

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Optimización del cultivo de una cepa ecuatoriana de *Ganoderma ecuadoriense*, mediante el análisis de sustrato, oxigenación y maduración de micelio

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en

Ciencias Biológicas

BRYAN NELSON DUEÑAS ORMAZA

Quito, 2016

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Bryan Nelson Dueñas Ormaza ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

María Eugenia Ordóñez, Ph.D

Directora de la Disertación

Quito, 10 de noviembre de 2016

DEDICATORIA

Para todos los biólogos soñadores de esta nueva generación, para que encuentren sus pasiones y no dejen que los miedos les impidan continuar por el camino que realmente quieren seguir. Dedico esta tesis a todos los apasionados por el cultivo de hongos, especialmente a Andrés Salazar y Jorge Flores, para que continúen transmitiendo su experiencia y el cultivo de hongos siga desarrollándose en el Ecuador. Dedico especialmente esta tesis a mi papá Jorge Dueñas y mi mamá Diorys Ormaza, porque gracias a su esfuerzo, pude completar la hermosa carrera de Biología y desarrollar una mentalidad cercana a la Madre Naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis padres, por darme la oportunidad de formarme como biólogo, y especialmente por todo el esfuerzo que invirtieron en mí desde pequeño. A mi querida hermana, por todo el cariño, por cantarme canciones de cuna cuando pequeños y actualmente apoyarme en el diseño de muchos de mis proyectos. Agradezco a mi novia Belencita, ya que nadie como ella para levantarme el ánimo en momentos negativos, y por todo el amor que me ha inspirado sentir por ella, ¡gracias ser un apoyo incondicional!

Agradezco al Ingeniero Julio César Sánchez por haber sido un gran guía desde el inicio del estudio, y por su buena voluntad para ofrecer recomendaciones y su punto de vista profesional sobre cuestiones estadísticas, que fueron muy importantes en este trabajo.

Gracias Esteban, Érica, Camilo y Belencita nuevamente por ayudarme en aquellas largas jornadas de cultivo que realizamos, y por acompañarme en mi sueño de cultivar hongos de forma ornamental. Le agradezco a mi pana Darío, por la ayuda en la preparación de algunas fundas, pero especialmente por ser tan diferente y tan alegre, por sacar ese lado “manaba” de mí y por haber sido un compañero en mi desarrollo espiritual. Gracias Maestro Barili, por todas las lecciones aprendidas y por todos los momentos especiales en el campo “hongueando”, ¡gracias por ser un amigo tan chévere!

Le agradezco al “Andresin”, porque me abrió su corazón, me brindó su amistad, su experiencia en cultivo y espacio en su invernadero para poder realizar este trabajo. Gracias por ser la más grande influencia “hippie” en mi vida, una influencia necesaria.

Gracias Mariu, porque fuiste como una segunda madre para mí desde que comencé a estudiar a los hongos, y porque tienes un interés genuino en apoyar de la mejor manera a todos los que conformamos el Fungario.

Gracias finalmente a los hongos, ya que antes la lluvia me entristecía, y ahora me alegra la tarde, porque es cuando puedo salir a buscarlos. Gracias porque me han mostrado su personalidad especial, me han permitido ver la naturaleza y el mundo de una forma espectacular y porque me han hecho enloquecer de curiosidad y de pasión por cultivarlos.

TABLA DE CONTENIDOS

TÍTULO.....	II
CERTIFICACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDOS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XII
1. RESUMEN	13
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUCCIÓN.....	15
3.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO Ganoderma	15
3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE Ganoderma	16
3.3 CULTIVO DE Ganoderma	17
3.3.1 FORMULACIÓN DE SUSTRATOS	18
3.3.2 INTERCAMBIO GASEOSO.....	19
3.3.3 TIEMPO DE MADURACIÓN DEL MICELIO.....	19

3.4	OBJETIVOS	20
3.4.1	OBJETIVO GENERAL	20
3.4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	22
4.2	PREPARACIÓN DE LA CEPA DE G. ecuatoriense	22
4.3	PREPARACIÓN DE SEMILLA EN GRANO.....	23
4.4	PREPARACIÓN DE FUNDA DE FRUCTIFICACIÓN CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	23
4.5	OBTENCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
5.	RESULTADOS	26
5.1	CRECIMIENTO DE LA CEPA DE G. ecuatoriense EN CALDO DE CULTIVO Y SEMILLA DE GRANO.	26
5.2	FASE DE INCUBACIÓN	26
5.3	APARECIMIENTO DE PRIMORDIOS	26
5.4	DESARROLLO EN FASE DE INVERNADERO	27
5.5	PESO FRESCO DE LOS CUERPOS	27
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	28
5.7	TRATAMIENTO ADICIONAL	28
6.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	30
6.1	APARICIÓN DE PRIMORDIOS	30

6.2 EFECTO DE LOS SUSTRATOS (TRATAMIENTO A).....	32
6.3 EFECTO DEL ÁREA MICELIAR EXPUESTA (TRATAMIENTO B).....	33
6.4 EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN (TRATAMIENTO C)	34
6.5 TRATAMIENTO ADICIONAL	34
6.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
7. LITERATURA CITADA	38
8. FIGURAS	42
9. TABLAS.....	48
10. ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de crecimiento de la cepa de <i>G. ecuadoriense</i>	42
Figura 2: Primordio de <i>G. ecuadoriense</i>	43
Figura 3. Tasa de contaminación total de fundas de fructificación.....	43
Figura 4. Ejemplo de primordios cosechados de <i>G. ecuadoriense</i>	44
Figura 5: Fórmula del CV (Coeficiente de variación).....	43
Figura 6: Tipos de cierre de funda de fructificación de <i>G. ecuadoriense</i>	45
Figura 7. Gráfico de dispersión de las diferencias entre el peso total de los cuerpos fructíferos de <i>G. ecuadoriense</i> de los tratamientos C0, C1 y C2.....	45
Figura 8. Primordios de <i>G. ecuadoriense</i> obtenidos con el tratamiento adicional.....	46
Figura 9. Cierre de la funda de fructificación del tratamiento adicional con Primordios en desarrollo.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables del estudio con sus respectivos niveles.....	48
Tabla 2. Codificación de los 27 tratamientos tras el ordenamiento factorial 3x3x3	48
Tabla 3. Tratamientos con los primeros primordios de <i>G. ecuadoriense</i> en aparecer.....	48
Tabla 4. Peso de los primordios de <i>G. ecuadoriense</i> para los tratamientos después de la eliminación del tratamiento B2	49
Tabla 5. Resultados del ANOVA (nivel de significancia 0.05) de todos los tratamientos para la optimización del cultivo de <i>G. ecuadoriense</i>	49
Tabla 6. Análisis post hoc de tratamientos A y C para la optimización del cultivo de <i>G. ecuadoriense</i>	50
Tabla 7. Pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para los factores A, B y C para la optimización del cultivo de <i>G. ecuadoriense</i>	50
Tabla 8: Días transcurridos durante el proceso de cultivo del bloque de tratamientos C y el tratamiento adicional.....	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Esquema del ciclo biológico de un hongo.....	52
Anexo 2: Protocolo de cultivo de hongos de la granja IntiWasi	53
Anexo 3: Resumen del proceso de cultivo.	54
Anexo 4: Tabla comparativa del cultivo analizado en este estudio de la cepa de <i>G. ecuadoriense</i> y de una cepa comercial de <i>Ganoderma</i>	55
Anexo 5: Sustratos utilizados en el estudio.	56
Anexo 6: Invernadero de la empresa IntiWasi ubicado en Tumbaco, Ecuador.....	56
Anexo 7. Humidificación por ultrasonido.....	57

1. RESUMEN

El género *Ganoderma* pertenece a la familia Ganodermataceae y al orden Polyporales. Algunas especies de este género tienen propiedades medicinales muy estudiadas. El objetivo de este estudio, fue optimizar el cultivo del hongo *Ganoderma ecuadoriense*, al reducir el tiempo de apareamiento de primordios respecto al control y al determinar tratamientos que aumenten el peso fresco en gramos del cuerpo fructífero después de 16 semanas de desarrollo. Las variables analizadas fueron: A) sustratos: control [A0], sulfato de manganeso adicional [A1] y melaza adicional [A2]; B) área de micelio en contacto directo con el ambiente: 20.27 cm² [B0], 81.07 cm² [B1] y 182.41 cm² de área con funda abierta [B2]; y C) tiempo de maduración miceliar: de 15 días [C0], 30 días [C1] y 45 días [C2] después de terminar la colonización. Dichas variables fueron ordenadas en un experimento factorial 3x3x3, para un total de 27 tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, resultando en 108 ensayos. El tratamiento B2 fue eliminado del estudio por tener una contaminación del 50%. Los tratamientos en producir primordios en el menor tiempo fueron: A0B0C1, A2B0C1, A1B1C1 y A0B0C0, a los 59 días después de ser inoculados, es decir, 31 días más temprano que el control. No hubo diferencias significativas en el tipo de sustrato o el área de micelio en contacto con el ambiente, sin embargo, sí hubo diferencias significativas en el peso fresco (g) de los cuerpos del tratamiento C1, que tuvo un peso total de 56.7 g, a diferencia de C0 con 12.3 g y C2 con 28.1g de peso total. Un tratamiento adicional mostró que fue más efectivo cerrar las fundas de fructificación con cinta adhesiva. Los resultados obtenidos indican que la optimización del cultivo de *G. ecuadoriense* se daría con el uso del sustrato control, una maduración miceliar de 30 días y un cierre de funda con cinta adhesiva.

Palabras clave. Cultivo de hongos, *Ganoderma*, maduración miceliar, área de micelio expuesto, sustrato.

