

**OBTENCIÓN *IN VITRO* DE MICELIO DE HONGOS COMESTIBLES, SHIITAKE
(*Lentinula edodes*) Y ORELLANAS (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus
pulmonarius*) A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CUERPOS FRUCTÍFEROS,
PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA**

**CAROLINA SUÁREZ ARANGO
COD. 107407**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BOGOTÁ D.C.
2010**

**OBTENCIÓN *IN VITRO* DE MICELIO DE HONGOS COMESTIBLES, SHIITAKE
(*Lentinula edodes*) Y ORELLANAS (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus
pulmonarius*) A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CUERPOS FRUCTÍFEROS,
PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA**

**CAROLINA SUÁREZ ARANGO
COD. 107407**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Especialista en Ciencia y
Tecnología de Alimentos**

**DIRIGIDO POR
MSc. MARTHA STELLA HOLGUÍN H**

**CODIRECTOR
MSc. NESTOR ARIEL ALGECIRA ENCISO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BOGOTÁ D.C.
2010**

A Dios por darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente y por permitirme caer para volverme a levantar con más fuerza y fe en mí.

A mis padres Hilda y José Vicente, por su amor, apoyo incondicional y por creer siempre en mí. No los defraudaré.

A mis hermanos David Ricardo, por ponerle siempre sal y picante a mi vida y Danna, por ser la alegría de mi existencia.

A quien no tenía los ojos color del sol, pero si eran los ojos que adoraba y me llenaban de felicidad, esperanza, luz y calor. Ahora ya no estás conmigo, pero siempre estarás en mi corazón como lo que eres, mi amor.

A mi profe Martha, por demostrarme que hay gente muy linda en la tierra. Gracias por brindarme su apoyo, darme ánimo en los momentos difíciles y por su valiosísima amistad.

A mi amiga del alma, Joha, que aunque estando lejos, me demuestra que las cosas siempre se pueden conseguir, eres mi ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

- A Julián Guevara, de “Fungita” por facilitar sus instalaciones, recursos y empleados para la producción de las setas empleadas en el estudio.
- Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y a su director, Dr. Carlos Novoa por permitirme realizar mi trabajo experimental y darme la oportunidad de trabajar en el marco de otras investigaciones realizadas en el Laboratorio de Control Microbiológico del Instituto.
- Nuevamente, a la profesora Martha Stella Holguín, por brindarme la confianza de trabajar en el laboratorio y compartir conmigo conocimientos y experiencias de vida.
- Al profesor Nestor Algecira, por brindarme la oportunidad de ingresar al programa de especialización y confiar en mí.
- A Gregorio Medina, técnico del Laboratorio de Control Microbiológico del ICTA, por compartir todo su conocimiento conmigo y brindarme apoyo en mi trabajo experimental.
- A la Dra Sci. Ivonne Nieto, profesora de la Facultad de Química de la universidad por darle un nuevo empuje a mi carrera y por darme la oportunidad de trabajar con ella.
- Al MSc Luis Carlos Veloza, por su inmenso apoyo, confianza y amistad.
- A Kelly y a Susana, por su impagable colaboración en el laboratorio.
- A Álvaro Jiménez y a todos los ingenieros, estudiantes, técnicos y demás empleados del ICTA, por su colaboración e interés en mí.

OBTENCIÓN *IN VITRO* DE MICELIO DE HONGOS COMESTIBLES, SHIITAKE (*Lentinula edodes*) Y ORELLANAS (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CUERPOS FRUCTÍFEROS, PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA

RESUMEN

Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles de años y han sido reportados como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macromicetos, como lo son sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, inmunomoduladoras, entre otras. Igualmente, han sido descritas sus propiedades nutricionales, tienen un elevado contenido de proteína, casi igual o superior al de algunas legumbres; además, poseen todos los aminoácidos esenciales para las funciones humanas, así como un alto contenido de vitaminas y minerales. Géneros de *Pleurotus* (orellanas) y *Lentinula edodes* (shiitake) se encuentran entre las setas con un mayor índice de producción a nivel mundial. En Colombia, el cultivo de este tipo de hongos es muy poco generalizado, así como la investigación y las fuentes de información para llevar a cabo este tipo de cultivos. Se desarrollaron varias metodologías para producir micelio a partir de cuerpos fructíferos para la producción de semilla. Al igual, se evaluaron diferentes medios de cultivo sintéticos y diferentes tipos de semillas de cereales para la producción de micelio y semilla (spawn), para la iniciación de los cultivos de setas. El mejor medio de cultivo para la producción de micelio fue PDA (Papa, dextrosa y agar) y el mejor cereal para la producción de semilla fue el trigo.

PALABRAS CLAVE

Shiitake, orellanas, producción de micelio, medios sintéticos, producción de semilla.

**IN VITRO MICELIA ISOLATION OF EDIBLE MUSHROOMS, SHIITAKE
(*Lentinula edodes*) AND OYSTER MUSHROOMS (*Pleurotus ostreatus* and
Pleurotus pulmonarius) FROM FRUITING BODIES, FOR SPAWN
PRODUCTION**

ABSTRACT

Macrocymetes have been part of the human culture for thousand years and have been reported as food in the most important civilizations in history. Many nutraceutical properties of the macromycetes have been described, for instead, anticancer, antitumor, hypocholesterolemic, antiviral, antibacterial, immunomodulatory, among others. They have also described its nutritional properties, have a high content of protein, nearly equal to or higher than some vegetables, also have all the amino acids essential to human functions and high content of vitamins and minerals. Genera *Pleurotus* (oyster mushrooms) and *Lentinula edodes* (shiitake) are among the mushrooms with a higher rate of the production worldwide. In Colombia, the cultivation of these fungi is very widespread, and research and sources of information to carry out this type of crop as well. Various methodologies were developed to produce mycelia from fruiting bodies for the spawn production. Several synthetic media and cereal seeds were evaluated to define the best media to mycelia and spawn production. The best media was PDA (Potato dextrose, agar) and the best grain for spawn production was wheat.

KEY WORDS

Shiitake, oyster mushroom, mycelia production, synthetic media, spawn production,

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ANEXOS	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 REINO FUNGI (HONGOS).....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. OBJETIVOS	38
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	38
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	39
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
7. RESULTADOS.....	42
7.1 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LAS METODOLOGÍAS.....	42
7.2 DESCRIPCIÓN DE LAS METODLOGÍAS EMPLEADAS PARA EL AISLAMIENTO DEL MICELIO.....	43
7.3 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SINTÉTICOS PARA EL AISLAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE MICELIO.....	50
7.4 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> Y <i>Pleurotus pulmonarius</i> EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS	52

7.5 EVALUACIÓN DE LOS GRANOS DE CEREAL PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA	57
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	61
9. CONCLUSIONES	68
10. RECOMENDACIONES	69
11. BIBLIOGRAFÍA	70
12. CIBERGRAFÍA.....	76
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Carpóforo típico de un macromiceto (Basidiomycete). <i>Amanita muscaria</i>	21
Figura 2. Ciclo de vida de los Basidiomycete	22
Figura 3. <i>Pleurotus ostreatus</i> en tubulares de aserrín	24
Figura 4. <i>Pleurotus pulmonarius</i> en tubulares de aserrín	25
Figura 5. Estructura química de las estatinas derivadas de productos fúngicos.	26
Figura 6. Fragmento de la estructura química del manogalactano aislado de <i>P. pulmonarius</i>	27
Figura 7. Estructura química del β -Glucano con actividad antinociceptica aislado de <i>P. pulmonarius</i>	28
Figura 8. Estructura química de la pleuromutilina	29
Figura 9. Carpóforos de <i>Lentinula edodes</i>	29
Figura 10. Estructura repetida del lentinan	31
Figura 11. Estructura de la eritadenina	31
Figura 12. Estructura del ergosterol	32
Figura 13. Crecimiento del micelio de los trozos de carpóforos de <i>Pleurotus ostreatus</i> desinfectados	44
Figura 14. Diagrama general de la metodología de aislamiento de micelio a partir de carpóforo con desinfección	45
Figura 15. Cámara húmeda para el aislamiento del micelio a partir del	46

carpóforo

Figura 16.	Presencia de micelio en el carpóforo después de la incubación en cámara húmeda	46
Figura 17.	Germinación de las esporas sembradas en fondo después de 12 días	47
Figura 18.	Diagrama de la metodología de aislamiento de micelio a partir de esporas atrapadas en papel	49
Figura 19.	Crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días	51
Figura 20.	Crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días	51
Figura 21.	Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días	52
Figura 22.	Crecimiento <i>Lentinula edodes</i> según los medios de cultivo evaluados	53
Figura 23.	Crecimiento <i>Pleurotus pulmonarius</i> según los medios de cultivo evaluados	53
Figura 24.	Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> según los medios de cultivo evaluados	54
Figura 25.	Frasco de granos de maíz amarillo recién inoculado con el hongo	58
Figura 26.	Crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en trigo	59
Figura 27.	Crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en millo	59
Figura 28.	Crecimiento típico de <i>Lentinula edodes</i> sobre placa de PDA	63
Figura 29.	Crecimiento típico de <i>Pleurotus pulmonarius</i> sobre placa de PDA	64
Figura 30.	Crecimiento típico de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre placa de PDA	64

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Contenido de proteína cruda, carbohidratos, grasa y fibra en <i>Pleurotus spp</i> y <i>Lentinula edodes</i> . (Valores en peso seco)	17
Tabla 2. Contenido de vitaminas y minerales en <i>Pleurotus spp</i> y <i>Lentinula edodes</i> (mg/Kg)	18
Tabla 3. Propiedades medicinales para <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pleurotus pulmonarius</i>	19
Tabla 4. Principales compuestos medicinales del Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	30
Tabla 5. Promedio del crecimiento (mm) de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Lentinula edodes</i> en diferentes tipos de medio de cultivo	50
Tabla 6. Ecuaciones de crecimiento obtenidas del tratamiento matemático de los datos arrojados por la experimentación	56
Tabla 7. Rata de crecimiento específico (μ , día ⁻¹) para cada una de los medios de cultivo y cada uno de los hongos evaluados	57
Tabla 8. Evaluación del crecimiento micelial en granos de cereal	60

LISTA DE ANEXOS

	pag.
Anexo 1. Crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> (3) en placas de pda, ogy y sabouraud a 10 días de incubación	78
Anexo 2. Tabla de ANOVA obtenida con los datos experimentales del crecimiento de los tres hongos en los tres tipo de agar	80
Anexo 3. Rata de crecimiento máxima específica (μ_m) para cada hongo, cada medio de cultivo y cada día de experimentación	81
Anexo 4. Graficas de crecimiento teóricas ajustadas a las ecuaciones 2 y 3 para los tres hongos y los tres medios de cultivo	84

1. INTRODUCCIÓN

El reino Fungi comprende un inmenso grupo de organismos muy versátiles, con diferentes morfologías, fisiologías, ciclos de vida, entre otros. Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles de años y han sido reportados como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Desde la década de los 70s se han incrementado las investigaciones científicas en este tipo de organismos debido al legado cultural que se tienen de ellos, en especial en el lejano oriente, de sus propiedades medicinales. Debido a esto, se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macrohongos (macromicetos), como lo son sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, inmunomoduladoras, entre otras. Igualmente, han sido descritas sus propiedades nutricionales, tienen un elevado contenido de proteína (casi igual o superior al de algunas legumbres) lo que los hace un gran sustituto de la carne cuando la dieta no incluye mucha proteína animal, además, poseen todos los aminoácidos esenciales para las funciones humanas, así como un alto contenido de vitaminas y minerales. Adicionalmente, este tipo de hongos son apetecidos por su exquisito sabor y son usados en diferentes platos tipo gourmet. Los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* se encuentran entre los primeros en producción mundial, los principales productores de estos hongos se encuentran en el lejano oriente y Estados Unidos, en Latinoamérica, Chile es el mayor productor de setas mientras que Colombia ocupa el tercer lugar, después de la Argentina.

En Colombia, el cultivo de este tipo de hongos está destinado a estratos socioeconómicos altos, debido a que la oferta en el país es muy baja y sus precios son muy elevados. Los agricultores colombianos no poseen las herramientas básicas para producirlos debido a que las fuentes de información acerca de este tipo de cultivos son en idiomas diferentes al castellano y además, la investigación en el país sobre este tipo de organismos es prácticamente nula. Uno de los mayores problemas que tienen los productores de este tipo de hongos es su procedencia asiática y por consiguiente se debe importar la cepa para producirla; lo que acarrea costos elevados y por consiguiente, el costo de producción se aumenta, llevando también ese costo a los consumidores.

El uso de cepas no foráneas, es decir, cepas aclimatadas a nuestras condiciones, hace que los productores tengan una ventaja, la producción de las setas se da en un menor tiempo que si se usa una cepa recién traída del exterior. El tener la capacidad de reproducir este tipo de organismos por los cultivadores colombianos y en ambientes autóctonos hace que la rentabilidad del negocio sea mucho mayor y que muchos más cultivos se instalen a lo largo del país; lo que acarrearía con muchos más puestos de trabajo y mejorarían las capacidades socioeconómicas de un tipo de población muy especial en el país, la población desplazada, que es uno de los tipos de población objetivo para que desarrollen este tipo de cultivos.

El objetivo principal de esta investigación fue el desarrollo *in vitro* de metodologías fáciles de desarrollar y reproducir por los cultivadores colombianos para que puedan producir su propio micelio a partir de su propia producción y así, producir la semilla para el inicio de este tipo de cultivos. Llevando a un gran impulso en la producción de este tipo de macromicetos lo que generaría muchas más fuentes de empleo, mayores ingresos de los productores y por consiguiente una mayor oferta al consumidor, que se beneficiaría de un menor precio por un producto que además de nutrirle, le llevaría grandes beneficios en su salud.

2. MARCO TEÓRICO

Las setas han sido parte de la dieta humana desde tiempos inmemoriales, siendo usados como alimentos, aún antes de que el hombre entendiera el manejo de otros organismos. Para los antiguos romanos estos eran “la comida de los dioses”, resultado de los rayos que chocaban contra la tierra empleados por Júpiter durante las tormentas; los egipcios los consideraban “un regalo del dios Osiris”, mientras que los chinos los veían como “el elixir de la vida” (Smith *et al.* 2002).

A través de la historia muchas culturas han construido su conocimiento práctico sobre cuales hongos eran convenientes para ser consumidos y cuáles eran venenosos. Muchas culturas, en especial en el oriente, identificaron que ciertas setas podrían tener profundos beneficios y ser promotores de la salud.

Son considerados tanto una solución para la desnutrición como una cura para el cáncer y otras enfermedades (MushWorld. 2004). Algunas investigaciones científicas han concluido que hay aproximadamente 10000 especies que poseen una estructura y tamaño suficiente para ser consideradas como posible fuente de alimento. Sin embargo, esto no quiere decir que estas 10000 especies sean perfectamente digeribles por el cuerpo humano. Se calcula que aproximadamente 1000 de estas especies son venenosas y que el 5% de ellas son consideradas mortales. Dentro de las 9000 restantes, no todas son consumibles directamente; algunas sólo son útiles para el ser humano de manera indirecta, requieren de algún tipo de descomposición química o de tratamiento. Es así como las setas pueden ser medicinales, alimenticias, alucinógenas y venenosas (Arias *et al.* 2008).

El cultivo de hongos comestibles se ha convertido en una práctica alrededor del mundo por la habilidad de crecer en un amplio rango de temperaturas utilizando varios sustratos. Así mismo, el interés de los consumidores por adquirir productos libres de fertilizantes, conservantes y otros productos químicos, así como con una alta proporción de proteínas y otros nutrientes, convierten a estos hongos en un alimento apetecido y con una creciente demanda.

Las proteínas constituyen uno de los nutrientes más importantes en la alimentación y es fundamental para construir los tejidos del cuerpo. Los hongos con un contenido de proteína que va de 3 – 7% (frescos) a 25 – 40% (secos) juegan un papel preponderante en el enriquecimiento de la dieta humana cuando el suministro de proteína cárnica es limitado. El contenido de proteína es casi igual al del maíz, la leche y las legumbres, aunque es más baja que la de la carne, pescados y huevos. Como fuente de proteína en la dieta, los hongos son superiores a la mayoría de las frutas y verduras con la excepción de los frijoles y guisantes. Los hongos pueden comerse frescos o cocinados, a diferencia de otras fuentes de proteína como la soya y la levadura que deben ser procesadas o enmascaradas de alguna manera para que sean aceptables al paladar.

Tabla 1. Contenido de proteína cruda, carbohidratos, grasa y fibra en *Pleurotus spp* y *Lentinula edodes*. (Valores en peso seco)

Seta	Proteína	Carbohidratos	Grasa	Fibra	Valor energético (Kcal/100 g)
	%	%	%	%	
<i>Lentinula edodes</i>	13,4 – 17,5	66,5 – 78,0	4,9 – 8,0	7,3 – 8,0	387 – 392
<i>Pleurotus spp.</i>	10,5 – 30,4	57,6 -81,8	1,6 – 2,2	7,5 – 8,7	345 – 367

Fuente: Arias, *et al.* 2008.

