

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Ensayo de fructificación de *Agaricus campestris* "paku" en
condiciones experimentales. Ayacucho - 1997**

**Tesis para optar el título profesional de Biólogo,
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

Bach. Félix Ayme Cáceres

Asesor:

Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Ayacucho - Perú

1999

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

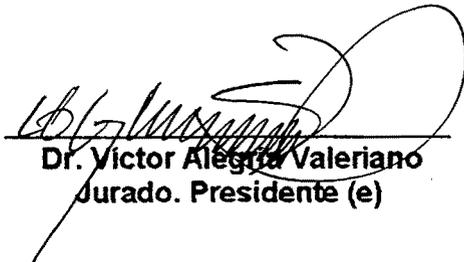
ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE BIOLOGIA

El Jurado Calificador da Constancia de que el Presente Trabajo de Tesis
Presentado por el **Bach. Félix Ayme Cáceres**.

Titulado:

**Ensayo de Fructificación de Agaricus campestris "paku", en Condiciones
Experimentales. Ayacucho-1997.**

Fue sustentado y aprobado con la nota de dieciséis (16) con fecha 22 de Diciembre
de 1999.



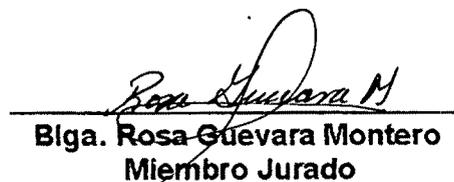
Dr. Víctor Alegre Valeriano
Jurado. Presidente (e)



Msc. César Magallanes Magallanes
Miembro Jurado



Biga. Laura Aucasime Medina
Miembro Jurado



Biga. Rosa Guevara Montero
Miembro Jurado

Con profundo cariño e infinita gratitud a mis padres David y Natividad, a quienes debo lo que soy y que gracias a sus ejemplos de constancia y sacrificio se realizaron mis mejores anhelos.

A mis hermanos; Máximo, Lidia, Teodoro y Dante, por su comprensión y ayuda en todo momento.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por conservar el reto de hacer surgir profesionales identificados con nuestra región. A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus conocimientos impartidos durante mi paso por las aulas en el difícil camino del saber.

Al Bigo. Mtblgo. Fidel R. Mujica Lengua, por su apoyo y asesoramiento durante todo el proceso del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Magdalena Pavlich Herrera, Profesora de la Facultad de Ciencias y Filosofía del Departamento Académico de Biología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por acogerme y por su apoyo intelectual; Asesora del presente trabajo de Investigación.

Al Ing^o Agrónomo MSc. Alex Tineo, por su orientación en la preparación del compostaje y el procesamiento del análisis estadístico.

Un especial reconocimiento a mi hermano Máximo Ayme C., por su comprensión y ayuda para llegar al término del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	01
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	04
1.1. Antecedentes sobre el cultivo	04
1.2. Valor Nutritivo y Medicinal	05
1.3. Taxonomía y Morfología	07
1.4. Reproducción	08
1.5. Aislamiento	09
1.6. Identificación	11
1.7. Producción del "Blanco" (Semilla)	11
1.8. Inoculación e Incubación	16
1.9. Proceso de Compostaje	18
1.10. Siembra	26
1.11. Incubación y Propagación Vegetativa	28
1.12. Tierra de Cobertura	28
1.13. Inducción a la Fructificación	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS	31
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
IV. CONCLUSIONES	72
V. RECOMENDACIONES	74
VI. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	75
ANEXOS.	

RESUMEN

El presente trabajo describe el proceso de recolección de cuerpos de fructificación de *Agaricus campestris* "paku" de su hábitat natural; y los métodos de aislamiento, obteniéndose resultados satisfactorios utilizando el tejido plectenquimático.

Los medios de cultivo mas utilizados para la propagación y conservación de las cepas fueron Agar Compost, Agar EML y Agar Trigo. Para la producción de blanco o "semilla" se utilizó el grano de trigo. También se reportan los datos con respecto al crecimiento micelial en los diferentes medios nutritivos evaluados por periodos consecutivos para realizar la resiembra, evitando cualquier posible contaminación mediante una adecuada selección, teniendo en cuenta las características del micelio en crecimiento.

De igual modo el proceso de tipos de compostaje elaborados con evaluaciones diarias a las condiciones de fermentación lenta para tener un

sustrato adecuado para el crecimiento del micelio y fructificación de Agaricus campestris "paku".

Para la fructificación, se ensayaron con la cepa ACQ - 03 Agaricus campestris "paku" frente a la cepa Ab. 01 (comercial) instalados en 2 sistemas de cajas de cultivo con 6 peldaños cada uno, para cuatro tipos de compost con 3 repeticiones e incubados a las condiciones de Humedad de 90 - 95%, temperatura de 21 -23°C y con una aireación constante.

La metodología para la evaluación de la Eficiencia Biológica (EB), Tasa de Producción (TP) y Rendimiento (R) de los carpóforos producidos, han sido extraídos de cada caja de cultivo y luego pesados en gramos de peso fresco y seco; de igual manera se realizó para el sustrato (Compost), peso húmedo y seco en gramos respectivamente. Los resultados fueron llevados a las fórmulas de evaluación para procesar al análisis de varianza, con los siguientes resultados:

- De los 4 sustratos probados, el compost de estiércol de caballo y llama fue el mejor para la cepa Ab.01 (comercial) y para ACQ - 03 cepa nativa.
- La mayor producción mostrada para la Eficiencia Biológica (EB), Tasa de Producción (TP) y Rendimiento (R) fue la cepa Ab. 01 con 5.357, 9.273 y 0.210 % seguido por la cepa ACQ - 03 con 3.077, 5.573 y 0.120 % respectivamente.

INTRODUCCIÓN

El estudio sobre los hongos comestibles en nuestro país está en una etapa incipiente, debido a que se conoce poco sobre la tecnología de multiplicación y/o preparación de "semilla"; así como la fase de producción de los cuerpos fructíferos.

Los problemas alimenticios en la mayoría de la población son deficientes, a falta de un consumo de alimentos ricos en proteínas, vitaminas y minerales; consumiendo hongos comestibles podemos solucionar estos problemas, ya que estos hongos contienen una elevada cantidad de proteínas, vitaminas y minerales, fácilmente digeribles por el organismo humano.

En nuestra región existen muchas especies de hongos comestibles, entre las cuales tenemos a *Agaricus campestris* "paku", que es ampliamente conocido y consumido por los lugareños desde la antigüedad. Estos hongos conociendo una buena tecnología, se pueden aislar en cepas

puras y cultivarlas en ambientes controlados.

La diferencia con otros cultivos agrícolas, es que éstos, se realizan a campo abierto; por tanto, se efectúan de 1 a 2 cultivos anuales: sin embargo, para el cultivo de *Agaricus campestris* "paku", se necesitan invernaderos o casas especiales dotados de temperatura, humedad y aireación adecuadas. A estas condiciones el cultivo es sin cesar, realizando de 4 a 5 cultivos anuales.

Uno de los factores principales es contar con cantidades grandes de materia prima lignocelulósica, para preparar el compost.

Nuestra región es propicia para este tipo de cultivos, ya que existe una inmensa cantidad de restos de desecho agrícola (material lignocelulósico), de diferentes calidades para la preparación del compost.

Para poder optimizar el cultivo de *Agaricus campestris* se requiere tener en cuenta los siguientes factores: (a) Obtener una producción de blanco o "semilla" de calidad, que se utiliza para inocular al sustrato (compost), y esta debe ser producida continuamente bajo condiciones libre de contaminantes en cantidades adecuadas; ya que se utiliza a razón de 400 g/m² de cama de cultivo. (b) Obtener un compost de calidad adecuada para la nutrición y crecimiento, sólo para *Agaricus campestris* "paku", de tal modo que no se encuentren en el sustrato microorganismos perjudiciales ni competidores en el proceso de crecimiento micelial y fructificación.

En el presente trabajo de investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislar en cultivo puro, micelios de *Agaricus campestris* "paku" por cultivo de esporada, tejido Plectenquimático y cultivo directo de micelios en condiciones de campo.
2. Seleccionar un medio de cultivo selectivo apropiado para la conservación y propagación de micelios de *Agaricus campestris* "paku".
3. Establecer las condiciones más apropiadas de temperatura, humedad relativa y aireación para la fructificación en condiciones de invernadero.
4. Evaluar la Eficiencia Biológica (%EB), Tasa de Producción (%TP) y Rendimiento (%R) en 4 tipos de compost a base de estiércol de llama, caballo y cuy.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANTECEDENTES SOBRE EL CULTIVO.

El cultivo de hongos comestibles en el ámbito mundial como fuente de alimentación es muy antiguo. Las especies *Lentinus edodes* y *Volvariella volvacea* se consumen desde hace más de 2000 años en los países asiáticos, como producto de un cultivo artificial.

La especie *Agaricus bisporus*, comenzó a cultivarse en el siglo XVIII, en Francia, más recientemente otras especies como *Pleurotus ostreatus* han entrado al grupo de los hongos cultivados (LEAL, 1993).

Agaricus bisporus es el más importante en función a los volúmenes de producción y la amplia distribución de zonas en donde se le cultiva. La producción de Shii – Take, un hongo japonés, también es notable, aunque su consumo no es tan generalizado como el del champiñón, siendo el consumo principalmente en el Japón.

Actualmente en México se cultivan de manera rudimentaria dos

especies de hongos, *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, imperando en un alto grado de empirismo, debido principalmente al escaso nivel de conocimiento científico y tecnológico en esta área.

Los hombres han consumido hongos comestibles desde los tiempos más primitivos; los griegos y los romanos ya los conocían y Dioscórides en su "Materia Médica" distinguía los comestibles de las venenosas (IBAR, 1980).

FIDALGO e GUMARAES (1985), manifiesta que el cultivo de hongos comestibles en Brasil se inició en escala comercial a partir de 1953, en el estado de Sao Paulo, con la especie de *Agaricus campestris* actualmente la producción del país se restringe a nuevas especies de *Agaricus campestris* conocido como champiñón y *Pleurotus ostreatus* Kummer vulgarmente conocido como calteta o cogumello gigante.

NICHOLS (1993), menciona que el cultivo de hongos comestibles, puede resultar provechosa para muchos países en vías de desarrollo. Ofrece buenas oportunidades de inversión y de generación de empleos, así como una valiosa fuente de proteína. Por necesitar mucha mano de obra, que abunda en los países en desarrollo.

1.2. VALOR NUTRITIVO Y MEDICINAL.

El valor nutritivo de los hongos comestibles es similar al de diversas hortalizas. Su contenido de proteínas es elevado, alcanzando de 1.5 al 6.0%, el valor de hidratos de carbono oscila entre 3.5 y 5%, son pobres en materias grasas, sin embargo, son ricas en cierto número de minerales, como potasio, fósforo, magnesio, hierro y calcio.

Cuadro N° 01: Composición media del “champiñón” comparando con otros productos vegetales y animales.

Espece	Agua	Proteínas	Materias grasas	Hidrato de carbono	Minerales
<i>Champiñón</i>	90	3.5	0.3	4.0	1.0
<i>Boleto</i>	86	5.4	0.4	5.2	1.0
<i>Cantarelas</i>	91	2.6	0.8	3.5	0.7
<i>Espinaca</i>	93	2.2	0.3	1.0	1.9
<i>Espárrago</i>	93	1.8	0.1	2.0	0.6
<i>Papas</i>	75	2.0	0.1	21.0	1.1
<i>Leche</i>	87	3.5	3.7	4.8	0.7
<i>Vacuno</i>	68	18.0	3.0	0.5	0.5

FUENTE: Vedder (1993), porcentaje sobre peso fresco.

También son ricas en vitaminas como la tiamina (B₁), la riovflavina (B₂), la piridoxina (B₆), ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido fólico, ácido ascórbico (Vit. C), ergosterona (provitamina D₂) y la biotina (Vit. H).

LAMBERT (1972), menciona que estas vitaminas se conservan bien cuando los champiñones se cocinan, se enlatan, se deshidratan o se congelan.

El consumo de hongos puede adicionalmente tener efecto curativo. Por ejemplo el contenido del ácido fólico favorece la curación de muchos casos de anemia; las sustancias presentes en el hongo (Shii - take), permite disminuir el contenido del colesterol en la sangre, también fue descubierto por investigadores japoneses, que en los hongos comestibles existe ciertas sustancias que detienen el cáncer (VEDDER, 1993).

1.3. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.

La especie de hongo comestible *Agaricus campestris*, comprendido en el presente estudio, se clasifica de la siguiente manera (ALEXOPOULOS, 1985; DEACON, 1993):

Reino	:	Fungi.
División	:	Eumicetes.
Clase	:	Basidiomycetes.
Sub - Clase	:	Holobasidiomycetidae II
Orden	:	Agaricales.
Familia	:	Agaricaceae
Género	:	Agaricus.
Especie	:	<u><i>Agaricus campestris</i></u>
Nombre vulgar:	:	"paku", "champiñón", "hongo blanco".

Agaricus campestris.- Presentan las características siguientes:

- Sombrero o píleo.- Con superficie seca, lisa y suavemente fibrosa, blanco puro a veces poco coloreado a pardo canela totalmente brillante con velo remanente.
- "Carne".- Es grueso, blanco, no se mancha cuando es maltratado; pero a veces se colorea a pardo rojo con el tiempo o en agua (especialmente junto por encima de las lámelas), olor agradable.
- Lámelas.- Son cerrados, de color rosado pálido en el estado juvenil, luego rosado brillante, empezando de púrpura, marrón a chocolate y finalmente pardo - chocolate.
- Pedicelo o pie.- Es gruesa, y una base delgada firme, liso, por encima del velo frecuentemente con un poco de fibra.

- Espora.- Es de color chocolate - pardo de $6.5 - 8.5 \times 4 - 5.5 \mu$, elíptica, lisa, la capa superficial no se amarillenta con KOH, basidio con más de 4 esporas.
- Hábitat.- crecen en gras a lo largo del mundo, desde el nivel del mar hasta las alturas. Usualmente crecen en grupos o en círculos en campos, pastizales, fructifican al comienzo del invierno (ARORA, 1986).

Agaricus campestris, son hongos que presentan una lámina de color café violáceo al inicio y finalmente café chocolate o negro violáceo; el sombrero es blanco y liso, con pocas escamas de color café rojizo. Son hongos de pie corto, aproximadamente del largo del diámetro del sombrero. Presentan anillo sencillo, suelto, membranoso colgante, delicado y fácilmente desprendible. Sombrero de 3 a 8 cm de diámetro, crecen silvestres en conjuntos a veces formando círculos o "anillos", en las praderas, potreros y jardines, en zonas tropicales, subtropicales y templadas (GUZMÁN, 1980).

1.4. REPRODUCCIÓN.

La reproducción de un basidiomiceto es un caso especial, ya que se realiza la fusión de hifas vegetativas provenientes de dos cepas monocarióticas. Después de disolverse las paredes, los núcleos se desplazan hacia el tipo de apareamiento hifal tiene dos núcleos diferentes, condición dicariótica, en última etapa se forma el cuerpo fructífero que desarrolla basidios; en cada basidio los núcleos se fusionan, hay meiosis y los núcleos haploides resultantes migran hacia las basidiosporas en

desarrollo (DEACON, 1993).

La fusión de núcleos se retrasa después de la conjugación, mientras tanto, el micelio dicariótico ha producido gran cantidad de basidios en los que se lleva a cabo la meiosis; una sola fusión de colonias compatibles da lugar a la producción de muchos millones de esporas de dispersión genéticamente diferentes.

Las esporas de los basidiomicetos tetranucleados contienen un único núcleo haploide y el micelio se forma tras la fusión de dos micelios primarios. La formación del cuerpo fructífero requiere la presencia simultánea de dos genes, el A_1 y el A_2 , cada uno de los cuales sólo puede estar en un único núcleo. Si los dicariones de un micelio tienen el mismo gen A_1 ó A_2 , no tiene lugar la formación del cuerpo fructífero. Se trata, por tanto, de "basidiomicetos heterotálicos" (WOLFGANG y GERHARD, 1994).

1.5. AISLAMIENTO.

El aislamiento de cepas consiste en un trabajo de laboratorio, partiendo de tejidos de sombrero o pie o también de una masa de esporas. Se obtiene un cultivo puro de micelio de champiñón, generalmente sobre un medio nutritivo compuesto de estiércol o malta solidificado con gelosa (Agar - agar).