2. ABSTRACT

Ganoderma are wood-decaying fungi that belong to the order Polyporales. Some species of this genus have well studied medicinal properties. The aim of this study was to optimize the cultivation of *Ganoderma ecuadoriense*, by reducing the time to obtain fungal primordia compared to the control group; and to determine which treatments increase weight of fruiting bodies in grams after 16 weeks of development. The variables analyzed in this study were: A) substrates: control [A0], additional manganese sulfate [A1], and additional molasses [A2]; B) oxygenation, with area of the mycelium in direct contact with the atmosphere of: 20.27 cm² [B0], 81.07 cm² [B1] and 182.41 cm² [B2] of open cover; and C) mycelium maturing time: of 15 days [C0], 30 days [C1], and 45 days [C2] of ripening after complete colonization. These variables were arranged in a factorial experiment 3x3x3; with a total of 27 treatments, each with 4 replicates, which resulted in 108 trials. Treatment [B2] was eliminated from the study due to a 50% of contamination. The treatments to produce primordia in the shortest time were: A0B0C1, A2B0C1, A1B1C1 and A0B0C0, at 59 days after inoculation, that is, 31 days earlier than the control group. There were no significant differences in the type of substrate or the area of oxygenation, however, there were significant differences in weight (g) of the fruiting bodies that belonged to treatment C1, which had a total of 56.7 g, compared to C0 with 12.3 g and C2 with 28.1 g of total fresh weight. An additional treatment showed that it was more effective to close the fruiting sheath with adhesive tape. The results obtained show that the optimization of *G. ecuadoriense* cultivation would occur using the control substrate, mycelial maturation of 30 days, and closing fruiting sheath with adhesive tape.

Key words: Mushroom cultivation, *Ganoderma*, mycelium maturity, mycelium exposed area, substrate.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Ganoderma*

El género *Ganoderma* pertenece al orden Polyporales y a la familia Ganodermataceae (Basidiomycota), la misma que fue descrita por Marinus Anton Donk en 1948 y que incluye cuatro géneros: *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Humphreya* y *Haddowia* (Kirk, Cannon, Minter & Stalpers, 2008). Actualmente en la base de datos Mycobank (octubre, 2016), se reportan 471 especies y subespecies del género *Ganoderma*. Este género fue descrito en 1881 por Peter Adolf Karsten, con un espécimen de *G. lucidum* originario de Inglaterra como especie tipo, la cual es considerada un complejo de especies por sus características principales, como por ejemplo una superficie brillante lacada (Gottlieb y Wright, 1999). Más tarde se describe a *G. applanatum* que tiene la superficie del cuerpo fructífero no lacado, constituyendo así, el segundo complejo de especies del género *Ganoderma* (Muthelo, 2009).

Ganoderma lucidum es la especie más conocida del género por sus características medicinales, sin embargo, varias especies de la familia Ganodermataceae gozan de una reputación como productores de componentes con funciones farmacológicas como: *G. tsugae*, *G. sinense*, *G. applanatum*, *G. multipileum*, *G. australe*, *G. capanense* y *G. sichuanense* (Zhou, Lin, Yin & Zhao, 2007; Chen, 2004; Wang, Wu, Su, Shih & Chen, 2009). Además, cumplen un rol ecológico transcendental al ser uno de los más importantes degradadores de lignina (Ryvarden, 2004). Generan una pudrición blanca en la que de-lignifican la madera mediante acción enzimática, sin destruir la estructura fibrilar de la celulosa en las paredes de células vegetales (Blanchette, 1987). Este género también es patógeno de plantas, y es responsable por grandes pérdidas en el cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis*), *Ganoderma* sp. es

considerado el principal limitante de este cultivo en Malasia (Gurmit, 1990). Los síntomas de la enfermedad causada por *Ganoderma*, puede ser detectados a nivel de las hojas de la flecha, las cuales no se abren ni expanden, y permanecen cloróticas y pequeñas (Nieto, 1994).

En Ecuador se han identificado 19 especies de *Ganoderma*, además se han encontrado 13 especies que posiblemente sean nuevas para la ciencia (Salazar, 2014). Recientemente se reportó una nueva especie perteneciente a Ecuador llamada *G. ecuadoriense* (Salazar, Barnes & Ordóñez, 2016), la especie utilizada en este trabajo. Las propiedades bioquímicas que pueda tener el cuerpo fructífero de esta nueva especie amazónica son desconocidas y pudieran incluir propiedades medicinales como tantas que se han encontrado en *G. lucidum*. Existe, por lo tanto, un potencial biotecnológico con *G. ecuadoriense*.

3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE *Ganoderma*

Ganoderma es un hongo que ha sido utilizado por cientos de años por culturas orientales, las cuales le atribuían propiedades medicinales casi milagrosas. En China se lo conoce como *Ling Zhi*, que significa “hongo de la inmortalidad” (Stamets, 1993). Gracias a que *G. lucidum* tiene aproximadamente 130 compuestos activos, se han estudiado múltiples propiedades como la acción antioxidante, anticancerígena (inducción de apoptosis), inmunomoduladora, hepato-protectora, anti-hipertensión, inhibición de colesterol, anti-inflamatoria, inhibidora de inducciones virales, anti-microbiana, entre otras (Powell, 2010).

Actualmente, la producción mundial anual de *G. lucidum* es de 6.000 toneladas, y se estima que el valor total de los productos derivados de este hongo supera los \$ 2.500

millones por año (Bidegain, et al., 2015), siendo comercializado por diversos tipos de empresas en el mundo. Se ha estudiado el efecto de este hongo sobre diferentes tipos de enfermedades; por ejemplo, el extracto de *G. lucidum* mostró ser efectivo en proteger el hígado de ratones de laboratorio de daño hepático inducido, al permitir la restauración de enzimas mitocondriales y mediante el potenciamiento de las membranas (Sudheesh et al., 2012). Igualmente, el consumo oral de este hongo redujo la fibrosis hepática en ratones, debido a un posible mejoramiento de la actividad de la enzima colagenasa (Wu, Fan & Lin, 2010). También se han realizado estudios en células humanas que demuestran que el extracto de *Ganoderma* inhibe la proliferación de células cancerígenas, produce apoptosis y suprime la proliferación de las células humanas de cáncer de próstata PC-3 (Stanley et al., 2005). Se ha demostrado que *Ganoderma* puede ayudar a tratar y prevenir varios tipos de cáncer gracias a sus triterpenoides y polisacáridos, los cuales actúan como un coadyuvante al tratamiento de la enfermedad. Siempre se recomienda, sin embargo, seguir con el tratamiento convencional y comunicar al médico tratante sobre el consumo de *Ganoderma* (Yuen y Gohel, 2005).

3.3 CULTIVO DE *Ganoderma*

Gracias a sus propiedades medicinales, *Ganoderma* ha sido utilizado por el hombre desde hace más de 2000 años, al menos desde los tiempos de la Dinastía Han (206 A.C – 220 D.C) en China (Stamets, 1993). En años recientes, *Ling Zhi* ha sido cultivado en 15 países a nivel mundial, con una producción anual de cerca de 15.000 toneladas, dato muy significativo, al tener en cuenta que hace 15 años solo se producían 200 toneladas de este hongo (Rogers, 2011).

El cultivo de hongos trata de emular las condiciones ambientales favorables para obtener cuerpos fructíferos de la especie de interés, es decir, reproducir el ciclo biológico de los hongos de manera controlada (Stamets, 1993). El ciclo comienza por la germinación de una espora, seguido del desarrollo del micelio y el apareamiento de primordios, para luego formar el cuerpo fructífero (Anexo 1). Los primordios son agregaciones hifales que forman estructuras pequeñas normalmente circulares, y son el inicio del desarrollo de un cuerpo fructífero (Gaitán, 2006). La obtención de primordios puede ser considerado el proceso más determinante del cultivo, ya que si este falla, todo el proceso de cultivo será en vano. Para obtener primordios se recomienda una humedad ambiental relativa del 95%, una reducción del contenido de dióxido de carbono y ciclos de 12 horas de luz y oscuridad (Stamets y Chilton, 1983), ya que, el micelio es susceptible a la aireación e iluminación como estímulos inductores de primordios (Gaitán, 2006).

3.3.1 FORMULACIÓN DE SUSTRATOS

Ganoderma es un hongo lignícola parásito o saprófito que puede ser cultivado directamente en troncos o en sustratos basados en aserrín y viruta de maderas duras (Stamets, 1993). Estos hongos son considerados “leñosos” o duros, y su crecimiento demora varias semanas o meses más que hongos “carnosos” o suaves como *Pleurotus* (Piepenbring, 2015), que a partir de la formación de primordios, tardan de 4 a 7 días en desarrollarse hasta su etapa madura (Stamets, 1993). Es necesario, entonces formular sustratos que aumenten el rendimiento y la velocidad del cultivo de los hongos leñosos, al eliminar o añadir componentes a la fórmula (Stamets & Chilton, 1983). Se ha visto, por ejemplo, que la melaza estimula el

crecimiento celular al aportar azúcares y nitrógeno (Erkel, 2009). Por otro lado, el sulfato de manganeso ($MnSO_4$) al ser suplementado en un 0.05%, puede aumentar la eficiencia biológica de *G. lucidum* en un 14.6% (Calvo, Montoya & Restrepo, 2014).

3.3.2 INTERCAMBIO GASEOSO

Además de la formulación del sustrato, el intercambio gaseoso es de vital importancia para el cultivo de *Ganoderma*, ya que estos hongos son muy susceptibles a niveles de oxígeno y dióxido de carbono durante la fase de fructificación (Stamets, 1993). Si no se expone a los primordios a niveles de oxígeno semejantes a los atmosféricos, el cuerpo del hongo perderá la oportunidad de desarrollarse (Stamets & Chilton, 1983). Se puede manejar el tamaño del área de micelio en contacto con el aire para determinar el nivel óptimo de intercambio gaseoso.

3.3.3 TIEMPO DE MADURACIÓN DEL MICELIO

En la empresa ecuatoriana de cultivo de hongos IntiWasi, madura la cepa comercial de *G. lucidum* aproximadamente por 30 días antes de trasladarla a invernadero para que fructifique (T. Woodsmith, comunicación personal, 29 de enero, 2016), y como resultado, aparecen primordios a los 40 días en total. Esta empresa cultiva la cepa G102.1 de *G. ecuadoriense* originaria de Ecuador con éxito, sin embargo, los tiempos de apareamiento de primordios (90 días) y de cosecha de cuerpos (120 días) son demasiado largos.

