

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA



**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR**

EVALUACIÓN DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA ELABORACIÓN DE MICELIO DEL HONGO OSTRAL BLANCO (*Pleurotus Ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., EN LABORATORIO.

DOCUMENTO FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA.

AUTORA:

Katiushka Susana Padilla Erazo

TUTOR:

Ing. Mg. Jorge Enrique Dobronski Arcos

CEVALLOS - ECUADOR

2023

APROBACIÓN

EVALUACIÓN DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA ELABORACIÓN DE MICELIO DEL HONGO OSTRA BLANCO (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., EN LABORATORIO.

REVISADO POR



.....
Ing. Mg. Jorge Enrique Dobronski Arcos

TUTOR

**EVALUACIÓN DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA
ELABORACIÓN DE MICELIO DEL HONGO OSTRA BLANCO (*Pleurotus
ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., EN LABORATORIO.**

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha:

.....

14/03/2023

Ing. Patricio Núñez Torres, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....

14/07/2023

Ing. Michel Leiva. Dr.C.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

14/07/2023

PhD Rafael Mera

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

La suscrita, **KATIUSHKA SUSANA PADILLA ERAZO**, portador de la cédula de identidad número: 180491463-6, libre y voluntariamente declaro que el informe Final del Proyecto de investigación titulado “**EVALUACIÓN DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA ELABORACIÓN DE MICELIO DEL HONGO OSTRA BLANCO (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., EN LABORATORIO.**”

Es original, auténtico y personal.

En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....
KATIUSHKA SUSANA PADILLA ERAZO

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este informe final del Proyecto de investigación titulado “**EVALUACIÓN DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA ELABORACIÓN DE MICELIO DEL HONGO OSTRA BLANCO (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., EN LABORATORIO**”, como requisito previo a la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizó a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



.....
KATIUSHKA SUSANA PADILLA ERAZO

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada:

Primero a Dios por darme la vida, la fuerza, la sabiduría y la capacidad para seguir en cada camino propuesto. Y por estar ahí para refugiarme en los momentos que más necesite de él.

A mi madre Paola Erazo que, con su constante esfuerzo, dedicación de arduos años, su apoyo incondicional hasta lograr mis objetivos, hoy se puede llevar a cabo lo aspirado agradeciéndole por cada enseñanza por cada momento compartido y por cada paso que me acompañó a lograr, hoy se pudo lograr lo anhelado.

A mi padre Kléber Padilla, a mis hermanas Mishell, Karina, Kerly, Kléber y Kenneth que de alguna u otra forma estuvieron presentes en esta etapa y en el desarrollo de este proyecto con sus consejos y con su apoyo cuando más lo necesite.

A mi hija Ángela Sofía, que con su llegada me inspiro a no rendirme y a luchar con más fuerza para terminar mi carrera.

A mi esposo Ángel Lloacana que estuvo presente desde el inicio hasta el final cuidándome, apoyándome, guiándome por el buen camino, por sus consejos que me ayudaron mucho en mi proceso académico hoy le puedo decir se logró.

A mis suegros que estuvieron prestos con sus consejos y creyeron en mí.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios por la oportunidad de estudiar y brindarme la inteligencia y así llegar hasta el final de esta carrera universitaria, donde me permitió obtener conocimiento permitiéndome culminar esta etapa.

A mis padres que me brindaron la confianza desde el inicio hasta el final y su apoyo incondicional convirtiéndose en el pilar fundamental en mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato especialmente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por brindarme el conocimiento por parte de todo el personal docente para formarme como una profesional.

Al Ing. Mg. Jorge Dobronski A, tutor de este trabajo de investigación, quien con su experiencia permitió lograr la culminación del mismo.

Al Ing. Luciano Valle por brindarme su apoyo, darme la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y su experiencia para poder culminar mis estudios con éxito.

De igual manera un agradecimiento a todas las personas que estuvieron presentes y me brindaron su apoyo en el transcurso de mi vida universitaria, ya que con su apoyo se pudo culminar una meta más.

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I	13
INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	15
1.2 OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
1.3 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL	18
1.3.1 Hongo ostra blanco (<i>Pleurotus ostratus</i>).....	18
1.3.2 Importancia.	18
1.3.3 Generalidades	18
1.3.4 Clasificación taxonómica.	19
1.4 CEBADA (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	20
1.4.1 Origen.....	20
1.4.2 Importancia.	20
1.4.3 Generalidades	20
1.4.4 Clasificación taxonómica.	21
1.4.5 Propagación.	21
1.5 FACTORES REQUERIDOS PARA EL MEDIO DE CULTIVO.	21
1.5.1. Parte vegetativa del hongo.....	21
1.5.2. Trigo (<i>Triticum</i>).	21
Propiedades: El trigo tiene como un nivel de gluten y humedad lo que favorece al uso de forrajes para mantener la humedad en los terrenos o ciertos cultivos, también se lo ocupa para el desarrollo de flora bacteria en laboratorio.	22
1.5.4. Paja de trigo.....	22
1.5.5. Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	22
1.5.6. Malta.....	22
1.5.7. Agar - Agar.	22
1.5.8. Dextrosa.	23
1.5.9. Levadura.	23
1.6. CONDICIONES NECESARIAS PARA EL CULTIVO.....	23
1.6.1. Factores que intervienen en la elaboración de sustratos.....	24
CAPÍTULO II.....	25

METODOLOGÍA	25
2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	25
2.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	25
2.2.1 Condiciones dentro del laboratorio	25
2.3 EQUIPOS Y MATERIALES.....	25
2.3.1 Materiales.....	25
2.3.2 Equipos.....	26
2.4 FACTORES EN ESTUDIO.....	26
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	26
2.6 MANEJO DEL EXPERIMENTO	27
2.6.1 Medio de cultivo compuesto con extracto de papa, Agar, dextrosa y levadura.....	27
2.6.2 Medio de cultivo compuesto con extracto de malta y Agar.....	27
2.6.3 Medio de cultivo compuesto con extracto de trigo, extracto de malta, paja de trigo, Agar y dextrosa.....	27
2.6.4 Medio de cultivo compuesto de Agar- Agar.....	28
2.6.5. Obtención de micelio de hongo ostra blanco (<i>Pleurotus ostreatus</i>) (Jacq.) P. Kumm.....	28
2.6.6. Inoculación del hongo ostra blanco (<i>P. ostreatus</i>) y posterior obtención de la semilla (micelio).....	28
2.6.7. Sustrato para la obtención del hongo ostra blanco (<i>P. ostreatus</i>).....	28
2.7. VARIABLES RESPUESTAS.....	29
2.7.1. Crecimiento micelial.....	29
2.7.3. Crecimiento de los basidiocarpos.....	29
CAPÍTULO III.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.1 Selección del medio de cultivo que favorezca la prolongación de micelio in vitro de <i>P. ostreatus</i>.....	31
3.2 Inoculación de micelio producido in vitro sobre semillas de cebada para incrementar biomasa de <i>P. ostreatus</i>.....	33
3.3 Inoculación de micelio producido in vitro sobre semillas de cebada para incrementar biomasa de <i>P. ostreatus</i>.....	35
3.4 Crecimiento de basidiocarpos	37
CAPÍTULO IV	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
4.1 CONCLUSIONES.....	39
4.2 RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Elaboración de medios de cultivo	38
Anexo 2: Esterilización de los medios de cultivo.	39
Anexo 3: Distribución de medios de cultivo.....	39
Anexo 5: Cajas Petri con micelio.....	40
Anexo 6: Siembra del micelio en semillas de cebada	41
Anexo 7: Análisis de variación de las diferentes variables.....	41
Anexo 8: Crecimiento micelial a los 20 días.	42
Anexo 9. Crecimiento de los basidiocarpos.	42
Anexo 10: Costo del experimento.....	43