Las setas también contienen todos los aminoácidos esenciales así como las amidas y los aminoácidos no esenciales más comunes; la lisina, cuyo contenido es bajo en la mayoría de los cereales, es el aminoácido más importante en estos organismos, por lo cual la proteína micótica se convierte en un importante aporte a la dieta humana.

Los hongos tienen altos contenidos de vitaminas que incluyen cantidades significativas de vitamina C, aunque desprovistos de vitamina A; los hongos son ricos en riboflavina, tiamina y cianocobalamina (Vit B₁₂), ésta última sólo se encuentra normalmente en productos animales; su contenido de niacina es casi equivalente a los niveles encontrados en la carne de cerdo, que se considera la fuente más rica de esta vitamina. También contienen un alto porcentaje de

minerales como el calcio, potasio, sodio y fósforo, además del ácido fólico, un ingrediente que enriquece el torrente sanguíneo y previene deficiencias como la anemia. El hierro también está presente en los hongos en una cantidad apreciable y junto con el fósforo, puede proporcionar una buena cantidad de las necesidades dietéticas diarias recomendadas. Los hongos son bajos en sodio, haciéndolos ideales para personas con ciertos tipos de dolencias del corazón y del riñón (MushWorld. 2004).

Tabla 2. Contenido de vitaminas y minerales en *Pleurotus spp* y *Lentinula edodes* (mg/Kg)

Seta	Tiamina	Niacina	Riboflavina	Ca	P	K	Fe	Na
<i>Lentinula edodes</i>	7,8	54,9	4,9	98	476	Nd	8,5	8,5
<i>Pleurotus spp</i>	4,8	108,7	4,7	33	1348	3793	15,2	8,3

Fuente: Arias, Gutiérrez, Ospina. 2008.

Adicionalmente a su valor nutricional, muchos macromicetos comestibles se han usado en el oriente para propósitos medicinales. Las costumbres culturales han suministrado pistas sobre las potenciales fuentes medicinales de los hongos. Muchas especies no comestibles, también han ganado un importante uso médico. En el presente, al menos a 270 especies conocidas de setas se les han atribuido propiedades terapéuticas (Tabla 3).

Los hongos medicinales se han convertido en ingredientes cada vez más comunes en el tratamiento de varias enfermedades y problemas de salud, debido a la habilidad de producir metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas. Usando aproximaciones modernas, los científicos han aislado e identificado componentes específicos, que pueden destruir o por lo menos debilitar tres de las enfermedades asesinas de la humanidad: el cáncer, las enfermedades del corazón y el SIDA (Mattila, Suonpää. 2000); además, las setas también ofrecen otras propiedades terapéuticas potenciales incluyendo las antioxidante, anti hipertensa, hipocolesterolémica, protección hepática, anti fibrótica, anti inflamatoria, anti diabética, anti viral y anti microbiana. Como resultado, desde los años setenta se ha publicado un gran bagaje de literatura científica acerca de los hongos, principalmente proveniente de hospitales e instituciones de investigación en Europa, Japón, China y Estados Unidos; influenciando las compañías

farmacéuticas del lejano oriente que están viendo en los hongos una rica fuente de moléculas biomédicas innovadoras (hongos medicinales).

Tabla 3. Propiedades medicinales para *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*

	Antifúngico	Antiinflamatorio	Antitumoral	Antiviral (anti-VIH)	Antibacterial y Antiparasítico	Regulador de la presión sanguínea	Desordenes cardiovasculares	Hipercolesterolemia, Hiperlipidemia	Antidiabético	Inmunomodulador	Tónico de riñones	Hepatoprotector	Tónico Nervioso	Potenciador Sexual	Bronquitis crónica
<i>Lentinula edodes</i>		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
<i>Pleurotus ostreatus</i>			+	+	+			+					+		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	+		+					+							

X: producto comercialmente desarrollado (medicamento o suplemento dietario=

+: no se ha desarrollado un producto comercial

Fuente: Wasser, 1999

2.1 REINO FUNGI (HONGOS)

Los hongos son descritos como organismos unicelulares o pluricelulares, eucarióticos, productores de esporas, que carecen de clorofila, heterótrofos, que se reproducen tanto sexual como asexualmente y que usualmente son filamentosos, ramificados con estructuras somáticas llamadas hifas y típicamente rodeados de paredes celulares. En el reino *Fungi* (hongos) se incluyen los phylum *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Otros phylum adicionales son los *Myxomycota*, *Dictyosteliomycota*, *Acrasiomycota*, *Plasmophoromycota*, *Oomycota*, *Labyrinthulomycota* y *Hyphochytriumycota*. Incluido en este reino se encuentran los champiñones, u hongos con forma de concha (setas), mildes polvosos, mohos del pan, levaduras, morillas y trufas, por nombrar algunos (Alexopoulos. 1996).

2.1.1 Macromicetos. Son denominados de esta manera los hongos cuyos carpóforos o cuerpos fructíferos pueden ser vistos a simple vista, comúnmente se dice que son organismos macroscópicos, sin embargo, esta afirmación es falsa ya que es solamente el carpóforo el que puede ser visto a simple vista.

Los hongos macromicetos están formados por hifas ramificadas que se reúnen en cordones y cuerpos de reproducción visibles. Son saprófitos ya que crecen en materia descompuesta absorbiendo materia orgánica, en simbiosis con plantas, formando ectomicorrizas o como parásitos sobre los árboles (Pedreros. 2007).

2.1.1.1 Ascomycetes. Pueden ser unicelulares o estar formados por un micelio de paredes quitinosas, con septos transversales incompletos (presentando un poro central). Las hifas pueden ser uni o multinucleadas, homocarióticas o dicarióticas ramificadas. La principal característica de estos hongos es que como producto de su reproducción sexual se forman unos sacos o bolsas llamados ascos los cuales, contienen en su interior a las esporas de origen sexual (ascosporas). Los cuerpos productores de ascos se denominan ascocarpos.

En la gran mayoría de las especies se forman cuerpos fructíferos macroscópicos o microscópicos que contienen uno o muchos ascocarpos, sin embargo algunas

especies no forman cuerpos fructíferos ni ascocarpos y los ascos quedan al descubierto y son diseminados en el micelio (Saldarriaga. 2001).

2.1.1.2 Basidiomycetes. Las esporas que dan nombre al grupo son las basidiosporas, producidas exógenamente en órganos especiales, los basidios. En los Basidiomycetes superiores se producen cuatro basidiosporas típicamente y los basidios se encuentran en laminillas (lamelas) de los basidiocarpos carnosos. Los Basidiomycetes inferiores tienen un ciclo vital más complicado y su lugar en la clasificación no es muy seguro. Un buen grupo de especies de Agaricales (hongos con laminillas) pueden desarrollarse en cultivos artificiales (Stamets. 2000).

Figura 1. Carpóforo típico de un macromiceto (Basidiomycete). *Amanita muscaria*



Fuente: Universidad de León. España. Consultado Enero 23 de 2010 en <http://www3.unileon.es/personal/wwdbvmgg/practicasconsusfotos/practica5sola/fotospractica5sola/hongos/amanitamuscariapielaminasbordesombbrero.jpg>

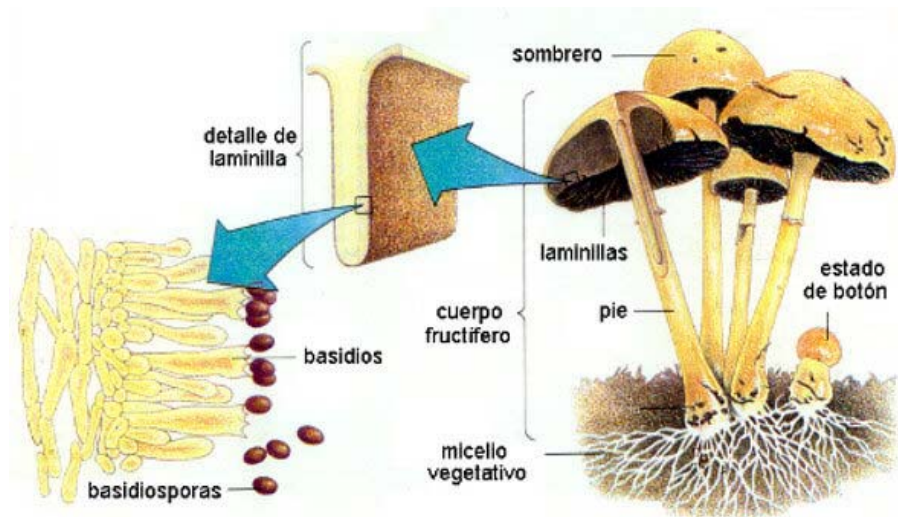
Una actividad muy importante de los basidiomicetos es la descomposición de la madera, papel y otros derivados de productos naturales. Estos hongos, por lo tanto son capaces de producir celulasas y enzimas capaces de catabolizar la lignina y utilizarla como fuente de carbono y energía. La descomposición de la lignina en la naturaleza es difícil y es realizada por un reducido grupo de hongos basidiomicetos, que producen la llamada podredumbre de la madera. Existen dos

tipos de podredumbre, la marrón, en la que solamente se degrada la celulosa pero no la lignina y la blanca, en la que ambos polímeros son degradados eficientemente (Pedreros. 2007).

2.1.1.3 Ciclo de vida. La forma de reproducción de los hongos es a través de las esporas, los hongos superiores poseen en el himenio unas células madres que son las encargadas de producir las esporas, en el caso de los Basidiomycetes, estas son llamadas basidios.

Las esporas son lanzadas por el himenio al exterior, si se depositan en lugares húmedos y de condiciones favorables, darán origen al micelio, éste crecerá bajo tierra o leños dando lugar a una seta con basidios en su himenio y se producirán las esporas para que sean nuevamente liberadas al exterior y se complete el ciclo de reproducción.

Figura 2. Ciclo de vida de los Basidiomycetes



Fuente: Recuperado, Enero 23 de 2010 en:

<http://www.hiperbiologia.net/fungi/fungiclas.htm#ChytridiomycetesGerm%C3%83%C2%A1n>

2.1.1.4 Orden agaricales. Los hongos pertenecientes a este orden, son hongos que se caracterizan por tener esporas de color café chocolate, presentar anillos diferentes a partir de un velo parcial y laminillas o agallas libres. Lo integran tanto especies comestibles, como venenosas. Pueden ser saprófitos, parásitos o ectomicorrizicos.

2.1.2 Orellanas. Los hongos ostra (como son conocidos en Estados Unidos, Europa y Asia) u orellanas (como son conocidos en Colombia), forman parte del grupo de hongos comestibles más populares, pertenecen al phylum Basidiomycetes, familia Pleurotaceae, orden Agaricales y al género *Pleurotus*. Al igual que las orellanas, muchos de los *Pleurotus* son descomponedores primarios de árboles de madera dura y se encuentran en todo el mundo. Su carpóforo es redondeado con la superficie lisa, abombada y convexa cuando es joven, aplanándose en su proceso de maduración, sus colores pueden variar desde azul oscuro, hasta crema, blanco, café, gris, amarillo y rosado, sin embargo, el color del carpóforo puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales, puede ser oscuro en condiciones frías y claro en condiciones de luz y calor. Su tamaño puede variar de 5 a 30 cm de diámetro. El cuerpo fructífero generalmente es pequeño cuando crece en troncos y es más grande cuando se cultiva en tubulares sintéticos con otros substratos. El pie es excéntrico o lateral, sin embargo cuando llega al sombrero, es central (Chang, Miles. 2004). Las esporas son pequeñas, ovoides, casi cilíndricas, que en gran número forman masas de polvo de color blanco con cierta tonalidad violácea (Guarín, Ramírez. 2004).

Para su crecimiento micelial, las mejores fuentes de carbono son el almidón, glucosa, fructosa, maltosa, manosa, sucrosa, pectina y, celulosa. Las fuentes de nitrógeno utilizadas por el microorganismo son la peptona, licor de maíz, polvo de torta de soya, polvo de levadura, sulfato de amonio, aspargina, serina, alanina y glicina. Las temperaturas óptimas de crecimiento del micelio son cercanas a 25°C a 28°C y el rango de pH es alrededor de 5,5 a 6,5. La tolerancia al CO₂ es baja, concentraciones mayores a 30% hacen que el crecimiento decaiga (Chang, Miles. 2004).

P. ostreatus, es un hongo destructor de la madera, está extendido en las zonas templadas y forma cuerpos fructíferos a temperaturas relativamente frescas comparados con otras especies de *Pleurotus*. Su carpóforo es grisáceo–marrón en estadios jóvenes, obteniendo un color crema–blanco en su maduración. En los basidios, se encuentran cuatro esporas para su reproducción.

Esta es la especie más frecuentemente cultivada dentro del género; una de las características de esta especie es que requiere un tratamiento de temperatura llamado “choque frío” para comenzar la formación de primordios (MushWorld. 2004).

Figura 3. *Pleurotus ostreatus* en tubulares de aserrín.



Fuente: La autora, 2010

Pleurotus pulmonarius crece de forma salvaje en regiones subtropicales y tropicales en la India. Es compatible con *P. sapidus*, pero son diferentes en apariencia. Su sombrero es marrón cuando está maduro. Se ha reportado que sus basidios albergan cinco esporas en vez de cuatro, como en las demás especies (Chang, Miles. 2004). Es un hongo apropiado para el cultivo en áreas subtropicales y tropicales porque su rango de temperatura óptima para el desarrollo de cuerpos fructíferos es relativamente alto (MushWorld. 2004).

Figura 4. *Pleurotus pulmonarius* en tubulares de aserrín.



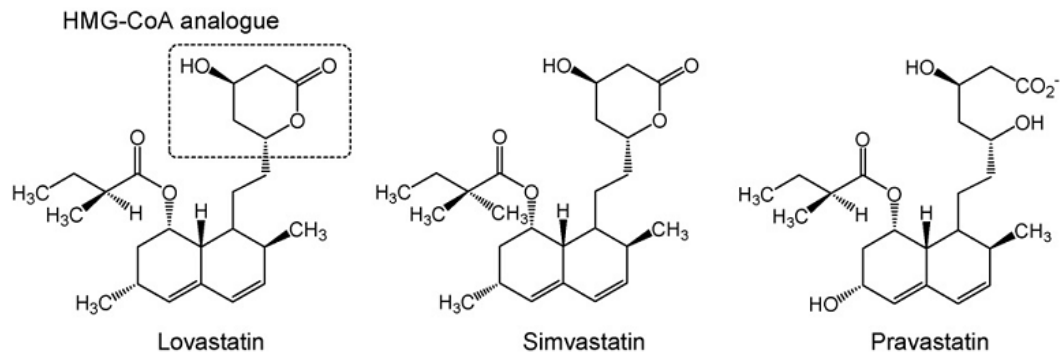
Fuente: La autora, 2010

2.1.2.1 Propiedades medicinales de las setas del género *Pleurotus*. Los efectos benéficos de *Pleurotus sp* se descubrieron independientemente en diferentes continentes. La conciencia de sus propiedades medicinales viene no sólo de Asia sino también de las tradiciones de Europa Central, Sur América y África. Existen un número de estudios que sugieren un rol importante de éste hongo en la cura de numerosas enfermedades además actividad anti cáncer, efectos inmunomoduladores y anti virales. Sin embargo su principal beneficio se observa en la producción de mevinolina (lovastatina) y sus análogos. Las especies del género son excelentes productoras de lovastatina, al punto que pueden ser consideradas como alimentos funcionales.

Estatinas: los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil glutaril conenzima A (HMG-CoA) reductasa, son comúnmente llamados estatinas (figura 5), son una nueva clase de droga ampliamente usada para el tratamiento de hipercolesterolemia en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida y también en aquellos pacientes con un alto riesgo de desarrollar arterioesclerosis (Nirogi *et al.* 2007). La mevinolina (lovastatina) es producida por muchas especies del género. *P. ostreatus* produce la mayor cantidad de lovastatina en su cuerpo fructífero, especialmente en las

lamelas. Se ha sugerido que las setas del género puedan ser recomendadas como disminuidores de colesterol naturales dentro de la dieta humana.