El presente estudio busca optimizar el cultivo de la cepa ecuatoriana *G. ecuadoriense* a través de la reducción de los tiempos de inicio de fructificación (aparecimiento de primordios) y desarrollo de cuerpos fructíferos, al analizar tres diferentes factores cruciales para el desarrollo del hongo: el sustrato, el tamaño del área de micelio en contacto directo con el aire, y el tiempo de madurez miceliar.

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el cultivo de la cepa ecuatoriana G102.1 de *G. ecuadoriense*.

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuál sustrato permite reducir el tiempo de aparecimiento de primordios y obtener mayores valores de peso fresco (g) de los cuerpos de la cepa G102.1 de *G. ecuadoriense* a lo largo de 16 semanas de desarrollo.
- Identificar cuál área de exposición de micelio genera un nivel de intercambio gaseoso adecuado para inducir el aparecimiento de primordios y obtener mayores valores de peso fresco (g) de los cuerpos de la cepa G102.1 de *G. ecuadoriense* a lo largo de 16 semanas de desarrollo.
- Determinar cuál es el tiempo de maduración de micelio necesario para que la cepa G102.1 de *G. ecuadoriense* comience su fase de fructificación antes de los 90 días de desarrollo y genere cuerpos con los mayores valores de peso fresco (g) en 16 semanas de desarrollo.
- Determinar cuál combinación de los factores de composición de sustrato, exposición del micelio y tiempo de maduración

- reduce el tiempo de apareamiento de primordios de la cepa G102.1 *de G. ecuadoriense* y produce cuerpos con mayor peso fresco (g) en 16 semanas de desarrollo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se basaron en el protocolo de cultivo de hongos comestibles y medicinales desarrollado por la empresa de cultivo de hongos IntiWasi (Anexo 2).

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se analizaron tres variables en el ensayo (Tabla 1): composición del sustrato [A0=control, A1= MnSO₄ adicional, y A2= melaza adicional], área del micelio en contacto con el aire [B0=20.27 cm², B1=81.07 cm² y B2= funda abierta correspondiente a 182.41 cm²], y maduración del micelio [C0=15 días, C1=30 días y C2=45 días de maduración]. Cada una de estas variables fueron combinadas, dando un total de 27 tratamientos para un arreglo factorial 3x3x3, con 4 repeticiones por tratamiento, para obtener así un total de 108 unidades experimentales (Tabla 2), representados por funda de fructificación.

4.2 PREPARACIÓN DE LA CEPA DE *G. ecuadoriense*

Se utilizó la cepa ecuatoriana G102.1 de *G. ecuadoriense* proporcionada por la empresa IntiWasi, ubicada en Tumbaco, Ecuador. El micelio del hongo fue sembrado en una caja Petri con medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) y se mantuvo en oscuridad a 24°C por 10 días hasta que colonizó por completo la caja Petri (Stamets, 1993).

Se multiplicó la cepa mediante inoculación en caldos de cultivo (Gaitán, 2006; Stamets, 1993). Para un litro de caldo se midió 950 ml de caldo de papa en un frasco de 1 L, al que se añadió 4 g de viruta y 2 g de polvo de yeso (sulfato de calcio dihidratado). Se autoclavó el medio por 20 minutos a 120°C. Dentro de una cámara de flujo laminar se inoculó el medio estéril con micelio de la cepa G102.1 de *G. ecuadoriense*. Se incubó el medio a temperatura ambiente en un cuarto limpio y oscuro por siete días. Se agitó el medio por un minuto cada día

para homogenizar el micelio en formación. Se preparó un total de 15 L de caldo de cultivo, en 15 botellas de 1 L.

4.3 PREPARACIÓN DE SEMILLA EN GRANO

Se prepararon 99 fundas de polifan resistente al calor, cada una de las cuales contenía 1 kg de granos de avena, 1 L de agua y 16 g de polvo de yeso, estas fueron autoclavadas por 20 minutos a 120°C. Luego, dentro de una cámara de flujo, cada funda se inoculó con 100 ml de caldo de cultivo colonizado, fue sellada y colocada en el cuarto de colonización, un cuarto limpio y oscuro, con humedad relativa baja de aproximadamente 20% y un rango de temperatura de 20 a 28°C. Se incubó las fundas por 30 días hasta que la semilla de grano quedó totalmente colonizada.

4.4 PREPARACIÓN DE FUNDA DE FRUCTIFICACIÓN CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Las fundas de fructificación contienen el sustrato que formará los cuerpos fructíferos del hongo. De cada funda de semilla en grano, se inocularon 2 fundas de fructificación. Se utilizaron 54 de las 99 fundas de semilla en grano generadas, para obtener 108 fundas de fructificación. Para el ensayo de composición de sustrato, el tratamiento control A0 consistió en la funda de fructificación con 500 g de viruta, 150 g de aserrín, 80 g de afrechillo, 45 g de polvo de yeso, 1,66 ml de melaza y 730 ml de agua; el tratamiento A1 tuvo la misma composición que A0 excepto que en lugar de melaza, se añadió 4 g de sulfato de manganeso; el tratamiento A2 tuvo la misma composición que A0 excepto que se añadió 3,3 ml más de melaza. Las fundas fueron pasteurizadas (Anexo 2), y una vez frías, inoculadas con aproximadamente 1 kg de la semilla de grano. Luego fueron selladas con anillos PVC (policloruro de vinilo) según su tratamiento: el

tratamiento B0 estuvo compuesto por un anillo de tubo PVC de 2 pulgadas de diámetro (20.27 cm² de área) ubicado en el cierre de la funda de polifan, el tratamiento B1 tuvo un anillo de PVC de 4 pulgadas de diámetro (81.07 cm² de área), y el B2 inicialmente fue cerrado con un anillo PVC de 2 pulgadas de diámetro, sin embargo, una vez ingresado al invernadero, se eliminó el anillo y se abrió la funda completamente, con el fin de obtener un área de exposición de aproximadamente 182.41 cm². La “boquilla” generada por el anillo de PVC, fue cubierta con papel aluminio y ajustada con una liga en todos los tratamientos. Controles visuales de crecimiento micelar fueron realizados cada 15 días en esta fase, para determinar si existían diferencias en el desarrollo del micelio, es decir, si alguno de los tratamientos colonizaba antes o presentaba contaminaciones.

Para el ensayo del tiempo de maduración del micelio, el tratamiento C0 se mantuvo en el cuarto de cultivo por 15 días, el C1 por 30 días, y el C2 por 45 días después de estar totalmente colonizadas. Una vez cumplidos los primeros 15 días de maduración micelar, las fundas del tratamiento C0 fueron llevadas a un estante de acero inoxidable dentro del invernadero de la empresa IntiWasi. Las fundas de los tratamientos C1 y C2 fueron llevadas al invernadero después de 30 y 45 días respectivamente. Una vez en el invernadero, se retiró el papel aluminio de las boquillas de todas las fundas de fructificación, para permitir el intercambio gaseoso entre el ambiente del invernadero y el micelio.

Una vez que las fundas del tratamiento C0 estuvieron en el invernadero, es decir a los 15 días de maduración micelar en el cuarto de cultivo, se realizaron controles visuales del crecimiento del cultivo cada 15 días para detectar la aparición de primordios y su desarrollo, dichos controles continuaron también con los tratamientos C1 y C2. Se registró la presencia o ausencia de primordios, se controló el desarrollo de fundas contaminadas y de encontrarse

fueron eliminadas. Después de 16 semanas de desarrollo a partir de la inoculación de las fundas de fructificación, los cuerpos fructíferos fueron cortados desde la base con un cuchillo desinfectado y pesados al instante para obtener sus valores de peso fresco en gramos.

4.5 OBTENCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al final del estudio se registró el número de primordios y los cuerpos fructíferos fueron colectados y pesados en fresco. La información del peso en gramos fue tabulada para cada uno de los 27 tratamientos. Los tratamientos fueron ordenados en bloques (A0, A1, A2; B0, B1, B2; C0, C1, C2), y se obtuvieron valores promedio de cada uno de los bloques y luego se obtuvo un promedio total. También se consiguió un promedio específico, al sumar el peso de todos los primordios obtenidos para ese bloque y dividirlos para el número de fundas con primordios, ya que no todas las fundas presentaron primordios.

Se utilizó el análisis del modelo lineal general (MLG) para determinar las interacciones entre factores y sus efectos individuales. Además, con el fin de analizar los resultados sin asumir la normalidad de los datos y reemplazarlos por categorías, se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para analizar los datos del bloque B, que finalmente presentó dos niveles (B0 y B1), y la prueba de Kruskal-Wallis para los bloques A y C, los cuales tuvieron 3 niveles cada uno: A0, A1, A2 y C0, C1 y C2.

5. RESULTADOS

5.1 CRECIMIENTO DE LA CEPA DE *G. ecuadoriense* EN CALDO DE CULTIVO Y SEMILLA DE GRANO.

En la primera etapa de multiplicación de la cepa en caldo de cultivo, se obtuvo un éxito de colonización de 73%, con tan solo cuatro de los 15 caldos de cultivo contaminados. Diez caldos de cultivo de 1 L fueron suficientes para preparar 99 fundas de semilla. En el desarrollo de las fundas de semilla en grano, se obtuvo un éxito de colonización de 64.64%. Treinta y cinco de las 99 fundas se contaminaron antes de colonizar la funda por completo. De las 64 fundas que colonizaron sin contaminación, se utilizaron 54 para la preparación de 108 fundas de fructificación, correspondientes a los 27 tratamientos y cuatro repeticiones del arreglo factorial 3x3x3 (Figura 1). Se contó, entonces, con suficiente material para establecer todos los tratamientos y repeticiones planificados.