Un cultivo puro, es un cultivo que con ciertos artificios permiten obtener y proteger totalmente contra organismos extraños, de forma que el champiñón es el único que se encuentra en él (VEDDER, 1993).

Existen técnicas de aislamiento para realizar cultivos de material silvestre como:

Cultivo de Esporada Múltiple; se obtiene colocando verticalmente durante 6 - 12 horas el cuerpo fructífero recién cortado, del cual se desea hacer un cultivo, sobre una superficie estéril. Durante este tiempo, las esporas producidas en el cuerpo fructificante se depositan sobre la superficie estéril. A continuación se obtiene una suspensión (Con solución de NaOH al 1%) con las esporas depositadas y se transfiere a un medio nutritivo (LEAL, 1990).

Para el cultivo de tejido se obtiene cortando asépticamente piezas del tejido interior del cuerpo fructificante y colocándolas en medio nutritivo.

Los cultivos de tejido producen normalmente un rendimiento menor que los cultivos de esporada, derivados del mismo cuerpo fructificante.

En ambos casos mencionados es conveniente obtener cultivos de cuerpos fructificantes del primer periodo de fructificación ya que éstos cultivos tienden a producir la mayor parte de su rendimiento en primeros periodos de fructificación.

PAVLICH (1997), menciona que una vez obtenido el hongo, se debe lavar en agua corriente, luego remojar en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, luego se debe enjuagar con agua destilada estéril, enseguida retirar fragmentos de 1 a 2 mm de la parte interna del hongo y colocarlos repartidos en una placa Petri con medio nutritivo y se debe incubar a 25 °C.

Los aislamientos silvestres muestran mejor resistencia a condiciones de cultivo desfavorables que las especies comerciales, lo cual representa una característica importante para ser introducidos en estas últimas, mediante programas futuros de mejoramiento genético (WANG, 1993).

1.6. IDENTIFICACIÓN.

Para identificar un hongo comestible se debe tomar en cuenta las características más resaltantes del cuerpo fructífero; tal es así, que se debe tomar en cuenta la forma, color y la consistencia de cada una de las partes del hongo, incluyendo la parte interna o "carne" y la parte subterránea.

La presencia o ausencia de cualquier estructura o característica del cuerpo fructífero, llamativo a la vista, ejemplo: escamas, verrugas, pelos, espinas, poros, grietas, estrías, viscosidad, carnosidad.

El cambio de color de cualquiera de las partes, ya sea al maltratarse; presencia o ausencia de un jugo lechoso o látex al cortarse el hongo.

También se debe tomar en cuenta el sabor de la "carne". Observar el color de las esporas en masa, porque el color de las esporas es básico para la identificación de los hongos (ARORA, 1986; GUZMAN, 1980).

Una de las características para la identificación microscópica del micelio de los basidiomicotina, es que las hifas dicarióticas presentan pequeñas ramificaciones que se proyectan hacia atrás y se originan enfrente de un septo y se fusionan con el compartimiento que se encuentra detrás del septo. Estas estructuras se denominan conexiones en grapa o fíbulas.

1.7. PRODUCCIÓN DEL BLANCO (SEMILLA).

"Blanco" es el nombre común con el que se conoce el sustrato sólido colonizado por un micelio puro y fresco, que se utiliza como semilla para la

producción del champiñón.

RIGAU (1985), sostiene que el blanco es un sustrato especialmente preparado, según el modelo adoptado por el productor e invadido en su totalidad de micelio proveniente de la germinación de esporas. Es en cierto modo una concentración bajo en pequeño volumen, de filamentos micelianos muy finos de gran vigor, de selección perfecta, exenta de todos los gérmenes perjudiciales de origen vegetal o animal.

STAMENTS (1993), opina que el blanco es usado para inocular sustratos preparados; este inóculo consiste de un material transportador completamente colonizado por el micelio de un hongo. El tipo de material varía de acuerdo a la especie del hongo cultivado.

LAMBERT (1972), manifiesta que existen varios productores bien acreditados de "blanco" que han dominado la complicada técnica del cultivo puro indispensable para preparar el material de preparación desde las esporas del champiñón. Casi todos los cultivadores prefieren comprar los micelios de éstos productores a tratar de prepararlo ellos mismos. Finalmente VEDDER (1993), dice que el "blanco" es adquirido por productores especializados, que lo preparan con cuidado y en condiciones de higiene total.

1.7.1. Clases de "Blanco".

- Blanco estiércol. - Es el micelio crecido sobre el estiércol compostado de caballo o mezclas de éste con el estiércol de vacuno, lavado, secado y esterilizado. Se produce en forma comercial en una envoltura enrollada cilíndrica, protegida con papel encerado, que esté

impregnado con insecticida o en botellas de vidrio de un litro de capacidad. Éste debe ser roto, desmenuzado y sembrado sobre el compost (STAMETS, 1993).

- Blanco grano.-Este tipo de blanco fue desarrollado por Sinder en 1935; este blanco proporcionaba muchos puntos de siembra, siendo innecesario fragmentarlo en pequeños trozos y podía extenderse tal cual sobre la superficie del compost (VEDDER, 1993). También se puede usar granos artificiales preparados de estiércol de caballo, salvado de cualquier otro material similar compactados.

El blanco grano es una mezcla de cereal, en este caso trigo entero, cocido en agua y mezclado con carbonato de calcio y yeso (PAVLICH, 1997).

La disponibilidad y costo de los materiales son los principales factores a ser considerados para decidir cual es el material a ser usado para una producción comercial del blanco a gran escala (VEDDER, 1993).

1.7.2. Preparación del sustrato para el blanco.

Para la elaboración del blanco estiércol se puede usar estiércol de caballo o una mezcla de éste con estiércol de vaca; se realiza el compostaje del estiércol bajo condiciones naturales por tres semanas. Se lava varias veces el estiércol con agua corriente para purificar las posibles sustancias inhibitoras del crecimiento y luego se drena el agua en exceso quedando con un 60 a 65 % de humedad.

Se elimina la paja larga, tamizando a través de una malla gruesa o

escogiendo a mano de manera que el material final es un sustrato finamente dividido, húmedo sin olor fuerte, producto del compost descompuesto y de pequeños pedazos de paja. La preparación de este sustrato tiene la ventaja que se realiza en grandes cantidades y se puede regular la humedad exactamente (PINKENTON, 1978).

VAN GRIENSVEN (1983), menciona que para la producción del blanco - grano, es importante considerar el tipo de grano que se usa: el sorgo, primeramente es precocido con agua corriente por 20 minutos, luego se deja en reposo por dos minutos, se descarta el exceso de agua y se ajusta el pH con una mezcla de sulfato de calcio y carbonato de calcio, el contenido de humedad debe ser aproximadamente de 53% y pH aproximado de 6.8 antes de la esterilización. Sin embargo, el sorgo no es adecuado para trabajar a gran escala.

Si se usa trigo, éste se puede hacer hervir en una cantidad de agua que permita que el grano se hinche y que incremente su contenido de humedad para ser luego esterilizado a fin de obtener un sustrato con un 71% de humedad después de la esterilización (VEDDER, 1993).

1.7.3. Materiales de cultivo y esterilización.

VEDDER (1993), señala que el blanco se produce en botellas u otros recipientes de vidrio, sacos o botes de plástico y se tapan con algodón en rama o con filtro en cinta. Para matar todos los gérmenes se esterilizan durante hora y media a una temperatura de 120 °C los recipientes y su contenido.

PAVLICH (1997), menciona que el blanco se produce en frascos de

vidrio de 500 ml de capacidad, boca ancha y de tipo Pirex capaces de soportar un proceso de esterilización en autoclave. También se pueden usar bolsas de plástico de tipo polipropileno.

Se debe esterilizar por 25 minutos en autoclave o de 90 a 120 minutos en caso se use olla a presión.

1.7.4. El micelio - inóculo.

El micelio escogido para la producción del blanco, debe ser de primera calidad, es decir sano y que no muestre signos de degeneración, esto significa que el micelio crece lentamente o crece en forma densa algodonosa y levantado, que a menudo aparece en sectores sobre el agar y produce estromas. Los signos de degeneración incluyen manchas desnudas en las camas o también otro signo de degeneración es la presencia de "hongos llorosos", que no son sino cuerpos fructíferos que exudan gotas de líquido (VAN GRIENSVEN, 1983).

El compost es probablemente el mejor medio para el mantenimiento del micelio de *Agaricus*, dado que contiene la nutrición natural del hongo (LAMBERT, 1972).

En Horts, Laboratorio de Producción de Blanco Holandés, los micelios son mantenidos en tubos sobre agar - trigo y compost. Es posible mantener también, conservándolos en nitrógeno líquido que minimiza la posibilidad de cambio por mutación natural.

El medio nutritivo biomalta agar, agar harina avena y papa dextrosa - agar, algunas veces inducen al desarrollo del micelio algodonoso, mientras que el compost - agar no provoca esto (VAN GRIENSVEN, 1983).

LEAL (1990), señala para el mantenimiento de cepas existen métodos como: la transferencia periódica de micelio mantenido en medio nutritivo; la cepa se transfiere cada tres a seis meses y de ella se hacen subcultivos para producir inóculos usados en el cultivo comercial. Éste es el método empleado con mayor frecuencia para el mantenimiento de cepas de basidiomycetos por varios años. Como condición indispensable se tiene que efectuar un control continuo de la productividad y de otras características de la cepa, para así poder detectar a tiempo una posible degeneración.

La estabilidad de las cepas depende de los medios usados; ya que éstos deben ser tan complejos como sea posible y se deben evitar transferir el micelio muy seguido.

Entre los medios nutritivos recomendados para este fin son: Agar Trigo, Agar Compost y Compost para Agaricus.

CASSINELLI (1991), menciona que la inoculación de cada medio de cultivo se realiza colocando una sola rodaja o porción de 10 mm de diámetro conteniendo micelio desarrollado en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) durante 15 días.

1.8. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN.

Las botellas o bolsas deben ser inoculadas bajo condiciones asépticas. Las técnicas más seguras requieren el empleo de un flujo de aire laminar. Para la inoculación, un operador abre la botella y flamea la boca, un segundo operador mezcla el inóculo en los granos y el primer operador después cierra las botellas. Las botellas preparadas con estiércol

son inoculadas transfiriendo una pequeña porción de cultivo puro crecido previamente en una botella semilla en el centro de la botella estéril, con un par de pinzas largas (VAN GRIENSVEN, 1983).

El cuarto de inoculación puede ser relativamente esterilizado usando lámparas de luz ultravioleta, aceites germicidas volátiles o usando aire filtrado de tal manera que el cuarto tenga presión positiva.

El personal que trabaja en el área estéril deberá tener acceso solamente después de desinfectarse las manos y ponerse un traje estéril. Las paredes y pisos deben mantenerse limpios y desinfectados. (STAMENTS, 1993).

PAVLICH (1997), menciona que la incubación de los bloques de sustrato debe hacerse en condiciones de oscuridad y se realizan controles diarios con el fin de comprobar el desarrollo del micelio y detectar casos de contaminación. La temperatura debe ser de 25 °C, la misma deberá mantenerse hasta completar la invasión del sustrato. La concentración de CO₂ se verá aumentada (en la bolsa cerrada) como un producto metabólico del crecimiento del micelio en el sustrato; sin embargo, esto no debe preocupar ya que una elevada concentración del CO₂ favorece el crecimiento micelial.

La incubación de las botellas con estiércol se hace de 20 a 25 °C con alta humedad y de 4 a 6 semanas; durante este tiempo el micelio se desplaza a través del estiércol de la botella hasta que penetra en todas sus partes y está en tal cantidad de manera que sostiene al estiércol en una masa compacta (STAMETS, 1993).

1.9. PROCESO DE COMPOSTAJE.

La palabra ~~compost~~ denominamos la degradación microbiana de sólidos orgánicos por medio de una respiración aerobia que pasa por una fase termofílica.

El compostaje empieza con una colección heterogénea de material orgánico que contiene una población grande de hongos y bacterias. Estos microorganismos se desarrollan e inician el proceso de descomposición en el momento en que se presentan condiciones favorables de humedad, temperatura y aireación (LEAL, 1990).

MAROTO (1986), menciona que el compost se fabrica sometiendo a un proceso de fermentación, con lo cual se consigue la transformación de determinadas sustancias precursoras de nutrientes en otras materias asimilables por parte del hongo, y por otro lado se llegan a destruir los gérmenes nocivos que pueden llevar las materias primas del "compost". Estos hechos van acompañados de importantes cambios químicos, como descenso de pH y gran absorción de agua.

VAN GRIENSVEN (1983), señala que la materia principal para el compost es la paja, de preferencia de trigo, dentro de lo posible se usa paja que ha servido para yacijas de caballos. Esta se pone disponible en forma de estiércol de caballo rico en paja.

Para la fermentación, la mezcla de paja y estiércol se coloca en montones largos y estrechos llamados cordones, que tienen 1.5 a 2m de ancho y de alto. En ellos comienza la fermentación bajo la influencia de los microorganismos que contienen.

La paja de trigo, cebada, centeno y avena (utilizados como cama en

los establos), suministra a la composta los hidratos de carbono básicos para la nutrición del hongo. La paja de trigo contiene aproximadamente 36% de celulosa, 25% de pentosas y 16% de lignina. La celulosa y pentosas son descompuestas a azúcares simples que suministran energía para el crecimiento microbiológico. La lignina es un material altamente resistente que durante el composteo es convertido al complejo nitrógeno - lignina - humus, que funciona como una fuente de proteínas para *Agaricus*.

Las heces de caballos son una fuente de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales. La paja a su vez contiene carbohidratos y en las heces viven microorganismos que aceleran el proceso de composteo. Es por ello que este material tiene una ventaja decisiva frente a otros materiales (LEAL, 1993).

VEDDER (1993), señala que para la preparación del compost de champiñón, puede utilizarse toda clase de materiales de origen vegetal. Se debe tener en cuenta el precio y las cantidades durante todo el año.

El compostaje se empieza colocando en un montón (sin comprimir) el estiércol fresco y pajoso del caballo, se añade estiércol de pollo, harina de semillas de algodón o de gérmenes de malta y yeso, se le dan 3 ó 4 vueltas. El estiércol de caballo se puede hacer una mezcla con la de vaca en una proporción de 50%.

1.9.1. Temperatura.

El calentamiento de masas en la fermentación, por medio de la actividad microbiana, puede alcanzar un máximo de 76 °C, en caso de que

se tenga suficiente agua para que el crecimiento no se encuentre limitado, y 80 °C presenta el límite del autocalentamiento de masas orgánicas por causas biológicas. No obstante, a estas temperaturas se realizan reacciones químicas exotérmicas en las masas de fermentación que favorecen el autocalentamiento de las mismas por arriba de los límites biológicos (LEAL, 1990).

Existen diferentes métodos de composteo, en función de los materiales básicos, suplementos y los recursos disponibles. De acuerdo con el tiempo de preparación, éstos pueden clasificarse en dos:

***COMPOSTEO LARGO.** - Se caracteriza por una duración de 20 a 28 días para completar la fase I. En este método, la descomposición de los materiales es fundamentalmente debida a la actividad microbiana. Con este método se busca evitar la descomposición química, por lo que no debe permitirse temperaturas por arriba de 65 °C. esto se logra con una periodicidad en los volteos y en las dimensiones de las pilas.

La fase finaliza cuando la composta presenta un color café oscuro, impregnada de actinomicetos y está libre de amoníaco. En este momento la composta presenta un contenido de humedad entre 67 y 70% y un pH de 7.0 a 7.5.

***COMPOSTEO CORTO.** - Este método fue desarrollado por Sinden y Hanser (1950), consiste que la fase I o composteo al aire libre de muy reducida duración (entre 8 y 12 días), promueve una descomposición química, el cual se ve favorecido por temperaturas superiores de 65 °C, un pH alcalino y la presencia de amoníaco y oxígeno.

La fase II; es realizado por un proceso biológico llevado a cabo por

microorganismos termófilos (bacterias, actinomicetos y hongos), manteniendo una temperatura de 58 a 60 °C durante 6 horas y luego bajar hasta el rango de 52 a 48 °C y manteniendo en este valor durante 6 a 8 días, proceso de acondicionamiento (LEAL, 1993).