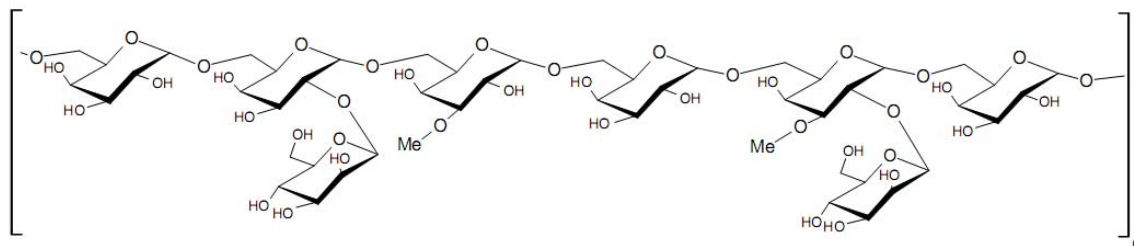
Figura 5. Estructura química de las estatinas derivadas de productos fúngicos.



Fuente: Nirogi *et al.* 2007

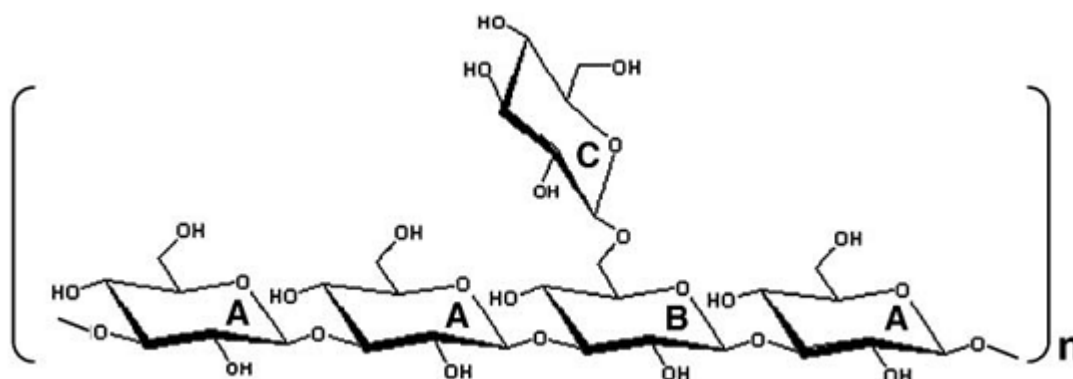
β -D-Glucanos: la producción de glucanos en macromicetos es común, son hidratos de carbono por lo general, constituyen la pared del hongo, junto con la quitina y proteínas. Son importantes debido a su potente acción antitumoral, dentro de los cuales varios glucanos lineales ((1,3)- β -glucanos) y ramificados son ampliamente conocidos, ya que a nivel genético presentan una poderosa inhibición de mutaciones, lo que permiten su potencial uso en tratamiento contra leucocitopenias (Nieto, 2010). Dentro de éstos se encuentra el Pleuran, que posee una actividad antibacteriana (Karácsonyi *et al.* 1994) y es producido por *P. ostreatus*; un 3-O-mananogalactano (figura 6) con efecto antinociceptivo (analgésico) producido por *P. pulmonarius* (Smiderle *et al.* 2008); otro β -Glucano (figura 7) aislado de *P. pulmonarius* con propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Smiderle *et al.* 2008). Se han reportado otras actividades biológicas de glucanos aislados del género como lo son la anti bacteriana y antifúngica (Hearst *et al.* 2009), inmunoestimulantes (Sun *et al.* 2009), inhiben la rinitis y las molestias nasales (Yatsuzuka *et al.* 2007) y como prebióticos (Synytsya *et al.* 2009).

Figura 6. Fragmento de la estructura química del manogalactano aislado de *P. pulmonarius*



Fuente: Smiderle *et al.* 2008

Figura 7. Estructura química del β -Glucano con actividad antinociceptica aislado de *P. pulmonarius*

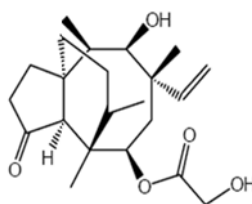


Fuente: Smiderle *et al.* 2008

Pleurostrina: es un péptido de 7kDa, con actividad inhibitoria en el crecimiento micelial de ciertos micromicetos, entre ellos *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* y *Physalospora piricola*.

Pleuromutilina: es un diterpeno (figura 8), tiene actividad antibiótica contra las infecciones micoplasmáticas y que sirvió para el desarrollo del primer medicamento de este tipo comercial de origen de un basidiomiceto.

Figura 8. Estructura química de la pleuromutilina



Fuente: Nieto, 2010

2.1.3 Shiitake. *Lentinula edodes*, *Lentinus edodes*, Shiang-gu u hongo fragante como son conocidos en Asia, su continente de origen, constituyen un alimento tradicional, exquisito y altamente valorado en las mesas de ese continente. Pero no solamente son deliciosos, nutritivos, con gran sabor y un aroma seductor, sino que también contienen un componente conocido por sus beneficios medicinales.

Figura 9. Carpóforos de *Lentinula edodes*



Fuente: La autora. 2010

Su sombrero cambia de rojizo oscuro a café, su tamaño varía de 5 a 25 cm de diámetro, semiesférico, convexo y con la edad se vuelve plano. La forma del

hongo puede ser a veces irregular. Otra característica particular, son las manchas blancas formadas en la cutícula pero que con el tiempo se pueden oscurecer a medida que el hongo se va deteriorando; su pie es centrado cuando está unido al sombrero, corto y con remanentes del velo. Sus esporas blancas en masa, tetrapolares, formando cuatro esporas en el basidio (Stamets. 1983. Guarín *et al.* 2004).

Para la producción de micelio se usa aserrín grueso, salvado de arroz y carbonato de calcio (CaCO₃). Hay algunos suplementos que ayudan al crecimiento del micelio, polvo de levadura, harina de soya, leche en polvo y molasas. El crecimiento más rápido se tiene con una humedad entre 50 – 60%, tiene una baja resistencia al CO₂ (menor de 1000 mg/Kg) y un pH óptimo entre 5 y 6 (Stamets. 1983).

El shiitake crece principalmente, en climas templados como organismos individuales o en racimos sobre maderas duras en descomposición o muertas. En la naturaleza, los shiitake son hongos saprofiticos de la pudrición blanca, que degradan sustratos leñosos que contienen componentes de lignina recalcitrantes, difíciles de descomponer. Debido a esta capacidad actualmente se utilizan leños y aserrín como sustratos para cultivarlo (MushWorld. 2005).

2.1.3.1 Propiedades medicinales del shiitake. El shiitake es uno de los hongos usados en medicina mejor conocidos y caracterizados. Es una fuente de preparaciones muy estudiadas y documentadas con propiedades farmacéuticas comprobadas (tabla 3), en la medicina oriental ha sido usado para un amplio rango de problemas de salud y sus propiedades curativas han sido probadas por la medicina tradicional. Los estudios se han enfocado especialmente en el polisacárido llamado lentinan, el micelio del hongo (LEM) y los extractos de medios de cultivos líquidos (LAP y KS-2) (Wasser, S.P. 2005). En la tabla 4 se muestran los principales compuestos medicinales de *Lentinula edodes*.

Se consiguen en el mercado preparaciones en forma de tabletas, cápsulas o elixires que son ampliamente comercializados en países orientales y cuyo consumo se ha incrementado en USA y Europa en mercados de alimentos o medicinas orgánicas (Wasser, S.P. 2005)

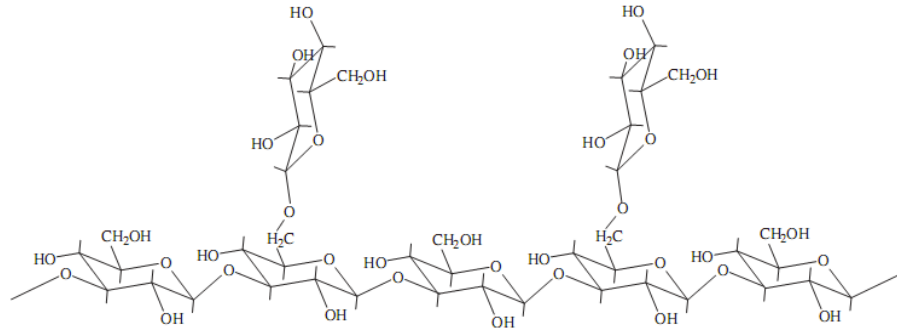
Tabla 4. Principales compuestos medicinales del Shiitake (*Lentinula edodes*)

Compuesto Activo	Tipo de Compuesto	Propiedad
Eritadenina	Derivado de adenosina	Hipolipidémico
C-1-2	Polisacárido	Inmunoactivo
Lectina	Proteína	Inmunoactivo
Lentinan	Polisacárido	Inmunoactivo, anticancerígeno, antiviral, antibacterial
Emitanina	Polisacárido	Inmunoactivo
EP3	Lignina	Antiviral, inmunoactivo
KS-2, KS-2-B	Péptido	Antiviral, inmunoactivo, antibacterial
-----	Poliribonucleótidos	Inmunoactivos
Ac2p	Polisacárido	Antiviral
FBP	Proteína	Antiviral
Tioprolina (TCA)	Aminoácidos	Eliminador de nitritos
Ergosterol	Esterol	Anticancerígeno

Fuente: Rendón *et al.* 2004

Lentinan: es un polisacárido (27,5kDa) β -1,3 glucano con ramificaciones de glucopiranósidos β -1,6 y β -1,3 y de estructura triple hélice (figura 10). Es soluble en agua producido en la pared celular del hongo, puede ser extraído del micelio y el carpóforo. En Japón, es una medicina anti cancerígena aceptada (Chang *et al.* 2004), que estimula la secreción de citocinas por células T y que incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos y células NK en presencia de interleuquina 2. Además, se conoce que inhibe el crecimiento de las especies *Physalospora priricola*, *Botrytis cinérea* y *Mycosphaerella arachidicola*, la actividad de la HIV-1 transcriptasa reversa (enzima que utiliza el virus de la inmunodeficiencia humana) y la proliferación de células de leucemia. Algunos autores han demostrado que normaliza parcialmente la caquexia inducida por factor de necrosis tumoral (TNF- α), que inhibe la infección (*in vitro*) célula a célula de los virus VIH 1 y VIH 2 y que aumenta la resistencia del organismo a infecciones bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias (Rendón *et al.* 2004).

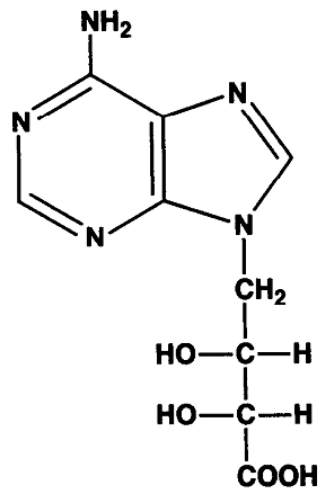
Figura 10. Estructura repetida del lentinan



Fuente: Zhang *et al.* 2010

Eritadenina: es un derivado acíclico de adenosina y un hipolipidémico que disminuye la tasa de colesterol, fosfolípidos y moléculas derivadas del fofatil colina en el plasma sanguíneo entre un 5% a un 10% (Rendón *et al.* 2004), una representación está en la figura 11.

Figura 11. Estructura de la eritadenina

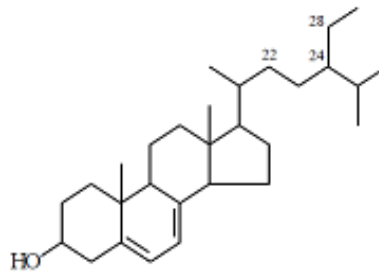


Fuente: Sugiyama *et al.* 1995

Inductor de interferón γ : es usado en el tratamiento contra el cáncer, como antiviral y anti inflamatorio. Se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de la hepatitis B y C y el SIDA (Rendón *et al.* 2004).

Ergosterol: es un precursor de la vitamina D, necesario para la absorción de calcio y potasio y eficaz en el tratamiento de cáncer de colon (figura 12).

Figura 12. Estructura del ergosterol



Fuente: Nieto, 2010

Ácido linoléico: es un precursor de la prostanglandina, eficaz en el tratamiento de problemas de erección masculina.

Quitina: Disminuye las concentraciones de colesterol en el plasma sanguíneo.

Equipo enzimático: se encuentra la súper-óxido dismutasa, que disminuye la peroxidación de lípidos (tratamiento anticancerígeno); la asparginasa, eficaz en el tratamiento de la leucemia infantil; la manganeso peroxidasa y la lacasa peroxidasa. Otras enzimas como las fenol oxidasas, celulasas y xilanasas.

Otros constituyentes: también se encuentran el LC11, un β -1-6-D-glucano con ramificaciones en la posición 1-4; peptidomanano KS2, monoglicéridos y ácidos

libres, fosfolípidos como el fosfatidil etanolamina y la cardiolipina y cerebrósidos, éstos últimos constituyentes de las neuronas, espermatozoides, leucocitos y hematíes y de gran ayuda en la lucha contra el mal de Fabry (Rendón *et al.* 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de hongos en América inició en México central en 1933, por medio de una tecnología simple, seguido por Argentina (1941), Colombia (1950), Brasil (1951), Chile (1959), Guatemala (1960), Perú (1967), Venezuela (1968), Costa Rica (1969) y Bolivia (1989) (Torres. 2003).

En nuestro país, el mismo impulsor del cultivo de champiñón en Bogotá, el señor Alfredo Beck, introdujo el cultivo de Shiitake, principalmente en forma vegetativa, sobre grano de cereal esterilizado, con el propósito de producir micofarina.

Posteriormente, se introdujeron al país cepas de *Pleurotus ostreatus* y otras especies que en la actualidad se están intentando comercializar de manera lenta (Beltrán *et al.* 2006); sin embargo, el cultivo de estos hongos podría ser más fácil que el de otras especies, ya que para el cultivo de éstas no se necesita hacer un compostaje previo, y se puede utilizar una gran variedad de sustratos que pueden ser desechos de otras industrias o desechos agrícolas para hacer los bloques sintéticos.

Al ser cultivos que apenas están incursionando en el país, no existe tecnología, ni conocimiento disponible para los posibles cultivadores, además, la bibliografía disponible se encuentra en el idioma inglés, lenguaje que los agricultores y la mayoría de la población colombiana desconoce. Sólo se conoce de un par de trabajos realizados por instituciones reconocidas a nivel nacional, el de Saldarriaga (Universidad de Antioquia, 2001) que trata sobre la producción de hongos comestibles, en el aspecto de aislamiento de esporas y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y el del propio CENICAFÉ (Centro Nacional de Investigaciones del Café) sobre el aprovechamiento de residuos de la industria cafetera para la producción de setas del género *Pleurotus* (MushWorld. 2004). Sin embargo, ninguna de estas instituciones ha estudiado con detenimiento distintas metodologías claras y sencillas para el aislamiento de micelio a partir de los carpóforos, ni tampoco han estudiado a *Lentinula edodes* (shiitake). El resto de los trabajos realizados en el país, tratan diferentes temas y metodologías diferentes a la de producción tradicional de setas comestibles, como lo son

fermentaciones líquidas para el aislamiento o mayor producción de metabolitos secundarios de hongos, realizadas en la Universidad de Antioquia y en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; reconocimiento de cepas autóctonas, por parte de la Universidad Tecnológica del Choco, entre otras.

Otro de los problemas para la producción de este tipo de hongos es que son cepas foráneas, traídas del Asia, por lo cual la semilla es costosa y de difícil adquisición. Con esto, los costos de producción se incrementan convirtiéndolos en productos inviables para la economía de quienes desean incursionar en este mercado y hace que la creación de este tipo de empresas sea muy reducido, por no decir nulo; además, este tipo de empresas ayudan a la generación de empleo y pueden generar proyectos productivos para tipos de población de bajos recursos y con exclusión social (Arias *et al.* 2008).

Al aumentar el número de este tipo de empresas, el consumo per capita de este tipo de alimentos se incrementaría; en la actualidad el consumo de setas alcanza los 120 gramos por año en nuestro país (La República. 2010), un promedio muy por debajo de países como Japón (4, 84 Kg por año) y la Unión Europea (3,16 Kg por año) (Díaz *et al.* 2001).

La disponibilidad del producto y un precio más accesible, harían que los hongos comestibles como las orellanas y el shiitake, fueran productos reemplazantes de alimentos de primera necesidad como algunas legumbres y la carne de res, que en la actualidad tienen precios bastante elevados; así mismo, son una buena fuente de proteína a bajo costo, la cual puede mejorar la ingesta en la población vulnerable de nuestro país con bajos ingresos; además de hacer aportes para la salud con el suministro de vitaminas, minerales y diferentes compuestos que inducen una mejora en la respuesta inmune (Mattila, Suonpää. 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos bajos en proteínas y otros componentes nutricionales como vitaminas, minerales, calcio, sodio y demás por parte de la población colombiana ha venido decreciendo con el tiempo debido a los costos elevados de los productos con éste tipo de componentes nutricionales. La ingesta de hongos no es una práctica común y extensiva de nuestro país, se da solamente en tipos de población de clase alta que tienen un poder adquisitivo mayor; además es muy poco el conocimiento que tiene la población en general sobre los beneficios del consumo de hongos, se cree que simplemente sirven como aderezo de comidas en general, gracias a su delicioso sabor característico.