5.2 FASE DE INCUBACIÓN

Se obtuvo una colonización total y homogénea de las fundas de fructificación en 19 días. Únicamente siete de las 108 fundas se contaminaron. Los siguientes tratamientos presentaron una repetición contaminada: A0B0C2, A0B2C1, A1BOC2, A1B1C0, A2B2C0, y el tratamiento A2BOC2 presentó dos fundas contaminadas en la fase de incubación.

5.3 APARECIMIENTO DE PRIMORDIOS

Los primeros primordios en aparecer fueron detectados a los 59 días en total a partir de la inoculación (Figura 2). Los tratamientos en presentar primordios primero fueron: A0B0C1 en dos de las cuatro repeticiones, y A0B0C0, A1B1C1 y A2B0C1 en una de las cuatro repeticiones (Tabla 3).

A partir de la colonización completa de las fundas, el tratamiento A0B0C0 produjo primordios a los 25 días, mientras que los tratamientos A0B0C1, A1B1C1 y A2B0C1 produjeron los primeros primordios a los 10 días. Las fundas que incluyen el tratamiento C1, fueron llevadas a invernadero 15 días de maduración más tarde que las C0.

5.4 DESARROLLO EN FASE DE INVERNADERO

Al final del ensayo, 36 fundas de fructificación siguieron un desarrollo normal y presentaron primordios, otras 36 fundas no presentaron primordios hasta el final del estudio, y 36 fundas se contaminaron (incluidas las siete contaminadas en fase de incubación).

Los bloques de tratamientos que tuvieron la menor cantidad de fundas contaminadas fueron el C1 con tres fundas y B0 con ocho fundas contaminadas. Los bloques de tratamientos que presentaron mayor contaminación fueron B2 con 18 fundas contaminadas, C0 con 17 fundas, y C2 con 16 fundas contaminadas (Figura 3). El tratamiento B2 fue eliminado del estudio debido a que el 50% de las repeticiones se contaminaron, y un 30.5% de las repeticiones sanas no presentaron primordios, lo que resultó en 80.5 % de repeticiones con un valor de peso fresco de primordio de 0 g.

5.5 PESO FRESCO DE LOS CUERPOS

Tras eliminar el tratamiento B2, el arreglo estadístico cambió a ser factorial 2x3x3. Los tratamientos que presentaron un mayor peso fresco en gramos fueron: B0, C1 y A1 con un total de 74.0 g, 56.7 g y 42.0 g respectivamente, y con un promedio total de 2.06 g, 1.58 g y 1.17 g respectivamente (Figura 4). Los tratamientos con menor peso fresco fueron: C0, A0 y B1 con un total de 12.3 g, 19.5 g y 23.1 g respectivamente, y un promedio total de 0.34 g, 0.54 g y 0.64 g respectivamente (Tabla 4).

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados con los tratamientos restantes luego de la eliminación del tratamiento B2. El ANOVA del MLG (nivel de significancia de 0.05) mostró que solo fueron significativas las diferencias entre los niveles del factor B, con un valor de 0.035 (Tabla 5), es decir, las diferencias entre B0 y B1 fueron significativas. A pesar de la significancia del factor B, el Coeficiente de Variación (CV) de esta prueba fue de 205.08% (Figura 5), valor demasiado alto, ya que el máximo recomendado para que los datos tenga validez es de 20% (Sánchez, 2013). Por lo tanto, las pruebas planteadas no fueron tomados en cuenta, y análisis no paramétricos complementarios fueron realizados. El análisis post hoc mostró que no hubo diferencias significativas en los bloques de tratamientos A y C (Tabla 6).

En la prueba de Mann-Whitney, el factor B obtuvo diferencias no significativas con un valor de 0.062, y en las pruebas de Kruskal-Wallis el factor A tampoco mostró significancia estadística con un valor de 0.701. Sin embargo, el factor C arrojó diferencias significativas con un valor estadístico de 0.028 (Tabla 7).

5.7 TRATAMIENTO ADICIONAL

Para asegurar obtener un número suficiente de fundas de semilla para completar los ensayos, se produjeron fundas en exceso. Dos de estas fundas se usaron para producir cuatro fundas de fructificación, generando así un tratamiento adicional. Se inoculó las fundas de igual manera que el de los otros tratamientos. Se utilizó el sustrato control, un cierre de la funda con cinta adhesiva (no se usaron anillos PVC ni papel aluminio) y se dejó madurar por 26 días (Figura 6), cuatro días menos que el tratamiento C1. Estas cuatro fundas fueron colocadas en un estante apartado del ensayo y ninguna de las cuatro repeticiones se contaminó. Al finalizar

el estudio, se obtuvo primordios con los siguientes pesos: 7.8 g, 9.3 g, 27.0 g y 40.4 g, siendo este último el primordio más pesado de todo el estudio. El peso total de los primordios fue de 84.50g y el promedio total fue de 21.13g.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Cuatro tratamientos que incluyeron la variable C1 (30 días de maduración) y uno la variable C0 (15 días de maduración), indujeron el apareamiento de primordios 31 días antes que con el método de cultivo tradicional de la empresa IntiWasi (90 días). Se determinó que el tratamiento de maduración miceliar de 30 días (C1) permitió un mayor crecimiento de los primordios en menor tiempo.

6.1 APARICIÓN DE PRIMORDIOS

El tratamiento control (A0B0C0) estuvo en el grupo de los cinco tratamientos que presentaron primordios primero, sin embargo, solo una de las cuatro repeticiones del tratamiento control presentó primordios, por esta razón, los tiempos usados para la comparación del apareamiento de primordios, fueron los 90 días obtenidos por empresa IntiWasi (Anexo 4). La diferencia entre el tratamiento control y el cultivo de IntiWasi es el tiempo de maduración, que fue de 15 días en el control y de cero días en el cultivo de la empresa, esto podría ser un indicio de que el tiempo de maduración podría influenciar el apareamiento temprano de primordios, sin embargo, este tratamiento no fue tomado como control por la falta de consistencia.

El tiempo de maduración de 30 días del tratamiento C1, podría ser un factor de importancia en el apareamiento temprano de primordios. El tiempo de maduración miceliar, al igual que otros factores como la temperatura (Stamets y Chilton, 1983), se pueden relacionar con la producción y la actividad de enzimas en hongos de pudrición blanca como *Ganoderma* (Mackensen et al, 2003); además, otras moléculas como antibióticos o micotoxinas también son producidas, y podrían ayudar a proteger el micelio de organismos micoparásitos (Webster

& Weber, 2007). En el hongo *G. lucidum* se han aislado 431 metabolitos secundarios, muchos de ellos moléculas bioactivas, como los triterpenos pentacíclicos (Baby, Johnsonn & Govindan, 2015), que tienen propiedades anti-bacteriales y anti-virales (Jager, Trojan, Koop, Lazzczyk & Scheffler, 2009), entre otras. Esto sugiere que en la funda de fructificación pueden existir moléculas exudadas por el hongo que protejan al micelio y ayuden a la fructificación. Posiblemente la actividad de las moléculas de los exudados no llegue a un nivel óptimo a los 15 días, pero sí a los 30 días de maduración miceliar, por lo tanto, exponer el micelio a condiciones inductoras de fructificación (mayor humedad, niveles de oxígeno y luz) en este tiempo, podría inducir al aparecimiento temprano de primordios y a el mejor desarrollo de los hongos a lo largo del tiempo.

A pesar de que no hubo diferencias significativas en el tiempo de aparecimiento de primordios entre los cinco tratamientos (tomando en cuenta que la fecha de inoculación fue la misma para todos), existen varios estímulos, como la luz, que permiten una fructificación más temprana y producción de hongos más pesados a lo largo del tiempo (Stamets & Chilton, 1983). Cabe señalar que el factor luz no fue analizado en este estudio. La maduración miceliar del tratamiento C1 podría ser uno de estos estímulos, que a pesar de que produce fructificaciones al mismo tiempo que el tratamiento C0, podría provocar un mejor desarrollo de los cuerpos a lo largo del tiempo. El peso total obtenido de los cuerpos del tratamiento C1 puede apoyar dicha hipótesis, sin embargo, mayores estudios son requeridos, ya que se necesita analizar el peso de los hongos una vez alcanzada su madurez. En el presente estudio no se dejó desarrollar a los primordios hasta su maduración por falta de tiempo, ya que hongos “leñosos” como *Ganoderma*, se demoran mucho más que los hongos “carnosos” como el hongo ostra *Pleurotus*

ostreatus (Piepenbring, 2015), por lo tanto, no se pudieron hacer comparaciones del peso final de los cuerpos fructíferos.

En la Tabla 4 se puede apreciar que los tratamientos B0 y C1 presentaron el mayor número de fundas de fructificación con primordios, y además el mayor peso total. Se podría dar la situación en la que se produzcan un menor número total de cuerpos fructíferos, pero con mayor peso, sin embargo, se sugiere que lo mejor sería obtener un mayor número de fundas de fructificación con primordios, aunque estas generen un menor peso, ya que estos primordios podrían seguir su desarrollo a lo largo de tiempo, y producir un mayor peso en promedio total.

6.2 EFECTO DE LOS SUSTRATOS (TRATAMIENTO A)

El ANOVA (Tabla 5) no mostró diferencias significativas (0.486) asociadas a la composición del sustrato. A pesar de los resultados diferentes en el peso promedio de los primordios (A0=19.55 g, A1=42.0 g, A2=35.6 g), la adición de sulfato de manganeso (Calvo, Montoya & Restrepo, 2014) y melaza (Erkel, 2009), no estaría ejerciendo un efecto significativo para el apareamiento temprano y desarrollo de los hongos. El tratamiento A1, tercero con el mayor peso de primordios en total con 42.0 g (Tabla 4), pudo estar influenciado por el tratamiento C1, así, por ejemplo: el tratamiento A1B0C1, tuvo repeticiones con un peso alto de 13.70 g y 10.8 g; en este tratamiento se considera a C1 como el factor que rige el efecto principal, ya que estadísticamente fue significativo. Se sugiere, entonces, seguir utilizando la formulación del sustrato control (Anexo 5).

