



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**CULTIVO DE HONGOS CON PROPIEDADES FUNCIONALES Y  
MEDICINALES: OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE CEPAS DE *Ganoderma* SOBRE SUBPRODUCTOS DE  
REGIONES FORESTALES**

**TEODORO BERNABÉ GONZÁLEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA  
2015



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Teodoro Bernabé González**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Cultivo de hongos con propiedades funcionales y medicinales: obtención, selección y caracterización de cepas de *Ganoderma* sobre subproductos de regiones forestales**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, agosto de 2015.

  
**Teodoro Bernabé González**

Firma

  
**Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**

Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Cultivo de hongos con propiedades funcionales y medicinales: obtención, selección y caracterización de cepas de *Ganoderma* sobre subproductos de regiones forestales**, realizada por el alumno: **Teodoro Bernabé González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



---

DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



---

DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



---

DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:



---

DR. MIGUEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:



---

DR. ISAAC TELLO SALGADO

Puebla, Puebla, México, agosto de 2015.

CULTIVO DE HONGOS CON PROPIEDADES FUNCIONALES Y  
MEDICINALES: OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE CEPAS DE *Ganoderma* SOBRE SUBPRODUCTOS DE  
REGIONES FORESTALES

Teodoro Bernabé González, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2015

En México hay pocos estudios sobre los recursos genéticos nativos de especies de *Ganoderma*. Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (AAS) tiene efectos metabólicos relevantes en especies vegetales y animales, pero no se conoce el efecto que tiene sobre el desarrollo micelial y reproductivo en hongos. En este estudio, nueve cepas nativas de *Ganoderma* se cultivaron sobre aserrín de *Quercus* spp., en donde cinco de ellas formaron basidiocarpos, con ciclo de cultivo de 160 a 187 días, con eficiencia biológica (EB) entre  $2.23 \pm 1.02\%$  y  $11.02 \pm 3.34\%$ . En el laboratorio, la cepa CP-145 de *G. lucidum* se cultivó en medio líquido de papa y dextrosa (PDB) con adición de AAS como inductor, en concentración  $100 \mu\text{M}$  y en agitación. La biomasa seca (*pellets*) del tratamiento fue significativamente superior a aquella del control y registró  $8.9 \pm 0.88 \text{ U/mL}$  de lacasas a 40 días de incubación, mientras que el control no expresó lacasas. Para corroborar el efecto mostrado en el laboratorio, la cepa CP-145 de *G. lucidum* se cultivó en aserrín de *Quercus* spp. Con adición de AAS en concentraciones  $10 \text{ mM}$ ,  $100 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$ . El tratamiento con AAS  $100 \mu\text{M}$  registró la más alta EB con  $5.78 \pm 3.6\%$ . El ciclo de cultivo fue de 130 a 145 días. Es factible utilizar el AAS como una innovación tecnológica para cultivar recursos genéticos nativos de *Ganoderma* sobre subproductos forestales regionales.

Palabras clave: ácido acetilsalicílico, *Ganoderma*, lacasas, recursos genéticos.

CULTIVATION OF MUSHROOMS WITH FUNCIONAL AND MEDICAL  
PROPERTIES: GETTING, SELECTION AND CHARACTERIZATION OF  
*Ganoderma* STRAINS ON BY-PRODUCTS OF FOREST REGIONS

Teodoro Bernabé González, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2015

There are few studies in Mexico on native genetic resources of *Ganoderma* species. The acetylsalicylic acid (ASA) has important effects on plants and animals, but its effect on mycelial and reproductive development of fungi is unknown. In this study, nine native *Ganoderma* strains were grown on sawdust (*Quercus* spp.), of which five strains developed basidiocarps in a crop cycle of 160-187 days and a biological efficiency (BE) ranging from  $2.23 \pm 1.02\%$  to  $11.02 \pm 3.34\%$ . In the laboratory, the strain CP-145 of *G. lucidum* was grown in flask using potato dextrose broth (PDB) with addition of ASA as inducer in a concentration of  $100 \mu\text{M}$ , under shaking conditions. Dry biomass (*pellets*) production from the treatment was significantly higher than that of the control, and  $8.9 \pm 0.88 \text{ U/mL}$  of lacasses were recorder after 40 days of incubation, while the control did not express lacasses. In order to confirm the effect shown in the laboratory, the strain CP-145 of *G. lucidum* was grown on sawdust (*Quercus* spp.) with addition of ASA at 10 mM,  $100 \mu\text{M}$  and  $1 \mu\text{M}$  concentrations. The highest BE of  $5.78 \pm 3.6\%$  was recorded on treatment with ASA  $100 \mu\text{M}$ . The cultivation cycle varied from 130 to 145 days. It is possible to use the ASA as a technological innovation for the cultivation of *Ganoderma* native genetic resources using regional by-products from forestry.