Con este proyecto, se busca desarrollar tecnología para que la producción de este tipo de alimentos sea accesible a cualquier público y poder llegar a suministrar una proteína de bajo costo al tener semillas para la producción de buena calidad y viabilidad. Al desarrollar este tipo de cultivos, se genera un impacto en la generación de empleo y la calidad de vida de muchas personas debido a la generación de industria, un problema que aqueja a la población colombiana.

Por otro lado, se podría incentivar el cultivo de éste tipo de hongos para usos medicinales, el beneficio de los hongos no se da solamente por la ingesta directa de éste, sino que porían ser procesados de maneras diferentes para aislar los componentes, ya conocidos, que tienen actividades benéficas para la salud. Esto podría inquietar a compañías farmacéuticas para la compra de los carpóforos y de esta manera hacer más accesible estos componentes benéficos a la población.

El desarrollo de la técnica permitirá obtener y mantener cepas autóctonas, medicinales y comestibles, cuyo estudio no ha sido desarrollado ampliamente en el país. Además se permitirá el estudio de sustratos viables y económicos como lo son los subproductos de la actividad agrícola en el país, que se han convertido en un problema ambiental ya que son utilizados para otros propósitos y simplemente son depositados en lotes valdíos o quemados, lo que produce contaminación; y finalmente, que con el auge de éste tipo de empresas, Colombia se convierta en un productor líder y competitivo en Latinoamérica de hongos comestibles, además,

éstos productos alimenticios son muy bien pagos debido a las exenciones arancelarias que gozan en la Unión Europea y Estados Unidos (Díaz *et al.* 2001), lo que permitiría que las ganancias sean mayores en los productores y exportadores, lo que repercutiría en la economía y la calidad de vida de la población del país.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica in vitro reproducible, manejable, fácil y económica para el aislamiento del micelio de hongos comestibles, Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) y Shiitake (*Lentinula edodes*), a partir de sus cuerpos fructíferos para la producción de semilla.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Valorar las técnicas de aislamiento de micelio a partir de los cuerpos fructíferos

Aislar micelio procedente de cuerpos fructíferos de los hongos objeto de estudio en medios de cultivo comerciales específicos

Evaluar el crecimiento micelial de las diferentes especies de hongos en tres tipos de medio de cultivo sólido

6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El proyecto de investigación se basó en un modelo experimental comparativo, que buscó encontrar la mejor técnica para aislar el hongo a partir de sus carpóforos (cuerpos fructíferos).

Se desarrolló una revisión bibliográfica para adquirir mayor conocimiento sobre el cultivo de hongos comestibles, en especial de las especies en estudio y determinar cuáles técnicas se han desarrollado para el aislamiento, conservación, producción de micelio, producción de semilla y fructificación de los hongos. Además se buscaron reportes que indiquen el estado del arte de este tipo de técnicas, especialmente de laboratorio, en el país.

Los cuerpos fructíferos maduros y no esporulados se obtuvieron de un proveedor local. Se determinó con este proveedor el estado de maduración, tamaño y fechas destinadas para el análisis y desarrollo del proyecto, para esto, se hizo un cronograma de siembras que permitieron la obtención de carpóforos de primera o segunda oleada (cosecha) ya que hay menos peligro de contaminación y las cepas no han tenido el tiempo de perder sus propiedades características, como ocurre cuando los cultivos son muy viejos (Stamets, P. 1983).

Se hicieron evaluaciones preliminares de varias metodologías para la obtención de micelio a partir de los cuerpos fructíferos utilizando trozos, hifas (con cámaras húmedas, cámaras secas, nevera) y esporas del hongo, aisladas en agar-agar, agua y tomadas del carpóforo por siembra por contacto (Scrase. 1995) o papel (Saldarriaga, 2001). El micelio (en cuadrados de agar de aproximadamente 16mm^2) se sembró en la superficie del agar (siembra central); las esporas aisladas por papel y agua se sembraron en superficie y en fondo, tomando 1cm^2 del papel o 1 mL del agua y realizando diluciones seriadas o esparciendo las esporas en la superficie del medio. A partir de estos resultados, se eligieron las metodologías con mejor crecimiento y menor contaminación, para posteriormente, con cultivos puros, valorar el crecimiento en diferentes medios de cultivo.

Los medios de cultivo específicos para evaluar el crecimiento del micelio fueron: PDA (Agar Papa Dextrosa) Oxoid®, OGY (Oxytetraciclina, Extracto de Levadura y Glucosa) Oxoid® y Sabouraud Difco®. Se tomaron trozos de 4x4 mm de los cultivos puros y se sembraron en la superficie de cada uno de los agares. Los medios inoculados fueron incubados a 25°C durante el tiempo que empleó el hongo en colonizar toda la caja de 9 cm (Villegas *et al.* 2007), se evaluó el crecimiento del hongo por su avance radial en la caja, con mediciones cada 48 horas con un calibrador (Mitutoyo®).

Como prueba de confirmación de la viabilidad del micelio que se obtuvo, se hicieron inoculaciones en diferentes tipos de cereales (maíz amarillo, cebada, trigo, millo y sorgo) para producir semilla, se evaluó cualitativamente el crecimiento en el sustrato de acuerdo a la rapidez de invasión de la semilla y la densidad de micelio producido.

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó un arreglo de 3 x 3, con bloques al azar, con tres tipos de aislamiento y en tres tipos de medios de cultivo; se hicieron 5 repeticiones por tratamiento (135 muestras analizadas), de manera que se pudieron evaluar las diferencias entre tratamientos y tipos de aislamiento mediante un análisis de varianza (ANOVA) y realizando la prueba de Fischer con el fin encontrar diferencias significativas (5%).

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Para las formas de aislamiento,

H₀: No hay diferencias significativas entre las técnicas empleadas para el aislamiento del hongo.

Para los medios de cultivo,

H_0 : No hay diferencias significativas en el crecimiento del hongo, para los medios de cultivo utilizados.

El análisis de los datos se llevó a cabo empleando el software el SPSS 17® para Windows ®.

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LAS METODOLOGÍAS

Como se detalló en el Marco Teórico, los carpóforos son una parte muy importante para la reproducción de los hongos, para un aislamiento *in vitro*, se busca aislar el micelio a partir de las mismas hifas del carpóforo o las esporas producidas producto de la reproducción sexual del macromiceto; por esto, se evaluaron varias metodologías para el aislamiento del micelio a partir de los cuerpos fructíferos para determinar cuál o cuáles de ellas cumplían dos características importantes para el aislamiento exitoso del micelio; la primera, la mínima contaminación presente en las cajas sembradas y la segunda, la rapidez de crecimiento del micelio *in vitro* en el agar.

Para realizar los aislamientos, se empleó sólo un tipo de agar para que no hubieran diferencias en los resultados debido a las diferencias del agar, el medio de cultivo empleado fue PDA (Oxoid®).

A partir del propio cuerpo fructífero se evaluaron varias metodologías, la primera, tomar trozos grandes de carpóforo y sembrarlos directamente al agar; la segunda tomar pequeños trozos del carpóforo que fueron desinfectados y luego sembrados en cajas de agar; la tercera, llevar el carpóforo a una cámara húmeda, y después de incubada, se tomaron asadas del micelio que se produjo sobre la superficie del carpóforo y fueron llevados a cajas de agar (las metodologías se ampliarán más adelante, en el ítem correspondiente); también se evaluó esta misma técnica en cámara seca y nevera, sin embargo, en la cámara seca no se obtuvo micelio y en nevera, aunque se produjo micelio, el índice de contaminación fue muy alto y no permitió un aislamiento sencillo y con pocos pasos, como se espera en un aislamiento microbiológico.

Para las esporas producidas en el carpóforo se evaluaron varias metodologías, la primera, descrita por Saldarriaga (2001) en papel; la segunda, el aislamiento de las esporas en agua estéril, poniendo el carpóforo en una bolsa estéril con agua

destilada durante 24 horas para que las esporas liberadas sean atrapadas por el agua y luego con diluciones, se sembraron en fondo y en superficie en el agar; y la tercera el aislamiento de las esporas en agar-agar, poniendo el carpóforo en una cámara húmeda la cual en el fondo tiene placas microscópicas cubiertas con agar-agar que capturen las esporas liberadas y luego de 24 horas de incubación a 22°C +/- 2°C el agar de las placas microscópicas es cortado en pequeños cuadros de 4x4mm y puestos por siembra central en las placas de agar. La técnica de aislamiento por agua resultó ser la menos indicada para el aislamiento, ya que el índice de contaminación es de casi del 100% y obtener un micelio puro en estas condiciones resulta muy engorrosos y se necesitaría de muchos pases lo que provoca un cambio genético en la cepa y por consiguiente una posible disminución en la calidad en la cepa.

7.2 DESCRIPCIÓN DE LAS METODLOGÍAS EMPLEADAS PARA EL AISLAMIENTO DEL MICELIO

Después de haber realizado la evaluación preliminar de las metodologías a estandarizar, se tomaron cuatro de ellas para posteriormente estudiarlas en detalle para que puedan ser reproducidas fácilmente. Se incluyeron dos metodologías de aislamiento a partir de las hifas que componen el carpóforo y dos metodologías de aislamiento a partir de las esporas.

7.2.1 Aislamiento del micelio a partir de trozos de carpóforo con desinfección. Debido a que la evaluación preliminar dio como resultado que el trozo del cuerpo fructífero es fuente de una amplia contaminación por bacterias, levaduras y mohos, se planteó una metodología que empleara la desinfección del carpóforo sin que fuera letal para las hifas, para esto también se pensó que para una mejor desinfección, los trozos debían tener una menor área para que la exposición a los desinfectantes fuera mayor. Se tomó el sombrero y se cortaron con un escalpelo estéril y en un ambiente estéril, pequeños cuadrados de 4mm de lado. Los trozos se dispusieron en una cada de Petri estéril y se desinfectaron así: tres lavados con hipoclorito de sodio al 3%, por un minuto con un enjuague entre cada lavado con agua destilada estéril un minuto, posteriormente, se hizo un lavado con alcohol al 70% por un minuto con su posterior lavado con agua destilada estéril por otro minuto.

Luego de tener los trozos desinfectados, se sembraron en superficie en agar PDA, cinco o seis trozos fueron puestos de forma radial en las placas con una

separación tal que las hifas tuvieran suficiente espacio para crecer (figura 13). Las placas fueron incubadas a 22°C +/-2°C, por 5 días o hasta que las placas fueran cubiertas completamente por el micelio. El agar fue cortado con un escalpelo estéril en trozos de agar de 4mm de lado y trasferidos a placas de los agares evaluados (PDA, OGY y Sabouraud), sembrados en forma central. Las cajas fueron incubadas a 22°C +/-2°C hasta que las cajas fueran cubiertas completamente por el micelio (aproximadamente una semana para los dos primeros medios), para posteriormente usar este micelio para la producción de semilla o “spawn”. La figura 14 muestra el diagrama general de ésta metodología.

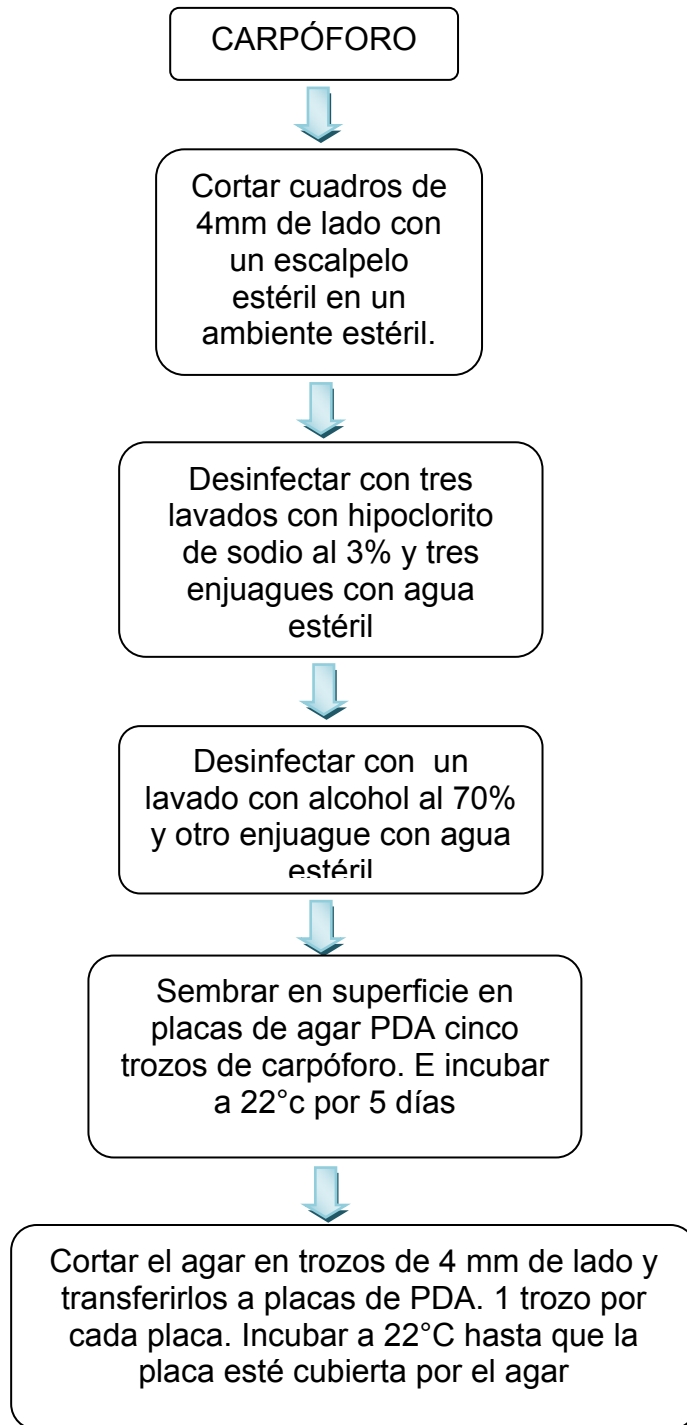
Figura 13. Crecimiento del micelio de los trozos de carpóforos de *Pleurotus ostreatus* desinfectados



Fuente: La autora. 2010

7.2.2 Aislamiento de micelio a partir de carpóforo con cámara húmeda. Se tomaron carpóforos maduros sin esporular y se llevaron un vaso de precipitados, en cuyo interior tenía papel filtro, agua destilada en el fondo y tapa de papel aluminio (figura 15), estériles y se incubó por 48 a 22°C +/-2°C. Después de la incubación, se observó la presencia de micelio sobre la superficie del cuerpo fructífero (figura 16) y se procede a realizar un repique de éste micelio sobre la superficie de las placas de Petri. Las cajas fueron incubadas nuevamente a 22°C +/-2°C hasta que el micelio cubrió la superficie del agar (aproximadamente una semana). El micelio obtenido fue utilizado para la preparación de la semilla.

Figura 14. Diagrama general de la metodología de aislamiento de micelio a partir de carpóforo con desinfección



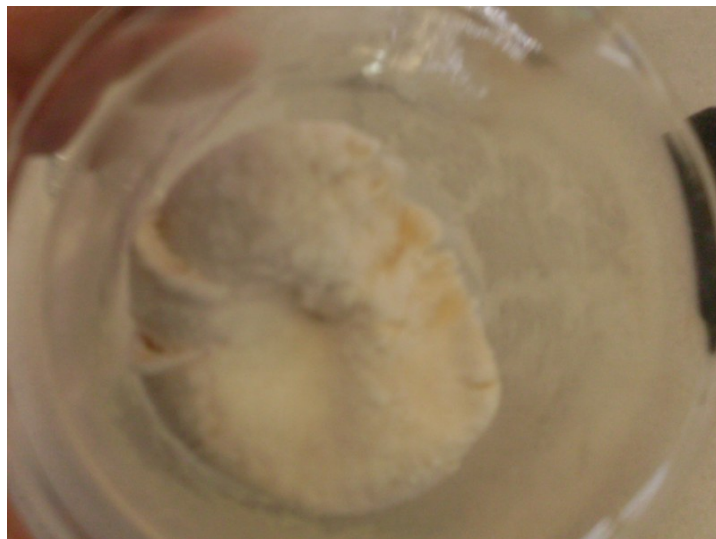
Fuente: La autora. 2010

Figura 15. Cámara húmeda para el aislamiento del micelio a partir del carpóforo



Fuente: La autora. 2010

Figura 16. Presencia de micelio en el carpóforo después de la incubación en cámara húmeda



Fuente: La autora. 2010

7.2.3 Aislamiento de micelio a partir de esporada tomada en papel. La metodología se llevó a cabo como se describe en Saldarriaga (2001). Se tomaron carpóforos maduros sin esporular y, tomando una cartulina estéril (220°C por tres horas) se dispusieron sobre ella sin el estípite. Los hongos se dejaron en un ambiente estéril a temperatura ambiente (17 – 22°C) de una noche para otra. Al día siguiente, se observa la esporada (figura 19) y se corta un cuadrado de 1cm² y se llevó a 10ml de agua peptonada (1%) estéril, se dejó allí por 3 horas y se realizaron diluciones seriadas. De cada dilución se sembró 1ml en fondo con agar OGY para evitar la contaminación con bacterias. Las placas se incubaron a 22°C +/-2°C hasta que se pudieran distinguir con claridad las colonias del hongo en el agar, aproximadamente 10 días (figura 17). Luego de esto, el agar es cortado en cuadros de 4mm de lado para ser sembrados en superficie en el agar y obtener así, micelio abundante para la producción de semilla. Se realizó un ensayo con siembra en superficie en agar PDA para disminuir el tiempo de germinación de las esporas, sin embargo, se obtuvo un menor índice de contaminación en la siembra en fondo que en la siembra en superficie.