6.3 EFECTO DEL ÁREA MICELIAR EXPUESTA (TRATAMIENTO B)

La prueba de Mann-Whitney no fue significativa (0,062) para el tratamiento B de área miceliar en contacto directo con el ambiente, a pesar de que B0 tuvo un peso total de primordios de 74 g y B1 de 23.1 g. Sin embargo, el área de micelio en contacto con el ambiente puede tener efectos sobre el desarrollo y apareamiento de primordios. Stamets y Chilton (1983) hacen referencia a un tipo de cultivo en bloque, donde el micelio de *G. lucidum* es retirado de la funda de manera exista un contacto directo con el ambiente, y se lo mantiene bajo neblina por períodos prolongados. En el invernadero IntiWasi (Anexo 6), los hongos son regados mediante aspersión (micro gotas) por 15 minutos cinco veces al día, y una vez al día con un sistema de humidificación por ultrasonido que genera el ambiente de neblina (Anexo 7). Según Stamets (1993), el micelio en contacto con el ambiente debe ser estimulado con vapor de agua y no con agua líquida.

En el invernadero hay una entrada directa de aire externo por donde se oxigena el lugar, pero también es la entrada de esporas de todo tipo de hongos, es decir que a pesar de que sea un lugar limpio, no es estéril. Sin embargo, si los sustratos tuvieron una correcta pasteurización e inoculación (Gaitán, 2006), el micelio crecerá y una vez colonizado el sustrato, el micelio no tendrá problemas para defenderse de patógenos externos. Por otro lado, cuando las fundas del tratamiento B2 se abrieron para generar un área expuesta de 182.41 cm², agua líquida ingresó en ellas, se filtró hasta llegar al fondo y se estancó en las fundas, esto pudo producir estímulos no favorables para el desarrollo del micelio que posiblemente lo debilitaron al encontrarse bajo estrés hídrico, y afectó su habilidad para defenderse de patógenos (Valencia & López, 2004). La alta tasa de contaminación de este tratamiento pudo provocar la contaminación de fundas aledañas, ya que a pesar de que las fundas contaminadas fueron eliminadas del invernadero

inmediatamente al ser detectadas, algunos hongos como *Trichoderma* suelen ser muy agresivos, de rápida colonización y esporulación (Gaitán, 2006; Stamets & Chilton, 1983).

6.4 EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN (TRATAMIENTO C)

El tratamiento C1 con un peso total de 56.7 g, fue significativamente superior (0.028) al tratamiento C0 con 12.3 g, y al tratamiento C2 con 28.1 g (Figura 7), como lo demuestra el análisis de Kruskal-Wallis para este factor. Por lo tanto, se puede decir que el tratamiento C1 de 30 días de maduración (T. Woodsmith, comunicación personal, 29 de enero, 2016), tuvo un efecto positivo en el desarrollo de esta cepa de *G. ecuadoriense*, al permitir que los cuerpos de los hongos de ese tratamiento crezcan 4.61 veces más que los del tratamiento C0 y 2.01 veces más que los primordios del tratamiento C2. Las posibles razones del efecto del tiempo de maduración de 30 días en el peso de los primordios ya se discutieron en el literal anterior.

6.5 TRATAMIENTO ADICIONAL

La tercera repetición de este tratamiento produjo el cuerpo fructífero más pesado del estudio, con un peso final de 40.4 g (Figura 8). Es muy probable que la razón del éxito de este tratamiento esté vinculada al tipo de cierre de la funda (Figura 9), ya que al no tener una tapa de papel aluminio, permitió un mayor intercambio gaseoso en la fase de incubación (France, 2000), lo cual podría estar influenciando un mayor desarrollo de los cuerpos, sin embargo, mayores estudios son requeridos para asegurar esta posibilidad. En este tratamiento no se estancó el agua, porque la funda permaneció asegurada con cinta todo el desarrollo, y porque una vez en el invernadero, el exceso de plástico de la boquilla de la funda fue cortado para evitar el estancamiento de agua.

A nivel operativo, este tipo de cierre de funda de fructificación implica un aumento en la eficiencia del proceso de cultivo, ya que es menos laborioso y reduce en tres veces el tiempo de cierre de la funda. El tiempo de maduración de este tratamiento fue de 26 días, 4 días menos que el tratamiento C1, lo cual puede ratificar la capacidad de dicho tratamiento para producir hongos con mayor peso del cuerpo.

Ninguna de las cuatro repeticiones de este tratamiento se contaminó. Esto puede deberse a que estas fundas fueron colocadas lejos de los 108 ensayos principales, en el mismo invernadero, corroborando así, que la tasa de contaminación que se presentó en los otros tratamientos pudo estar ligada a la ejecución del tratamiento B2.

Gracias a este tratamiento adicional, se puede pensar en proponer otro tipo de estudios referentes el tiempo de maduración del micelio, ya que no solo la funda de fructificación tuvo un tiempo de maduración, sino también la semilla de grano. Las fundas con semilla de grano maduraron 35 días antes de ser utilizadas; en los 108 ensayos realizados, la semilla maduró solo 3 días después de ser inoculada (Tabla 8).

6.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A pesar de que no se obtuvo diferencias significativas, parece existir una tendencia en el área de exposición miceliar, entre más pequeña el área, más peso produce los hongos, o por lo menos con las condiciones ambientales del invernadero IntiWasi. Por otro lado, el tipo de cierre de la funda de fructificación fue un aspecto crucial para generar un ambiente favorable para el desarrollo del crecimiento de *G. ecuadoriense*. El método de cierre mostró hacer más eficiente el proceso de cultivo, al inducir el apareamiento temprano de primordios y permitir que los hongos crezcan más rápido y con menos contaminación.

Una maduración de 30 días parece ser óptima, dar un estímulo de fructificación después de este tiempo, puede inducir a una fructificación más temprana y a un mejor desarrollo del hongo, para lograr cosechas con peso fresco de los cuerpos fructíferos de *G. ecuadoriense* mayor que el control.

Se recomienda utilizar el sustrato control, ya que, según los datos obtenidos en este estudio, los aditamentos (melaza y sulfato de manganeso adicional) no tuvieron un efecto significativo en el desarrollo de los cuerpos fructíferos.

Para reducir el tiempo de fructificación y aumentar el desarrollo de los cuerpos a las 16 semanas, se recomienda utilizar el sustrato control, un cierre de la funda de fructificación con cinta adhesiva sin tapa de papel aluminio, y permitir la maduración del micelio por 30 días antes de llevarla al invernadero.

Se sugiere estudios adicionales en relación con la maduración del micelio en la semilla en grano. El micelio de la cepa de *G. ecuadoriense* utilizada mostró ser especialmente vulnerable

al contacto directo y continuo de agua líquida. Se recomienda evitar que el agua ingrese en la funda de fructificación, ya que, al estancarse produce un aumento en la tasa de contaminación. Para futuros estudios del área de micelio en contacto directo con el ambiente, se recomienda aumentar el tiempo de humidificación por vapor de agua en el invernadero, y eliminar el riego directo de agua líquida.

De presentarse una tasa de contaminación alta, se recomienda buscar las causas inmediatamente, ya que una vez hallado el origen de la contaminación, puede ser corregido para evitar contaminaciones en el futuro.

7. LITERATURA CITADA

Baby, S., Johnson, A. & Govindan, B. 2015. Secondary metabolites from *Ganoderma*. Elsevier. *Phytochemistry*, 114, 66-101. doi 10.1016/j.phytochem.2015.03.010.

Bidegain, M., Postemsky, P., Gonzales, M., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S., Pereyra, C., Curvetto, N. & Cubitto, M. 2015. Optimización del a producción del hongo medicinal Reishi (*Ganoderma lucidum*) para el desarrollo de nutraceuticos y fitoterapicos. Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires-Argentina.

Blanchette, R., & Otjen, L. 1987. Assessment of 30 white rot basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung*, 41,343-349.

Calvo, L., Montoya, S. & Restrepo, G. 2014. Effect of Manganese on Enzyme Activities of Ligninolytic Laccase and Peroxidase on Solid Culture of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*. Poster in The 8th Medicinal Mushrooms Conference, Manizales-Colombia.

Chen, A. 2004. Mushrooms from the tropic. Growing *Ganoderma* Mushrooms. Mushroom Grower Handbook 1. USA.

Crous, P., Gams, W., Stalpers, J., Robert, V. & Stegehuis, G. 2004. Mycobank: an online initiative to launch mycology into de 21st century. *Studies in Mycology*. 50:19-22.

Erkel, E. 2009. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 7, 841-844.

France, A., Cañumir, J. y Cortez, M. 2000. Producción de hongo ostra. Boletín N°23. Instituto de investigaciones agropecuarias. Impresora Trama. Chillán-Chile.

Gaitán, R., Salmones, D., Pérez, R., & Mata, G. 2006. Manual Práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Xalapa-México. Instituto de Ecología A.C.

Gottlieb, A., & Wright, J. 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvingia*. Mycological Research, 103, 1289-1298.

Gurmit, S. 1990. The scourge of oil palms in the coast areas. In: Ganoderma Workshop. Bangai, Selangor. Malasia.

Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Lazzczyk, M., & Scheffler, A. 2009. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants-Rich Sources for a New Group of Multipotent Plant Extracts. Journal Molecules, 14, doi.10.3390/molecules14062016.

Kirk, P., Cannon P., Minter, D. & Stalpers, J. 2008. Dictionary of the Fungi (10th edition). CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Mackensen, J., Bauhus, J. & Webber, E. 2003. Decomposition rates of coarse debris-A review with emphasis in Australian tree species. Australian Journal of Botany. Volume 51. Pp 27-37.

Muthelo, V. 2009. Molecular characterization of *Ganoderma* species. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Pretoria. Pretoria, Sudáfrica.