RESUMEN

El trabajo se realizó en los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, con el propósito de evaluar distintos medios de cultivo *in vitro* para la elaboración de micelio del hongo ostra blanco (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., Los medios de cultivo utilizados fueron cuatro que dieron como resultado de cuatro repeticiones por cada medio de cultivo compuesto de Agar con extracto de malta; medio de cultivo compuesto de papa, Agar, dextrosa y levadura; medio de cultivo compuesto de extracto de trigo, extracto de malta, extracto de paja de trigo, Agar y dextrosa; medio de cultivo compuesto de Agar - Agar. Se utilizó el diseño de completamente al azar con cuatro repeticiones, los datos de las variables respuestas fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y aquellas variables que muestren diferencias significativas se someterán a la prueba de comparación de medias según Tukey al 5%, en la evaluación de los distintos medios se realizaron cuatro repeticiones de cada medio de cultivo elaborado y se pudo determinar que en el medio de Agar - Agar no se registraron diferencias, ya que una vez realizado el medio de cultivo y sembrado con un segmento del hongo ostra blanco (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., mostró crecimiento micelial con un promedio de 2,75 cm en los siguientes medios de cultivos: medio de cultivo compuesto de Agar con extracto de malta; medio de cultivo compuesto de extracto de malta, extracto de trigo, paja de trigo, Agar y dextrosa; medio de cultivo compuesto de Agar - Agar a los 20 días de permanecer en la incubadora, mientras que en otros medios de cultivo compuesto de papa, Agar, dextrosa y levadura a los 20 días se registraron resultados con un mayor crecimiento, ya que empezó a crecer el micelio con un promedio de 4,93 cm en el medio de cultivo compuesto de papa, Agar, dextrosa y levadura. Se procedió a realizar la siembra en semillas de cebada con ayuda de fundas plásticas de polietileno donde permanecieron en la incubadora envueltas con papel aluminio durante 20 días; una vez con la biomasa en cada funda se realizó la siembra del micelio en fundas con sustratos elaborados con semillas de cebada y con picadillo de paja, donde se observó el crecimiento de los basidiocarpos a los 20 días.

Palabras clave: basidiocarpos, medios de cultivo, sustratos

ABSTRACT

The work was carried out in the microbiology laboratories of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato, located in the Cevallos canton, Tungurahua province, with the purpose of evaluating different in vitro culture media for the elaboration of mycelium of the fungus. white oyster (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., The culture media used were four that resulted in four repetitions for each culture medium composed of Agar with malt extract; culture medium composed of potato, agar, dextrose and yeast; culture medium composed of wheat extract, malt extract, wheat straw extract, agar and dextrose; culture medium composed of Agar - Agar. The completely randomized design with four repetitions was used, the data of the response variables were subjected to analysis of variance (ANOVA) and those variables that show significant differences will be subjected to the comparison of means test according to Tukey at 5%, in For the evaluation of the different media, four repetitions of each elaborated culture medium were carried out and it was possible to determine that in the Agar - Agar medium no differences were registered, since once the culture medium was made and seeded with a segment of the oyster fungus white (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm., showed mycelial growth with an average of 2.75 cm in the following culture media: Agar culture medium with malt extract; culture medium composed of malt extract, wheat extract, wheat straw, agar and dextrose; Culture medium composed of Agar - Agar after 20 days of remaining in the incubator, while in other culture mediums composed of potato, Agar, dextrose and yeast, results were recorded with greater growth after 20 days, since it began to Grow the mycelium with an average of 4.93 cm in the culture medium composed of potato, agar, dextrose and yeast. Sowing was carried out in barley seeds with the help of polyethylene plastic bags where they remained in the incubator wrapped with aluminum foil for 20 days; once with the biomass in each bag, the mycelium was planted in bags with substrates made with barley seeds and with straw mince, where the growth of the basidiocarps was observed after 20 days.

Keywords: basidiocarps, culture media, substrates

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los hongos están implicados en diversos fenómenos biológicos y químicos vinculados a la desintegración de la materia orgánica, procesos industriales de fermentación, fabricación comercial de medicamentos, alimentación humana y los sistemas de producción agroforestal (Oca, 2012).

(Betancourt, 2013), mencionó que la producción de hongos ostra (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), es la segunda especie comercial de hongos comestibles más cultivada a nivel mundial; su denominación de hongo ostra es gracias a que su basidiocarpo posee una forma de concha espatulada que lo asemeja a una ostra, el género *Pleurotus* es el hongo xilotrófico más explotable, con valiosas propiedades biotecnológicas, médicas y nutricionales. Las características relevantes de este género es que al explotarlo de manera industrial su costo de elaboración es bajo, ya que se pueden utilizar sustratos diferentes como desechos orgánicos que generalmente se producen luego de una cosecha como por ejemplo bagazos, pajas o aserrín.

Imbaquingo (2012), observó que los hongos desde hace mucho tiempo han tenido una gran importancia en la dieta de los humanos, estos se han usado como alimento mucho antes de que el ser humano apreciara con otros organismos, es decir que estos vienen a ser una de las primeras comidas consumidas, de esta manera se hanpreciado como una comida exótica. Los hongos se han considerado como un suplemento esencial para combatir la desnutrición y como una potencial cura para el cáncer, de esta manera se busca introducir los hongos ostra a un mercado en el cual su ventaja sea continua y que satisfaga la demanda.

(Vasquez, 2017), comentó que este hongo es un alimento que puede sustituir la carne de res, ya que con su sabor y aroma se presta para la elaboración de gran variedad de platos aportando un valor nutricional al consumidor. Este hongo aporta proteínas, vitaminas y minerales, ya que ayuda al organismo consumir un bajo contenido de grasa, haciéndolo importante como un recurso alimenticio, de esta manera se busca conseguir el micelio del mismo en un laboratorio que tenga las condiciones adecuadas para su elaboración. En esta etapa la siembra del micelio o inoculación debe poseer condiciones favorables donde crecerá y fructificará el hongo. El inóculo lo compone un sustrato donde crecerá el micelio del mismo. Como sustratos intermedios se pueden utilizar: sorgo, trigo o aserrín, dependiendo del tipo de hongo. Según (Flores & Oca, 2012), el micelio se obtiene depositando fracciones del cultivo de la cepa obtenido anteriormente sobre el sustrato intermedio como el aserrín húmedo. De este modo se tendrá suficiente cantidad de sustrato impregnado con el micelio para propagar cantidades proporcionalmente mayores del mismo.

Villarroel (2019), afirmó que aunque en algunos países sean escasos los proveedores para la producción del inóculo; esto hace que el interesado que quiera cultivar setas pueda comprar el inóculo como si fueran semillas de plantas e iniciar el proceso preparando los sustratos ya mencionados, debido a la complejidad de sustratos sobre los cuales pueden crecer los hongos en este caso el hongo ostra blanco (*P. ostreatus*), es posible aprovechar diversas materias primas dependiendo su reserva en diferentes regiones del país. El proceso de preparación consiste en humectarlos, desinfectarlos con el propósito de eliminar microorganismos que puedan competir con el crecimiento de *P. ostreatus*, y brindar condiciones de humedad que favorezcan el desarrollo de las setas. El proceso de humectación puede realizarse adicionando agua., también se puede ocupar agua destilada para un mejor rendimiento y crecimiento.

La inoculación de un sustrato consiste en mezclar el inóculo producido o adquirido en el mercado; con el sustrato seleccionado. El sustrato inoculado se acondiciona en contenedores que pueden ser bolsas, tocones de árboles o bandejas, donde crecerá el micelio y emergerán finalmente los carpóforos del hongo (Villarroel 2019). Según (Imbaquingo 2012), la cantidad de inóculo a utilizar depende de la especie que se quiera producir, pero generalmente se calcula con base al peso húmedo del sustrato a utilizar. Regularmente la cantidad de inóculo oscila entre 2 y 10 por ciento de su peso

húmedo. Durante el proceso de cultivo, la fase de inoculación es importante ya que se requiere de un buen manejo del sustrato y micelio para no tener problemas de contaminación en la siguiente fase de incubación.