Figura 17. Germinación de las esporas sembradas en fondo después de 12 días



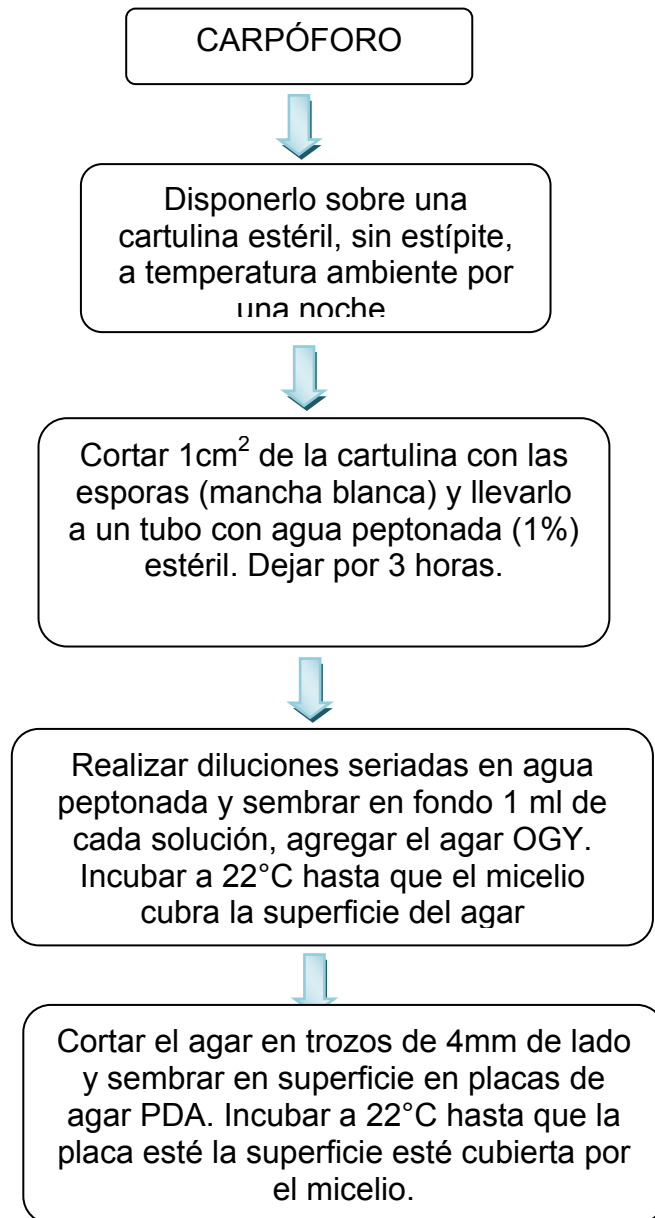
Fuente: La autora. 2010

7.2.4 Aislamiento de micelio a partir de esporas atrapadas en agar. Se toma un carpóforo maduro y sin esporular y se introduce en una cámara húmeda (como

la descrita en el párrafo 7.2.2), sin embargo en el fondo se dispuso un soporte para un portaobjetos que está cubierto con agar-agar estéril. El carpóforo se pega con vaselina a la tapa de aluminio y se incuba a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Después de ese tiempo se saca el carpóforo de la cámara y el portaobjetos cubierto por el agar. Se corta el agar en trozos de 4mm de lado y se siembra en superficie en PDA, se incuba por 8 días a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y luego, este nuevo agar es cortado nuevamente y transferido a PDA e incubado a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que el micelio cubra nuevamente la superficie del agar.

De cada cultivo puro de cada género se realizó un cultivo madre (R1) para desarrollar posteriores cultivos para la producción de micelio y semilla y lógicamente, la preservación de la cepa.

Figura 18. Diagrama de la metodología de aislamiento de micelio a partir de esporas atrapadas en papel



Fuente: La autora. 2010

7.3 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SINTÉTICOS PARA EL AISLAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE MICELIO

Después de tener micelio completamente puro, se procedió a la evaluación de los diferentes medios de cultivos para determinar cuál de ellos es mejor para el aislamiento y producción de micelio. Los medios de cultivo fueron reconstituidos de acuerdo al fabricante y esterilizados a 121°C por 15 minutos; después fueron servidos en cajas de Petri de vidrio y se dejaron solidificar. Se cortaron trozos de agar con micelio de 4mm de lado y se sembraron centralmente para poder medir el radio de crecimiento del micelio en el tiempo. Las cajas se incubaron a 22°C +/- 2°C hasta que el micelio cubriera toda la superficie del agar. El radio de crecimiento fue medido con un calibrador (Mitutoyo®) cada dos días y reportado en milímetros. Se realizaron 5 réplicas para cada medio de cultivo y especie de hongo. Los promedios de los resultados de crecimiento del micelio de acuerdo a la cepa y al agar se presentan en la tabla 5.

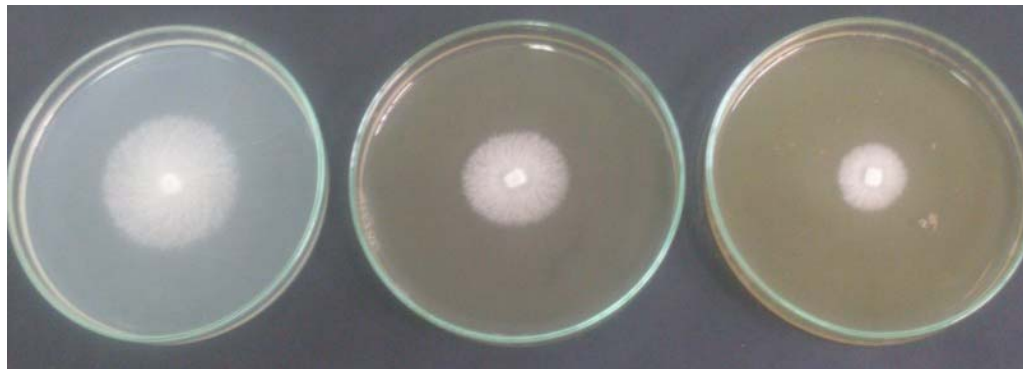
Tabla 5. Promedio del crecimiento (mm) de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* en diferentes tipos de medio de cultivo

		DIA 2	DIA 4	DIA 6	DIA 8	DIA 10	DIA 12	DIA 14
<i>L. edodes</i>	PDA	3	11,8	31	44,4			
	OGY	0,4	10,8	17,2	25,6	38,8	45	
	SABOURAUD	0,3	7	13,4	19,2	29,6	39,6	
<i>P. pulmonarius</i>	PDA	3	10,4	36,8	45			
	OGY	3	11,6	20,6	31,6	45		
	SABOURAUD	1,2	6,2	11,2	17,8	27,2		
<i>P. ostreatus</i>	PDA	2,6	7,2	23,4	37,4	45		
	OGY	2,8	14,2	23,6	34,4	41,6	45	
	SABOURAUD	1,2	4,6	7,6	11,8	16,6	24,8	33,8

Fuente: La autora. 2010

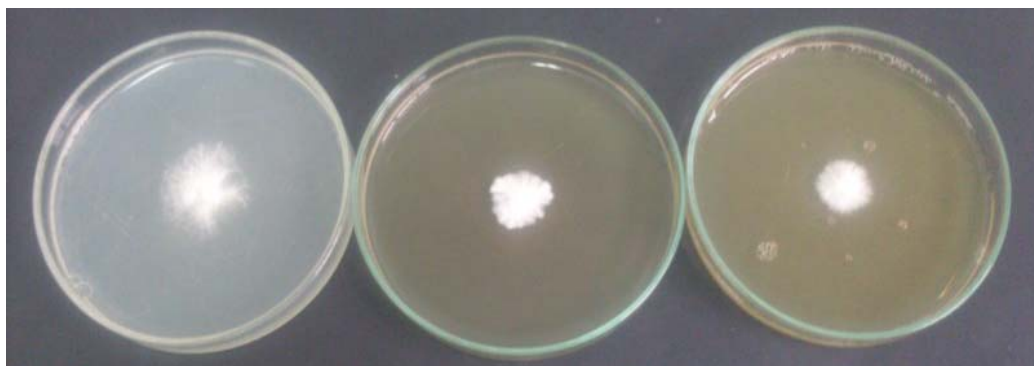
Para todas las cepas, se observa que el medio de cultivo que fue más rápidamente invadido fue PDA, *Lentinula edodes* y *Pleurotus pulmonarius* fueron las cepas que tuvieron un crecimiento más rápido en este medio, invadieron la caja en 8 días, mientras que *Pleurotus ostreatus* tuvo un crecimiento más lento en este tipo de agar. El segundo medio de cultivo más rápido fue OGY, mientras que Sabouraud tuvo un pobre crecimiento, a tal punto que el crecimiento micelial se detuvo en un momento determinado. Las figuras 19, 20 y 21 muestran el crecimiento micelial de las cepas en los tres medios de cultivo a los 4 días.

Figura 19. Crecimiento de *Lentinula edodes* en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días



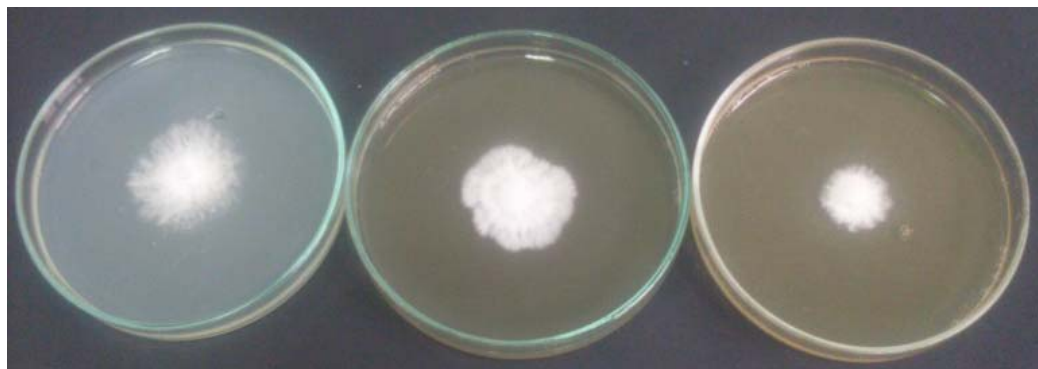
Fuente: La autora. 2010

Figura 20. Crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días



Fuente: La autora. 2010

Figura 21. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en los medios PDA, OGY y Sabouraud a los 4 días



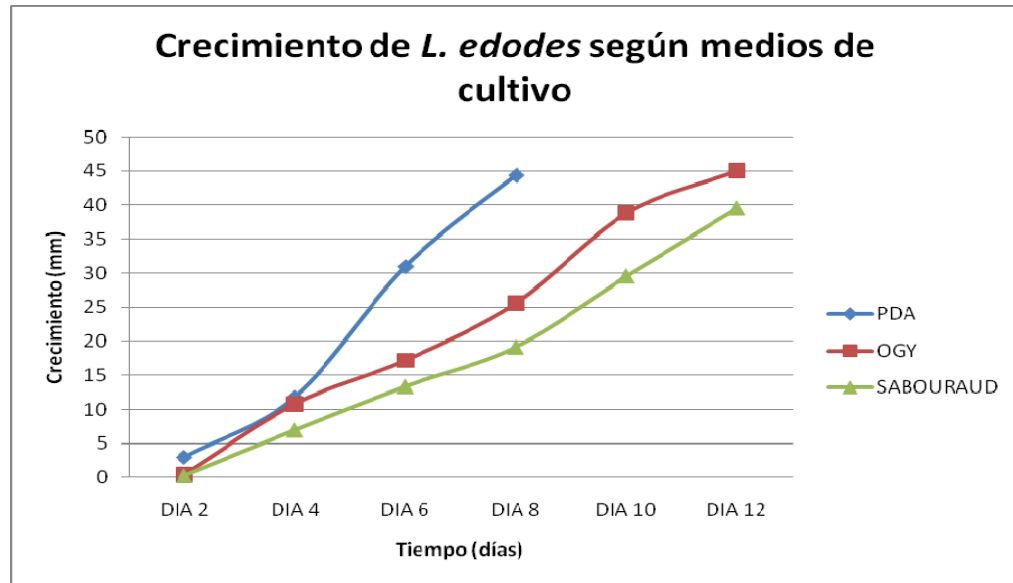
Fuente: La autora. 2010

Al realizar un análisis cualitativo de los resultados se puede observar que hay diferencias entre los medios y las cepas empleadas, cada cepa tiene un comportamiento diferente entre los diferentes medios de cultivos y como era de suponerse, el comportamiento de cada cepa es diferente comparado con otra. Esto se corrobora con el análisis estadístico de los datos, la prueba de Fischer nos indica que con un porcentaje de confianza del 95% ($p=0,05$) se evidencia que hay diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivos y diferencias entre las cepas empleadas, el Anexo 2 muestra en detalle el análisis de varianza (ANOVA) que se empleó en el análisis estadístico.

7.4 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* Y *Pleurotus pulmonarius* EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS

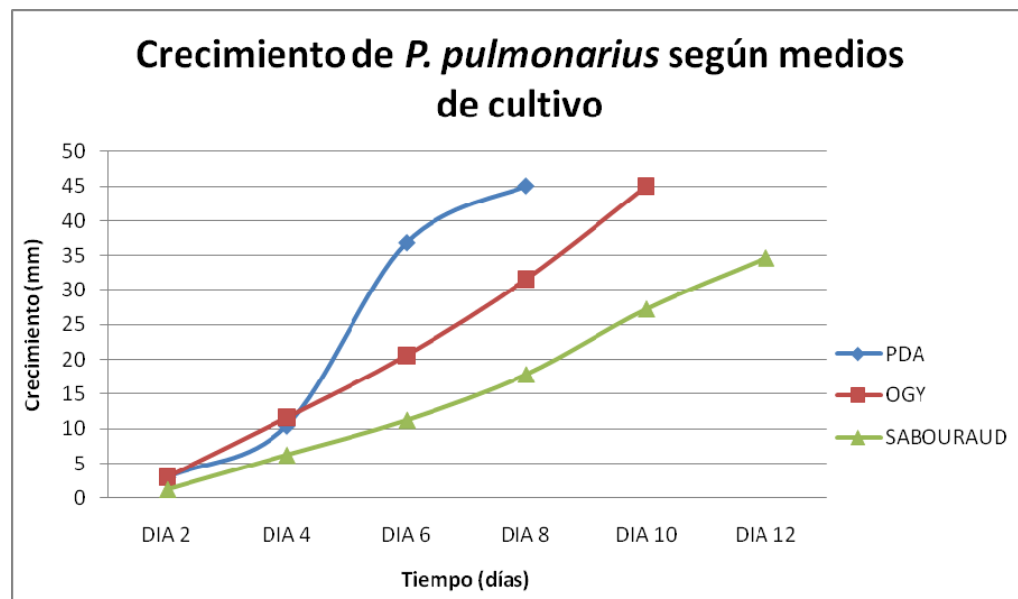
Con los datos obtenidos del crecimiento, se determinó hallar la velocidad de crecimiento de las diferentes especies de hongos en los diferentes tipos de agar. Como primera medida se graficaron los datos obtenidos, representados en la tabla 5. Las figuras 22, 23 y 24, representan el crecimiento de los diferentes hongos en los medios de cultivo sintéticos evaluados.