VEDDER (1993), menciona que Lambert descubrió que en un montón de estiércol en fermentación se podrían distinguir varias zonas. En algunas zonas, la temperatura se eleva a 70 – 80 °C, mientras en otras no alcanzaba más que 50 –60 °C la capa exterior apenas fermentaba, debido a que el estiércol se enfriaba y desecaba demasiado en esta zona.

WAINWRIGHT (1995), manifiesta que en el centro del compost alcanza una temperatura de 70 °C, temperatura suficiente para matar la mayoría de las plagas y patógenos de los champiñones. Pero desafortunadamente las capas exteriores del compost no alcanzan esta temperatura y frecuentemente actúan después como focos de propagación de los patógenos.

1.9.2. Humedad.

La humedad es un factor muy importante en la fermentación del compost, para la preparación de compost de pajas de cereales se necesita una humedad mayor de 70%.

La actividad del agua es el factor que mejor describe un estado en que ésta se encuentre presente y el grado de dificultad que pueden tener los diversos tipos de microorganismos para utilizarla para su crecimiento (LEAL, 1990).

El agua es el componente más importante en el proceso de

composteo. En gran medida el agua gobierna el nivel de actividad microbiana. La paja deberá ser humedecida a saturación, "el estiércol de caballo" a 69 - 71% y la composta sintética a 71 - 73% para posteriormente ser amontonado.

Los microorganismos necesitan también de oxígeno para desarrollarse. Un sobrehumedecimiento en la composta (arriba de 75%) ocasiona que los espacios de aire se llenen con agua, impidiendo el paso del oxígeno al interior de la composta, causando condiciones anaerobias. En contraste, insuficiente humedad (debajo de 67%) resulta una composta muy aireada, donde la actividad de los microorganismos es baja. Para mantener estas condiciones de humedad, se necesitará 2500 a 3000 L de agua por tonelada de paja seca (LEAL, 1993; VEDDER, 1993).

1.9.3. Aireación.

Este proceso tiene dos finalidades: suministrar oxígeno y extraer el calor producido.

La aireación de las pilas se realiza por medio del volteo periódico. Este volteo debiera basarse en la concentración del oxígeno en la pila.

En el cordón del estiércol en fermentación, existen microorganismos aeróbicos que necesitan aire, oxígeno para seguir el proceso. Por tanto, es preciso asegurar que penetre la suficiente cantidad de oxígeno en el montón del compost en fermentación (LEAL, 1993; VEDDER, 1993).

El oxígeno en la pila es consumido por la microflora en pocas horas después del volteo. Así que el volteo tiene una limitada función en cuanto al suministro del aire. El efecto de chimenea es el más importante

mecanismo para la aireación del compost. El aire penetra a la pila a causa de la diferencia de temperaturas entre el medio ambiente y el interior de la pila (LEAL, 1993).

1.9.4. Relación carbono/ nitrógeno (C/N).

Es el aspecto más importante del composteo. La mayoría de los microorganismos usan 30 partes en peso de carbono por cada parte de nitrógeno, por lo que una relación C/N de 30 es la más conveniente para una fermentación eficiente, aunque se informa composteos eficientes con materiales que poseen valores de C/N que fluctúan de 26 a 35.

Si se tienen materiales con bajo contenido de nitrógeno, como son las pajas o desechos de madera, es posible producir mezclas fermentables al añadir materiales con alto contenido de nitrógeno, como son los desechos de animales. En estas mezclas las proporciones de los diversos tipos de materiales usados se deben calcular de forma que la relación C/N se acerque lo más posible a 30.

La combustión de las combinaciones de carbono proporciona la energía que necesita la microflora para desempeñar su función durante el compostaje. La relación C/N disminuye sin cesar, debido al consumo de carbono y a que la cantidad de nitrógeno permanece invariable o ligeramente creciente.

La relación de carbono - nitrógeno de la paja fresca es 80, de estiércol de caballo 30 y de los microorganismos 10 aproximadamente.

La relación C/N tanto de la paja como del estiércol es demasiado pequeña en comparación con la de carbono. Esto puede corregirse con

suplementos como la urea o la gallinaza. Hay que alcanzar de un 1.5 a un 2% de nitrógeno según el tipo de compost, en la entrada de la pasteurización. (VEDDER, 1993; LEAL, 1993).

1.9.5. Cambios durante el compostaje.

Los microorganismos utilizan rápidamente los carbohidratos fácilmente degradables y los lípidos presentes. Las hemicelulosas y celulosas son degradados hasta cierto punto, mientras que la lignina es el material más resistente a la degradación.

El pH inicial es ligeramente ácido (pH - 6). Durante las primeras etapas de compostaje, el pH disminuye; en fases posteriores, al aumentar la temperatura aumenta también el pH y se estabiliza ligeramente alcalino a causa de la producción de amoníaco.

Las formas solubles del nitrógeno son asimiladas de inmediato, y las formas insolubles son solubilizadas antes de ser usados por los microorganismos. Durante la fermentación se produce amoníaco por medio de la desaminación oxidativa de aminoácidos, la mayor parte del nitrógeno sintetizado se encuentra como proteína.

El pH óptimo para la mayoría de los hongos es menor que para las bacterias activas en la fermentación. El champiñón y muchos otros hongos prefieren el pH 7. El pH del estiércol de caballo fresco es aproximadamente 9, muy elevado para el champiñón. Debido a la pérdida y transformación de amoníaco durante el proceso de fermentación, el pH del compost baja. (LEAL, 1990; VEDDER, 1993).

1.9.6. Adición de yeso.

El yeso se utiliza para mejorar la estructura del compost, o sea, para impedir que el compost se haga graso y para bajar el pH. También sirve como suministro de calcio para el champiñón, y para permitir la transformación del ácido oxálico que segrega el micelio en oxalato de calcio. (VEDDER, 1993).

GERRITS (1977) quien estudió la importancia del yeso en el compostaje sintético, suplementada con gallinaza como fuente de nitrógeno. Él comparó los rendimientos obtenidos en el compost con y sin aplicación de yeso. Fue posible definir que el efecto del yeso tiene una relación con el contenido de amoníaco en el compost; cuando se aplica niveles altos de gallinaza el contenido de amonio se incrementa y con ello el pH del compost sube. En presencia de yeso el pH decrece, por tanto, la adición del yeso al compost tiene un efecto estabilizador en el rendimiento.

1.9.7. Pasteurización.

Es un Proceso Térmico para matar a los microorganismos, nemátodos, larvas de moscas presentes en el compost y, además, liberar la presencia de amoníaco.

LAMBERT (1972), menciona que el compost debe acomodarse en montones largos, angostos bien ventilados, el contenido de agua debe tener entre 70 - 75%, se debe llenar una tonelada de compost húmedo, aproximadamente unos 10 m². Cuando todo está lleno, los almácigas con compost, se cierran las puertas y se apagan los ventiladores y se deja elevar la temperatura del cuarto como resultado del calor generado del

compost, con la ayuda del vapor muy caliente, hasta que la temperatura del compost esté entre 57 - 60 °C. Se mantiene esta temperatura hasta que el compost pierda su olor a amoníaco y el pH sea de 8.2 o menos. Los almácigas deben recibir agua durante la pasteurización, para tener una humedad de 65 % al término después de 4 a 6 horas.

El llenado de la sala de pasteurización se realiza de acuerdo al sistema de cultivo utilizado. La pasteurización se puede efectuar en charolas colocadas en estantes o bien a granel o en masa, el compost se debe colocar lo más rápido posible, para evitar pérdidas de calor. Si en esta etapa el compost presenta partes secas, éstas deben regarse ligeramente (LEAL, 1993).

La pasteurización, tiene dos finalidades fundamentales como:

1. Producir un sustrato selectivo para *Agaricus*, lo más uniforme posible.
2. Prevenir que en el sustrato se encuentren organismos dañinos al micelio de *Agaricus sp.* O que compitan con él por las fuentes de nutrientes (LEAL, 1990).

Finalmente VEDER (1993), señala que una vez pasteurizado es necesario que, en un espacio de 8 - 12 horas, la temperatura del compost baje grado a grado hasta alcanzar 58 - 56 °C en el centro del compost. Alcanzado esta temperatura se puede prolongar aire durante 8 a 12 minutos cada media hora.

1.10. SIEMBRA.

Antiguamente se utilizaba fragmentos de caballos bien invadidos de

micello para introducirlos en los caballones nuevos, Constantin y Matruchot (1894), consiguieron un cultivo puro de micelios de champiñón. El otro gran avance fue dado por Sinden (1935) cuando puso a punto el blanco sobre grano. Este blanco proporcionaba muchos puntos de siembra (VEDDER, 1993).

Existen varios métodos de siembra; la siembra en masa es uno de los métodos, fue conseguido por el Dr. Sinden (1935), éste se basa en que el blanco es mezclado con el compost y homogenizado al sembrar.

Las grandes explotaciones que utilizan el sistema plurizona y que emplean cajas, utilizan para esto maquinarias en donde vuelcan juntos el compost y la semilla, mezclados por un cilindro de púas. A continuación se colocan nuevamente en las cajas el compost con la semilla y se compacta con fuerza, utilizando una prensa hidráulica.

Sin embargo, existen otros métodos como la siembra post - mezclado. Fue creado por el danés Rasmussen (1920), la siembra se emplea en la superficie del compost, pasados 8 - 10 días cuando el micelio creció a mitad de camino en la capa del compost se remueve éste, mezclando convenientemente (VEDDER, 1993).

PAVLICH (1997), señala que la semilla se introduce en el sustrato una cantidad equivalente del 2 al 5% del peso del sustrato.

Sin embargo, LEAL (1993) y VEDDER (1993), señalan que la siembra se debe realizar lo más rápido posible, utilizando un 0.5% sobre el peso del compost, los materiales empleados deben estar bien limpios lo mismo que las manos y ropas del personal.

1.11. INCUBACIÓN Y PROPAGACIÓN VEGETATIVA.

Bajo las condiciones ambientales adecuadas se logra que el micelio se desarrolla inmediatamente. Esto dependiendo de la calidad del compost, del blanco y la cantidad del inóculo, el micelio alcanza su desarrollo después de 10 a 14 días de incubación.

Durante el desarrollo vegetativo se debe mantener una temperatura constante de 25 a 27 °C en el compost, la humedad relativa del ambiente de cultivo se debe mantener entre 90 y 95% puede ser suministrado por medio de un vapor (LEAL, 1993).

CRESPO (1994), señala que en los momentos previos a la siembra se debe tener mucho cuidado en la temperatura que debe oscilar entre 21 °C y 23.5 °C, una ventilación por dos veces al día para cambiar el aire del ambiente. También los riesgos son importantes para mantener un nivel hídrico adecuado.

Finalmente LAMBERT (1972), menciona que se debe proporcionar un poco de ventilación durante el crecimiento de los micelios y la capa superficial del compost se riega ligeramente con agua para mantener su contenido apropiado de humedad cerca de 65% de todo el compost.

Durante la incubación, el micelio de hongo genera grandes cantidades de CO₂, siendo factible que su concentración en el medio alcance valores de 1.5 a 3%. Estas concentraciones de CO₂ no influyen negativamente sobre el crecimiento vegetativo.

1.12. TIERRA DE COBERTURA.

Es una mezcla de sustratos que tiene la finalidad de atrapar la

humedad, sirve como tampón de humedad, aireación y protege al micelio en crecimiento.

La utilización de la tierra de cobertura es un factor indispensable, pues sin la tierra de cobertura los champiñones aparecerán en pequeña cantidad o no aparecerán en absoluto.

La capa de cobertura es el medio en el que el micelio pasa de la fase vegetativa a la generativa. La función acaba con la formación de granos, pues los granos necesitan mucha agua, entonces la tierra de cobertura deberá servir de reserva de agua o tampón de humedad.

La capa de cobertura debe tener un pH correcto de 7.0 a 7.5 por lo que se añade carbonato de calcio. En el momento de aplicar debe ser estéril; por esta razón se debe desinfectar a vapor o al formol (VEDDER, 1993).

Una vez que el micelio de *Agaricus sp* ha invadido el compost, se procede a cubrir la superficie con la tierra de cobertura, en ella se favorecen los factores que desencadenan el proceso de fructificación, la formación de un gradiente en la concentración de CO₂, de un cierto microclima y la presencia de cierto tipo de bacterias.

La tierra de cobertura debe tener una estructura granulosa que permita un intercambio gaseoso (CO₂ y O₂). El espesor de la capa de cobertura depende de la profundidad del llenado (cantidad del compost). Comúnmente es utilizada de 3.5 a 4 cm (LEAL, 1993).

MAROTO (1986), señala que la tierra de cobertura se puede añadir de un espesor no superior a 2 cm y ligeramente húmeda.

La tierra de cobertura está compuesta de turba y "tierra esponjosa"

que es residuo de la industria de la remolacha azucarera, sirve como tampón de agua, previene la desecación del compost y produce un clima húmedo y el más importante es que se desempeña un papel esencial en la fructificación (VAN GRIESVEN, 1983).

La tierra de cobertura debe ser una magra que no sea demasiado arenosa en textura ni contenga demasiada arcilla, debe ser de reacción neutral, se neutraliza agregando piedra caliza pulverizada (LAMBERT, 1972).

1.13. INDUCCIÓN A LA FRUCTIFICACIÓN.

La inducción es el cambio de las condiciones ambientales para pasar de un desarrollo vegetativo a un generativo (formación de primordios). Esta fase comienza cuando el micelio ha alcanzado la superficie de la tierra de cobertura, el primer paso es disminuir la temperatura del compost al rango de fructificación entre 18 - 20 °C y 15 a 17 °C en el aire; en este periodo la humedad relativa del ambiente debe mantenerse a un nivel de 95%, el nivel de CO₂ se debe bajar a 0.1 y 0.2 % (LEAL, 1993).

Para la formación de granos se debe regular el aire: para que el crecimiento vegetativo se detenga, la humedad relativa debe permanecer entre 85 - 90%. En esta etapa no se debe regar el cultivo (VEDDER, 1993).

La producción del cuerpo fructífero se produce tres semanas después de la siembra a intervalos semanales, la mayor cosecha se produce en la primera semana, después de la cual la producción disminuye progresivamente (WANWRIGHT, 1995).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El presente Trabajo de Investigación se realizó en el Laboratorio Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

La cepa para el presente trabajo corresponde al hongo comestible *Agaricus campestris* "paku" que fueron recolectados y aislados en 12 zonas ecológicamente diferentes del distrito de Quinoa (Anexo N° 11) y la cepa comercial adquirida de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Extracto de Malta (AEM).
- Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML).

- Agar Sabouraud Maltosado (ASM).
- Agar Papa Dextrosa (APD).
- Agar Papa Dextrosa y Extracto de Levadura (APDL).
- Agar Trigo (AT).
- Agar Compost (AC).

2.4. RECOLECCIÓN DE CUERPOS DE FRUCTIFICACIÓN DE Agaricus campestris "paku":

Para el aislamiento de micelios en cepa pura de Agaricus campestris "paku" se recolectaron los cuerpos de fructificación en los diferentes anexos del distrito de Quinua de la manera siguiente:

- Utilizando un cuchillo, los carpóforos, fueron extraídos del suelo, luego fueron colocados cuidadosamente a un frasco de vidrio estéril cada hongo independientemente.
- Inmediatamente fue codificada con el nombre del lugar, número y la fecha de colección respectiva para cada frasco. Luego en una libreta fue anotando las características del medio ambiente y del hongo, y fue llevado al laboratorio para su procesamiento respectivo.

2.5. OBTENCIÓN DE ESPORADA MÚLTIPLE.

Se seleccionaron los carpóforos sanos de mayor tamaño y maduros, luego se procedió a cortar el estípite (Pie), para colocarlo sobre una placa Petri con papel blanco estéril, enseguida se cubrió con un frasco de vidrio.

Después de 12 a 24 horas, se procedió a la recolección del papel conteniendo esporas de Agaricus campestris "paku", luego con un asa de

Kolle y agua destilada estéril se procedió a recoger las esporas y fueron inoculadas en estrías sobre medios preparados de Agar Extracto de Malta (AEM) en placas Petri y/o tubos de prueba. Inmediatamente se incubaron a medio ambiente fluctuando una temperatura de 19 a 21 °C por un periodo de 60 días.