Según **Paredes (2020)**, la incubación es la etapa que permite la colonización del sustrato por el hongo, en condiciones de temperatura, iluminación, ventilación y humedad óptimas, para obtener la mayor tasa de crecimiento posible; así mismo, influyen en el desarrollo del micelio, el vigor de la cepa, adaptación de la cepa, cantidad del inóculo y sustrato utilizado. El área de incubación debe ser un ambiente aséptico con bancales, literas y/o estructuras específicas para colocar los contenedores. En esta etapa es conveniente monitorear la invasión del micelio. Todo contenedor que presente coloraciones y olores que no son característicos del hongo, deben descostarse inmediatamente del área de incubación a fin de evitar el avance de contaminantes al resto de contenedores.

Con base en lo antes mencionado el micelio que se haya colonizado en el sustrato se deben cambiar las condiciones ambientales mantenidas durante la fase de incubación a efecto de inducir el brote y crecimiento de los primordios. La fase de fructificación inicia con la aposición de pequeños corpúsculos en zonas de crecimiento crítico del micelio, llamados primordios. Durante esta etapa, la aplicación de riego es importante para mantener alto porcentaje de humedad en el ambiente. Los carpóforos no se obtienen todos a la vez, generalmente se producen en series, separadas por períodos cortos de crecimiento micelial, formación y desarrollo de nuevos primordios (**Sisa, 2017**).

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Pascolini (2013), mencionó que las características fenotípicas como: el aspecto, el color, las cualidades gustativas, el modo de crecimiento de los basidiocarpos, la adaptación a cada tipo de sustrato o condiciones de cultivo, el rendimiento, la precocidad, la aptitud a la cosecha mecánica, la tasa de desecho posterior a la cosecha, la resistencia a los parásitos se determina con mucho cuidado según la variedad del banco de cepas. En este caso el hongo a obtener es el hongo ostra blanco (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm.

Sisa (2017), evaluó que el cultivo de tejidos es una técnica para aislamiento de cepas y por ello, también una forma de conservación del recurso fúngico. La conservación se refiere al mantenimiento en condiciones óptimas del material genético proveniente de clones silvestres, híbridos, cepas comerciales, o cualquier otro material valioso. Requiere de una metodología confiable, sencilla y lo más barata posible que asegure, no solo la conservación de las características genéticas de las cepas, sino también su vitalidad. Por esta situación, la técnica de conservación empleada debe estar establecida de manera perfectamente clara y definida para el laboratorio, para que no haya dudas ni errores, aun cuando cambie el personal que se encarga de la conservación.

(Calero, 2018), mencionó que los cultivos aislados de esporas difieren genéticamente del cultivo de tejidos. Los cultivos que se originan de esporas son impredecibles ya que cuando germinan resultan en muchas combinaciones genéticas diferentes. Estas combinaciones son deseables cuando se trata de desarrollar una nueva cepa, pero indeseables cuando se trata de mantener una cepa específica. Un segmento cultivado es esencialmente un clon del hongo. Un clon se define como un duplicado idéntico de un organismo. Para obtener cultivos axénicos, varios tipos de medios pueden ser utilizados.

Belobrajdic (2007), recomienda que durante la inoculación se tome el tubo con la mano izquierda y se sostenga el tapón de algodón entre el meñique y la palma de la mano derecha. No se deben dejar nunca los tapones ni las asas sobre la mesa de trabajo. Mantener el tubo lo más cerca posible de la horizontal durante la inoculación para evitar que microorganismos no deseados puedan ingresar por gravedad al cultivo y trabajar siempre en la zona cercana a la llama del mechero. Las bocas de los tubos y matraces de donde se toman los inóculos y de los que los van a recibirlo, deben flamearse, antes y después de introducir el asa o el bisturí. Además de destruir cualquier microorganismo que se encuentre en el borde del tubo, el flameado crea corrientes de convección hacia fuera del mismo disminuyendo el riesgo de contaminación, una vez que el micelio ha crecido, se selecciona aquel que posea mejor apariencia. El cultivo seleccionado es transferido varias veces a un medio fresco para revisar el crecimiento micelial y confirmar que sea normal (cultivo puro). Los cultivos puros o axénicos deben ser entonces probados en una siembra de validación, la cual consiste en sembrar el inóculo obtenido a partir del cultivo de tejido en un substrato definitivo para ratificar la productividad y la calidad del hongo.

(Heredia y Herrera, 2011), mencionaron que este método de cultivo es el que más se utiliza en todo el mundo; sin embargo, el tamaño, forma, número de fundas y los tiempos de cosecha son distintos en cada región. Las fundas usualmente tienen una forma tubular con pesos desde 500 g hasta 8 kg de sustrato. Algunos productores cultivan en una funda transparente, las dos primeras fundas son de polietileno transparente, y segunda funda negra para controlar de una forma más eficiente el ingreso de luz al sustrato. Además, el sustrato puede ser solo uno o más combinaciones. Una vez llenas las fundas, se procede a perforarlas con la ayuda de una herramienta punzante esterilizada, para permitir el intercambio gaseoso al sustrato y una adecuada respiración del hongo. Estas perforaciones se realizan en todas las paredes de la funda y después de 1 a 2 días de sembradas, estas son perforadas en la base para permitir la salida del agua acumulada. Con lo cual, se evita condiciones de anaerobiosis que provocan una fermentación láctica que inhibe el crecimiento de *Pleurotus*.

En este proyecto de tesis se colocaron dos libras de sustrato de cebada con paja de trigo en una funda de polietileno una vez sembrado el micelio se realizó una abertura en la funda para que se desarrolle el hongo y de ahí mismo colocar agua para mantenerlo húmedo, siguiendo las recomendaciones de (Flores y Oca, 2012).

La producción de hongos comestibles llega a ser una alternativa que se adapta a nuestro medio, ya que estos hongos poseen la capacidad de utilizar diferentes desechos para su alimentación, por ello se busca encontrar posibles medios y sustratos que ayudaran a la producción de *P. ostreatus*.

- **Hipótesis:** Mediante la selección de un medio de cultivo que favorezca la producción *in vitro* de micelio de *P. ostreatus* se podrá obtener suficiente inóculo a partir de semilla de cebada para producir artesanalmente en bolsas basidiocarpos con valor comercial.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la influencia de medios de cultivo en la producción de micelio como agente inoculante de semillas de cebada para la producción artesanal de hongo ostra blanco (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.) P. Kumm.

Objetivos específicos

- Seleccionar un medio de cultivo que favorezca la producción de micelio *in vitro* de *P. ostreatus*.
- Inocular el micelio producido *in vitro* en semilla de cebadas para incrementar la biomasa de *P. ostreatus*.
- Inocular la biomasa de *P. ostreatus* en bolsas con sustratos elaborados artesanalmente para la producción de biomasa comercial.

1.3.1 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL. Hongo ostra blanco (*Pleurotus ostratus*).

Este hongo tiene forma de sombrero a manera de abanico o de espátula y cuenta con unas laminillas decurrentes, otra característica es la situación del pie, excéntrico o incluso lateral, común a casi todas las especies de *Pleurotus* (Godoy, 2019).

1.3.2 Importancia.

Desde el punto de vista del valor alimenticio de las setas, los hongos son un alimento sabroso, nutritivo y bajo en calorías constituyendo una excelente opción alimentaria. Contienen entre el 10 - 40% de proteínas en base seca, mayores al de la mayoría de los vegetales, según Michel *et al* (2010), estas proteínas son de alta calidad debido a que contienen todos los aminoácidos esenciales, tales como, lisina, leucina, valina, isoleucina, entre otros. El hongo ostra es rico en carbohidratos, vitaminas, fibra y minerales; y, posee un bajo contenido de grasas.

1.3.3 Generalidades.

Los hongos son organismos con mayor reproducción en la naturaleza, pueden adaptarse a la vida terrestre, acuática y sus esporas son abundantes en el aire, pueden crecer sobre objetos inertes y sobre seres vivos. Son importantes degradadores de materia orgánica, su éxito se basa en su capacidad de adaptación ya que sobreviven y se reproducen en distintas temperaturas, diversas condiciones atmosféricas y en diferentes sustratos (Godoy, 2019).