Figura 22. Crecimiento *Lentinula edodes* según los medios de cultivo evaluados



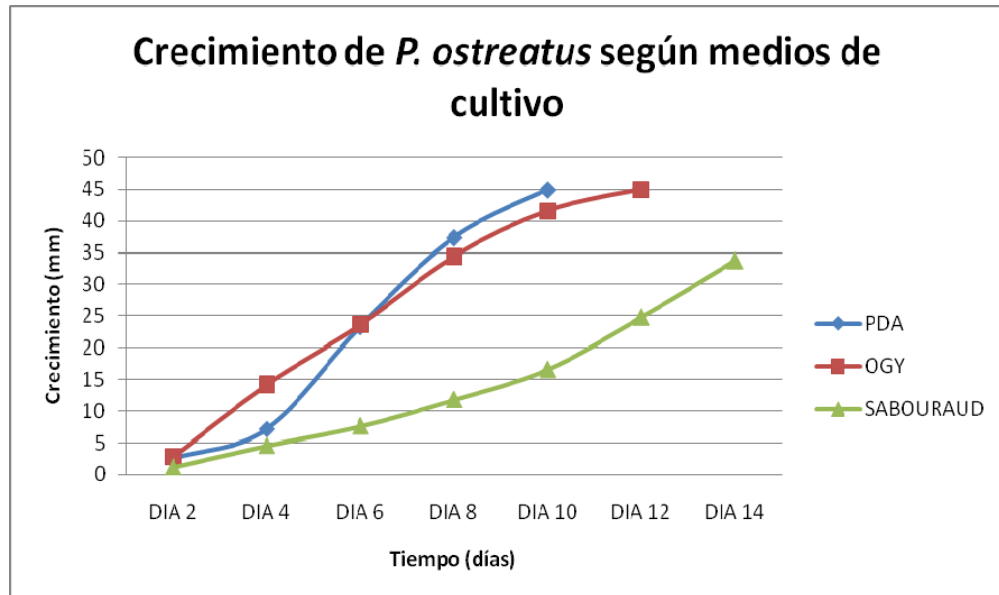
Fuente: La autora. 2010

Figura 23. Crecimiento *Pleurotus pulmonarius* según los medios de cultivo evaluados



Fuente: La autora. 2010

Figura 24. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* según los medios de cultivo evaluados



Fuente: La autora. 2010

Las gráficas nos muestran que el crecimiento en PDA fue más rápido para todas las cepas el segundo mejor medio fue OGY y por último Sabouraud. El tipo de crecimiento filamentosos o algodonosos indica cualitativamente la producción de biomasa de las cepas, sin embargo, para determinar cuantitativamente dicha producción se procedió a realizar diferentes cálculos matemáticos en base a la ecuación logística de Verhulst-Pearl (1), originalmente desarrollada para el crecimiento de una población (Viniestra-González *et al.* 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left(1 - \frac{X}{X_M} \right) \quad (1)$$

Donde X es la densidad de biomasa (g por l, por cm² o por kg), μ_M la tasa máxima de crecimiento específico, (h⁻¹, día⁻¹) y X_M, el nivel de equilibrio para X donde, dX/dt=0 para X >0. La solución de la ecuación se da en la ecuación 2.

$$X(t) = \frac{X_M}{1 - ((X_M - X_0)/X_0)e^{-\mu_M t}} \quad (2)$$

Donde X_0 es la condición inicial de X . Esta ecuación asume que los cultivos microbianos están prácticamente saturados por el sustrato y por consiguiente, la rata de crecimiento específico no es una función de la concentración del sustrato (Viniegra-González *et al.* 2003).

Tomando la ecuación 2, se halla μ_M para cada uno de los medios de cultivos y las cepas para cada uno de los días de experimentación (Anexo 3), luego, estos μ específicos son graficados nuevamente contra el tiempo y se toma la línea de tendencia lineal para cada curva para poder obtener una linealización de los datos. Con esta línea de tendencia se calcularon nuevamente los radios (teóricos) de crecimiento y se graficaron. Se adicionó una línea de tendencia exponencial para obtener la ecuación típica de crecimiento microbiano (3) (Anexo 4). La tabla 6 muestra las ecuaciones obtenidas con los datos experimentales y ajustadas a las ecuaciones 1 y 2.

$$Y = Ae^{kt} \quad (3)$$

Tabla 6. Ecuaciones de crecimiento obtenidas del tratamiento matemático de los datos arrojados por la experimentación

Hongo	Medio	PDA	R ²	OGY	R ²	Sabouraud	R ²
<i>Lentinula edodes</i>		Y= 0,9879e ^{0,8051x}	0,9796	Y= 1,3985e ^{0,5456x}	0,918	Y= 1,2616e ^{0,5332x}	0,9607
<i>Pleurotus pulmonarius</i>		Y= 0,9659e ^{0,817x}	0,9678	Y= 1,4258e ^{0,6145x}	0,9557	Y= 1,4339e ^{0,4896x}	0,9738
<i>Pleurotus ostreatus</i>		Y= 1,233e ^{0,648x}	0,9621	Y= 1,9369e ^{0,5136x}	0,8829	Y= 1,5982e ^{0,3982x}	0,9856

Fuente: La autora. 2010

La tabla 7 muestra los μ específicos para cada una de las cepas y para cada uno de los medios de cultivos evaluados.

Tabla 7. Rata de crecimiento específico (μ , día⁻¹) para cada una de los medios de cultivo y cada uno de los hongos evaluados

Hongo \ Medio	PDA	OGY	Sabouraud
<i>Lentinula edodes</i>	0,8051	0,5456	0,5332
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,817	0,6145	0,4896
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,648	0,5136	0,3982

Fuente: La autora. 2010

7.5 EVALUACIÓN DE LOS GRANOS DE CEREAL PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA

Después de tener el micelio puro en las cajas de Petri, los granos de cereal son evaluados. El procedimiento para producir la semilla, es descrito por Saldarriaga (2001). Se toman los granos de cereal y se lavan con abundante agua, eliminando los granos infectados o rotos, además de los desechos vegetales que quedan después de la recolección de los cereales (ramas, hojas, tallos, etc). Se dejan en agua por una noche para que los granos se hidraten y luego, son escurridos. Es adicionado un 1% (en base húmeda) de carbonato de calcio a los granos de cereal y posteriormente, son esterilizados a 121°C y 15 lb de presión por una hora, debe cumplirse el tiempo de esterilización ya que si esto no se da, el porcentaje de contaminación (por mohos, especialmente *Trichoderma spp*) se incrementa. Se midió el porcentaje de humedad y el pH de los granos después de la esterilización. El promedio de pH fue de 5,96 y el de humedad 46,3%.

Después de que los frascos con los granos están a temperatura ambiente, son inoculados; se toman cuadrados de agar de 1 cm de lado y se distribuyen en el frasco que contiene los granos, entre 3 y 4 cuadrados de agar son suficientes para

que haya una rápida y efectiva infección de los granos (figura 25). Se incubaron en oscuridad a 22°C +/-2°C por el tiempo que fuera necesario hasta que se observara una infección completa de los granos, a la semana de incubación, los frascos fueron agitados para que hubiera una distribución homogénea del micelio y de humedad.

Figura 25. Frasco de granos de maíz amarillo recién inoculado con el hongo



Fuente: La autora. 2010

El crecimiento del micelio fue medido cualitativamente en el tiempo, se observaba la distribución y abundancia de micelio en los granos de cereal. Se determinó el final de la incubación cuando el frasco tenía un color blanco debido al crecimiento abundante del micelio. Las figuras 26 y 27 muestran las diferencias en el crecimiento del micelio en dos tipos diferentes de cereal en el mismo tiempo de incubación (2 semanas).

Figura 26. Crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en trigo



Fuente: La autora. 2010

Figura 27. Crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en millo



Fuente: La autora. 2010

Según los resultados obtenidos se puede concluir que el trigo es el mejor cereal para la producción de semilla (spawn) en todos los géneros de hongos. Se dio una rápida y homogénea infección de los granos. En dos semanas, los frascos fueron completamente infectados y el micelio era denso. La cebada fue el segundo mejor cereal, aunque el crecimiento fue mucho más lento que para el trigo (3 semanas), se dio de manera uniforme en los granos y para las tres cepas de hongos. Hubo diferencias entre ciertos tipos de cereal, mientras que el trigo fue una excelente semilla para la producción de spawn para todas las cepas, el sorgo fue mejor para *Lentinula edodes*, que para las dos cepas de *Pleurotus*. El millo y el maíz amarillo no tuvieron una buena infección por parte del micelio de los hongos, para que se viera la infección de los granos se debió esperar más de 4 semanas y para ver una infección total del cereal se debió esperar más de 6 semanas. La tabla 8, describe el comportamiento de los diferentes granos de cereal, en cuanto a la infección del micelio de los hongos.

Tabla 8. Evaluación del crecimiento micelial en granos de cereal

	Trigo	Sorgo	Cebada	Millo	Maíz amarillo
<i>P. ostreatus</i>	+++	+	++	+	+
<i>P. pulmonarius</i>	+++	+	++	+	+
<i>L. edodes</i>	+++	++	++	+	+

Escala:

+++ Alto porcentaje de infección, crecimiento rápido

++ Porcentaje de infección medio, crecimiento lento

+ Poco porcentaje de infección, crecimiento lento

Fuente: La autora. 2010

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de la investigación fue el de proponer metodologías efectivas, fáciles, económicas y reproducibles para que los productores de setas y población en general puedan desarrollar para impulsar el cultivo de este tipo de macromicetos, en este orden, se determinó que las cuatro metodologías descritas anteriormente son las más adecuadas para el aislamiento de micelio a partir de cuerpos fructíferos, para su posterior uso en la producción de semilla.

Evaluar la contaminación por parte de otros microorganismos es muy importante al realizar un protocolo de aislamiento de cualquier tipo de microorganismo, es por esto que se hizo una evaluación preliminar de métodos para descartar los que tenían un mayor índice de contaminación por parte de bacterias, levaduras y mohos. Sin embargo, para esto también se debe tener en cuenta las condiciones en las que se desarrolla el cultivo de las setas –en este caso- y sus condiciones de transporte hasta el laboratorio. Si un cultivo presenta un alto índice de contaminación es casi imposible obtener un micelio puro con un solo aislamiento o pase, es necesario hacer varios repiques para obtener finalmente la cepa pura. Al hacer las siembras de los trozos de carpóforo directamente al agar, sin ningún proceso de desinfección se observó contaminación bacteriana, levaduras, pero sobre todo, de mohos que se considerarían de tipo ambiental y otros que son contaminación del cultivo (se sabe que hay presencia de *Trichoderma sp* en el cultivo). Es por esto que se tomó la decisión de realizar la desinfección de los trozos de carpóforo para el aislamiento del micelio. Para esta desinfección es necesario que los desinfectantes tengan la concentración adecuada y que el tiempo de contacto de éstos con los trozos de los carpóforos sea el indicado, ya que un tiempo mayor implicaría la muerte de las hifas del hongo a aislar y no se lograría el objetivo principal de la técnica.

Los ambientes en los que se realicen los procedimientos son muy importantes para el éxito del aislamiento, deben ser lo más estériles y aislados posibles ya que como se sabe, la contaminación ambiental afecta el aislamiento de las cepas, ya sea porque inhibe el crecimiento de la cepa en cuestión -como sería el caso de la *Trichoderma sp* (Romero-Arenas *et al.* 2009)- y como es obvio, no se obtendría un cultivo puro para seguir el siguiente paso en la producción de las setas comestibles, la preparación de la semilla. Estos ambientes deben ser

desinfectados antes y después de cada procedimiento, además de ser (si es posible) irradiados con los UV para tratar de eliminar toda la contaminación existente. En cada procedimiento se debe contar con la presencia de uno o dos mecheros para crear un ambiente aún más estéril y que el índice de contaminación sea mínimo.

El carpóforo de los macromicetos está constituido por hifas especializadas que puedan soportar las condiciones del ambiente externo (recordemos que el micelio del hongo por lo general se encuentra dentro de la madera como en el caso de los hongos de pudrición de la madera como *Pleurotus spp* o *Lentinula edodes*, bajo el suelo, la vegetación muerta sobre el suelo, etc.), además de las hifas especializadas para la producción de las esporas (en el caso de los hongos objeto de estudio, los basidios) y éstas son liberadas al ambiente. Es por esto que se puede concluir que el aislamiento del micelio a partir del carpóforo es la metodología más sencilla. La germinación de las hifas a partir de esta parte del hongo es mucho más rápida que si se toman las esporas. En dos semanas se puede obtener micelio puro y abundante para realizar la infección de los granos de cereal para la producción de semilla, mientras que a partir de las esporas se puede tomar hasta casi cuatro semanas para obtener el mismo resultado. Esto se da por la germinación de la espора; esta estructura del hongo es muy fuerte y de resistencia que se produce cuando el hongo siente “stress” por el ambiente (mucho frío, mucho calor, poca luz, etc.) o porque los requerimientos nutricionales para el hongo han disminuido a tal punto que su ciclo de vida vegetativo (micelio) no se puede dar más. El “stress” es un mecanismo que usan los cultivadores de setas ya que las esporas de los hongos (macromicetos) sólo se producen en los carpóforos, si no hay esta tensión, el hongo permanece en su ciclo vegetativo y no produciría los carpóforos. Las esporas son liberadas y deben soportar un ambiente hostil hasta que las condiciones ambientales cambien o la espора viaje por medio del viento, insectos entre otros, y pueda encontrar un ambiente benévolo donde pueda iniciar su ciclo de germinación (que toma su tiempo) y vuelva su ciclo vegetativo. En el caso del presente trabajo, el agar es un medio perfecto para la germinación de la espора por sus condiciones de humedad, temperatura y nutricionales, sin embargo, a pesar de que los medios de cultivos son ricos en nutrientes y las condiciones ambientales son favorables, el proceso de germinación toma su tiempo hasta que la espора termina su estadio de dormancia y se activa metabólicamente para poder iniciar el ciclo vegetativo.

De las metodologías de aislamiento a partir de las esporas, la descrita por Saldarriaga (2001) es la más sencilla y económica de seguir, esto porque no es necesario ensamblar la cámara húmeda que se describe en este trabajo (a pesar de que es una cámara con muy pocos materiales, económica y fácil de

ensamblar), sin embargo, si se habla de efectividad y pureza del micelio aislado, las dos metodologías se encuentran a la par, el tiempo de germinación es el mismo y en más de tres semanas se puede obtener micelio puro para producir la semilla.

Otro de los objetivos del presente trabajo fue el de evaluar medios de cultivo sintéticos, usados comúnmente en un laboratorio de microbiología. Hubo diferencias significativas ($p=0,05$) entre los medios de cultivos evaluados y entre las cepas de hongo, lo que se ve reflejado en las figuras 22, 23 y 24. Ningún medio de cultivo tuvo un comportamiento diferente para una cepa determinada, los tres medios de cultivo tuvieron un comportamiento similar para los tres hongos estudiados, lo que nos puede indicar que esto podría extrapolarse a la totalidad de hongos de este tipo, es decir, los hongos de la pudrición blanca de la madera, ya que se estudiaron dos géneros que comparten esta característica (ligninolíticos y celulolíticos) pero que no tienen la misma clasificación taxonómica. El micelio obtenido es característico de cada especie, mientras que para *Lentinula edodes* (shiitake) el micelio es poco denso, simétrico y podría llamarse “débil” (figura 28), para las orellanas (*Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus ostreatus*) se observa un micelio denso, de crecimiento irregular, abundante y “fuerte” (figuras 29 y 30); sin que los adjetivos “débil” y “fuerte” tengan que ver con su índice de infección en los medios de cultivo o los granos de cereal. Si se observa la tabla 7, a pesar que el shiitake tenga un crecimiento micelial poco denso, su velocidad de crecimiento es prácticamente igual que para las otras dos especies.