Nieto, L. 1994. Pudrición Basal del tallo de la Palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) causada por *Ganoderma* sp. Revista Palmas, Volumen 15, N° 2.

Piepenbring, M. 2015. Introducción a la Micología en los Trópicos. American Phytopathological Society. Impreso en Estados Unidos.

Powell, M. 2010. Medicinal Mushrooms a Clinical Guide. Mycology Press.

Rogers, R. 2011. The Fungal Pharmacy, The complete guide to medicinal mushrooms & lichens of North America. Published by North Atlantic Books.

Ryvarden, L. 2004. Neotropical Polypores. Part 1. Introduction, Hymenochaetaceae and Ganodermataceae. Fungiflora, Oslo, Noruega.

Salazar, A. 2014. Diversidad de los géneros de *Ganoderma* y *Amauroderma* en el Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Salazar, A., Barnes, C. & Ordóñez, M. 2016. *Ganoderma ecuadoriense* sp. nov. Persoonia-Volumen 36. Pp 440-441.

Sánchez, J. 2013. Introducción al diseño experimental. Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito – Ecuador. Pp: 12.

Stamets, P. & Chilton, J. 1983. The Mushroom Cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. Agarikon Press. Washington- USA.

Stamets, P. 1993. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Third Edition. Ten Speed Press Berkeley. Colorcraft Ltd, Hong Kong, China.

Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J. & Silva, D. 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta 1 from prostate cancer cells. Department of medicine, School of medicine of Indiana University. USA.

Sudheesh, N., Ajjth, T., Mathew, J., Nima, N. & Janardhanan, K. 2012. *Ganoderma lucidum* protects liver mitochondrial oxidative stress and improves the activity of electron transport chain in carbon tetrachloride intoxicated rats. The Japan Society of Hepatology.

Valencia, N. & López, C. 2004. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Proexport. Caldas-Colombia

Wang, D., Wu, S., Su, C, Peng, J, Shih, & Chen, L. 2009. *Ganoderma multipileum*, the correct name for '*G. lucidum*' in tropical Asia. Botanical Studies 50: 451-458.

Webster, J. & Weber, R. 2007. Introduction to Fungi. Third Edition. Cambridge University Press. United States. New York.

Wu, Y., Fang, H. & Lin, W. 2010. Post-treatment of *Ganoderma lucidum* reduced liver fibrosis induced by thioacetamide in mice. Wiley InterScience. China Medical University. Taiwan-China.

Yuen, J. & Gohel, M. 2005. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. Nutr Cancer. The Hong Kong Polytechnic University. China.

Zhou, X., Lin J., Yin, Y. & Zhao, J. 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. University. Shangai- China.

8. FIGURAS

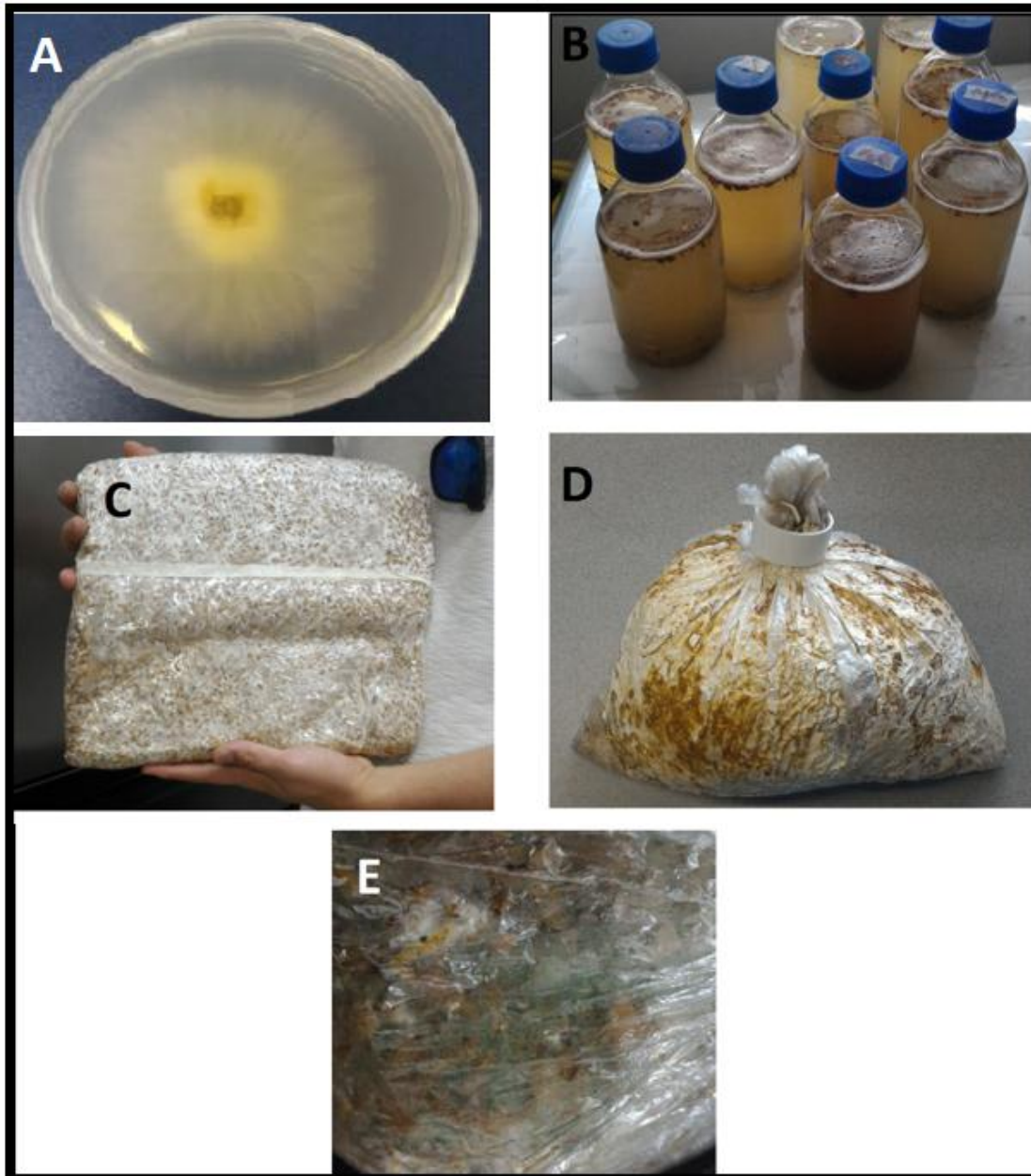


Figura 1. Etapas de crecimiento de la cepa de *G. ecuadoriense*. A) Micelio colonizando en PDA en una caja Petri. B) Caldos de cultivo inoculados con *G. ecuadoriense* C) Funda de semilla en grano. D) Funda de fructificación colonizada. E) Funda de fructificación contaminada, las manchas verdes son hongos contaminantes.



Figura 2. Primordio de *G. ecuadoriense*. Primordio correspondiente al tratamiento A2B0C1.

T ^a	Fundas de fructificación	Porcentaje de contaminación
A0		38,9
A1		27,8
A2		33,3
B0		22,2
B1		27,8
B2		50*
C0		47,2
C1		8,3
C2		44,4

Figura 3. Tasa de contaminación total de fundas de fructificación. Cada bloque de tratamientos tiene 36 fundas, representados en esta figura como cuadrados de color. Los cuadrados de color rojo corresponden a fundas contaminadas y los verdes a las que no estaban contaminadas. *El tratamiento B2 tuvo una contaminación del 50% y fue eliminada del estudio. ^a = Tratamiento.



Figura 4. Ejemplo de primordios cosechados de *G. ecuadoriense*.

$CV = \frac{\sqrt{ECM}}{\bar{X}} \times 100$
<p>Donde:</p> <p>ECM (error cuadrático medio) = 7,654</p> <p>X = 1,349</p>
$CV = \frac{\sqrt{ECM}}{\bar{X}} \times 100 = 205.084$

Figura 5. Fórmula del CV (Coeficiente de variación).



Figura 6. Tipos de cierre de funda de fructificación de *G. ecuadoriense*. A) Cierre con anillo PVC tapado con papel aluminio en fase de incubación. B) Cierre con anillo PVC sin papel aluminio en fase de invernadero. C) Cierre del tratamiento adicional, solo con cinta adhesiva.

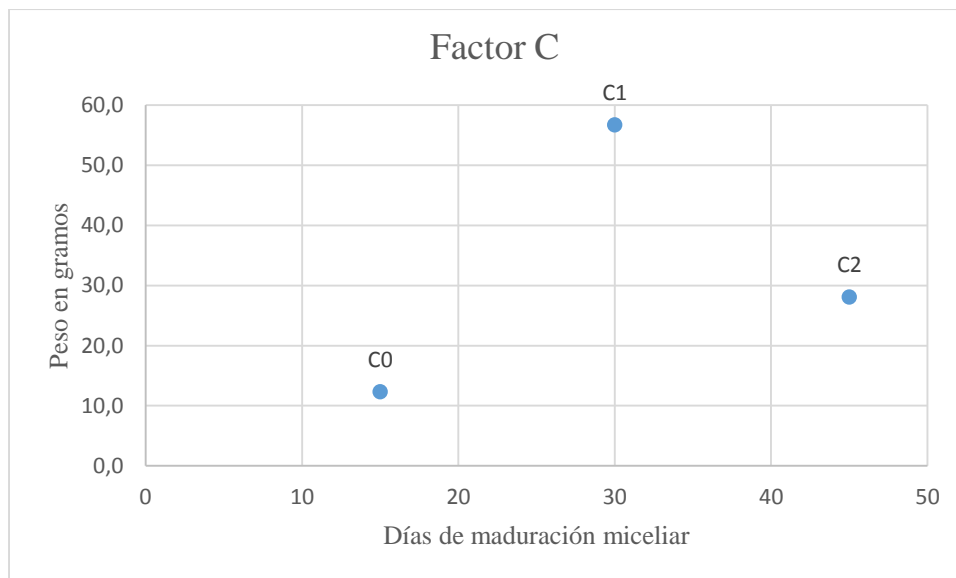


Figura 7. Gráfico de dispersión de las diferencias entre el peso total de los cuerpos fructíferos de *G. ecuadoriense* de los tratamientos C0, C1 y C2. Parece haber un pico óptimo a los 30 días de maduración miceliar.