1.3.4 Clasificación taxonómica.

Reino:	Fungi
Filo:	Basidomycota
Clase:	Homobasidomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Pleurotaceae
Género:	<i>Pleurotus</i>
Especie:	<i>ostreatus</i>

1.3.5 Propagación.

Para realizar la propagación del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) se la puede optar por la reproducción asexual:

Reproducción asexual.

Para la reproducción vegetativa se lo realiza mediante las esporas, estas esporas son células haploides producida por la mitosis de una célula progenitora haploide. Para ello se deben recoger las esporas con ayuda de una cartulina blanca o negra dependiendo de las laminillas del hongo, se realiza un agujero en la parte central de la cartulina luego se introduce el estípite del hongo, el estípite del hongo debe estar sumergido en agua o agua destilada (**Basantes, 2019**).

Cultivo *in vitro*.

Es un método heterogéneo que consiste en colocar células, una parte vegetativa en un medio de cultivo nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerara uno o más hongos. Se incubará en condiciones ambientales controladas para su desarrollo (**Oviedo et al., 2016**).

1.3 CEBADA (*Hordeum vulgare* L.).

1.4.1 Origen.

La cebada (*H. vulgare*) es una planta herbácea monocotiledónea anual que pertenece a la familia de las poáceas, su origen es la parte occidental de Asia. Es un cereal de gran importancia a nivel mundial, ya que alrededor de 86 países poseen este cereal. Por su gran adaptación a climas extremos, considerado como el cereal del invierno (**Rodríguez, 2015**).

1.4.2 Importancia.

La cebada es empleada para la elaboración de cerveza y la obtención de maltas, mientras que los excedentes se comercializan para la alimentación animal y humana. La forma de consumirla puede ser semimolida y se la conoce como arroz de cebada en sopas, o en forma de harina (machica) para realizar coladas que es habitual en el desayuno por el alto contenido de proteína y carbohidratos y bajo contenido en fibra (**Rodríguez, 2015**).

1.4.3 Generalidades.

La cebada (*H. vulgare*) o conocido como el cereal del invierno posee una amplia adaptación ecológica y a su diversidad de aplicaciones (**Canal, 2012**). Entre tanto, que la importancia social y económica de la cebada se basa en su uso diversificado como alimento para consumo humano. En la actualidad la Unión Europea es el mayor exportador de cebada y malta. Arabia Saudita, Japón y China son los mayores importadores de cebada del mundo.

En Ecuador el cultivo de la cebada es más amplio en la sierra ecuatoriana, su mayor área de producción es: Cotopaxi (2640ha), Carchi (2419ha). Pichincha (1197ha) e Imbabura (976ha), la cebada se cultiva para muchos propósitos, pero en su mayoría para el malteado y la producción de cerveza; y en menor cantidad como alimento humano, animal o semilla. Con este cereal se puede formar rollo, harinas o paleteado, los residuos se utilizan para la producción de alimentos balanceados que son utilizados para el pastoreo, corte, heno, forraje y como cama (**INEC-ESPAC, 2018**).

1.4.4 Clasificación taxonómica.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Hordeum</i>
Especie:	<i>Hordeum vulgare</i>

1.4.5 Propagación.

La cebada puede reproducirse por semilla, se la puede sembrar al voleo, arrojando la semilla o en líneas o por medios vegetativos empleando técnicas modernas para el desarrollo de esta planta. Su propagación también se realiza mediante cultivo *in vitro* con las anteras de cebada o con ayuda de ovarios sin fecundar, ya que representa una herramienta útil y de apoyo a los programas convencionales de mejoramiento genético de esta especie, con esta técnica se obtiene plantas exactamente iguales, en lo que la genética se refiere, esto ayudaría a una mejor producción de la cebada y por tanto a su comercialización (Enríquez, 2019).

1.4 FACTORES REQUERIDOS PARA EL MEDIO DE CULTIVO.

1.5.1. Parte vegetativa del hongo.

Los cultivos que se originan de esporas son impredecibles ya que cuando germinan resultan en diferentes combinaciones genéticas. Varios tipos de medios de cultivo pueden ser utilizados para el desarrollo de biomasa, a continuación, se mencionan algunos de los medios de cultivo que se usan frecuentemente para la conservación y propagación de cepas fúngicas (Sánchez, 2018).

1.5.2. Trigo (*Triticum*).

El trigo es una planta gramínea con espigas que se cultiva en climas subtropicales (verano), posee una forma ovalada que contiene proteínas y es consumido en forma de harinas. El trigo es conocido como la revolución verde.

Propiedades: El trigo tiene como un nivel de gluten y humedad lo que favorece el uso de forrajes para mantener la humedad en los terrenos o ciertos cultivos, también se lo ocupa para el desarrollo de flora bacteria en laboratorio (**Moreno, 2020**).

1.5.4. Paja de trigo.

El trigo es una planta gramínea que tiene como origen la antigua Mesopotamia. Se trata de una planta anual, ampliamente consumida por todo el mundo que nos da la posibilidad de ser usada en su totalidad ya que su paja es comercializada para un sinnúmero de productos como: alimento de ganado, para rellenos, para materia orgánica, etc.

Propiedades: La paja de trigo hoy en día es considerada como materia prima respetuosa al medio ambiente, permite la realización de relleno de compuestos termoplásticos como el polietileno, gracias a este material se reduce la fabricación de plásticos ayudando a la producción de plástico biodegradable, es usado también como alimento de ganado, para rellenos, para materia orgánica (**Klee, 2020**).

1.5.5. Papa (*Solanum tuberosum L.*).

La papa es un tubérculo que posee estolones agrandados, con una apariencia redondeada, pulpa blanca, rico en almidón, con un alto contenido de proteína y fibra, este alimento es consumido en todas partes del mundo. Se lo considera como uno de los alimentos más importantes en el mundo por la gran cantidad de nutrientes como: hierro, calcio, fósforo y vitamina C.

Propiedades: La papa aporta una gran cantidad de carbohidratos, almidón, proteínas, B6 y potasio. Por su contenido de almidón y la combinación de dextrosa promueve el crecimiento de levaduras y mohos; también se la puede utilizar para la identificación de hongos, mientras más bajo sea su pH ayudará a la inhibición de la flora bacteria (**Vásconez, 2018**).

1.5.6. Malta.

El extracto de malta contiene vitaminas B1, B2 y B3, que contribuyen al crecimiento y desarrollo esencialmente en niños; también está destinado para el uso bacteriológico para el desarrollo de hongos, levaduras y mohos en medios de cultivo de extracto de malta (**Ramírez, 2018**).

1.5.7. Agar - Agar.

El agar es un polisacárido que se obtiene a partir de algas marinas. El polvo resultante es utilizado para la elaboración de medios de cultivos vegetales, ya que posee propiedades gelificantes (**Dalmazzo, 2020**).

1.5.8. Dextrosa.

Muñoz et al. (2019), manifestaron que este compuesto químico es usado para microbiología, que consiste en una base usada como una fuente de hidratos de carbono para la fermentación y para la asimilación.

1.5.9. Levadura.

La levadura es un autolizado de células que contiene una porción saludable de vitamina y complejo B, promueve el desarrollo de hongos unicelulares por lo cual ayuda a la preparación de medios de cultivos microbiológicos en un laboratorio (**Cultivo, 2022**).

1.6. CONDICIONES NECESARIAS PARA EL CULTIVO DEL HONGO (*P. ostreatus*).

Ambiente: Para el crecimiento de los hongos, tanto en su fase vegetativa, como en la reproductiva, es importante contar con un ambiente apropiado, debido a que los hongos son muy susceptibles al ataque de plagas y enfermedades. Los factores ambientales que afectan el cultivo de hongos incluyen la temperatura, humedad, luz y aireación (**FAO, 2019**).