2.6. OBTENCIÓN DE TEJIDO PLECTENQUEMÁTICO.

Se seleccionaron los hongos sanos en forma de "botón" sin la abertura de copa, luego se procedió a la limpieza y desinfección..

Cuidadosamente se lavaron los carpóforos en agua corriente, para luego remojar en una solución jabonosa por 20 minutos agitando constantemente, luego fue transferido a una solución de 2.5% de hipoclorito de sodio (Lejía) durante 30 minutos en agitación. Posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril por varias veces.

Inmediatamente, sobre una placa Petri estéril y bajo la llama de un mechero con la ayuda de una pinza y bisturí estéril se procedió a cortar el cuerpo fructificante en dos partes, luego la parte interna es seccionada en fragmentos pequeños de tamaño de 1 a 2 mm de tejido y se procedió a inocular sobre medios preparados de Agar Extracto de Malta (AEM) distanciados en placas Petri y/o tubos de prueba. Inmediatamente fueron incubados a temperatura ambiental fluctuando entre 19 a 21°C, a condición de oscuridad por un periodo de 30 días.

2.7 OBTENCIÓN DE MICELIO DE CAMPO.

El micelio fue recolectado juntamente con los cuerpos fructificantes,

en forma de raicillas blancas, éstos fueron lavados suavemente con agua destilada estéril en agitación por varias veces, y luego se procedió a la inoculación sobre medios preparados de Agar extracto de Malta (AEM) en placas Petri y/o tubos de prueba, luego fue inoculado a medio ambiente fluctuando la temperatura de 19 – 21 °C por un periodo de 15 días en condiciones de oscuridad.

2.8 IDENTIFICACIÓN DE Agaricus campestris "paku".

▪ Identificación macroscópica.

Para la identificación macroscópica se utilizaron las claves taxonómicas seguidas por GUZMÁN (1980) y ARORA (1986).

▪ Identificación Microscópica:

Esta parte del trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Botánica y Micología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Con los siguientes experimentos:

▪ Identificación de esporas:

Con la obtención de la esporada múltiple se preparó una solución de esporas en agua destilada estéril y luego se sacó una gota al porta objeto, se cubrió y se observó a (400X) comparando sus características principales.

▪ Prueba de Crecimiento Micelial:

Sobre los medios de cultivo Agar extracto de Malta (AEM) y Agar Compost (AC), en placas Petri, fueron inoculados con las cepas aisladas de Agaricus campestris "paku" bajo condiciones de asepsia total. Inmediatamente fueron incubados a medio ambiente, a una temperatura

que fluctuaron entre 22 - 26 °C, fueron evaluadas diariamente las características de crecimiento micelial.

▪ **Observación Microscópica del Micelio:**

Para la determinación del micelio de *Agaricus campestris* "paku" con la ayuda de un bisturí se cortó un pedazo del crecimiento micelial, conjuntamente con el agar agar, se ubicó sobre un portaobjeto y luego se cubrió para pasar al calor del mechero para su fijación.

▪ **Observación del micelio con KOH al 10 %.**

Se procedió al raspado del micelio en crecimiento de *Agaricus campestris* "paku" y se realizó el montaje en portaobjeto con la solución de KOH al 10%, luego se cubrió la muestra; se observó a microscopio colocando una gota de azul de metileno a inmersión.

2.9. PROPAGACIÓN DEL MICELIO.

Con el fin de conseguir a nuestras condiciones de laboratorio un medio adecuado para la propagación micelial de *Agaricus campestris* "paku", cepa ACQ-03 se evaluó su crecimiento y las características del micelio en 7 tipos de medios de cultivo descritos en el (Anexo 10), bajo las condiciones de temperatura, de 19-21°C en oscuridad..

2.10 SUSTRATO EN GRANO DE TRIGO.

Se procedió a hervir 1 Kg. de trigo durante 10 minutos en 2.00 litros de agua, moviendo el exceso de agua se drenó y se dejó orear por un periodo; luego se mezcló con 3.5 g de CaCO₃ y 13 g de yeso, inmediatamente se procedió a llenar a frascos de vidrio y/o bolsas de

plástico de tipo polipropileno, luego se procedió a la esterilización en autoclave por un periodo de 2 horas a 15 lb. de presión y a 121 °C. El pH del sustrato fue de 7.5 y el contenido de humedad fue del 50 %.

2.11 INOCULACIÓN.

Bajo la llama de un mechero, la cepa pura fue cortada en porciones de 1 cm². Inmediatamente bajo condiciones asépticas fue transferida al sustrato enfriado en bolsas y frascos en una proporción de 3% y luego fue incubado al medio ambiente fluctuando una temperatura de 19 - 21 °C por un periodo de 25 días.

2.12. PREPARACIÓN DE COMPOST.

A fin de hallar bajo nuestras condiciones un sustrato óptimo para el crecimiento y fructificación de *Agaricus campestris* "paku" se consideraron tres tipos de estiércol, aditivos y componente celulésico, para preparar cuatro tipos de compost.

La procedencia del estiércol de caballo fue adquirida en el distrito de Quinua, el estiércol de llama fue adquirida en los criaderos de llama del distrito de Vinchos (Tunsulla), la de cuy fue proporcionada por la Estación Experimental CANAAN - INIA, y la de gallinaza fue adquirida en la granja Avícola Quispe.

El material celulésico (paja de trigo) fue adquirida de los trilladores en Wari, Distrito de Quinua.

El proceso de compostaje se realizó en aire libre en el Área del Programa de Investigación de Pastos y Ganadería de la Facultad de

Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Allí se prepararon cuatro tipos de compost.

Utilizando como sustratos la paja de trigo, estiércol de caballo, llama y cuy. La mezcla de paja y estiércoles fueron de proporciones iguales para los siguientes tipos de compost:

1. Compost de caballo
2. Compost de llama y cuy
3. Compost de caballo y llama
4. Compost de caballo y cuy.

➤ **Compost de caballo.**

En total se prepararon 20 Kg. en materia prima seca, primeramente se pesó 10 Kg. de paja de trigo y remojando totalmente en un pozo 48 horas antes, luego fue mezclado con 10 Kg. de estiércol de caballo; y se adicionó 2 Kg. de paja de alfalfa molida, 1.6Kg de gallinaza, en seguida fue apilado y se procedió al riego total con manguera.

Para la evaluación de temperatura se utilizó un termómetro de máxima, haciendo la lectura diariamente en tres partes de la pila, centro y dos extremos.

Los volteos se realizaron a intervalos de cada tres días, efectuando un total de siete en el proceso, para este fin se utilizó un trinche de metal especialmente diseñado, en cada volteo se realizó la fumigación con insecticida (Ambuch - 50) a una concentración de 0.7 x 1000.

En el segundo volteo se adicionó yeso la cantidad de 600 g, a

medida que se iba volteando se distribuyó poco a poco. En cada volteo se humedeció las partes secas para conservar la humedad deseada.

➤ **Compost de llama y cuy.**

Para preparar 20 Kg. de materia prima seca, se pesó 10 Kg. de paja de trigo remojando en un pozo 48 horas antes, luego fue mezclado con 5 Kg. estiércol de llama, 5 Kg. estiércol de cuy, 2 Kg. paja de alfalfa molida y 1.6 Kg. de gallinaza en seguida fue apilada.

El riego, la evaluación de temperaturas, los volteos, la fumigación y la adición de yeso, fue igual al de compost de caballo.

➤ **Compost de caballo y llama.**

Se preparó la misma cantidad de sustrato que el compost de llama + cuy, la mezcla, adición de sustratos, evaluación de temperatura, volteos, fumigación y la adición de yeso también fue lo mismo.

➤ **Compost de caballo y cuy.**

El procedimiento fue igual en todas sus partes que el compost de llama y cuy.

2.13. PASTEURIZACIÓN DEL COMPOST.

El compost fue llenado en bolsas de plástico polipropileno cada tipo independientemente, luego se procedió al proceso de pasteurización utilizando autoclave a una temperatura de 60°C por un período de 4 horas.

Previo a la pasteurización se evaluó el contenido de pH de cada tipo

de sustrato. En un vaso de precipitación se disolvió el sustrato y utilizando un pHmetro digital, se tomó la lectura respectiva haciendo tres repeticiones para cada uno.

2.14. ACONDICIONAMIENTO DE LAS CAJAS DE CULTIVO Y SIEMBRA.

Para eliminar todo tipo de organismos presentes en el cuarto y cajas de cultivo, 48 horas antes del acondicionamiento, fueron fumigados con una solución de formol al 0.5%.

Las cajas de cultivo fueron de madera con la base de malla de nylon, las dimensiones de 55 x 40 x 9 cm, el compost pasteurizado fue pesado utilizando una romana y llenado poco a poco a las cajas de cultivo.

Utilizando 2 cepas, *Agaricus campestris* "paku" cepa nativa codificada con ACQ. 03 y Ab. 01 (cepa comercial) fueron sembradas a las cajas de cultivo con micelio en grano de trigo a una proporción de 1% en ambos casos; en cuatro tratamientos (compost) y con tres repeticiones para cada cepa.

La siembra se realizó en masa; cada caja de cultivo fue llenado con 7Kg de compost y luego compactado utilizando una madera forrada con plástico, la ubicación fue distribuida para cada cepa y para cada compost.(Ver anexo N° 05).

Una vez distribuidas en su lugar fueron aplicados un riego ligero con agua, en seguida fueron fumigados con una mezcla de benlate al 0.5 x 1000 y ambuch al 0.7 x 1000, inmediatamente fueron cubiertos con plástico de color negro con una ventilación constante.

2.15. INCUBACIÓN.

La incubación es un proceso de cuidado, manejo de temperatura y humedad, en tales condiciones durante este período la sala de cultivo fue mantenido a una temperatura fluctuando entre 21 a 23°C; para ello se utilizó el encendido de dos estufas eléctricas a intervalos de 2 a 3 horas diarias y para la recirculación del calor se utilizó una Ventiladora con ventilación suave cada cierto tiempo.

La humedad relativa fue mantenida remojando las paredes del ambiente de cultivo a chorro fino utilizando una mochila de fumigación; la lectura de la humedad relativa se realizó utilizando el Diagrama Psicrométrico para Ayacucho; para ello se utilizó dos termómetros de máxima ubicación en una madera, uno con bulbo seco y otro con bulbo húmedo, registrándose la lectura diariamente.

2.16. PREPARACIÓN DE LA TIERRA DE COBERTURA.

Con el fin de dar las condiciones para la fructificación de Agaricus campestris "paku" se prepararon 19 Kg. de tierra de cobertura utilizando los siguientes sustratos:

- Turba Negra	71.0%	13.5 Kg.
- Turba Rubia	10.5%	2.0 Kg.
- Arena fina del río	8.0%	1.5 Kg.
- Caliza triturada	8.0%	1.5 Kg.
- Carbonato de calcio	2.5%	0.5 Kg.

La piedra caliza fue triturada en un batán hasta obtener una arena

fin luego los sustratos se mezclaron homogéneamente y se procedió a remojar hasta obtener un lodo, posteriormente fue apilado y se dejó por un período de 5 días para proceder a medir el pH.

➤ **Pasteurización.**

Previamente al embolsado se procedió a medir el pH, en un vaso precipitado, se colocó un puñado de tierra más agua destilada y homogeneizado. Utilizando un pH metro digital y tomando la lectura, se realizó por tres repeticiones de diferentes zonas de la pila.

La pasteurización del sustrato se realizó en autoclave por un período de 4 horas a 60°C.

2.17. PROCESO DE LA COBERTURA.

Después de la pasteurización, la tierra fue colocada por encima del compost con crecimiento micelial con un espesor de tierra de 2 cm, luego fueron regados con agua a chorro fino, estandarizando la misma temperatura y humedad que la de incubación. Y con los mismos procedimientos.

2.18. INDUCCIÓN A LA FRUCTIFICACIÓN.

Cuando aparecieron micelios sobre la tierra de cobertura, se bajó la temperatura a 18 °C con una ventilación constante, a la vez se ubicaron tinas de agua conteniendo porciones de hielo y proporcionando riegos a las paredes del ambiente con agua fría y a chorro fino.

2.19. COSECHA.

Para evaluar la Eficiencia Biológica (EB), Tasa de Producción (TP) y Rendimiento (R) de los basidiocarpos, se realizaron las cosechas teniendo en cuenta el número de cajas de cultivo de la cepa correspondiente, determinándose el peso fresco de los cuerpos fructíferos por cada caja de cultivo y luego fueron secados en estufa para realizar el peso seco.

2.20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Con el peso fresco y seco de los basidiocarpos y el peso seco y húmedo del sustrato utilizado y el tiempo de producción, al final del experimento se procedió a determinar los siguientes parámetros: Eficiencia Biológica (%), Tasa de Producción (%) y Rendimiento (%) para cada cepa en estudio. Estos resultados se sometieron a un Análisis de Varianza, en el Diseño de Bloques Completos y Randomizados con arreglo factorial 2A x 4B, donde 2A = Tipos de cepas y 4B = tipos de sustratos.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUADRO N° 02: Inoculación por tres métodos de Aislamiento de micelios de *Agaricus campestris* "paku". Sobre medio Agar Extracto de Malta (AEM)

Métodos de aislamiento	Repeticiones por zona	N° de placas Inoculadas	Placas inoculadas				\bar{X} Crecimiento /días.
			Contam.	%	No Contam.	%	
Esporada Múltiple	02	24	23	95.8	01	4.2	55
Tejido Plectenquimático	02	24	21	87.5	03	12.5	25
Micelio en cond. de campo	02	24	24	100.00	00	00	8
TOTAL	---	72	68	94.4	04	5.6	---

3.1. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE MICELIO DE *Agaricus campestris* "paku"

En el cuadro N° 02, se presentan tres métodos de aislamiento, por esporada, tejido Plecténquimático y micelios en condiciones de campo, para ello se trabajó con dos repeticiones por zona y para cada método de aislamiento utilizando el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM), resultando un total de 72 pruebas.

El aislamiento utilizando tejido Plecténquimático, fue el que resultó mejor, resultando tres cepas aisladas en un 12.5% del total por este método. El tiempo de aislamiento fue un factor importante, ya que en este método fue de 25 días promedio, lo cual favoreció menor riesgo de contaminación durante la evaluación.

El aislamiento por esporada es un método convencional, en centros de producción de champiñones (LEAL, 1993; VEDDER, 1993), para evaluar la productividad de una especie, es un método tan importante; sin embargo, necesita de equipos especiales, porque la germinación de esporas es demasiado lento, para este experimento se trabajó con esporada múltiple. Logrando aislar una (01) cepa con una proporción de 4.2%, en un periodo de 55 días promedio.

El método utilizando micelios en condiciones de campo, es un método tan antiquísimo, utilizado para la propagación del micelio dentro del compost, este método sobre medio de cultivo (AEM) resultó con un 100% de contaminación en un periodo de 8 días promedio.

El trabajo se llevó a cabo con un riguroso sistema de asepsia; sin embargo, pudieron existir errores en la manipulación de la limpieza y desinfección de los carpóforos recolectados o en la inoculación al medio de

cultivo y/o durante el incubado y evaluaciones.

Finalmente resultó 68 pruebas contaminadas, principalmente por hongos ambientales, haciendo un total de 94.4% y 4 pruebas no contaminadas haciendo un total de 5.6% respectivamente.

El aislamiento utilizando tejido interior Plecténquimático respondió mejor a nuestras condiciones de laboratorio, dependiendo de la desinfección del cuerpo fructífero, y por el menor tiempo de crecimiento micelial sobre el medio de cultivo. Mientras que el aislamiento por esporada no fue adecuado por necesitar equipos especiales y el tiempo de germinación de esporas ocurre en un tiempo prolongado. El aislamiento utilizando micelios en condiciones de campo no fue bueno, ya que el micelio se encuentra creciendo contaminado con otros microorganismos en su medio natural.

3.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE *Agaricus campestris* "paku".

Las cepas aisladas e identificadas fueron cuatro (4) codificadas de la siguiente manera ACQ.01, ACQ.03, ACQ.06 y ACQ. 10E. Los basidiocarpos recolectados fueron identificados macroscópicamente utilizando las claves taxonómicas seguidas por GUZMÁN (1980) y ARORA (1986).

En la identificación microscópica de las esporas se observaron esporas ovoides, lisas y brillosas de color marrón chocolate, y, para la identificación del micelio se realizó una prueba de crecimiento micelial sobre Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Compost (AC), teniendo

referencia las características del micelio del champiñón; con crecimiento lento, y formación de cordón micelial rizomorfo.