Key words: acetylsalicylic acid, *Ganoderma*, genetic resources, lacasses.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por mantenerme sano y por permitir que día a día tenga motivos para superarme.

A mis padres, Sr. Heliodoro Bernabé Pólito, Sra. Amada González Reyna (†), a mis hijos Gadiel, Yair y Marvin, a mi nieto Axel Gadiel, a todos mis hermanos y a toda mi familia, por estar conmigo en todo momento y por su apoyo incondicional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar parte de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla; a todos los integrantes de mi Consejo Particular y a los sinodales, por contribuir de manera decidida en mi formación académica para obtener un grado más de estudios.

A las autoridades del PROMEP y a las autoridades de la Universidad Autónoma de Guerrero, por otorgar todas las facilidades económicas, laborales y administrativas en la liberación de la carga laboral, para que el profesorado se dedique de tiempo completo en su superación académica y en la obtención de un postgrado.

Al Dr. Arturo Contreras Gómez, quien en su momento como Director de la Unidad Académica de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Guerrero, me brindó su apoyo para la obtención del postgrado.

Al Biólogo Wilfrido Martínez, a la M.C. Myrna Bonilla y al Sr. Hugo Martínez por su apoyo durante las etapas de investigación, pero sobre todo por su valiosa amistad. Al M.C. Alan Helios Escudero Uribe y a la Dra. Claudia Katia Reyes Quintanar por brindarme su amistad.

## CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO REFERENCIAL.....	3
2.1. Características morfológicas de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	3
2.2. Taxonomía y distribución.....	4
2.3. Caracterización y análisis molecular.....	7
2.4. Composición química.....	8
2.5. Actividad biológica y funciones farmacológicas.....	12
2.6. Otras aplicaciones.....	14
2.7. <i>G. lucidum</i> como parásito en plantas.....	15
2.8. Las enzimas en <i>G. lucidum</i> y su aplicación.....	15
2.9. Inductores para incrementar lacasas en <i>G. lucidum</i> .....	18
2.10. El cultivo de <i>G. lucidum</i> en substrato sólido.....	21
2.11. Producción de <i>Ganoderma</i> en México.....	23
2.12. El ácido salicílico (AS) y el ácido acetilsalicílico (AAS).....	24
2.13. Aplicación del AS en plantas de importancia económica....	26
2.14. El efecto del AS en hongos fitopatógenos.....	28
2.15. Aplicación y efecto del AAS.....	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1. Material biológico.....	35
6.2. Análisis estadístico.....	35
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	36
7.1. ETAPA I. CULTIVO DE NUEVE CEPAS DE <i>Ganoderma</i> EN ASERRÍN DE <i>Quercus</i> spp.....	36
7.1.1. Resumen.....	36
7.1.2. Introducción.....	37
7.1.3. Materiales y métodos.....	37
7.1.4. Resultados.....	42

7.1.4.1.	VARIABLES EVALUADAS.....	43
7.1.5.	DISCUSIÓN.....	51
7.2.	ETAPA II: EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL Y EN LA ACTIVIDAD DE LACASAS Y PROTEÍNAS EN LA CEPA CP-145 DE <i>Ganoderma lucidum</i> , CULTIVADA EN PDB CON AGITACIÓN.....	53
7.2.1.	Resumen.....	53
7.2.2.	Introducción.....	54
7.2.3.	Materiales y métodos.....	54
7.2.4.	Resultados.....	57
7.2.4.1.	VARIABLES EVALUADAS.....	57
7.2.5.	DISCUSIÓN.....	63
7.3.	ETAPA III: EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL CULTIVO DE LA CEPA CP-145 DE <i>Ganoderma lucidum</i> EN SUBSTRATO SÓLIDO.....	65
7.3.1.	Resumen.....	65
7.3.2.	Introducción.....	66
7.3.3.	Materiales y métodos.....	66
7.3.4.	Resultados.....	67
7.3.5.	DISCUSIÓN.....	75
8.	CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	77
9.	CONCLUSIONES.....	79
10.	ESTRATEGIA PROPUESTA.....	80
11.	LITERATURA CITADA.....	86
12.	ANEXOS.....	105
12.1.	ANEXO 1: EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL Y PRODUCCIÓN DE LACASAS Y PROTEÍNAS EN LA CEPA CP-145 DE <i>Ganoderma lucidum</i> , CULTIVADA EN PDA, Y EN PDB SIN AGITACIÓN.....	105
12.1.1.	Resumen.....	105
12.1.2.	Introducción.....	106
12.1.3.	Materiales y métodos.....	106
12.1.4.	Resultados.....	110