Figura 28. Crecimiento típico de *Lentinula edodes* sobre placa de PDA



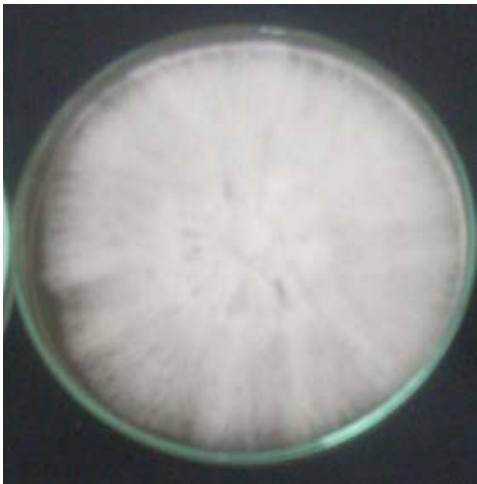
Fuente: La autora. 2010

Figura 29. Crecimiento típico de *Pleurotus pulmonarius* sobre placa de PDA



Fuente: La autora. 2010

Figura 30. Crecimiento típico de *Pleurotus ostreatus* sobre placa de PDA



Fuente: La autora. 2010

Como se describió anteriormente, el medio de cultivo sintético que mejor resultado arrojó para el aislamiento y producción de micelio fue PDA (Papa, dextrosa, agar), no existen estudios científicos que determinen el por qué de este comportamiento por parte de los hongos, pero como es sabido por microbiólogos, bacteriólogos,

biólogos y demás personas que estudian hongos (tanto macromicetos, como micromicetos), éste es uno de los medios de cultivo mayormente utilizados para la manutención y preservación de los hongos. Este medio de cultivo tiene todos los componentes nutritivos para que los hongos se desarrollen, el extracto de papa proporciona almidón, algo de lignina y otros minerales que ayudan a que los hongos se desarrollen e inhiban el crecimiento de bacterias, la dextrosa (glucosa) es la fuente de carbono principal para los hongos y el agar es adicionado como agente gelificante, su pH (5,6 +/-2), es ideal para el crecimiento de hongos y la inhibición de bacterias debido a su ligera acidez. El OGY (Extracto de levadura, glucosa y extracto de levadura) tiene en su composición también la glucosa como su principal fuente de carbono, pero contiene además extracto de levadura y como agente antibacteriano la oxitetraciclina, aunque el medio contenga la glucosa, es evidente que el extracto de levadura, que en su mayoría es un componente protéico no brinda las mejores condiciones nutricionales para el desarrollo de este tipo de hongos (recordemos que éste es un medio utilizado para el conteo de mohos y levaduras en el control de calidad microbiológico de alimentos), aunque se podría contar como una opción al no tener PDA, ya que el crecimiento es más lento sólo por unos pocos días (2 a 4). El medio Sabouraud fue el que tuvo un resultado menos favorecedor, en todos los casos, el crecimiento micelial de las especies de hongos se detuvo, las cajas se tuvieron en incubación días después que las placas de otros medios fueron retiradas pero en vez de haber crecimiento, el medio se deshidrató, es por eso que los tiempos se detuvieron hasta cuando se sacaron las últimas cajas de los otros agares. Por esto se puede concluir que este medio no es una buena opción para el crecimiento de estos hongos macromicetos, aunque el medio de cultivo contiene también dextrosa, el complemento, que es un concentrado enzimático de caseína, no es el adecuado para la producción de micelio, debido a que es un concentrado proteico y de origen animal, este es un medio que aunque es utilizado para el conteo de hongos en el laboratorio, no es el indicado para hongos de la pudrición de la madera.

El realizar un estudio de la cinética de crecimiento de las especies estudiadas, es importante para el investigador, esto porque se puede entender con mayor profundidad el comportamiento de los microorganismos estudiados y poder una mejor explicación a un cambio de las condiciones de crecimiento de las especies. El punto de partida para estudiar por ejemplo, el crecimiento de un cierto tipo de microorganismo bajo un nuevo medio de cultivo, debe ser comparado obligatoriamente con un medio de cultivo ampliamente estudiado y conocido para determinar si este nuevo medio de cultivo es mejor que el utilizado comúnmente. No se han realizado muchos estudios de la cinética de crecimiento de este tipo de hongos en medios sólidos, las investigaciones se han enfocado a la cinética de crecimiento de hongos en fermentaciones líquidas, ya que son en éste tipo de fermentaciones en que se puede determinar con mejor precisión, el agotamiento de un nutriente, o la producción de algún metabolito secundario de interés. Sin

embargo, es bueno aclarar que la cinética se debe hacer para cada experimento, ya que las condiciones ambientales, especialmente, cambian de un laboratorio, pero podrían ser comparables en un momento determinado y los datos serían de gran utilidad e importancia.

La cinética de crecimiento estudiada en este trabajo nos hace pensar que el comportamiento de las cepas *in vitro* es similar en cuanto a los medios de cultivo utilizados. Se hallaron las ecuaciones de crecimiento que permitieran describir el crecimiento de las diferentes especies de hongos. El R^2 nos indica que los datos obtenidos no tienen una gran variación entre sí y que se ajustan en buena medida a la ecuación propuesta. El hongo con una tasa de crecimiento específica (μ) menor fue *Pleurotus ostreatus* para todos los medios de cultivo, mientras que para PDA, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* este índice fue similar, para OGY y Sabouraud se ven diferencias y *Pleurotus pulmonarius* tuvo una tasa mayor para estos medios que *Lentinula edodes*.

Para la preparación de la semilla es primordial los pasos anteriores a la inoculación de los granos. El grano debe estar sumergido en agua entre 16 a 24 horas para que absorba toda el agua posible y pueda haber una buena infección del grano (entre más húmedo, más susceptible a la infección) y además, para que exista las condiciones de humedad propias para el desarrollo del hongo. Debe existir la proporción perfecta de carbonato de calcio y el peso en base húmeda de los granos, ya que si se adiciona más carbonato el pH puede bajar más de lo recomendable (5,5 es lo mínimo (Stamets, P. 2003)) o si no se agrega la cantidad suficiente el pH permitiría la aparición de bacterias que inhibirían el crecimiento del hongo si el proceso de esterilización no es el adecuado. Es necesario asegurarse que la temperatura en el centro térmico de los granos sea superior a los 121°C (temperatura de esterilización) ya que se puede dar el caso de que los granos exteriores del frasco queden completamente estériles, pero en el centro, los granos tengan focos de contaminación, en especial de mohos, que compitan con el hongo a producir y sea inhibido. Si se presenta un foco de contaminación, visible ya que por lo general este tipo de mohos poseen un color verde, pardo, gris, o negro, el frasco debe ser esterilizado nuevamente y el proceso de limpieza y desinfección debe darse nuevamente, o simplemente los granos son eliminados.

En cuanto a la evaluación de los granos de cereal, aunque no se hizo un análisis cuantitativo, se puede concluir que el mejor grano es el trigo, seguido por la cebada, el sorgo, el millo y el maíz amarillo. Esto concuerda con Stamets (2003), que dice que los mejores cereales son el trigo, la cebada y el sorgo. Esto se da

por la cantidad de agua que los granos pueden absorber y también al contenido de almidones de fácil rompimiento, contenido de lignina, celulosa, etc. El mijo y el maíz son granos muy duros que el hongo no puede penetrar. Para que puedan ser más fáciles de penetrar, los granos deberían tener un menor grado de madurez, pero esto implica que todos los almidones y azúcares presentes en el grano no están en un 100% de concentración y entonces el hongo no se desarrollaría por falta de nutrientes. Si es necesario usar este tipo de cereales se recomendaría que fueran sumergidos en agua por un periodo de tiempo más largo, para que las paredes del grano se ablanden más y el hongo pueda penetrar las paredes.

Las metodologías estandarizadas en este trabajo tienen muchas ventajas, entre ellas un bajo índice de contaminación por otros microorganismos, son fáciles de aplicar, totalmente reproducibles y con un alto índice de éxito, es decir que el aislamiento del micelio es satisfactorio, además, el procedimiento para la producción de semilla cumple con las mismas características aquí citadas, además que granos de cereales que no serían comercializados por su baja calidad pueden ser utilizados para la producción de semilla. Lo que cumple el objetivo primordial de este trabajo, los agricultores tendrán herramientas fáciles de seguir, en su idioma, económicas y claras para iniciar o complementar sus cultivos de shiitake y orellanas. Los costos por la compra de semilla importada y costosa disminuirán considerablemente ya que ellos no deberán comprar esta semilla, tendrán la capacidad de producir su propia semilla con alta pureza, calidad y productividad.

9. CONCLUSIONES

Se describieron cuatro metodologías para el aislamiento y producción de micelio a partir del cuerpo fructífero del hongo, esto con el objetivo de que los productores de setas en Colombia no tengan la necesidad de comprar semilla costosa e importada y la puedan producir a partir de su propia producción. Además, se tiene la ventaja de que los hongos de los que se hacen los aislamientos ya están adaptados a las condiciones medioambientales del lugar de producción y no se debe hacer una adaptación, como si se debe hacer con una semilla importada.

Las metodologías descritas en el presente trabajo son económicas, reproducibles, fáciles de realizar y efectivas para obtener un aislamiento puro y con las características fisiológicas propias de los hongos en estudio.

La metodología más fácil y con mejores resultados es la de trozo de carpóforo con desinfección. En dos semanas se puede obtener micelio puro y abundante para la producción de semilla.

Las metodologías a partir de esporas aunque son efectivas, tienen el inconveniente de que toman mucho más tiempo (entre una y dos semanas más) en obtener el mismo resultado que la metodología de trozo de carpóforo con desinfección.

El medio de cultivo sintético con un mejor crecimiento de todos los hongos estudiados es PDA, le sigue OGY y Sabouraud.

El mejor grano de cereal para la producción de semilla (spawn) para las tres especies fue el trigo, seguido de la cebada y el sorgo.

10. RECOMENDACIONES

Es importante tener en cuenta las condiciones de contaminación de los cultivos, ya que un alto índice de contaminación hace que el aislamiento sea un procedimiento más difícil de lograr.

Es importante tener desinfectadas y limpias los sitios de trabajo para evitar contaminaciones ambientales indeseadas.

Las concentraciones de los desinfectantes deben ser exactas, ya que de lo contrario se correría el riesgo de matar las hifas vivas de los carpóforos.

El medio de cultivo recomendado para realizar todos los procedimientos es PDA, sin embargo, se podrían hacer estudios posteriores con un medio "casero", ya que no todos los cultivadores tienen las posibilidades de comprar los medios de cultivo comerciales.

El estudio de la cinética de crecimiento así como de la utilización de sustrato por parte del hongo en la producción de semilla, sería una importante investigación que se debería hacer en el futuro.

11. BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, L. Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus spp.* Instituto Politécnico Nacional. Mexico. 2007.

ALEXOPOLUS C.J. MIMS C.W. BLACKWELL M. Introductory mycology. Fourth Edition. John Wiley & Sons, INC. New York. 1996.

ARIAS, G. GUTIÉRREZ, C. OSPINA, C. Propuesta del cultivo de hongo *Pleurotus* y *Lentinula edodes* a partir de la biomasa del café en las fincas cafeteras de Manizales para el fortalecimiento de los programas de desarrollo alternativo. Cuadernos Latinoamericanos de Administración. Vol 4. No. 6. 2008. Pag 35 – 68.

BAYSAL ERGÜN. PEKER HÜSEYİN. YALINKILIC MUSTAFA KEMAL. TEMİZ ALI. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. Bioresource Technology. Vol 89. 2003. Pag. 95 – 97.

BRUHN J.N. MIHAIL J.D. Forest farming of shiitake mushrooms: aspects of forced fruiting. Bioresource Technology. Vol 100. 2009. Pag 5973 – 5978.

CAGLARIRMAK NECLA. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. Food Chemistry. Vol 105. 2007. Pag. 1188 – 1194.

CAMPBELL A.C. RACJAN M. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). International Biodeterioration and Biodegradation. Vol 43. 1999. Pag. 101 – 107.

CHANG SHU-TING. MILES PHILIP G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Second Edition. CRC Press. 2004.

CHIU S.W. WANG Z.M. CHIU W.T. LIN F.C. MOORE DAVID. An integrated study of individualism in *Lentinula edodes* in nature and its implication for cultivation strategy. Mycol Res. Vol 103. Número 6. 1999. Pag. 651 – 660.

CHU, K. XIA, L. NG, T. Pleurostrina, an antifungal peptide from the oyster mushroom. Peptides. 26. 2005

COATES PAUL M. BLACKMAN MARC R. CRAGG GORDON M. LEVINE MARK. MOSS JOEL. WHITE JEFFREY D. Encyclopedia of dietary supplements. Marcel Dekker. New York. 2005.

DAS NIRMALENDU. MUKHERJEE MINA. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. Bioresource Technology. Vol 98. 2007. Pag. 2723 – 2726.

DÍAZ MERCHÁN JOSÉ ANDRES, ORTIZ FELIPE. Mercado internacional de hongos exóticos. Biocomercio sostenible. Instituto Alexander von Humboldt. 2001.

GARCÍA, I. Experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake) y su desarrollo químico-biológico. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. 2003.

GUARÍN JOEL ANDRÉS, RAMÍREZ ANDRÉS A. Estudio de la factibilidad técnico – financiera de un cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Pontificia Universidad Javeriana. 2004.

HALL IAN R. STEPHENSON STEVEN L. BUCHANAN PETER K. YUN WANG. COLE ANTHONY L.J. Edible and poisonous mushrooms of the world. Timber Press. Portland. 2003.

HEARST, R. NELSON, D. McCOLLUM, G. MILLAR, B. MAEDA, Y. GOLDSMITH, C. ROONEY, P. LOUGHREY, A. RAO, J. MOORE, J. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 15. 2009

JOB DANIEL. La utilización de la borra del café como substrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (JACQ.:FR) KUMMER. *Revista Iberoamericana de Mycologia*. Vol 21. 2004. Pag. 195 – 197.

KARÁCSONYI, S. KUNIAK, L'. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polymers*. 24. 1994.

MANZI PAMELA. MARCONI STEFANIA. AGUZZI ALTERO. PIZZO FERRATO LAURA. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*. Vol 84. 2004. Pag. 201 – 206.

MATTILA PIRJO, SUONPÄÄ KAROLINNA, PIIRONEN VIENO. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. Vol 16. No 7/8. 2000. Pag. 694 – 696.

MUSHWORLD. Mushroom growers handbook 1: oyster mushroom cultivation. MushWorld – Heineart. INC. Corea. 2004. Translation: CERZOS (UNS-CONICET). Argentina.

MUSHWORLD. Mushroom growers handbook 2: shiitake cultivation. MushWorld – Heineart. INC. Corea. 2005. Translation: CERZOS (UNS-CONICET). Argentina.

NIETO, I. Metabolitos secundarios de macrohongos y sus bioacciones. *Química de Hongos Macromicetos*. Universidad Nacional De Colombia. 2010.

NIROGI, R. MUDIGONDA, K. KANDIKERE, V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis. 44. 2007.

PEDREROS, J. Evaluación del crecimiento y producción de *Lentinula edodes* (shiitake), en residuos agroindustriales. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.

RAO R JULURI. CHERIE MILLAR B. JHON E. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). International Journal of Antimicrobial Agents. Vol 33. 2009. Pag. 591 – 592.

RENDON, M. DE VILLEROS, P. Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacaridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Universidad EAFIT. 2004.

ROMERO-ARENAS, O. HUERTA, M. DAMIAN, M. A. DOMÍNGUEZ, F. ARELLANO, D. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Revista Colombiana de Biotecnología. XI. 2009.

SALDARRIAGA Y. Manual de micología aplicada. Universidad de Antioquia. 2001.

SALMONES DULCE. MATA GERARDO. WALISZEWSKI KRZYSZTOF N. Comparative culturing of *Pleurotus spp.* on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. Bioresource Technology. Vol 96. 2005. Pag. 537 – 544.

SCRASE RICHARD. Cultivating mushrooms – from pure culture to spawn production. Mycologist. Volume 9. Part 2. Mayo 1995. Pag. 53 – 56.

SMIDERLE, F. OLSEN, L. CARBONERO, E. BAGGIO, C. FREITAS, C. MARCON, R. SANTOS, A. GORIN, P. IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3), (1→6) -linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*. 597. 2008

SMIDERLE, F. OLSEN, L. CARBONERO, E. BAGGIO, C. FREITAS, C. MARCON, R. SANTOS, A. GORIN, P. IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactano from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect. *Phytochemistry*. 69. 2008

STAMETS PAUL. CHILTON JEFF S. *The mushrooms cultivator: a practical guide to growing mushrooms at home*. Agarikon Press Olimpia. 1983.

STAMETS PAUL. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed. Press. Hong Kong. 1993.

STAMETS PAUL. Can mushrooms help save the world?. *Explore*. Vol 2. No 2. Pag 153 – 163.

SUGIYAMA, K. AKACHI, T. YAMAKAWA, A. Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Nutritional Biochemistry*. 6. 1995.

SUN, Y. LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*. 100. 2009.

SYNYTSYA, A. MÍCKOVÁ, K. SYNYTSYA, A. JABLONSKÝ, I. SPEVACEK, J. ERBAN, V. KOVÁRIKOVÁ, E. COPIKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*. 76. 2009.

TORRES TORRES MABEL GISELA. HURTADO RIOS ALICIA. Potencial de la microbiota nativa y medicinal en el municipio de Quibdó. Grupo de Investigación en Recursos Vegetales. Universidad Tecnológica del Chocó. 2003.

VILLEGAS E VALESKA. PÉREZ ANA MILENA. ARREDONDO CLARA. Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivos sólidos para la producción de micelio como inóculo. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol IX. Número 2. Diciembre de 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. FAVELA-TORRES, E. AGUILAR, C. RÓMERO-GOMEZ, S. DÍAZ-GODINEZ, G. AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal. 13. 2003.

WASSER, S.P. WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1. 1999.