Las cepas diferentes a las características del crecimiento micelial fueron descartadas y Las cepas con características semejantes, se llevaron a la identificación microscópica; la técnica utilizada fue preparar un montaje del micelio en crecimiento para identificar las características del género *Agaricus*, donde fue observado un micelio con hifas uniformes, septados y con presencia de fíbulas. Estas características observadas fueron ratificados que, el micelio es un basidiomiceto.

Es difícil llegar a identificar microscópicamente hasta la especie solamente podemos llegar a estas condiciones con la prueba de electroforesis de isoenzimas y la prueba de fructificación (NICOL, 1993).

CUADRO N° 03: Crecimiento radial (mm) de *Agaricus campestris* "paku" a los 5, 10 y 15 días después de la inoculación sobre diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Eval. / Días	N° de placas				\bar{X}	Vigor	Observaciones
		01	02	03	04			
AEM	5	4.0	3.0	4.5	5.0	4.1	II	micelio blanco cremoso en forma aérea
	10	6.0	5.5	8.0	8.0	6.9	II	
	15	7.0	8.0	10.0	11.0	9.0	II	
AEML	5	5.0	4.0	4.5	6.0	4.9	III	Blanco cremoso con cordón micelial
	10	8.5	8.0	7.5	9.5	8.4	III	
	15	11.0	(1)	(1)	12.0	11.5	III	
ASM	5	3.0	1.5	3.5	3.0	2.8	I	Plano estrellado Blanco humo
	10	5.5	3.5	5.0	7.0	5.3	I	
	15	9.0	(1)	8.0	(1)	8.5	I	
APD	5	3.5	(1)	3.0	3.5	3.3	III	Crema intenso Aéreo
	10	7.0	(1)	6.5	6.0	6.5	I	
	15	8.0	(1)	8.0	7.5	7.8	I	
APDL	5	5.0	4.5	3.5	4.0	4.3	II	Cremoso aéreo con cordón
	10	7.0	7.0	6.0	7.0	6.8	II	
	15	(1)	9.5	8.0	9.0	8.8	II	
AT	5	2.5	2.0	2.0	3.5	2.5	I	Pobre crecimiento, forma plana
	10	5.0	3.0	(1)	6.0	4.7	I	
	15	7.5	7.0	(1)	8.5	7.8	I	
AC	5	8.0	9.0	8.5	10.0	8.9	II	Blanco rizomorfo con cordón micelial.
	10	11.5	10.0	11.0	10.5	10.8	II	
	15	13.5	14.5	15.0	(1)	14.3	II	

(1) Placa contaminada

I. Micelio débil

II. Micelio Medio

III. Micelio Fuerte.

3.3. BÚSQUEDA DE UN MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA LA PROPAGACIÓN DE MICELIOS DE Agaricus campestris "paku".

El cuadro N° 03 muestra el crecimiento radial en milímetros de Agaricus campestris "paku", evaluados a los 5, 10 y 15 días después de la inoculación, sobre 7 medios de cultivo, realizados con un mínimo de tres repeticiones y tres resiembras consecutivas.

Se observan diferencias de crecimiento micelial en los medios de cultivo utilizados; la densidad fue evaluada a través de números romanos en orden ascendente, resultando los mejores medios de cultivo Agar Compost (AC) y Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML) en el primero alcanzó un crecimiento promedio de 14.3 mm, y en el 2do. 11.8 mm respectivamente dentro de 15 días..

Los dos mejores medios de cultivo fueron seleccionados para la propagación de Agaricus campestris "paku"; creciendo un micelio con características diferentes para ambos medios, un micelio con una densidad medio en el primero y fuerte en el segundo.

El menor crecimiento fue en el Agar Trigo (AT), resultando un promedio de 7.8 mm, para 15 días; con una densidad débil, en forma plana con cordón micelial delgado, diferente a los demás medios.

Los otros cuatro medios de cultivo favorecieron en el crecimiento en menor grado; resultando promedios semejantes de crecimiento a los 15 días con deformaciones en el micelio, formando micelio aéreo con inhibición de diferencias de color en el medio; por tanto, no son buenos para la propagación.

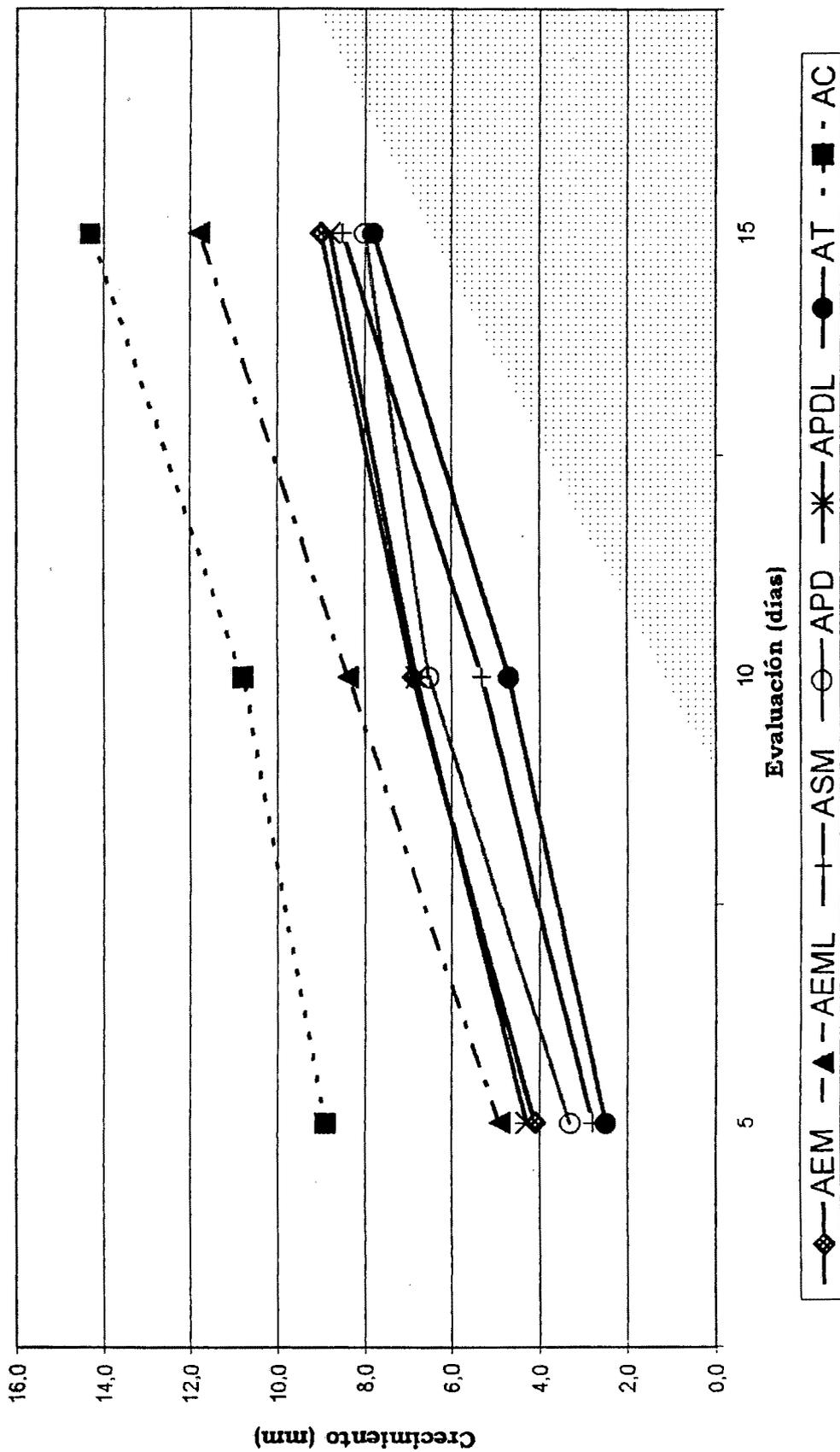
Los medios usados comúnmente en micología son: Agar Papa

Dextrosa y extracto de Levadura, Agar Sabouraud y Agar Extracto de Malta. Ninguno de ellos es muy adecuado para *Agaricus*, ya que favorecen la degeneración de la cepa, produciendo un tipo anormal de crecimiento, que tiende a crecer vigorosamente en el sustrato de hifas aéreas principalmente y produce un rendimiento bajo (LEAL, 1990).

Cabe señalar que el Agar Compost (AC) fue tan adecuado para la propagación, por presentar una nutrición natural y compleja; lo mismo el Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML).

En centros de producción de blanco de champiñón, Francia, Inglaterra y Suiza, se obtiene un cultivo puro de micelios generalmente sobre un medio nutritivo compuesto de extracto de estiércol solidificado con agaragar. (Vedder, 1993).

Figura N° 01: Curva de crecimiento micelial de *Agaricus campestris* "paku" en 7 medios de cultivo



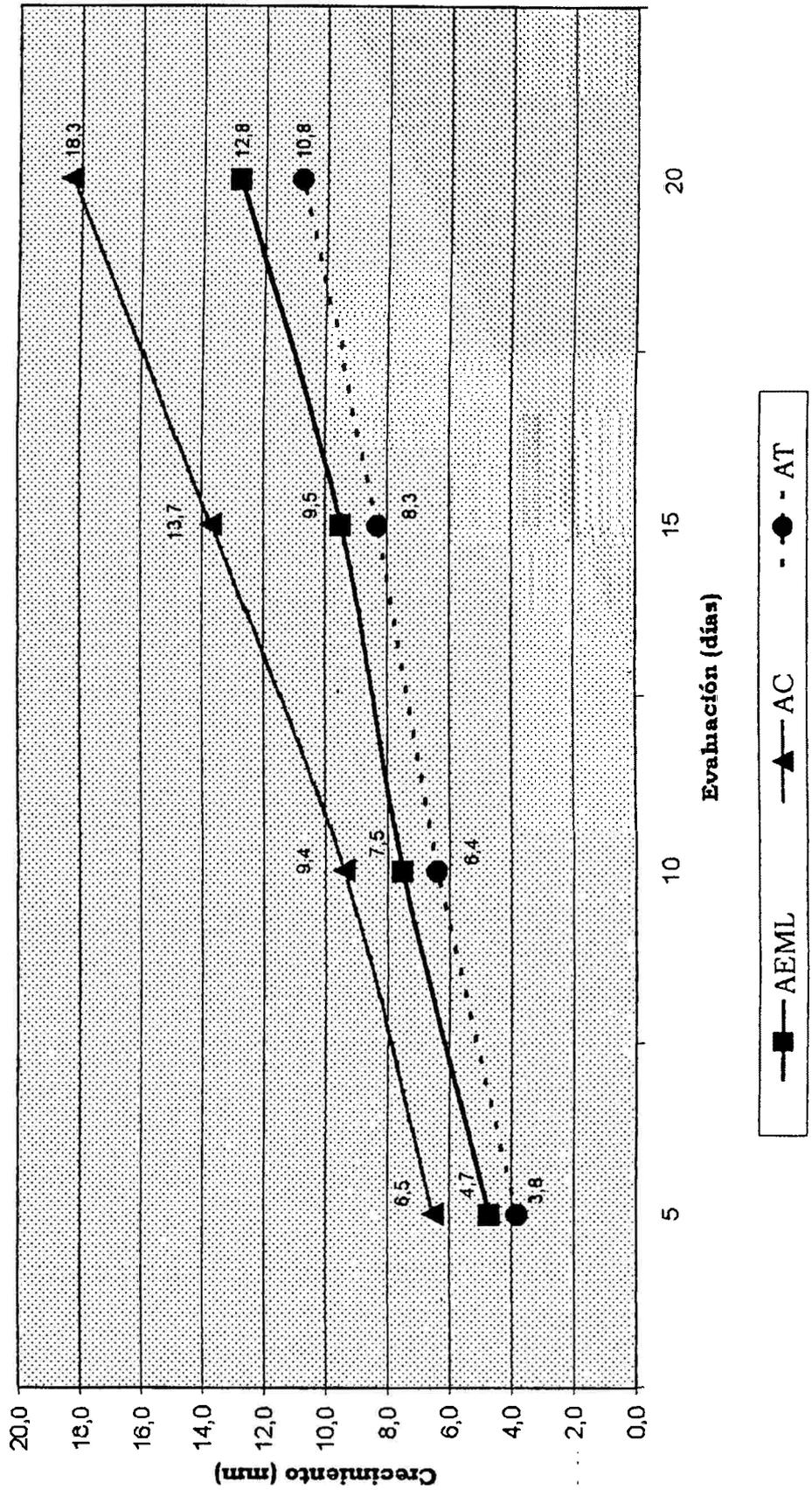
CUADRO N° 04: Crecimiento radial (mm) de *Agaricus campestris* "paku" a los 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación sobre tres medios de cultivo.

Medios de cultivo	Eval. / Días	N° de placas				\bar{X}	Vigor	Observaciones
		01	02	03	04			
AEML	5	4.5	5.0	(1)	4.5	4.7	III	Blanco cremoso con cordón micelial tipo esponjoso
	10	7.0	8.0	(1)	7.5	7.5	III	
	15	9.0	10.0	(1)	9.5	9.5	III	
	20	(1)	13.5	(1)	12.0	12.8	III	
AC	5	6.0	6.5	7.0	6.5	6.5	II	Blanco claro rhizomorfo con cordón micelial
	10	9.5	8.5	10.0	9.5	9.4	II	
	15	13.5	(1)	13.0	14.5	13.7	II	
	20	18.5	(1)	17.0	19.5	18.3	II	
AT	5	3.5	3.0	4.0	4.5	3.8	I	Blanco pálido, débil crecimiento rhizomorfo
	10	6.0	5.0	7.0	7.5	6.4	I	
	15	8.0	7.5	(1)	9.5	8.3	I	
	20	10.5	11.0	(1)	(1)	10.8	I	

(1) Placa contaminada

- I. Micelio débil
- II. Micelio medio
- III. Micelio fuerte.

Figura N° 02: Curva de crecimiento micelial de *Agaricus campestris* "paku" en 3 medios de cultivo seleccionados.



3.4. Crecimiento micelial en 3 medios de cultivo seleccionados.

En el Cuadro N° 04 se observa la efectividad en el crecimiento micelial sobre mejores medios de cultivo para la propagación, fueron evaluados durante 20 días, observándose con los resultados en Agar Compost (AC) un crecimiento de 18.3 mm. Seguido por Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML) con un promedio de 12.8 mm y en Agar Trigo (AT) un promedio de 10.8 mm; tal vez estos crecimientos se manifestaron tan lentos, porque fueron incubados a temperatura ambiental, que fluctuaron entre 19 a 21 °C o también pudiera haber un error en el preparado de los medios de cultivo. NICOL (1993), comparó, crecimiento micelial en Agar Compost por 20 días con temperaturas de 24, 28 y 32 °C y una humedad de 65, 55 y 75 % resultando promedios de crecimiento de 3.5 cm, 3.3 cm y 2.9 cm, respectivamente

El pH del medio de cultivo fue un factor primordial en el crecimiento micelial; resultados con un pH de 7.0 a 7.5 fueron óptimos; a un pH ácido el crecimiento fue inhibido presentando deformaciones.

3.5. MANTENIMIENTO DE CEPAS AISLADAS.

La cepa aislada del campo fue mantenida en medios de cultivo preparados en tubos de ensayo a temperatura de 4 °C y renovados cada 4 a 6 meses.

Los medios de cultivo utilizados fueron: Agar Compost (AC) y Agar trigo (AT), puesto que en el primero, el micelio es denso y muy notorio; pero el consumo del medio es cada vez rápido por ende fueron transferidos cada 4 meses; en el segundo, el crecimiento es más lento y el medio

nutritivo dura más tiempo. (Anexo 06 fig. N° 02).

3.6. PRODUCCIÓN DE SEMILLA O BLANCO

▪ FASE I

La propagación del micelio fue realizada por medio de tres repiques consecutivos (Resiembra) sin utilizar el cultivo aislado del campo, en medios de Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML) y Agar Compost (AC). Se realizó en tubos de prueba y placas Petri.

La incubación fue a temperatura ambiental fluctuando entre 19 - 21 °C por un periodo de 30 días a condiciones de oscuridad.