Temperatura: La temperatura óptima ambiental varía en las diferentes etapas del cultivo. En el estado vegetativo de crecimiento, los hongos necesitan una temperatura ambiental de 16 a 30°C; mientras que, en el estado reproductivo, la temperatura debe mantenerse entre 10 y 20°C. El micelio de los hongos no debe bajar de 5°C, ni subir de 40 ° C, debido a que a estas temperaturas el micelio moriría (**Baena, 2005**).

Humedad: El manejo adecuado de la humedad es uno de los factores más influyentes para que el cultivo sea resistente a las contaminaciones; y, para prevenir daños en la superficie del sustrato y de los cuerpos fructíferos. Se recomienda regar agua en pisos y en el aire, para aumentar la humedad relativa, no es aconsejable regar agua directamente sobre las fundas, pero, si se lo hace, se debe utilizar agua estéril, lo cual, garantiza un sustrato de calidad libre de patógenos. Un exceso de humedad causa deficiencias de oxígeno en el sustrato, lo que, entorpece el crecimiento vigoroso del micelio (**Dalmazzo, 2020**).

Iluminación: La fase de incubación del hongo no requiere de luz, esta debe ser en la oscuridad; sin embargo, la fase de fructificación requiere de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad según **Garzón y Cuervo (2008)**. La luz tiene relación con el color del hongo. Si la luz es insuficiente, el hongo genera un color blanco y troncos alargados. La ausencia

o poca cantidad de luz conlleva a una baja producción. Los hongos requieren iluminación indirecta (Vásquez, 2017).

1.6.1. Factores que intervienen en la elaboración de sustratos.

Un sustrato adecuado para el desarrollo y reproducción de hongo, debe tener propiedades nutricionales que ayuden al crecimiento y así poder aportar al hongo, con ello ayudamos a que el hongo posea un nivel bajo de posibles bacterias competidoras.

Según (Hernández, 2019.), los factores para obtener un sustrato en buenas condiciones para su uso deben contener:

- **Materia orgánica:** La mejor a utilizar es la paja en descomposición o el uso de semillas de cebada o trigo, que se encuentren limpias para obtener una descomposición de forma rápida.
- **Humedad:** para obtener resultados positivos, la humedad óptima se debe encontrar entre el 50 y 60%.
- **Temperatura:** lo adecuado es que el sustrato debe estar a una temperatura de 25°C y en oscuridad para el desarrollo de los hongos.
- **pH:** este factor es de mucha importancia debido a que ayuda a que la biomasa se desarrolle en óptimas condiciones, ya que un sustrato debe encontrarse en un pH de 5.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato perteneciente al sector Querochaca del cantón Cevallos, provincia de Tungurahua a 1° 22' 02" de latitud de Sur y 78° 36' 22" de longitud Oeste, a 2850 msnm (INAMHI, 2016).

2.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.

De acuerdo con los registros meteorológicos del promedio de cinco años de la Estación Meteorológica de la Granja Experimental Docente Querochaca, la precipitación anual es de 632 mm, con una temperatura media de 12,7°C y la humedad relativa de 76,1% con una velocidad de viento de 3,3 m/seg con dirección de Este a Oeste (INAMHI, 2016).

2.2.1 Condiciones dentro del laboratorio

Dentro del laboratorio en donde se desarrolló la investigación (Laboratorio de Microbiología), la temperatura fue de 25°C.

2.3 EQUIPOS Y MATERIALES.

2.3.1 Materiales.

- Agua destilada.
- Papel aluminio.
- Agar 100 g (Titan Media, en polvo).
- Papa 200 g.
- Extracto de Malta 20 g (SweetMaltasa, en polvo).
- Dextrosa 30 g (C₆H₁₂O₆) (ROYAL COMMAND).
- Bisturí.
- Pinzas de disección de acero inoxidable.
- Pipetas (KUBUS).
- Papel filtro (WHATMAN N°2).
- Alcohol al 96%.
- Semillas de cebada 16 lb (Variedad Cañicapa).
- Semillas de trigo 400 g (Variedad Atacazo).
- Paja de trigo 100 g.

- Levadura 175 g (Levapan, en polvo).
- Cajas de Petri (BIOLOGIX, de 90 mm x 15 mm, plástica).
- Mechero de alcohol.
- Probeta (Pyrex, 100 ml).
- Vaso de precipitación (Pyrex, 1000 ml).
- Fundas de Polietileno 16 cm x 16 cm.
- Gotero.
- Regla de 30 cm (Apolo).

2.3.2 Equipos.

- Balanza analítica (EURO TECH - JF 2204).
- Matraz Erlen Meyer (Pyrex).
- Autoclave (M11 ultra clave).
- Cámara de flujo laminar (BIOBASE).
- Incubadora (BIOBASE).
- Medidor de pH (HANNA HI-5221).
- Cámara fotográfica (Canon 2000d).
- Destilador de agua (CWS - 43.5 LIT SIN TANQUE - Balta la).

2.4 FACTORES EN ESTUDIO.

- M1: Medio de cultivo compuesto con extracto de malta y agar.
- M2: Medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura.
- M3: Medio de cultivo compuesto de extracto de malta, extracto de trigo, paja de trigo, agar y dextrosa.
- M4: Medio de cultivo compuesto de agar.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.

En el presente estudio se utilizó un diseño de completamente al azar con cuatro repeticiones, los datos de las variables respuestas fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y aquellas variables que muestren diferencias significativas se sometieron a la prueba de comparación de medias según Tukey al 5%, usando el programa estadístico INFOSTAT 2017.

2.6 MANEJO DEL EXPERIMENTO.

2.6.1 Medio de cultivo compuesto con extracto de papa, agar, dextrosa y levadura.

Para la obtención del extracto, se escogió la papa más sana, se procedió a lavar, pelar y a cortar en cubos pequeños, seguidamente se puso en cocción en 50 ml de agua destilada durante 10 - 15 min. El extracto se filtró en papel filtro y se adicionó agua hasta ajustarlo a 100 ml. En esta misma solución se agregó 15 g de agar, 2 g de levadura y 20 g de dextrosa. Se calentó a fuego lento moviendo constantemente durante 1-2 min, se verificó que su pH este en 5.5 a 25°C. Luego se colocó en el Matraz ErlenMeyer se lo tapó con papel aluminio y se esterilizó a 15 PSI por 15 min en el autoclave (M11 ultra clave).

De los 100 ml de solución se tomaron 70 ml y se distribuyeron en cuatro cajas Petri de 90 mm.

2.6.2 Medio de cultivo compuesto con extracto de malta y agar.

Para su elaboración se tomaron 10 g de extracto de malta y 15 g de agar, se mezclaron con 100ml de agua destilada, todo esto se calentó en fuego lento hasta que se disuelvan totalmente los ingredientes, con un medidor de pH se verificó que la solución alcanzara un pH de 5.5 a 25°C; cuando la solución estuvo diluida se tapó con papel aluminio y se esterilizó a 15 PSI por 15 minutos en el autoclave (M11 ultra clave).

De los 100 ml de solución se tomaron 70 ml y se colocaron en cuatro cajas Petri de 90 mm.

2.6.3 Medio de cultivo compuesto con extracto de trigo, extracto de malta, paja de trigo, agar y dextrosa.

Para la obtención del extracto de trigo se lavó y se hirvió con un litro de agua destilada, hasta que el trigo comenzó a cambiar de color, luego se realizó lo mismo con la paja de trigo. Se filtraron ambos extractos donde se ocupó 50 ml de cada uno. A esta mezcla se añadieron 10 g de extracto de malta, 15 g de Agar y 10 g de dextrosa, se verificó que la solución alcanzara un pH de 5.5 a 25°C. Se procedió a calentar a fuego lento hasta diluir completamente, se tapó con papel aluminio y se esterilizó a 15 PSI por 15 minutos en la autoclave.

De los 100 ml de solución se tomaron 70 ml y se colocaron en cuatro cajas Petri de 90 mm.