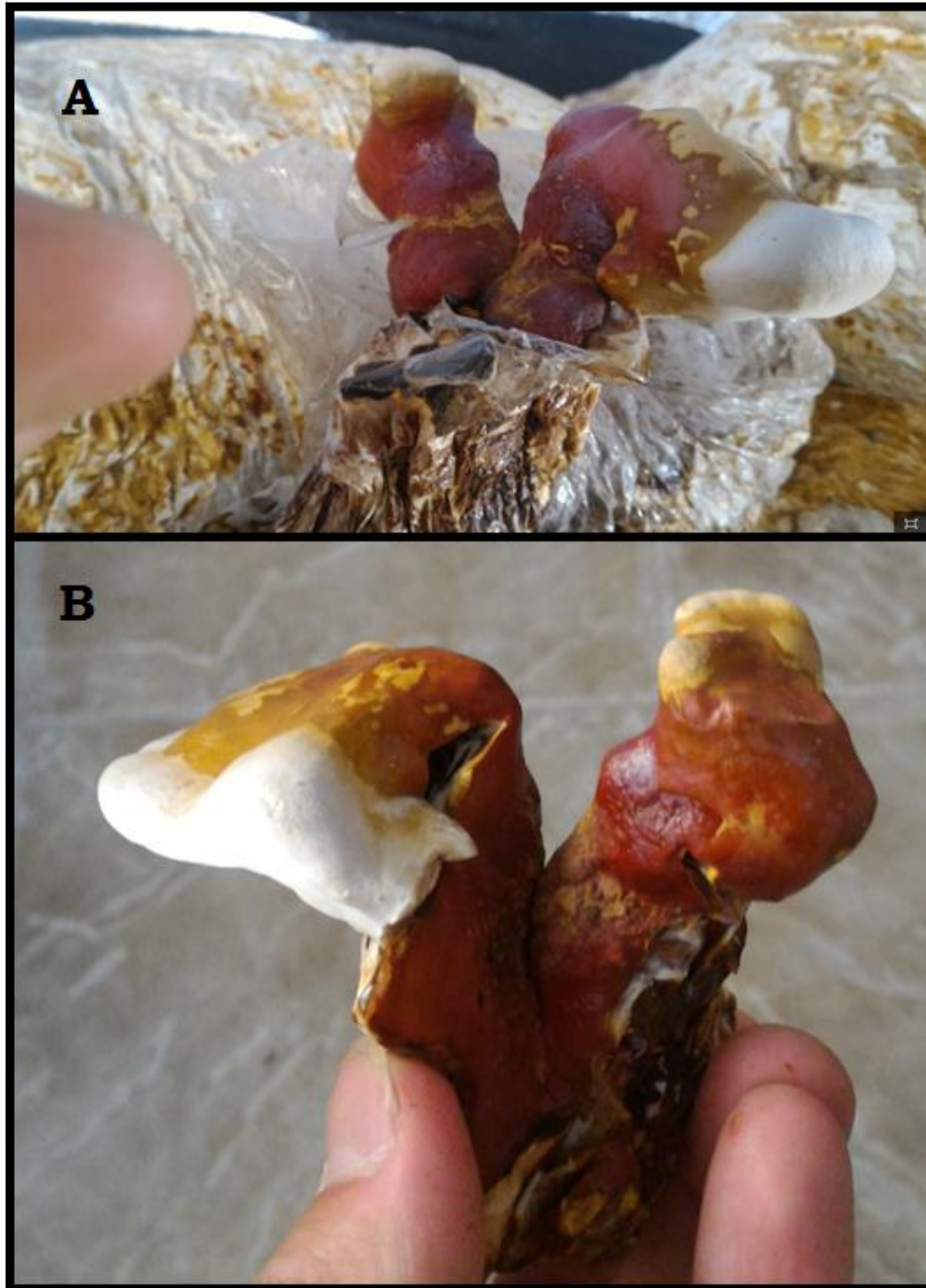


Figura 8. Primordios de *G. ecuadoriense* obtenidos con el tratamiento adicional. A) Se puede observar el cuerpo más pesado del estudio anclado a su funda de fructificación. B) Acercamiento del mismo hongo obtenido.

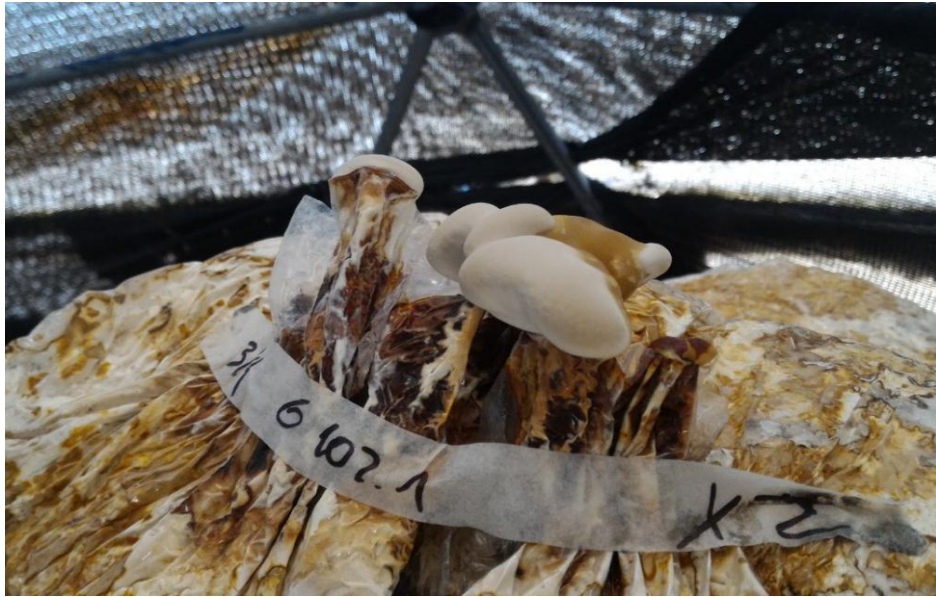


Figura 9. Cierre de la funda de fructificación del tratamiento adicional con primordios en desarrollo.

9. TABLAS

Tabla 1. Variables del estudio con sus respectivos niveles.

Sustrato		Área de exposición		Maduración	
A0	Control	B0	20,27cm ²	C0	15 días
A1	MnS04	B1	81,07cm ²	C1	30 días
A2	Melaza	B2	182,41cm ²	C2	45 días

Tabla 2. Codificación de los 27 tratamientos tras el ordenamiento factorial 3x3x3. A corresponde al tratamiento de composición de cultivo, B al área de contacto para intercambio gaseoso, y C al tiempo de maduración del micelio.

A0 B0 C0	A1 B0 C0	A2 B0 C0
A0 B0 C1	A1 B0 C1	A2 B0 C1
A0 B0 C2	A1 B0 C2	A2 B0 C2
A0 B1 C0	A1 B1 C0	A2 B1 C0
A0 B1 C1	A1 B1 C1	A2 B1 C1
A0 B1 C2	A1 B1 C2	A2 B1 C2
A0 B2 C0	A1 B2 C0	A2 B2 C0
A0 B2 C1	A1 B2 C1	A2 B2 C1
A0 B2 C2	A1 B2 C2	A2 B2 C2

Tabla 3. Tratamientos con los primeros primordios de *G. ecuadoriense* en aparecer.

Tratamiento	No. de Fundas con primordios	No. de días desde la fase de incubación	No. de días desde la fase de invernadero
A0 B0 C0	1	59	25
A0 B0 C1	2	59	10
A1 B1 C1	1	59	10
A2 B0 C1	1	59	10

Se contó con cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 4. Peso de los primordios de *G. ecuadoriense* para todos los tratamientos, después de la eliminación del tratamiento B2.

Tratamiento	Peso total (g)	Promedio total (g) ^a	N° de fundas con primordios	Promedio específico (g) ^b
A0	19,50	1,08	10	1,95
A1	42,00	2,33	8	5,25
A2	35,6	1,98	11	3,24
B0	74,00	2,06	18	4,11
B1	23,10	0,64	11	2,10
C0	12,3	0,68	7	1,76
C1	56,7	3,15	14	4,05
C2	28,1	1,56	8	3,51

^a El promedio total fue calculado al dividir el peso total, para nueve, que fue el número total de fundas por tratamiento.

^b El promedio específico fue calculado al dividir el peso total para número de fundas con primordios. Los datos coloreados en verde corresponden a los tres tratamientos con pesos de primordios más altos.

Tabla 5. Resultados del ANOVA (nivel de significancia 0.05) de todos los tratamientos para la optimización del cultivo de *G. ecuadoriense*.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	220,122 ^a	17	12,948	1,692	0,073
Interceptación	130,950	1	130,950	17,108	0,000
A	11,200	2	5,600	,732	0,486
C	42,208	2	21,104	2,757	0,072
B	35,983	1	35,983	4,701	0,035 ^a
A * C	71,108	4	17,777	2,322	0,068
A * B	7,252	2	3,626	,474	0,625
C * B	5,434	2	2,717	,355	0,703
A * C * B	46,936	4	11,734	1,533	0,206
Error	413,338	54	7,654		
Total	764,410	72			
Total corregido	633,460	71			

^aEl tratamiento B obtuvo diferencias significativas en este análisis.

Tabla 6. Análisis post hoc de tratamientos A y C para la optimización del cultivo de *G. ecuadoriense*.

