom products.* Sánchez, J. E.; Huerta, G. and Montiel, E. (Eds.). UAEM, Cuernavaca, Morelos, México. 303-309 pp.
- Salmones, D.; Mata, G. and Waliszewki, K. N. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. On coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Biores. Tech.* 96(5):537-544.
- Salmones, D. and Gutierrez Lecuona, T. 2008. Cultivation of Mexican *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Singer (Agaricomycetidae) Strains on alternative substrates. *Int. J. Med. Mush.* 10:1-6.
- Soto-Velazco, C.; Fausto, S. and Guzmán-Dávalos, L. 1995. Cultivation of the mushrooms *Lentinus boryanus* and *L. edodes* on a mixture of maguey tequilero bagasse and sugarcane bagasse. *Afr. J. Mycol. Biotechnol.* 3:115-120.
- Thon, M. R. and Royse, D. J. 1999. Evidence for two independent lineages of shiitake of the Americas (*Lentinula boryana*) based on rDNA and beta-tubulin gene sequences. *Mol Phylogenet. Evol.* 13:520-524.