2.6.4 Medio de cultivo compuesto de Agar- Agar.

Se tomaron 100 ml de agua destilada y se colocaron 20 g de Agar previamente pesados en la balanza analítica, se calentó a fuego lento hasta lograr una suspensión homogénea, se verificó que la solución se encontraba con un pH de 5.5 a 25°C, se tapó con papel aluminio y se esterilizó a 15 PSI por 15 minutos en la autoclave.

De los 100 ml de solución se tomaron 70 ml y se colocaron en cuatro cajas Petri de 90 mm.

2.6.5. Obtención de micelio de hongo ostra blanco (*Pleurotus ostreatus*).

Previamente se realizó la limpieza y desinfección con alcohol en la cámara de flujo laminar; en condiciones de asepsia y con ayuda de mecheros y el medio de cultivo tibio se vertió en las cajas Petri con: cuatro repeticiones de extracto de malta con agar; cuatro repeticiones de extracto de papa, agar, dextrosa y levadura; cuatro repeticiones de extracto de trigo, extracto de malta, paja de trigo, agar y dextrosa. Se procedió a etiquetar cada repetición y se dejó gelificar por dos días en la incubadora cubiertas con papel aluminio. Luego en la cámara de flujo laminar se colocó 0,1 g de hongo ostra blanco (*P. ostreatus*), para finalmente colocar cinta de sellado y dejar por 20 días a 25°C en la incubadora.

2.6.6. Inoculación del hongo ostra blanco (*P. ostreatus*) y posterior obtención de micelio.

Para la inoculación se utilizó el micelio desarrollado en el medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura que tuvo mayor diámetro de crecimiento micelial, este se cortó en fragmentos con un bisturí previamente flameado y desinfectado con alcohol y con una aguja de disección se tomó cada una de los fragmentos de micelio y se colocaron en una funda de polietileno que contenía ½ libra de semillas de cebada (previamente lavadas con agua destilada), se realizó un nudo dejando con un poco de aire. Se incubó a 25°C en la oscuridad hasta que la biomasa cubra totalmente la cebada a los 20 días el inóculo estuvo listo.

2.6.7. Sustrato para la obtención del hongo ostra blanco (*P. ostreatus*).

El sustrato se elaboró con semillas de cebada y paja de trigo previamente lavadas y desinfectadas, se procedió a picar la paja; posteriormente se dejó por tres días hasta que las semillas y la paja se encontraran humedecidas a partir de eso se procedió a colocar en una funda de polietileno el sustrato y la biomasa, se realizó una abertura en la funda para el crecimiento del hongo ostra blanco (*P. ostreatus*).

2.7. VARIABLES RESPUESTAS.

2.7.1. Crecimiento micelial.

Esta variable se midió su diámetro de cada caja Petri con ayuda de una regla, ubicándola desde donde había crecimiento micelial a los 20 días.



2.7.2. Crecimiento de los basidiocarpos.

Para la obtención de estos datos se midió las dimensiones de los basidiocarpos que crecieron en el sustrato con una regla milimetrada a los 20 días.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección del medio de cultivo que favorezca la prolongación de micelio in vitro de *P. ostreatus*.

Los datos registrados del crecimiento micelial en las cuatro repeticiones de los cuatro medios de cultivo a los 20 días de la incubación, cuyo diámetro van entre los 3 cm hasta los 5,5 cm en las cajas Petri. El análisis de varianza para la lectura a los 20 días se presenta en el cuadro 1.

CUADRO 1. Análisis de varianza para la variable de crecimiento micelial a los 20 días.

Fuente de Variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F	Valor-P
Modelo	14,66	3	4,89	17,06	0,0001
Medios	14,66	3	4,89	17,06	0,0001
Error	3,44	12	0,29		
Total	18,09	15			

ns = no significativo

* = significativo al 5%

CV = 16,37

El medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura fue donde se determinó un mayor crecimiento micelial. Con 4.93 cm estadísticas significativas respecto al resto de los tratamientos.

TABLA 1. Prueba de tukey al 5% para el crecimiento micelial en cm.

MEDIOS	PROMEDIOS	RANGO
- Medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura.	4,93	A
- Medio de cultivo compuesto de agar con extracto de malta.	2,75	B
- Medio de cultivo compuesto de extracto de malta, extracto de trigo, paja de trigo, agar y dextrosa.	2,75	B
- Medio de cultivo compuesto de agar – agar.	2,75	B

El medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura obtuvo resultados favorables para esta investigación ya que este medio presento más micelio en las cajas Petri, crecimiento de biomasa en fundas de polietileno y crecimiento de los basidiocarpos en sustratos dando a entender que esta combinación de papa, dextrosa y levadura hace que exista un crecimiento satisfactorio del micelio ya que posee un alto contenido de glucosa y bajo pH, mientras que el agar es quien brinda la consistencia al medio.

Oviedo (2016), obtuvo resultados similares al evaluar tres medios de cultivos para la elaboración de micelio de *P. ostreatus*; con quinua, papa y malta por cultivo *in vitro*, dando como resultados en el medio de cultivo con papa un promedio de 4,82 cm a los 25 días y se menciona que estos resultados se pudieron dar por que la papa presenta glucosa, sugiriendo el uso de este medio de cultivo para la realización de colonización de hongos.

Por otro lado **Martínez (2015)**, menciona varias estrategias que podrían facilitar el éxito para desarrollar el crecimiento micelial para estudios posteriores entre ellas el evaluar diferentes constituyentes habituales de los medios de cultivo como el uso de caldos, peptonas, agentes reductores como la cisteína y el tioglicolato; además **Soto (2019)**, destaca que cada medio de cultivo ejerce una fuerte influencia en la capacidad del crecimiento micelial dependiendo de la especie que se vaya a cultivar; así mismo **Flores (2018)**, menciona que el micelio al momento de la inoculación debe estar blanco y denso para que invada rápidamente en la gramínea a usar y el proceso de colonización sea optimo.

Según **(Sabino, 2015)**, manifestó que la necesidad de conocer un valor estimado del crecimiento micelial en las cajas Petri es una prioridad para el estudio de hongos; para conocer su expansión, comportamiento y desarrollo internamente del medio del cultivo de manera exhaustiva. No obstante, es necesario recalcar que en la presente investigación se realizo la medida con una regla para conocer el diámetro micelial y así realizar el análisis de varianza.

3.2 Inoculación de micelio producido in vitro sobre semillas de cebada para incrementar biomasa de *P. ostreatus*.

Ardón (2007), menciona que comúnmente se utilizan granos de cereales de trigo, arroz, centeno, paja de trigo, sorgo, cebada y aserrín para obtener biomasa micelial. Algunas veces también se usan granos secos de maíz, pero deben ser molidos para que puedan ser fácilmente esterilizados y el micelio los penetre sin inconvenientes, los granos deben estar libres de fungicidas. Se debe usar grano fresco y en la medida de lo posible, de alta calidad porque los granos añejos contienen esporas de bacterias y hongos que obligan al productor a incrementar el tiempo de esterilización para matar los organismos contaminantes. El factor más importante a considerar es la elección del sustrato para la inoculación, ya que es la habilidad del micelio del hongo para crecer en él. Los granos pueden ser totalmente colonizados por el micelio en 2-4 semanas después de la inoculación, según el tipo de recipiente. A partir de entonces estarán listos para ser sembrados en el sustrato definitivo.

En la presente investigación la inoculación de micelio producido in vitro se realizó en semillas de cebada previamente esterilizadas, para lo cual hubo un incremento de biomasa en las cuatro repeticiones de cada funda de polietileno, estas fundas permanecieron en un cuarto oscuro para progresar su colonización y así obtener el micelio para realizar la inoculación en el sustrato.

Según **Vásquez (2017)**, afirma que obtuvo resultados al evaluar la inoculación usando aserrín con salvado de arroz donde alcanzó la colonización en un 100%, por ello considera importante realizar la inoculación en una cámara de transferencia o en una campana de flujo laminar, de manera totalmente aséptica para ello esterilizó las fundas a 15 libras/pulg² de presión a una temperatura de 121° C durante 15-20 minutos dejándolos por 30 días en oscuridad.