▪ FASE II

Una vez que el micelio de la Fase I ha sido colonizado, se transfirió el micelio cortando más o menos 1 cm² a frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con 100 g de sustrato previamente esterilizados. Un tubo fue para un frasco y una placa Petri para cuatro frascos.

El tiempo de incubación fue de 35 días en las mismas condiciones de la Fase I.

Los frascos se agitaron cada 5 días para hacer una mezcla de todos los granos con el micelio en crecimiento.

▪ FASE III

La propagación del micelio en esta fase fue realizada en frascos de vidrio de 1 litro de capacidad, conteniendo 400 g de sustrato en grano de trigo y bolsas de plástico de tipo polipropileno tamaño 25 x 38 cm,

conteniendo 300 g de sustrato en grano esterilizado. (Anexo 07, fig. N° 03)

La inoculación se realizó transfiriendo 20 a 25 g del inóculo por frasco o bolsa, la incubación es el mismo de las fases anteriores y el tiempo de colonización fue de 20 días. El tiempo depende de la cantidad del inóculo utilizado.

La homogeneización del sustrato se realizó con la misma frecuencia de la Fase II. Una vez listo el blanco, se llevó a refrigeración hasta el día de la inoculación al sustrato definitivo (Compost), si esta no es inmediata.

Para obtener un blanco de buena calidad, se necesita tener experiencia en reconocer, cuando un micelio no ha degenerado, cuando no está contaminado y cuando tiene un potencial normal de producción. Pues la calidad del blanco influye decisivamente en el rendimiento.

CUADRO N° 05: Evaluación de 4 tipos de compostaje para *Agaricus campestris* "paku" . ACQ.03 y Cepa Comercial Ab.01

Tipos de cómpost	Temperatura de la pila (°C)		pH	Observación final
	Inicial	Final		
Caballo	64	37	7.75	Descomposición total de la paja, olor a tierra, color marrón oscuro
Llama+ cuy	61	38	8.19	Descomposición parcial, olor a amoniaco, color marrón
Caballo + llama	59	36	8.0	Mantiene la paja larga, sin olor, color marrón claro
Caballo+ cuy	59	37	8.47	Descomposición de la paja, olor amoniaco, color marrón oscuro

3.7. PREPARACIÓN DEL COMPOSTAJE.

▪ FASE I

La fermentación fue realizada al aire libre utilizando el método de composteo largo, propuesto por LEAL (1993).

Las pilas de compostaje al inicio se acondicionaron con 65 cm de alto y 85 cm de ancho para los 4 tipos de compost. (Fig. 04, Anexo 05).

Las temperaturas de fermentación fueron controladas diariamente, resultando en el primer volteo 64 °C en el compost preparado a base de estiércol de caballo; en el compost preparado a base de estiércol de llama y cuy fue de 61 °C; en el compost a base del estiércol de caballo y llama , compost de estiércol de caballo y cuy, resultó una temperatura de 59°C para ambos casos.

Para el último volteo, la temperatura se homogenizó, resultando temperaturas de 37, 38, 36 y 37 °C, respectivamente.

Se observaron diferencias en la descomposición del material lignocelulósico (paja de trigo), resultando en el compost de caballo un desmenuzado total, con un pH de 7.75; en el compost de caballo y cuy, el resultado fue semejante con olor amoniacal y un pH de 8.47.

Para el compost de llama y cuy, presentó una ligera descomposición parcial. En el compost de estiércol de caballo y llama, el material lignocelulósico se mantenía larga y suave, con un pH de 8.0 (Ver cuadro N° 05).

La altura de la pila y el tipo de estiércol fue un factor importante para la elevación de la temperatura dentro del compost. También el contenido de nitrógeno en los estiércoles y aditivos fue una fuente de calor

producido, ya que la gallinaza contiene 6% de nitrógeno, el estiércol de cuy 2.84%, el estiércol de caballo 0.44% y alfalfa 2% respectivamente (LEAL, 1993).

La relación carbono/nitrógeno es el factor más importante del proceso de compostage. La mayoría de los microorganismos prefieren una relación de C/N de 30/1, que es la más conveniente para una eficiente fermentación.

Se observó que el estiércol de caballo presenta una fermentación más caliente con respecto a las mezclas realizadas.

▪ FASE II

Para eliminar los microorganismos presentes en el compost preparado y conseguir un sustrato adecuado para el crecimiento de *Agaricus campestris* "paku", se realizó la pasteurización a 60 °C durante 4 horas.

Al finalizar el compost fue más suave con olor a tierra con el compost de caballo y en el compost de caballo y llama. Los otros dos compost presentaron un ligero olor amoniacal.

3.3.8.SIEMBRA DE MICELIO EN GRANO DE TRIGO E INCUBACIÓN.

El micelio en grano fue pesado 70 g para cada caja de cultivo, tanto de la cepa *Agaricus campestris* "paku" ACQ - 03 y la cepa Ab.01 (Comercial); inmediatamente fue sembrada e incubado a una temperatura de 21 °C a 23 °C con una humedad de 90 a 95%.

En la evaluación se observa el crecimiento característico del micelio rizomorfo de color blanco después de 5 días de la siembra. La cepa ACQ

- 03, aceleró un tanto en el crecimiento en comparación a la cepa Ab. 01, que tardó en reaccionar.

Después de 10 días las cajas de cultivo, presentaron crecimiento micelial periférico, observándose con diferencias en el compost de caballo y llama con crecimiento denso de la cepa ACQ - 03 con respecto a los demás sustratos. Liberando un olor característico.

A los 15 días, la totalidad de las cajas de cultivo presentaban crecimiento micelial tanto de Agaricus campestris "paku" ACQ - 03 y la cepa Ab.01 (Comercial), presentando manchas principalmente centrales sobre las cajas de cultivo.

En el compost de caballo y cuy y compost de caballo el crecimiento fue muy lento, ocurrió en ambas cepas.

A los 19 días fue cubierto con la capa de cobertura, por que los micelios de ACQ - 03 crecieron sobre las cajas de cultivo y de la misma manera los micelios de Ab.01.

Después de los 25 días, se observaron micelios en crecimiento en la superficie de la tierra de cobertura en las cajas de cultivo conteniendo el compost de caballo + llama y compost de llama y cuy, para Agaricus campestris "paku" ACQ - 03 y para la cepa Ab. 01 (Comercial) observándose un retraso en los otros 2 tipos de compost..

A los 35 días fueron diferenciadas la formación de los primeros primordios en cajas de cultivo conteniendo compost de caballo y llama para ambas cepas. A los 7 días después del crecimiento de los primordios fueron cosechados y pesados en fresco y luego en seco tomando el tiempo total de producción (anexo 01). Desde estos datos fueron ordenados para

la EB (anexo 2; cuadro 2), TP (cuadro 3) y rendimiento (anexo 3; cuadro N° 4) para las dos cepas y procesadas a análisis de varianza.

Al final el compost de caballo y llama se comportó como mejor sustrato para el crecimiento de *Agaricus campestris* "paku" ACQ - 03 y para la cepa Ab.01 (Comercial); seguido por el compost de llama + cuy.

El compost de caballo y cuy y el compost de caballo se comportaron con menor crecimiento micelial, y con menor número de fructificaciones.

El poco crecimiento del micelio en los compost C₄ y C₁ se debió a la presencia del olor amoniacal en el primero y en el segundo por presentar un compost totalmente desmenuzado.

Finalmente el cultivo fue perjudicado por la aparición de moscas y ácaros en el periodo de formación de los primordios, afectando las fructificaciones posteriores.

CUADRO N° 06: Análisis de varianza de la determinación de Eficiencia Biológica (% EB) de la fructificación de *Agaricus campestris* "paku" y la cepa comercial en cuatro clases de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Bloque	2	0.1583583	0.0791792	0.34 ^{NS}
Compost	3	31.0534792	10.3511597	44.33**
Cepas	1	3.5805375	3.5805375	15.33**
Compost vs. Cepa	3	5.3207458	1.7735819	7.60*
Error	14	3.2691750	0.2335125	
TOTAL	23	43.3822958		

C.V. = 18.95%

CUADRO 6 A: Efectos simples de tipos de compost dentro de cepas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Compost (ACQ-03)	3	6.48113333	2.16037778	9.252*
Compost (Ab.01)	3	29.8930917	9.9643639	42.672**

CUADRO 6 B: Efectos simples de clases de cepas dentro de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Cepa (Compost 1)	1	0.12326667	0.12326667	0.528 ^{NS}
Cepa (Compost 2)	1	0.22426667	0.22426667	0.960 ^{NS}
Cepa (Compost 3)	1	7.79760000	7.79760000	33.393**
Cepa (Compost 4)	1	0.75615000	0.75615000	3.238*

N.S. = Estadísticamente no significativo

* = Significativa, $\alpha = 0.05$

** = Significativa, $\alpha = 0.01$

CUADRO N° 07: Prueba de Duncan para tratamientos (De Eficiencia Biológica en%)

ORDEN	TRATAMIENTO	PROMEDIO DE E.B.	VALOR DUNCAN			
1	C ₃ x (Ab.01)	5.357	a			
2	C ₃ x (ACQ.03)	3.077		b		
3	C ₂ x (Ab.01)	3.063		b		
4	C ₂ x (ACQ.03)	2.677		b	c	
5	C ₄ x (Ab.01)	2.310			c	d
6	C ₄ x (ACQ.03)	1.600				d
7	C ₁ x (Ab.01)	1.300				d
8	C ₁ x (ACQ.03)	1.013				d

(**) Los tratamientos seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente al 0.05%.

C₁ = Compost de caballo.

C₂ = Compost de lama + cuy

C₃ = Compost de caballo + llama

C₄ = Compost de caballo+ cuy.

ACQ.03 = *Agaricus campestris* "paku", cepa (nativa).

Ab.01 = Cepa (comercial).

El cuadro N° 06 muestra el análisis de varianza de la Eficiencia biológica de la fructificación de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ - 03) y cepa comercial (Ab. 01) en cuatro clases de compost en el cual se observa diferencia altamente significativa para todas las fuentes de variación. La significancia estadística para la interacción indica que la Eficiencia Biológica de las cepas estudiadas está influenciada por la clase de compost, es decir existe una interdependencia entre las cepas y la clase de compost que se manifiesta en diferentes valores de Eficiencia Biológica. Por esta razón se realizó el estudio de efectos simples que se muestra en los cuadros 6 A y 6 B.

En el cuadro 6 A, la alta significancia mostrada para las diferentes clases de compost en la cepa de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ. 03) y la cepa comercial (Ab.01) indica que la Eficiencia Biológica de estas cepas son diferentes por lo menos en dos clases de compost.

El cuadro 6 B muestra significación estadística para las cepas sólo en los compost 3 y 4, pero no en los compost 1 y 2, lo que significa que en el compost de caballo (C₁) y en el compost de llama y cuy (C₂) no hay diferencia en la Eficiencia Biológica de las cepas estudiadas, mientras que en el compost de caballo y llama (C₃) y el compost de caballo y cuy (C₄) la cepa comercial (Ab.01) tiene mayor Eficiencia Biológica que la cepa de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03).

Al realizar la prueba de Duncan (Cuadro N° 07) para todos los tratamientos, se determina que la mayor Eficiencia Biológica la obtuvo con la cepa comercial en el compost de caballo y llama (C₃) (Ab.01).

correspondiendo los valores más bajos de Eficiencia Biológica a las cepas de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03) y cepa comercial (Ab.01) en los compost de caballo (C₁) y de caballo y cuy (C₄).

CUADRO N° 08: Análisis de varianza de la determinación de Tasa de Producción (%TP) de la fructificación de *Agaricus campestris* "paku" y la cepa comercial en cuatro clases de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Bloque	2	1.3610333	0.6805167	0.86 NS
Compost	3	89.4243125	29.8081042	37.70 **
Cepa	1	11.5509375	11.5509375	14.61 **
Compost vs. Cepa	3	13.1671125	4.3890375	5.55 *
Error	14	11.0693000	0.790664	
TOTAL	23	126.5726960		

C.V. = 19.37%

CUADRO 8 A: Efectos simples de tipos de compost dentro de cepas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Compost (ACQ-03)	3	20.5080000	6.8360000	8.646 *
Compost (Ab.01)	3	82.0834250	27.3611417	34.605 **

CUADRO 8 8: Efectos simples de clases de cepas dentro de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Cepa (Compost 1)	1	0.06615000	0.06615000	0.084 NS
Cepa (Compost 2)	1	0.79935000	0.79935000	1.011 NS
Cepa (Compost 3)	1	21.54615000	21.54615000	27.251 **
Cepa (Compost 4)	1	2.30640000	2.30640000	2.917 *

N.S. = Estadísticamente no significativo

* = Significativa, $\alpha = 0.05$

** = Significativa, $\alpha = 0.01$

CUADRO N° 09: Prueba de Duncan para tratamientos (De Tasa de Producción en %)

ORDEN	TRATAMIENTO	PROMEDIO DE E.B.	VALOR DUNCAN
1	C ₃ x (Ab.01)	9.273	a
2	C ₂ x (Ab.01)	5.573	b
3	C ₃ x (ACQ.03)	5.483	b
4	C ₂ x (ACQ.03)	4.843	b
5	C ₄ x (Ab.01)	4.197	b c
6	C ₄ x (ACQ.03)	2.957	d
7	C ₁ x (ACQ.03)	2.303	d
8	C ₁ x (Ab.01)	2.093	d

(**) Los tratamientos seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente al 0.05%.

C₁ = Compost de caballo.

C₂ = Compost de lama+ cuy

C₃ = Compost de caballo + llama

C₄ = Compost de caballo + cuy.

ACQ.03 = *Agaricus campestris* "paku", cepa (nativa).

Ab.01 = Cepa (comercial).

En el cuadro N° 08 se muestra el análisis de varianza de Tasa de producción de la fructificación de Agaricus campestris "paku" (ACQ.03) y la cepa comercial Ab.01 en cuatro clases de compost, en el cual se observa diferencia altamente significativa para todas las fuentes de variación. La significancia estadística para la interacción indica que la Tasa de Producción de las cepas estudiadas está influenciada por la clase de compost, es decir existe una interdependencia entre las cepas y la clase de compost que se manifiesta en valores diferentes de Tasa de Producción. Por esta razón también se realizó el estudio de efectos simples que se encuentran en los cuadros 8 A y 8 B.

En el cuadro 8 A, la alta significancia mostrada para las diferentes clases de compost en la cepas de Agaricus campestris "paku" ACQ.03 y la cepa comercial Ab.01 indica que en la tasa de producción de estas cepas son diferentes por lo menos en dos clases de compost

El cuadro 8 B muestra significación estadística para las cepas solamente en los compost 3 y 4, pero no en los compost 1 y 2, lo que significa que en el compost de caballo (C_1) y en el compost de llama y cuy (C_2) no hay diferencia en la Tasa de Producción de las cepas estudiadas, mientras que en el compost de caballo y llama (C_3) y el compost de caballo y cuy la cepa comercial Ab.01 tiene mayor Tasa de producción que la cepa de Agaricus campestris "paku".

Al realizar la prueba de Duncan (Cuadro N° 09) para todos los tratamientos, se determina que la mayor Tasa de producción la obtuvo con la cepa comercial en el compost de caballo y llama (C_3) (Ab.01) correspondiendo los valores más bajos de Tasa de Producción a las cepas

de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03) y la cepa comercial (Ab.01) en los compost de caballo (C₁) y de caballo y cuy (C₄), respectivamente.