		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
A						
0	1	-,938	,7987	,474	-2,862	,987
	2	-,671	,7987	,680	-2,596	1,254
1	0	,938	,7987	,474	-,987	2,862
	2	,267	,7987	,940	-1,658	2,191
2	0	,671	,7987	,680	-1,254	2,596
	1	-,267	,7987	,940	-2,191	1,658
C						
0	1	-1,850	,7987	,062	-3,775	,075
	2	-,658	,7987	,690	-2,583	1,266
1	0	1,850	,7987	,062	-,075	3,775
	2	1,192	,7987	,303	-,733	3,116
2	0	,658	,7987	,690	-1,266	2,583
	1	-1,192	,7987	,303	-3,116	,733

^aNo hubo diferencias significativas.

Tabla 7. Pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para los factores A, B y C para la optimización del cultivo de *G. ecuadoriense*.

		Mann-Whitney			Kruskal-Wallis			
		Sig.	W de Wilcoxon	U de M- W	Z	Sig.	gl	X ²
Factores A						0,701	2	0,71
B ^a		0,062	1167	501	-1,866			
C						0,028 ^b	2	7,173

^aLa prueba de Kruskal-Wallis solo puede realizarse con factores de por lo menos tres niveles, el factor B que tenía dos niveles tras la eliminación de B2, fue analizado con la prueba de Mann-Whitney. ^b El factor C mostró diferencias significativas.

Tabla 8. Días transcurridos durante el proceso de cultivo del bloque de tratamientos C y el tratamiento adicional.

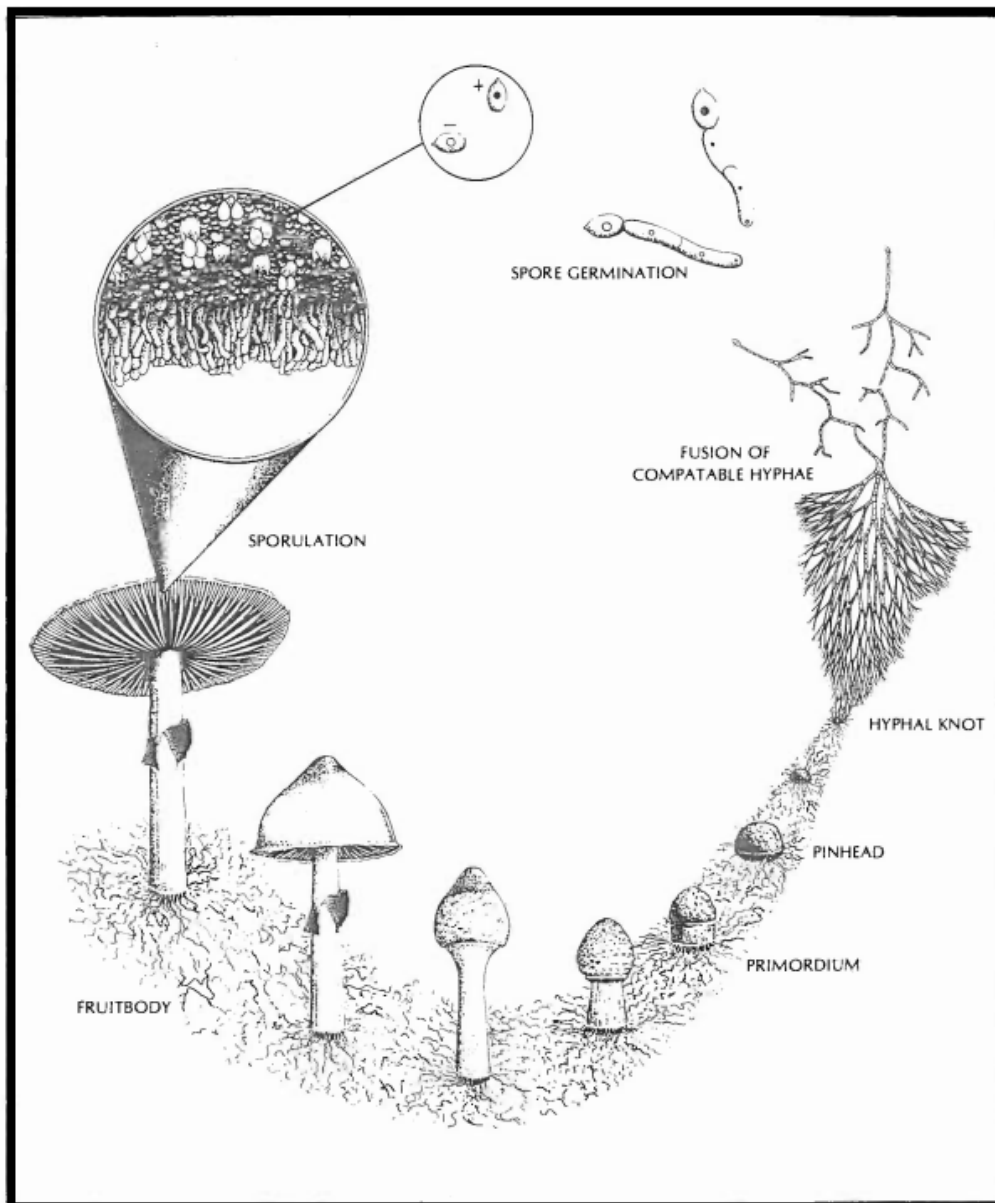
Etapa de cultivo	Procesos	Tratamientos			
		C0	C1	C2	Adicional
Semilla de grano	Inoculación	0	0	0	0
	Tiempo de colonización	28	28	28	28
	Tiempo de maduración	3	3	3	35 ^a
Fundas de fructificación	Inoculación	0	0	0	0
	Tiempo de colonización	19	19	19	17
	Tiempo de maduración	16	30	45	26 ^b
Total de días hasta:	La Cosecha (10/8/2016)	162	162	162	162

^aLas semillas del tratamiento adicional maduraron por 35 días.

^b El tratamiento adicional tuvo casi el mismo tiempo de maduración que C1.

10. ANEXOS

Anexo 1. Esquema del ciclo biológico de un hongo.



Tomado de Stamets & Chilton (1983).

Anexo 2. Protocolo de cultivo de hongos de la granja IntiWasi.

El cultivo se compone de cuatro procesos principales:

1. **Preparación de caldos de cultivo.** Un medio nutritivo líquido y autoclavado es inoculado con el micelio del hongo de interés.
2. **Preparación de semilla en grano.** Se autoclava una funda de polifan con aproximadamente 1 Kg de granos de avena. Enfría y luego es inoculada con el caldo de cultivo previamente colonizado por micelio.
3. **Preparación de fundas de fructificación.** Las fundas son pasteurizadas (se coloca una malla metálica de 20 cm de altura dentro de un tanque de metal y se llena con agua hasta el nivel de la malla, encima se colocan las fundas de fructificación y se aplica fuego por dos horas y media) y después inoculadas con la semilla en grano colonizada por el micelio del hongo de interés. Las fundas son incubadas en un cuarto oscuro con un 20% de humedad relativa y un rango de temperatura de 20 a 28°C.
4. **Fructificación.** Una vez que las fundas de fructificación son colonizadas por completo, se las lleva a un invernadero con humedad relativa de 90 – 95% y un rango de temperatura diurna de 25 a 35°C y nocturna de 17 a 20°C. Los hongos fructifican y el tiempo de cosecha depende de la especie cultivada, de una a dos semanas con hongos ostra, y un mes y medio aproximadamente con cepas comerciales de Reishi.

Anexo 3. Resumen del proceso de cultivo.



1) La cepa fue reactivada en PDA. 2) Con la caja Petri colonizada se preparan caldos. 3) Con caldos de cultivo colonizados se prepara semilla de grano. 4) Con la semilla de grano colonizada se inoculan fundas de fructificación. 5) Las fundas colonizadas son enviadas a un invernadero para que fructifiquen.

Anexo 4. Tabla comparativa del cultivo analizado en este estudio de la cepa de *G. ecuadoriense* y de una cepa comercial de *Ganoderma*.

	Tiempo de aparecimiento de primordios (días)	
Cultivo y Cepas	Colonización de fundas de fructificación	^a Aparecimientos de primordios
Cultivo de la empresa IntiWasi, de la cepa ecuatoriana G 102.1 de <i>G. ecuadoriense</i>	20	90
Cultivo de la cepa G 102.1 de <i>G. ecuadoriense</i> analizado en este estudio	19	59 ^b
Cultivo de la cepa comercial G 217 de <i>G. lucidum</i>	10	40

^a El tiempo es calculado desde la inoculación de las fundas de fructificación. ^b En el presente estudio se obtuvieron primordios 31 días antes que el cultivo de la empresa IntiWasi. El origen de los tiempos fue proporcionado por la empresa IntiWasi.

Anexo 5. Sustratos utilizados en el estudio.

SIMBOLOGÍA	Detalle	CONTENIDO
A0	Control	500 g de viruta, 150 g de aserrín, 80 g de afrechillo, 45g de polvo de yeso, 730 ml de agua y 1,66 ml de melaza.
A1	(MnSO ₄) adicional	500 g de viruta, 150 g de aserrín, 80 g de afrechillo, 45g de polvo de yeso, 730 ml de agua y 4 g de (MnSO ₄).
A2	Melaza adicional	500 g de viruta, 150 g de aserrín, 80 g de afrechillo, 45g de polvo de yeso, 730 ml de agua y 5 ml de melaza.

Anexo 6: Invernadero de la empresa IntiWasi ubicado en Tumbaco, Ecuador.



Anexo 7. Humidificación por ultrasonido.



En la imagen se puede observar al micólogo Paul Stamets, sosteniendo una funda de fructificación de *G. lucidum* en un invernadero que utiliza un sistema de humidificación por ultrasonido.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Bryan Nelson Dueñas Ormaza, C.I. 1720622552 autor del trabajo de Graduación titulado: “Optimización del cultivo de una cepa ecuatoriana de *Ganoderma ecuadoriense*, mediante el análisis de sustrato, oxigenación y maduración de micelio”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT con formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, ___ de _____ del 2016

Bryan Nelson Dueñas Ormaza

C.I. 1720622552