Córdova (2018), empleo la inoculación del micelio usando mote cocido en frascos esterilizado con el fin de mantener la higiene y controlar los niveles de contaminación, dando como resultado que de dos a tres semanas se demoró en cubrir todo el frasco con el micelio en su totalidad sin permitir que tengan luz solar; así mismo recomienda que la inoculación del micelio puede ser realizado en fundas de polietileno para un mejor manejo y trasportación.

3.3 Inoculación de la biomasa de *P. ostreatus* en bolsas con sustratos elaboradas artesanalmente para la producción de biomasa comercial.

Según **Bósquez (2018)**, manifiesta que la inoculación de biomasa en sustratos es un proceso que depende al tiempo requerido para que los materiales empleados, alcancen las cualidades que necesita el sustrato para un adecuado desarrollo del micelio. Las actividades para preparar el sustrato en el que se va a cultivar el hongo varían según se trate de sustrato tradicional o sustrato artificial. El sustrato tradicional es en la que se utiliza paja que fue usada como cama en las caballerizas y que es conocida también como “composta de caballo”. La segunda forma consiste en realizar mezclas de diversas materias primas, principalmente pajas de cereales y suplementos de origen agrícola, cuyo objetivo es asemejar las condiciones que el compostaje tradicional proporciona. La preparación de un sustrato selectivo que favorezca el crecimiento del hongo conlleva una etapa de fermentación libre o en cordón y otra de fermentación controlada, que incluye la pasteurización y un período final de acondicionamiento. A si mismo **Córdova (2018)**, afirma que este proceso inicia con la construcción o adaptación de un local con las condiciones ambientales y los requerimientos para el hongo. Para el cultivo de hongo o setas, el sustrato se somete a un proceso de tratamiento térmico (pasteurización), con el propósito de disminuir los microorganismos nocivos presentes en el sustrato; la pasteurización puede ser por medio de inyección de vapor o por inmersión en agua caliente. Posteriormente el sustrato se coloca en bolsas plásticas y se siembra con el inóculo. Las bolsas con sustrato inoculado se incuban en oscuridad (23-27°C) por un período de dos a tres semanas. La obtención de los hongos se logra 25 a 30 días posteriores a la siembra, bajo condiciones de luz, aireación y humedad (75-90%).

Por otro lado, **Vásquez (2017)**, afirma que obtuvo resultados usando sustrato de semillas de trigo con paja de trigo con el inóculo de aserrín con salvado de arroz donde se observo el crecimiento y la presencia de los primeros primordios a los 30 días. Mientras que **Córdova (2018)**, presento resultados óptimos usando sustrato de paja de trigo empleando la inoculación del micelio con mote cocido, donde presentaron nódulos en las bolsas que son los que dan paso a la formación y al crecimiento del hongo para luego ser cosechado.

En los resultados obtenidos en esta investigación fueron positivos ya que los sustratos a ocupar fueron semillas de cebada con paja de trigo donde hubo colonización en toda la funda que permitió dar el paso al desarrollo de primordios y así al crecimiento de los basidiocarpos.

3.4 Crecimiento de los basidiocarpos

Los datos correspondientes a estas variables existieron con pocas diferencias ya que crecieron los primeros basidiocarpos a los 20 días con un diámetro de 1 cm hasta 5 cm. Cada funda con sustrato de cebada con paja de trigo presentó cinco botones a los 20 días. Apreciando que dos bolsas de sustrato con biomasa tuvieron mayor crecimiento de basidiocarpos, dando a entender que los sustratos favorecen para la producción de este hongo los cuales son: inóculo compuesto de papa, Agar, dextrosa y levadura con un promedio de 3,53 cm; inóculo compuesto de extracto de malta, extracto de trigo, Agar y dextrosa con un promedio de 2,63 cm según la Prueba de Tukey al 5%.

CUADRO 2. Análisis de varianza para variable de crecimiento en los basidiocarpos a los 20 días.

Fuente de Variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F	P - Valor
Modelo	10,88	3	3,63	9,39	0,0018
Medios	10,88	3	3,63	9,39	0,0018
Error	4,63	12	0,39		
Total	15,51	15			

ns = no significativo

* = significativo al 5%

CV = 25,82

TABLA 2. Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento de basidiocarpos.

MEDIOS	PROMEDIO	RANGO
M2	3,53	A
M3	2,63	A
M4	1,23	B
M1	2,25	B

Según **(A y A, 2020)**, los sustratos empezaran a formar primordios o botones con frecuencia de 20 a 30 días, saldrá de uno a varios basidiocarpos en cada bolsa de sustrato lo cual ayudó a evitar contaminaciones, facilitará el transporte y se obtendrán setas de mejor calidad.

Las bolsas con sustratos de cebada y paja de trigo, compuestos por el inóculo de papa, agar, dextrosa y levadura; inóculo de extracto de malta, extracto de trigo, agar y dextrosa tuvieron una propagación o desarrollo masivo de la reproducción de basidiocarpos de *P. ostreatus* dando a entender que en esta investigación los medios de cultivo, el inoculo y los sustratos están aptos para la elaboración del hongo ostra blanco.

Según **Vásquez (2017)**, obtuvo resultados donde se evaluó la efectividad del sustrato de semillas de trigo con paja de trigo dando paso al crecimiento de basidiocarpos con un promedio de 3,3 cm a los 30 días. Mientras que **Córdova (2018)**, determino que en su investigación el uso del sustrato de paja de trigo funciona ya que los primeros primordios crecieron efectivamente con un progreso de 3 cm en cada primordio a los 25 días de la inoculación de micelio.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El desarrollo de los cuatro medios de cultivos obtuvo diferentes resultados y se pudo observar estadísticamente que presentan diferencias, ya que el medio de cultivo compuesto de papa, agar, dextrosa y levadura fue el mejor en cuanto al crecimiento micelial; se seleccionó este medio de cultivo por que favorece la producción de micelio *in vitro* de *P. ostreatus*.
- La inoculación del micelio producido *in vitro* sobre semillas de cebada de cada repetición del medio de cultivo promovió el incremento del crecimiento de la biomasa a los 20 días de realizar el cultivo en las fundas, donde presentaron una colonización total.
- La inoculación de la biomasa de *P. ostreatus* en bolsas con sustratos elaboradas artesanalmente con cebada y paja de trigo presento resultados positivos ya que a los 20 días se observó el crecimiento de los primeros primordios.
- La variable del crecimiento de basidiocarpos en fundas con sustrato se lo hizo con el objetivo de permitir el crecimiento de botones o basidiocarpos, teniendo un crecimiento que va desde 1 cm hasta los 4,8 cm. Esto se pudo observar en las fundas con los siguientes medios; medio de cultivo compuesto de papa, Agar, dextrosa y levadura; medio de cultivo compuesto de extracto de malta, extracto de trigo, paja de trigo, Agar y dextrosa.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir probando diferentes sustratos y medios de cultivos para obtener otras combinaciones y así producir mayor crecimiento micelial, inóculo logrando el crecimiento de hongo ostra blanco (*P. ostreatus*).
- Efectuar ensayos donde se evalúen distintos medios de cultivos con otros productos que contengan la habilidad de descomposición y así promover el crecimiento del micelio forma rápida tanto en cajas Petri como en sustratos.
- Se recomienda que antes de la siembra en las cajas Petri todos los materiales a ocupar se encuentren en condiciones de asepsia para evitar contaminación cruzada o por manipulación, lo cual pueda generar pérdidas.
- En cuanto al uso de medios se recomienda investigar otros factores que puedan ayudar al crecimiento micelial en el cultivo *in vitro*, generando interés en este tipo de investigaciones.
- Se recomienda incentivar el cultivo y consumo de los hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus*, ya que es un cultivo en el cual se puede utilizar gran cantidad de residuos de materia prima como sustrato. Además, el cultivo de los hongos comestibles de manera doméstica, porque es una alternativa didáctica, innovadora, educativa y sostenible para generar la experiencia y el conocimiento de sus propiedades gastronómicas y nutricionales.
- Se recomienda realizar un tratamiento de lavado de sustrato y adicionalmente de desinfección alcalina, porque reduce drásticamente la contaminación del sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