CUADRO N° 10: Análisis de varianza de la determinación del Rendimiento(%R) de la fructificación de *Agaricus campestris* "paku" y la cepa comercial en cuatro clases de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Bloque	2	0.00022500	0.00011250	0.32 NS
Compost	3	0.04781250	0.01593750	45.46**
Cepas	1	0.00570417	0.00570415	16.27**
Compost vs. Cepa	3	0.00821250	0.00273750	7.81*
Error	14	0.00490833	0.00035060	
TOTAL	23	0.6686250		

C.V. = 18.96 %

CUADRO 10 A: Efectos simples de tipos de compost dentro de cepas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Compost (ACQ-03)	3	0.01020000	0.00340000	9.698 **
Compost (Ab.01)	3	0.04582500	0.01527500	43.568 **

CUADRO 10 B: Efectos simples de clases de cepas dentro de compost.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C
Cepa (Compost 1)	1	0.00015000	0.00015000	0.4288 NS
Cepa (Compost 2)	1	0.00026667	0.00026667	0.7611 NS
Cepa (Compost 3)	1	0.01215000	0.01215000	34.655 **
Cepa (Compost 4)	1	0.00490833	0.00490833	3.850 *

N.S. = Estadísticamente no significativo

* = Significativa, $\alpha = 0.05$

** = Significativa, $\alpha = 0.01$

CUADRO N° 11: Prueba de Duncan para tratamientos (De Rendimiento en %)

ORDEN	TRATAMIENTO	PROMEDIO DE E.B.	VALOR DUNCAN
1	C ₃ x (Ab.01)	0.210	a
2	C ₃ x (ACQ.03)	0.120	b
3	C ₂ x (Ab.01)	0.117	b
4	C ₂ x (ACQ.03)	0.103	b
5	C ₄ x (Ab.01)	0.090	b c
6	C ₄ x (ACQ.03)	0.060	c d
7	C ₁ x (ACQ.03)	0.050	d
8	C ₁ x (Ab.01)	0.040	d

(**) Los tratamientos seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente al 0.05%.

C₁ = Compost de caballo.

C₂ = Compost de lama + cuy

C₃ = Compost de caballo + llama

C₄ = Compost de caballo + cuy.

ACQ.03 = *Agaricus campestris* "paku", cepa (nativa).

Ab.01 = Cepa (comercial).

En el cuadro N° 10 muestra el análisis de varianza del Rendimiento de la fructificación de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03) y la cepa comercial (Ab.01) en cuatro clases de compost, en el cual se observa diferencia altamente significativa para todas las fuentes de variación. La significancia estadística para la interacción indica que el Rendimiento de las cepas estudiadas está influenciada por la clase de compost, es decir existe una interdependencia entre las cepas y la clase de compost que se manifiesta en diferentes valores del Rendimiento. Por esta razón se realizó el estudio de efectos simples que se muestra en los cuadros 10 A y 10 B.

En el cuadro 10 A, la alta significación mostrada para las diferentes clases de compost en la cepa de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03) y la cepa comercial (Ab.01) indica que el Rendimiento de estas cepas son diferentes por lo menos en dos clases de compost.

El cuadro 10 B muestra significación estadística para las cepas solamente en los compost 3 y 4, pero no en los compost 1 y 2, lo que significa que en el compost de caballo (C₁) y en el compost de llama y cuy (C₂) no hay diferencia en el Rendimiento de las cepas estudiadas, mientras que en el compost de caballo y llama (C₃) y el compost de caballo y cuy (C₄), la cepa comercial Ab.01) tiene mayor Rendimiento que la cepa *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03).

Al realizar la prueba de Duncan (Cuadro N° 11) para todos los tratamientos, se determina que el mayor rendimiento la obtuvo con la cepa comercial en el compost de caballo y llama (C₃) (Ab.01), correspondiendo los valores más bajos del Rendimiento a las cepas de *Agaricus campestris* "paku" (ACQ.03) y la cepa comercial (Ab.01) en los compost de caballo (C₁) y de caballo y cuy (C₄).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. En nuestras condiciones de laboratorio es posible aislar cepas puras de **Agaricus campestris** "paku", pero esto dependerá del grado de conocimiento de los requerimientos nutricionales, temperatura y las principales características que debe tener un micelio. El método de aislamiento por tejido Plectenquimático fue favorable, ya que el crecimiento requiere de menor tiempo; por ende, existe menor riesgo de contaminación. El tiempo de aislamiento promedio fue de 50 días.
2. El medio de cultivo apropiado para la propagación de **Agaricus campestris** "paku", fue el Agar Compost (AC) y Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML), donde el micelio creció normal y vigoroso. Para la conservación del micelio fueron utilizados Agar Compost y

el Agar Trigo, ya que en éstos medios naturales, el micelio no cambia de vigor.

3. Las condiciones apropiadas de fructificación fueron mantenidas a una temperatura de 18 °C, humedad relativa de 80 - 85% y con una aireación controlada de 2 a 3 veces por día por un cierto tiempo.
4. De acuerdo a la evaluación para la Eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y Rendimiento (R) para la cepa ACQ.03 y Ab.01 en los cuatro tipos de compost existe una diferencia altamente significativa para toda las fuentes de variación y encontrándose una significación estadística para las cepas, en los compost 3 y 4 respectivamente.
5. La mayor (EB), (TP) y (R) se han encontrado en la cepa Ab.01 (Comercial), superando en un margen mayor de 50% a la cepa ACQ - 03 *Agaricus campestris* "paku" con los resultados de (5.357,9.273, 0.210) y (3.677, 5.573, 0.120) respectivamente.

RECOMENDACIONES

1. Sería interesante realizar un trabajo de investigación utilizando el sustrato (Compost 3) disminuyendo en las proporciones de estiércol de 10, 20 y 30% con el fin de estandarizar un sustrato adecuado para nuestra zona.
2. Evaluar otros residuos agrícolas lignocelulósicos para el crecimiento y fructificación de *Agaricus campestris* "paku", ya que en nuestra zona existe una inmensa cantidad de éstos residuos y una vez utilizado el sustrato, evaluar la calidad nutricional en plantas.
3. Se deben estudiar otros hongos comestibles de nuestra Selva, ya que fueron reportados el consumo rutinario por los pobladores nativos; éstos hongos deben ser probados en sustratos diferentes, para optimizar un sustrato adecuado para la producción.
4. Consumir estos hongos en forma de botón en fresco y/o cocinado en diversas formas ya que la Calidad Nutricional es alta.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ALEXOPOULOS, J. (1985). Introducción a la Micología. Edit. Omega S.A.
Barcelona - España. Pp 56, 525.
2. ARORA, D. (1986). Mushrooms Demystified. By Etition Berkeley. USA.
Pp. 310 - 318.
3. CASSINELLI, S. (1991). Búsqueda de un Medio Nutritivo para el Cultivo
comercial del Hongo Comestible *Lentinus edodes* (berk) Shii -
Taki Singer en el Perú. Tesis Universidad Nacional Agraria La
Molina. Lima - Perú. Pp 28 - 29.
4. CRESPO, M. (1994). Cultivo Comercial del Champiñón. Edit. Albatros
SACI. Buenos Aires- Argentina. Pp 97 - 110.
5. DEACON, J. (1993). Introducción a la Micología Moderna. Edit. Limusa
S.A. C.V. Segunda Edición. México. Pp 39, 179 - 182.
6. FERRAN, L. (1969). Cómo Cultivar el Champiñón, la trufa y otros
Hongos. Editorial AEBOS. Barcelona - España.

7. GUIMARAES, S. (1980). ASituacao do Cogumelo Comestivel no Brasil e no Exterior im: Centro Nacional sobre Cogumelos Comestivel. Sao Paulo. Instituto de Botánica. Revista Ciencias Biomédicas da Universidade Federal de Uberlandia. Pp 13 - 14.
8. GUZMAN, G. (1980). Hongos. Editorial Limusa S.A. Cuarta reimpression. México. Pp 22 - 23.
9. GUZMÁN, G. (1989). Identificación de Hongos Comestibles, Venenosos, Alucinantes y Destruyores de Madera. Edi. Limusa S.A. Segunda Reimpression. México.
10. IBAR, L. (1980). Cómo buscar, comer, guisar, conservar setas. Editorial AEDOS. Barcelona - España. Pp 12, 83 - 89.
11. LAMBERT, B. (1972). El Cultivo de Champiñón en los Estados Unidos. Centro Regional de Ayuda Técnica (AID). México/ Buenos Aires. Pp 2 - 8.
12. LEAL, L. (1990). Producción de Hongos Comestibles. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos, O. Monroy y G. Viniegra (Comp). A.G.T. Editor S.A. México. Pp 157 - 165.
13. LEAL, L. (1990). Principios de Composteo, Fermentación al Aire Libre de Materia orgánica. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos, O. Monroy y G. Viniegra (Comp). A.G.T. Editor S.A. México. Pp 95 - 98..
14. LEAL, L. (1993). Producción de Hongos Comestibles. Biotecnología Alimentaria. Edit. Limusa S.A. de C.V. México. Pp 362 - 375.

15. MAROTO, J. (1986). Hongos Cultivados. Horticultura Herbácea Especial. Edit. Mundi – Prensa. Segunda Edición. España. Pp 571 – 577.
16. NICHOLS, M. (1993). Setas Comestibles. El Arte de Cultivar estos Caprichosos Hongos. Revista Agricultura de las Américas. Universidad de Massy, Palmerse North. Nueva Zelanda. Pp 108 – 114.
17. PAVLICH, Magdalena. (1997). Cultivo de Hongos Comestibles. Curso UNSCH, Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho – Perú. Pp 1 – 9.
18. PINKERTON, M. (1954). Comercial Mushroom Growing In: Spawn and Spawning. Pp 104 – 113.
19. REYES, P. (1980). Bioestadística Aplicada a Agronomía – Biología – Química. Editorial Trillas. México. Pp 104 – 117.
20. RIGAU, A. (1985). Cultivo de Champiñones y Trufas. Edit. Sintes. S.A. Barcelona – España.
21. RODRÍGUEZ, F. (1993). Cultivo de *Pleurotus sp.* "florida". Na Região de Uberlândia, MG, Brasil. Revista do centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. Edit. Da UFU – EDUFV. V.9. Nº 1. Pp. 20 – 23.
22. STAMETS, P. (1993). Growing Courmot and Medicinal Mushrooms Printed in Hong Kong, co Produced by ten speed press and Mycomedía. Pp. 90 – 91, 108 -114.

23. VAN GRIENSVEN, L. (1983). Al Desarrollo del Cultivo del Champiñón en Holanda. Boletín Agro - Holanda S. Pp 2 -7.
24. VEDDER, P. (1993). Cultivo Moderno del Champiñón. Edit. Mundi - Prensa. Madrid - España. Pp 375, Cap 5 - 6 - 7 - 8.
25. WAINWRIGHT, M. (1995) Producción de Setas. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza - España. Pp 158.
26. WANG, Z. (1993). Identificación of field - ollected isolates of *Agaricus bisporus*. Nicol Neotrop. Apl. 6. P. 128 - 139.
27. WOLTGANG, D y GERHARD, J. (1994). Cultivo del Cuerpo Fructífero de Hongos Superiores. Biotecnología con Experimento Modelo. Edit. Acribia S.A. Zaragoza - España. Pp 70 - 74.

ANEXOS

ANEXO N° 01

CUADRO N° 01: Peso Fresco y Peso Seco de los Corpóforos de ACQ - 03 Cepa
(nativa) *Agaricus campestris* "paku" y Ab. 01 Cepa (Comercial).

CEPAS			ACQ - 03			Ab.01			
Sustratos	Tasa de Inocul.	Repet.	Peso fresco	Peso seco	Tiempo total	Peso fresco	Peso seco	Tiempo total	N° de cosechas
Compost de caballo	1%	1	42.80	3.73	60.0	50.20	4.37	47.0	2.0
		2	35.00	3.05	51.0	45.60	3.97	50.0	2.0
		3	45.00	3.92	58.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Prom.	40.93	3.57	56.0	47.90	4.17	48.0	2.0
Compost de llama y cuy	1%	1	88.50	7.71	52.0	96.50	8.41	52.0	2.0
		2	75.80	6.60	60.0	91.30	7.95	55.0	2.0
		3	87.90	7.66	55.0	100.80	8.78	58.0	2.0
		Prom.	84.07	7.32	56.0	96.20	8.38	55.0	2.0
Compost de caballo y llama	1%	1	94.00	8.19	53.0	169.50	14.77	60.0	2.0
		2	87.80	7.65	60.0	192.80	16.80	58.0	2.0
		3	108.00	9.41	56.0	142.40	12.41	55.0	2.0
		Prom.	96.60	8.42	56.0	168.23	14.66	58.0	2.0
Compost de caballo y cuy	1%	1	52.80	4.60	51.0	71.00	6.18	51.0	2.0
		2	48.70	4.24	54.0	65.10	5.67	55.0	2.0
		3	49.40	4.30	58.0	81.70	7.12	58.0	2.0
		Prom.	50.30	4.38	54.0	72.60	6.32	55.0	2.0

ANEXO N° 02

CUADRO N° 02: Resultados Ordenados de la Eficiencia Biológica* (%) de ACQ.03 Cepa (nativa) *Agaricus campestris* "paku" y Ab. 01 Cepa (Comercial).

Especie	ACQ - 03				Ab.01			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Tratamiento Bloque								
I	1.36	2.82	2.99	1.68	1.59	3.07	5.40	2.26
II	1.11	2.41	2.80	1.55	1.45	2.91	6.14	2.07
III	1.43	2.80	3.44	1.57	0.00	3.21	4.53	2.60
TOTAL	3.90	8.03	9.23	4.80	3.04	9.19	16.07	6.93
PROMEDIO	1.30	2.68	3.08	1.60	1.013	3.06	5.36	2.31

(**) Peso de los carpoforos frescos/ Peso del sustrato seco x 100.

- 1 = Compost de caballo.
- 2 = Compost de lama + cuy
- 3 = Compost de caballo + llama
- 4 = Compost de caballo + cuy.

CUADRO N° 03: Resultados Ordenados de la Tasa de Producción*(%) de ACQ.03 Cepa (nativa) *Agaricus campestris* "paku" y Ab. 01 Cepa (Comercial).

Especie	ACQ - 03				Ab.01			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Tratamiento Bloque								
I	2.27	5.42	5.64	3.29	3.38	5.90	9.00	4.35
II	2.18	4.02	4.67	2.87	2.90	5.29	10.58	3.76
III	2.46	5.09	6.14	2.71	0.00	5.53	8.24	4.48
TOTAL	6.91	14.53	16.45	8.87	6.28	16.72	27.82	12.54
PROMEDIO	2.30	4.80	5.48	2.96	2.093	5.57	9.27	4.18

(**) Eficiencia Biológica (EB) / Tiempo de Producción x 100.

- 1 = Compost de caballo.
- 2 = Compost de lama + cuy
- 3 = Compost de caballo + llama
- 4 = Compost de caballo + cuy.

ANEXO N° 03

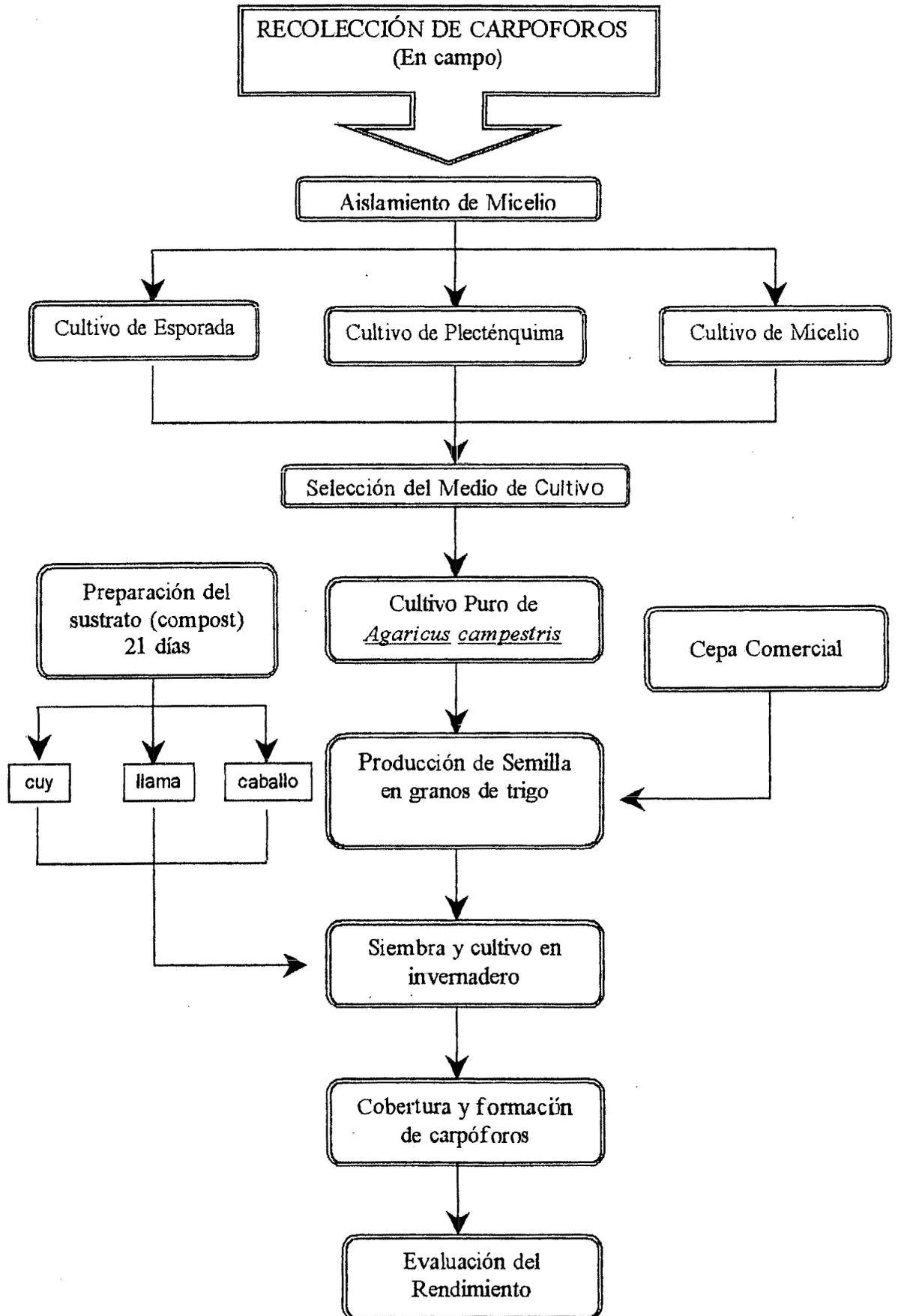
CUADRO N° 04: Resultados Ordenados del Rendimiento (%) de ACQ.03 Cepa (nativa) *Agaricus campestris* "paku" y Ab. 01 Cepa (Comercial).