WASSER, S.P. Shiitake (*Lentinus edodes*). En Encyclopedia of dietary supplements. COATES, P. M. BLACKMAN, M, R. CRAGG, G. M. LEVINE, M. MOSS, J. WHITE, J. D. Eds. Marcel Dekker. New York. 2005.

YATSUZUKA, R. NAKANO, Y. JIANG, S. UEDA, Y. KISHI, Y. SUZUKI, Y. YOKOTA, E. RAHMAN, A. ONO, R. KOHNO, I. KAMEI, C. Effect of usuhiratake (*Pleurotus pulmonarius*) on sneezing and nasal rubbing in BALB/c mice. Biological Pharmaceutical Bulletin. 30. 2007.

ZHANG, Y. LI, S. WANG, X. ZHANG, L. CHEUNG, P. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. Food Hydrocolloids. Artículo a imprimir. 2010

12. CIBERGRAFÍA

Anonimo. La web de la biología. Recuperado el 10 de Junio de 2010 en:

[<http://usuarios.multimania.es/vicobos/nutricion/setas/setas3.html>]

Champiñón, cultivo con potencial. La República.com. Recuperado el 21 de Enero de 2010 en:

[http://www.larepublica.com.co/archivos/AGRONEGOCIOS/2009-09-30/chmapinon-un-cultivo-con-potencial_84313.php]

López, F.J., Castrillón, P. Evolución y desarrollo de la agroindustria (Ai), en Colombia. Recuperado el 20 de Enero de 2010 en:

[[http://www.umanizales.edu.co/programs/economia/publicaciones/12/agroindustria Colombia.pdf](http://www.umanizales.edu.co/programs/economia/publicaciones/12/agroindustria%20Colombia.pdf)]

Reino de los hongos. Hiperbiología. Recuperado el 23 de Enero de 2010 en:

[<http://www.hiperbiologia.net/fungi/fungiclas.htm#ChytridiomycetesGerm%C3%83%C2%A1n>]

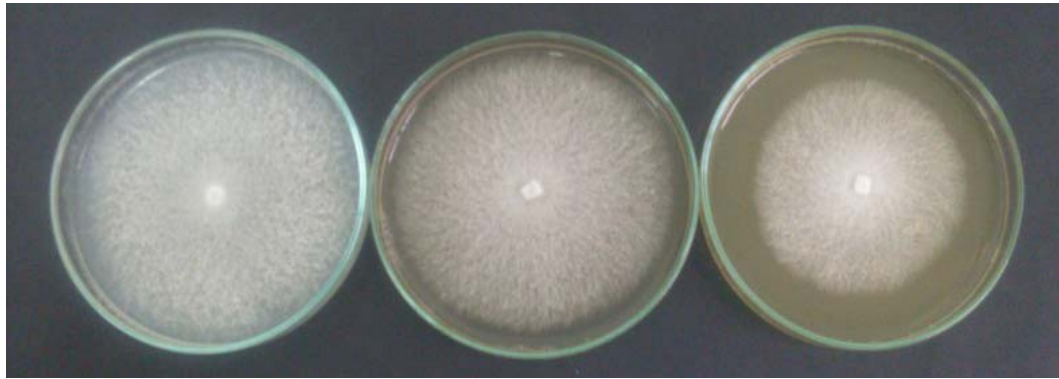
Universidad de León. España. Cuerpo fructífero de *Amanita muscaria*. Recuperado el 23 de Enero de 2010 en:

[[http://www3.unileon.es/personal/wwdbvmgg/practicasconsusfotos/practica5sola/fo tospractica5sola/hongos/amanitamuscariapielaminasbordesombbrero.jpg](http://www3.unileon.es/personal/wwdbvmgg/practicasconsusfotos/practica5sola/fo%20tospractica5sola/hongos/amanitamuscariapielaminasbordesombbrero.jpg)]

ANEXOS

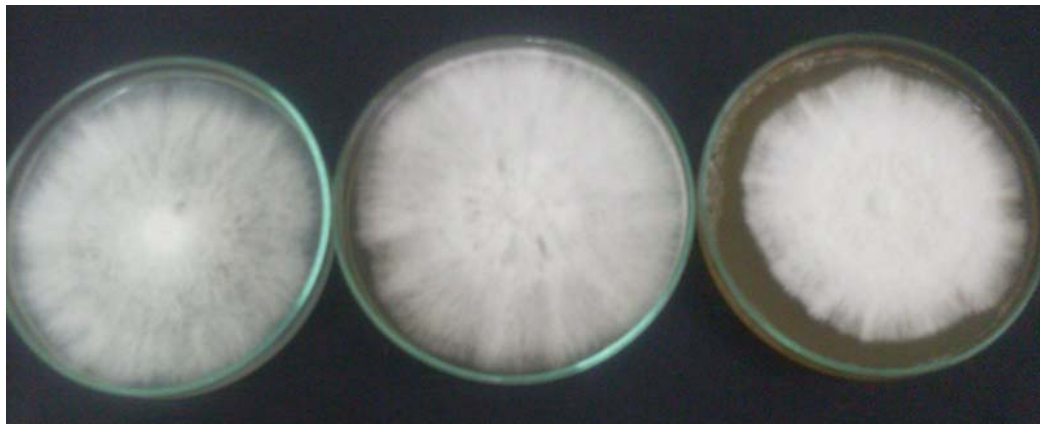
**ANEXO 1. CRECIMIENTO DE *Lentinula edodes* (1), *Pleurotus pulmonarius* (2)
Y *Pleurotus ostreatus* (3) EN PLACAS DE PDA, OGY Y SABOURAUD A 10
DÍAS DE INCUBACIÓN**

(1)



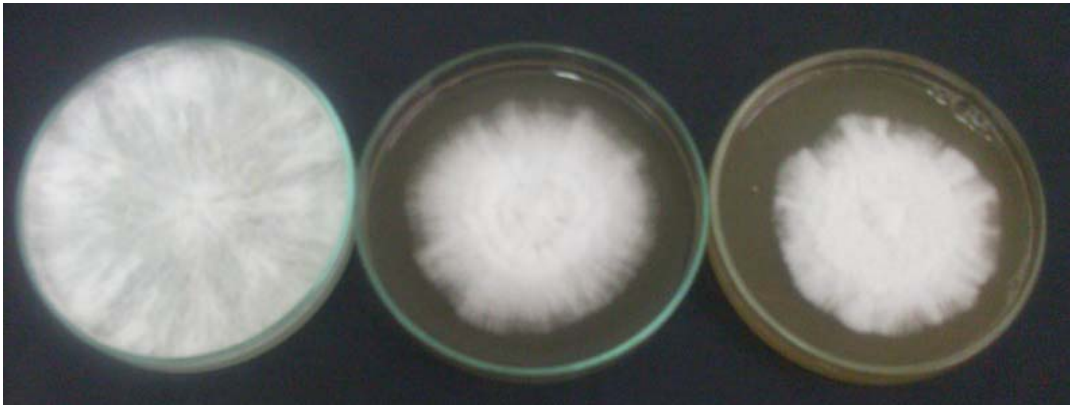
Fuente: La autora. 2010

(2)



Fuente: La autora. 2010

(3)



Fuente: La autora. 2010

**ANEXO 2. TABLA DE ANOVA OBTENIDA CON LOS DATOS
EXPERIMENTALES DEL CRECIMIENTO DE LOS TRES HONGOS EN LOS
TRES TIPO DE AGAR**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3947,88	6	13,36	3,00
Dentro de las especies	591,11	12		
Total	4538,99	18		

ANEXO 3. RATA DE CRECIMIENTO MAXIMA ESPECÍFICA (μ_m) PARA CADA HONGO, CADA MEDIO DE CULTIVO Y CADA DÍA DE EXPERIMENTACIÓN

Lentinula edodes

DIA	PDA	OGY	SABOURAUD
1	2,23	2,218	2,345
2	1,15	1,109	1,172
3	0,74	0,739	0,781
4	0,55	0,554	0,586
5	0,44	0,444	0,469
6	0,37	0,37	0,391
7	0,31	0,316	0,335
8	0,27	0,277	0,293
9		0,246	0,26
10		0,222	0,234
11		0,201	0,213
12		0,185	0,195

Fuente: La autora. 2010

Pleurotus pulmonarius

DIA	PDA	OGY	SABOURAUD
1	2,218	2,218	2,48
2	1,109	1,109	1,24
3	0,734	0,739	0,827
4	0,554	0,554	0,62
5	0,443	0,444	0,496
6	0,37	0,37	0,413
7	0,317	0,317	0,354
8	0,277	0,277	0,31
9		0,246	0,275
10		0,222	0,248
11			0,225
12			0,207

Fuente: La autora. 2010

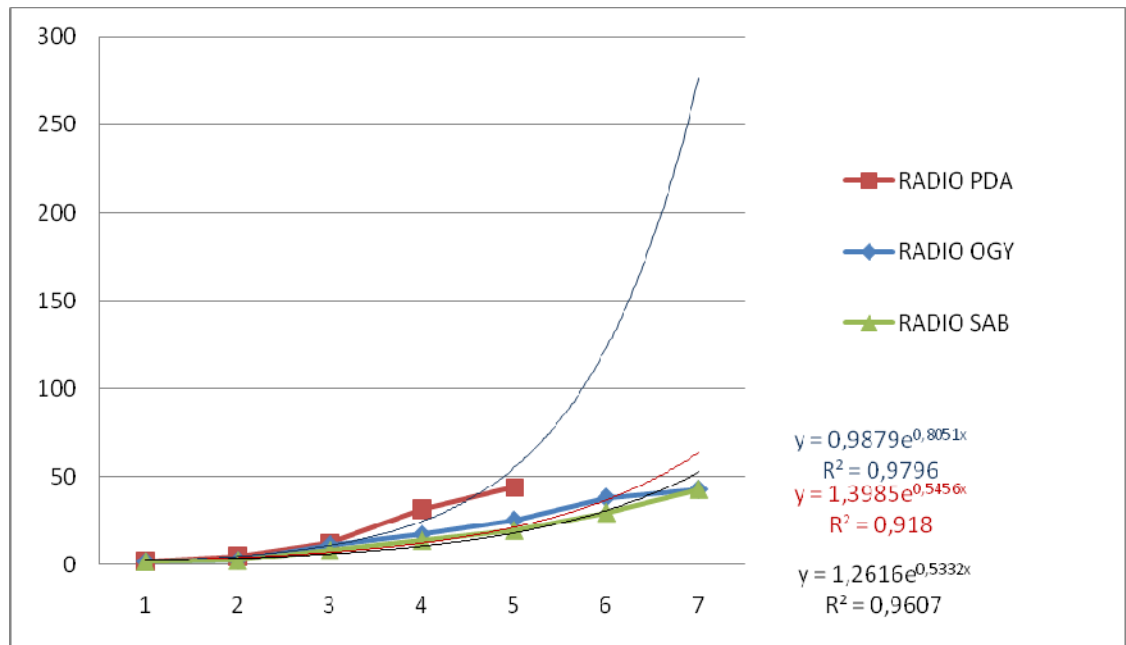
Pleurotus ostreatus

DIA	PDA	OGY	SABOURAUD
1	2,218	2,218	2,503
2	1,109	1,109	1,251
3	0,739	0,739	0,834
4	0,554	0,554	0,626
5	0,444	0,444	0,501
6	0,37	0,37	0,417
7	0,317	0,316	0,357
8	0,277	0,277	0,313
9	0,246	0,246	0,278
10	0,222	0,222	0,25
11		0,201	0,227
12		0,185	0,208
13			0,192
14			0,178

Fuente: La autora. 2010

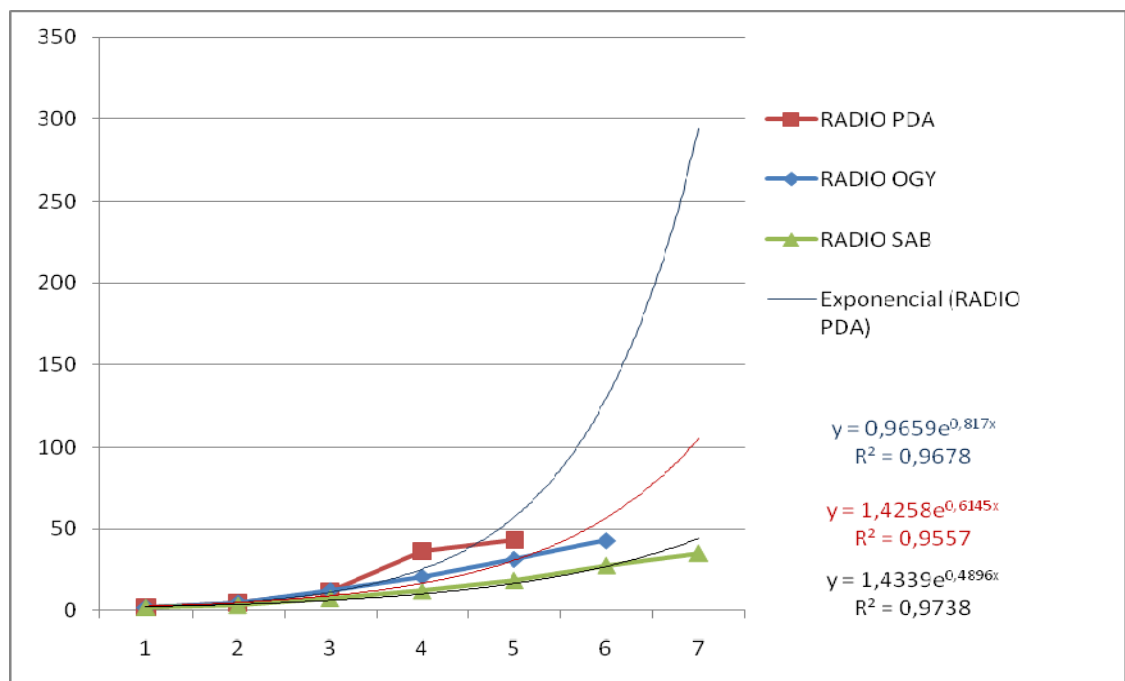
ANEXO 4. GRAFICAS DE CRECIMIENTO TEÓRICAS AJUSTADAS A LAS ECUACIONES 2 Y 3 PARA LOS TRES HONGOS Y LOS TRES MEDIOS DE CULTIVO

Lentinula edodes



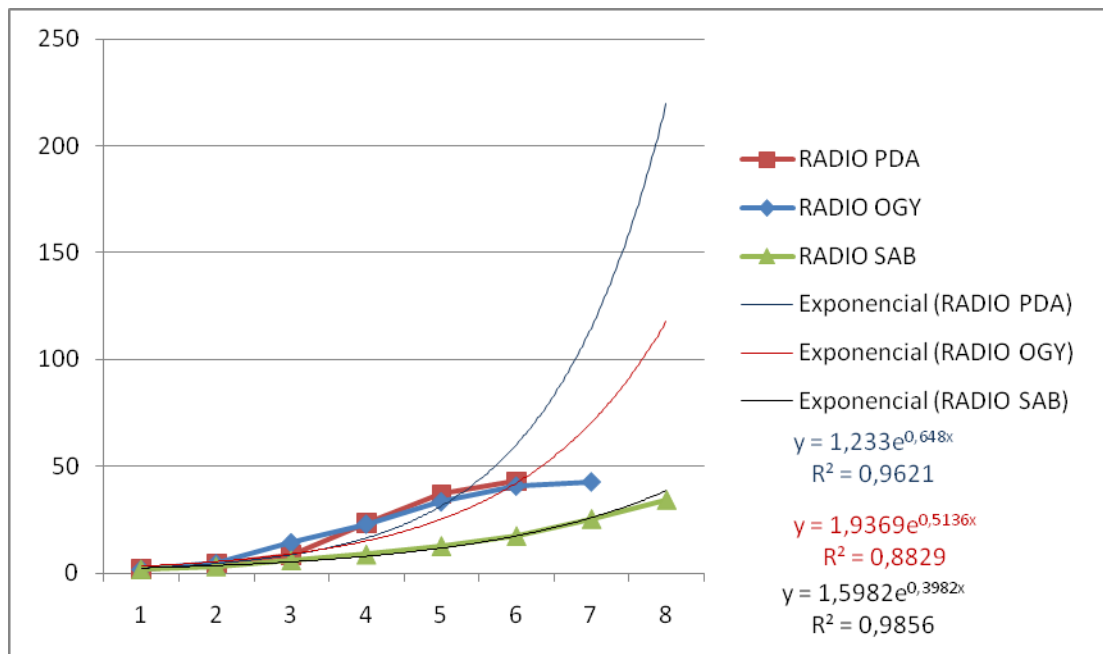
Fuente: La autora. 2010

Pleurotus pulmonarius



Fuente: La autora. 2010

Pleurotus ostreatus



Fuente: La autora. 2010