- Agricultura, M. D. E., & Alimentacion, P. Y. (n.d.). *Nuevas tecnicas de cultivo del pleurotus ostreatus*.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1985_08.pdf
- Betancourt, R. (2013). Instructivo de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador. In *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/by3.pdf>
- Bosquez, N. (2012). *EVALUACIÓN DE CUATRO SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DEL HONGO OSTRA (Pleurotus ostreatus) EN TRES CICLOS DE PRODUCCIÓN EN LA ZONA DE TAMBILLO, PROVINCIA DE PICHINCHA*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4663/1/CD-4295.pdf>
- Calero, E. (2018). *Valoración del crecimiento del hongo Ostra Rosado (Pleurotus djamor) sobre formulaciones de sustratos de residuos agroindustriales y forestales de la provincia de Cotopaxi para la producción de setas comestibles en la empresa ASOPROTEC*. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28371/1/BQ155.pdf>
- Cultivo, M. D. E. (2022). *CRECIMIENTO IN VITRO DE HONGO OSTRA (Pleurotus ostreatus) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO In vitro growth of fungus ostra (Pleurotus ostreatus) in different growing media*. 9, 0–2.
<http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v9n1/2409-1618-riiarn-9-01-10.pdf>
- Dalmazzo, X. (2020). *Producción de hongos ostra (Pleurotus ostreatus) usando como sustrato residuos de corteza de eucalipto ricos en lignina producidos por la empresa NOVOPAN*. 1–70.
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24837/1/T-ESPE-044537.pdf>
- Elias, V. (2017). “Formulación de una torta tipo hamburguesa a base de hongo ostra (Pleurotus ostreatus) y harina de coqueta roja (Eisenia foetida) y comparación con las concentraciones de proteína y hierro con la carne de vacuno” Presentado. In *BMC Public Health* (Vol. 5, Issue 1).
<https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio>

- itorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P
- Enríquez, M. (2019). *Producción de hongos ostra (Pleurotus ostreatus) usando como sustrato residuos de corteza de eucalipto ricos en lignina producidos por la empresa NOVOPAN*.
- FAO. (n.d.). *Colección Hongos tipo Ostra*.
http://www1.inecol.edu.mx/cv/CV_pdf/libros/Manual_PleurotusGaitan.pdf
- Flores, A., & Oca, M. D. E. (2012). Manual De Cultivo De Hongo Seta (Pleurotus ostreatus) De Forma Artesanal. In Herrera (Ed.), *Geografo e instructor en cursos de jongo seta* (Vol. 3, Issue 3).
http://huertofenologico.filos.unam.mx/files/2017/05/Cultivo_de_hongo_seta.pdf
- Heredia, R., & Herrera, A. (2011). Producción Comercial Del Hongo Ostra (Pleurotus ostreatus) en empaque de cartòn en la Molina. In *Revista de investigacion de hongos Benèficos GINHBE* (Vol. 3, pp. 1–9).
https://eventos.iica.int/sites/default/files/2020-10/Art. cientifico_ Ronald Axel Heredia Vásquez.pdf
- Hernandez, D. (n.d.). *MANUAL PRACTICO DEL CULTIVO DE SETAS*.
http://www1.inecol.edu.mx/cv/CV_pdf/libros/Manual_PleurotusGaitan.pdf
- Imbaquingo Alexandra. (2012). *ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA IMPLEMENTACION Y COMERCIALIZACION DE UN CULTIVO DE HONGOS OSTRAS (Pleurotus ostreatus)*.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3736/6/UPS-YT00206.pdf>
- Muñoz, K. D., Guajardo, M. C., Alberto, C., Torres, L., Arturo, L., & Ramírez, G. (2019). (Pleurotaceae) ICFC 153 / 99 cultivado sobre diferentes residuos lignocelulósicos *Production of Pleurotus ostreatus (Pleurotaceae) ICFC 153 / 99 grown on different waste lignocellulosic*. 26(3), 1177–1184.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992019000300022
- Oviedo, J. C., Casas, A. E., Valencia, J. A., & García, L. (2016). Evaluation of three variables of growth of pleurotus pulmonarius on corncob using digital image processing. *Informacion Tecnologica*, 27(5), 27-36. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500004>

Sabino, P. (n.d.). *Cultivo del Hongo Ostra*.
[https://almazul.com.ar/storage/Bibliografia/Manual Girgolas Mushworld.pdf](https://almazul.com.ar/storage/Bibliografia/Manual%20Girgolas%20Mushworld.pdf)

ANEXOS

Anexo 1: Elaboración de medios de cultivo





Anexo 2: Esterilización de los medios de cultivo.

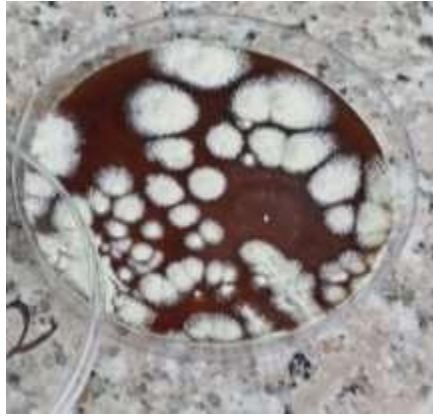


Anexo 3: Distribución de medios de cultivo.



Anexo 5: Cajas Petri con micelio





Anexo 6: Siembra del micelio en semillas de cebada.



Anexo 7: Análisis de variación de las diferentes variables.

A. ADEVA de la variable de crecimiento micelial a los 20 días.

Fuente de Variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Valor de F	Valor-P
Modelo	14,66	3	4,89	17,06	0,0001
Medios	14,66	3	4,89	17,06	0,0001
Error	3,44	12	0,29		
Total	18,09	15			

CV= 16,37

B. Factorial ADEVA, tabla de crecimiento de basidiocarpos.

Fuente de Variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F	P - Valor
Modelo	10,88	3	3,63	9,39	0,0018
Medios	10,88	3	3,63	9,39	0,0018
Error	4,63	12	0,39		
Total	15,51	15			

CV= 25,82

Anexo 8: Crecimiento micelial a los 20 días.

MEDIOS	REPETICIONES			
	I	II	III	IV
Extracto de malta + Agar	3,5	2	2,8	2,7
Papa + Agar + dextrosa + levadura	5,5	3,8	4,9	5,5
Extracto de trigo + extracto de malta + paja de trigo + Agar + dextrosa	2,3	3	2,7	2,6
Agar	2,8	3	2,5	2,7

Anexo 9. Crecimiento de los basidiocarpos.

MEDIOS	REPETICIONES			
	I	II	III	IV
Extracto de malta + Agar	1,5	1,0	1,2	1,2
Papa + Agar + dextrosa + levadura	2,3	4,8	3,5	3,5
Extracto de trigo + extracto de malta + paja de trigo + Agar + dextrosa	2,4	3	2,7	2,4
Agar	1,5	3	2,2	2,3

Anexo 10: Costo del experimento.

Recursos	Unidades	Cantidad	Presupuesto
Papel aluminio	1 rollo	\$2	\$2
Agar	65 g	\$25	\$25
Papa	5	\$1	\$1
Malta	4 libra	\$3,50	\$14
Dextrosa	1 libra	\$9	\$9
Bisturí	1	\$1.5	\$1.5
Alcohol	1	\$2	\$2
Semillas de cebada	16 libras	\$0,78	\$12,48
Semillas de trigo	1 libra	\$0,45	\$0,45
Levadura	1 sobre	\$0,40	\$0,40
Fundas de Polietileno	20	\$0,10	\$2
Cajas Petri	16	\$0,30	\$4,8
TOTAL			\$74,63