Especie Bloque	ACQ - 03				Ab.01			
	1	2	3	4	1	2	3	4
I	0.05	0.11	0.12	0.06	0.06	0.12	0.21	0.09
II	0.04	0.09	0.11	0.06	0.06	0.11	0.24	0.08
III	0.06	0.11	0.13	0.06	0.00	0.12	0.18	0.10
TOTAL	0.15	0.31	0.36	0.18	0.12	0.35	0.62	0.27
PROMEDIO	0.05	0.10	0.12	0.06	0.04	0.12	0.21	0.09

(*) Peso de los carpoforos secos/Peso del sustrato húmedo x 100.

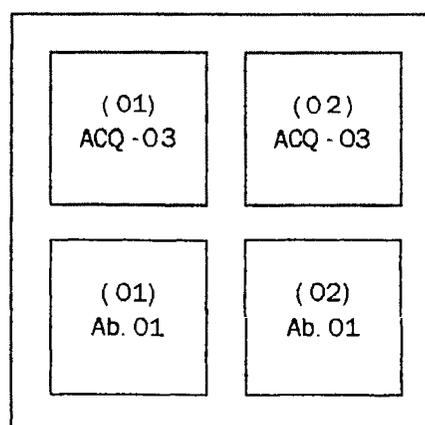
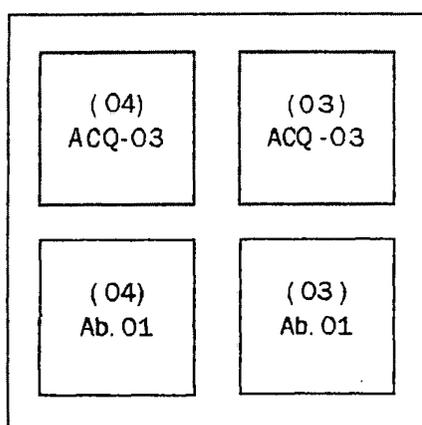
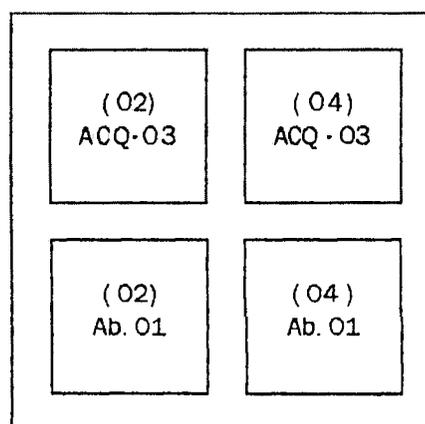
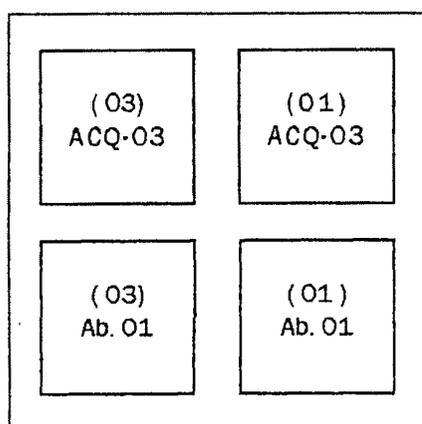
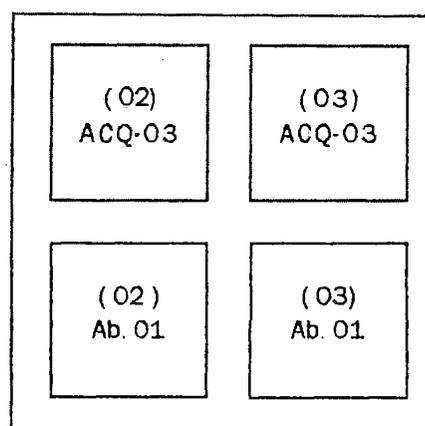
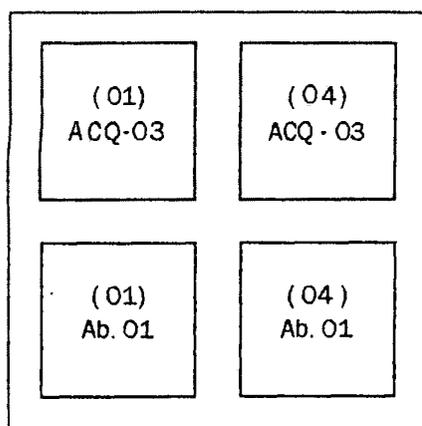
- 1 = Compost de caballo.
- 2 = Compost de lama+ cuy
- 3 = Compost de caballo + llama
- 4 = Compost de caballo + cuy.

ANEXO N° 04: FLUJOGRAMA EXPERIMENTAL



ANEXON°05

DISEÑO EXPERIMENTAL: DBCR (Condiciones de Invernadero)



1 = Compost de caballo.

2 = Compost de lama + cuy

3 = Compost de caballo + llama

4 = Compost de caballo + cuy.

ACQ.03 = *Agaricus campestris* "paku", cepa (nativa).

Ab.01 = Cepa (comercial).

ANEXON°06



Fig N° 1: *Agaricus campestris* "paku", recolectado en medio ambiente natural



Fig. N° 2: cepa pura aislada creciendo sobre los medios nutritivos Agar Compost y Agar Trigo

ANEXON°07



Fig. N° 3: Multiplicación de micelios de *Agaricus campestris* "paku", sobre sustrato en grano de trigo



Fig N° 4: Preparación de 4 tipos de compostaje de la Fase I.

ANEXON°08



Fig. N° 5: Fructificación de *Agaricus campestris* "paku" ACQ-03 sobre compost en caja de cultivo

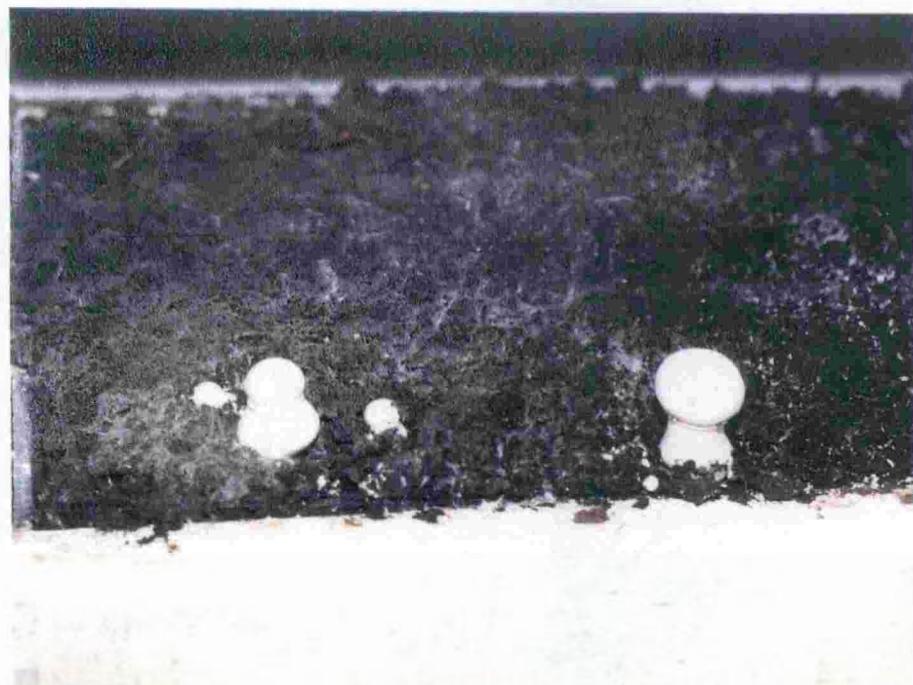


Fig. N° 6: Fructificación de Ab.01 cepa ccmercial sobre compost en caja de cultivo

ANEXO N° 09

ALGUNAS RECETAS PARA COCINAR CHAMPIÑONES

1. **Champiñón a la Sartén.-**

Se preparan las especies más tiernas con champiñón silvestre. Se cortan en pequeñas láminas, se pasan por huevo batido y posteriormente se rebozan con una mezcla de pan y queso finamente rallados. Se frien en aceite hirviendo durante unos minutos.

2. **Champiñones Guisados.-**

Se cortan los champiñones en conchas de aproximadamente 1 cm de grueso, a continuación se frien en aceite, o en aceite con mantequilla a partes iguales, junto con un diente de ajo previamente machacado en el mortero. Después de los 5 primeros minutos de cocción a medida que se va evaporando el agua que contienen los champiñones, se va añadiendo al guiso caldo de cubitos de extracto de carne diluidos en agua, se sazonan al gusto pudiendo añadirse un poco de pimienta.

3. **Champiñones Gratinados con Papas.-**

Se escogen papas de buena calidad, mejor tiernas, se hierven con su piel en agua salada. Se pelan y cortan en rodajas bastante gruesas, procurando que no se enfrién para evitar su endurecimiento. En una fuente de gratinar, bastante honda, con el fondo recubierto de una fina capa de aceite o mantequilla derretida, se coloca una primera capa de papas. Se recubre con champiñones cortados a pedazos gruesos, pan relleno y trocitos de mantequilla. Se colocan alternativamente una o dos capas más de papas y champiñones, cubriendo la última de éstas con queso rallado y sazonado al gusto. Se introduce la fuente en el horno caliente y no se saca hasta que se haya formado una costra dorada.

4. **Pizza con Champiñones.-**

Ingredientes: 400 g de Harina de trigo, 300 g de champiñones, 100 ml de agua, 20 g de levadura de cerveza, 20 g de mantequilla, 6 tomates maduros, un diente de ajo, una ramita de perejil y una de orégano.

Preparar una masa con el agua, harina y levadura y dejarlo fermentar, cubierta con un paño, durante tres horas. Amasar unos minutos más y extender la pasta sobre una mesa apropiada hasta formar un disco de unos 30 cm y 1 cm de grosor.

En un sartén y a fuego suave, freír en mantequilla, durante unos veinticinco minutos, el diente de ajo y las setas cortadas y saladas al gusto.

En un molde para pizza, previamente untado con aceite, se coloca el disco de pasta; se recubre con los champiñones y los tomates pelados, cortados a tiras y ligeramente salados, y espolvoreados con perejil y orégano. Cocer al horno caliente.

ANEXO N° 10

MEDIOS DE CULTIVO:

➤ Agar Extracto de Malta (AEM).

Se pesó 20 g de extracto de malta, 20 g de dextrosa, 1 g de peptona, se disolvió en agua destilada, luego se agregó 18 g de agar agar. Se hirvió moviendo hasta disolverlo. Finalmente se llenó hasta 1L y luego se procedió al autoclavado por 15 minutos a 121 °C y a 15 lb. de presión, se distribuyó en tubos de prueba y/o placas Petri bajo la llama de un mechero para evitar la contaminación.

➤ Agar Extracto de Malta y Levadura (AEML).

Se pesó 20 g de extracto de malta, 2 g de extracto de levadura, disolvió en agua destilada, luego se agregó 18 g de agar agar, se hirvió con movimientos suaves a fuego lento evitando quemar el medio, luego se enrasó a un litro y se procedió a esterilizar a 121 °C y a 15 lb. de presión por 15 minutos, luego se distribuyó en tubos de prueba y/o placas Petri manteniendo la asepsia para evitar la contaminación.

➤ Agar Sabouraud Maltosado (ASM).

Se pesó 65 g de Agar Sabouraud Maltosado (De fábrica), disolviéndose en agua destilada a fuego lento hasta que se vea cristalino (Sin solutos visibles), luego se llenó a 1 L. Inmediatamente se procedió al esterilizado a 121 °C y a 15 lb. de presión por 15 minutos se distribuyó en las mismas condiciones que el medio anterior.

➤ Agar Papa Dextrosa (APD).

Se hirvió 380 g de papas peladas y picadas con agua destilada por media hora, se filtró con gasa y al filtrado se le añadió 20 g de dextrosa o azúcar y 18 g de agar agar. Se volvió a hervir moviendo hasta disolverlo. Finalmente se llenó a 1 L, se ajustó el pH a 7.0 con KOH al 0.1 N, luego se esterilizó a 121 °C y a 15 lb. de presión por 30 minutos, luego se procedió en las mismas condiciones al medio anterior.

➤ Agar Papa Dextrosa y Extracto de Levadura (APDL).

La preparación de este medio de cultivo fue igual al d APD, pero se le agregó, además, 0.1 g de extracto de levadura por litro.

➤ Agar Trigo (AT).

Se hirvió 400 g de grano de trigo con agua destilada por 2 horas, se dejó en reposo 24 horas, luego se filtró el sobrenadante, se agregó 1.8% de agar y fue hervido nuevamente moviendo para que se disuelva el agar y se completó a 1 L con agua destilada, se ajustó el pH a 7.0 con KOH 0.1 N y se esterilizó en autoclave a 121 °C y a 15 lb. de presión por 30 minutos, luego se distribuyeron a tubos de prueba y/o placas Petri bajo la llama del mechero, evitando la contaminación.

➤ Agar Compost (AC).

Se procedió a hervir 100 de compost para champiñones previamente secado, molido y tamizado con 1 L de agua destilada y se le agregó 18 g de agar, se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave a 121 °C y a 15 lb. de presión por 2 horas y por dos días consecutivos (Tindalización).

ANEXO N° 11

Recolección de cuerpos de fructificación de *Agaricus campestris* "paku" en 12 zonas del distrito de Quinua, para la identificación y aislamiento de micelios.

Origen	Fecha de muestreo	Hábitat	Zona ecológica	Observaciones
Sallalli	18/12/97	T	bh - MS	En parejas y dispersos, grandes
Sallalli	18/12/97	P	bh - MS	En círculo, presencia de humus
Zayhuapata	15/01/98	P	bs - MBS	Solitarios, dispersos.
Zayhuapata	15/01/98	T	bs - MBS	Dispersos de tamaño grande
Zayhuapata	15/01/98	P	bs - MBS	Dispersos en cantidad
Ananzayocc	20/02/98	P	e - MS	Solitario, grande
Ananzayocc	20/02/98	R	e - MS	Algunas en parejas, disperso
Ananzayocc	20/02/98	R	e - MS	Cantidad, tamaño diversos
Lorenzayocc	28/02/98	A	e - MS	Solitario mediano
Lorenzayocc	28/02/98	A	e - MS	En parejas tamaño mediano
Moya	10/03/98	R	bh - MS	Pequeños, dispersos
Moya	10/03/98	T	bh - MS	Pequeños en zigzag.

- T = Terreno eriazo pedregoso.
P = Terreno con pastos de kikuyo.
R = Riveras de cultivo.
A = Riveras de acequia.