12.1.5. Discusión..... 122

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Comparación de algunas características de los basidiocarpos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	4
<b>Tabla 2.</b> Distribución en México de especies de <i>Ganoderma</i> , substratos o hábitat en que se desarrollan.....	6
<b>Tabla 3.</b> Componentes nutrimentales de <i>Ganoderma lucidum</i> (g/100 g de materia seca) comparados con hongos silvestres y cultivados, y en el extracto.....	9
<b>Tabla 4.</b> Composición proximal (%) de <i>Ganoderma lucidum</i> y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con <i>Ganoderma tsugae</i> .....	10
<b>Tabla 5.</b> Contenido de azúcares solubles (mg/g en peso seco) de <i>Ganoderma lucidum</i> y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con <i>Ganoderma tsugae</i> .....	10
<b>Tabla 6.</b> Contenido de aminoácidos libres (mg/g de materia seca) de <i>Ganoderma lucidum</i> y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con <i>Ganoderma tsugae</i> .....	11
<b>Tabla 7.</b> Componentes nutrimentales de <i>Ganoderma lucidum</i> con y sin fermentación sólida, en base seca.....	12
<b>Tabla 8.</b> Algunos compuestos bioactivos y su efecto terapéutico contenidos en <i>Ganoderma lucidum</i> .....	13
<b>Tabla 9.</b> Inductores que incrementaron la producción de lacasas en <i>Ganoderma lucidum</i> y en otras especies de este género.....	20
<b>Tabla 10.</b> Substratos utilizados en el cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> , tiempo de colonización del micelio, ciclo de cultivo y eficiencia biológica obtenida.....	21
<b>Tabla 11.</b> Algunas aplicaciones y efecto del ácido salicílico en plantas de importancia económica.....	27
<b>Tabla 12.</b> Cepas de <i>Ganoderma</i> utilizadas en el presente estudio.....	43
<b>Tabla 13.</b> Días de incubación, colonización del sustrato (aserrín de <i>Quercus</i> spp.) y formación de primordios de fructificación de nueve cepas de <i>Ganoderma</i> .....	45
<b>Tabla 14.</b> Días del ciclo de cultivo, eficiencia biológica, rendimiento e índice de degradación del sustrato (aserrín de encino, <i>Quercus</i> spp.) en cinco cepas de <i>Ganoderma</i> con n = 4.....	48

<b>Tabla 15.</b>	Características morfológicas y medidas de los basidiocarpos de las cepas cultivadas en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.), pertenecientes al género <i>Ganoderma</i> .....	50
<b>Tabla 16.</b>	Valores de pH y temperatura en el sustrato de aserrín de <i>Quercus</i> spp. antes de la siembra y después de la cosecha de los basidiocarpos en cepas de <i>Ganoderma</i> ...	50
<b>Tabla 17.</b>	Valores de pH y temperatura en el medio de cultivo PDB solo y con adición de AAS 100 µM antes y después de su esterilización.....	60
<b>Tabla 18.</b>	pH en el testigo y en el tratamiento con AAS 100 µM en la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en PDB con agitación a 120 rpm, entre 28 °C a 29.5 °C, durante 40 días de incubación.....	60
<b>Tabla 19.</b>	Colonización, formación de primordios de fructificación y abertura de las unidades de producción en el cultivo de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en aserrín de encino como testigo y en los tratamientos con adición de AAS 10 mM, AAS 100 µM y AAS 1 µM (2000 g de sustrato en peso húmedo con n = 14).....	68
<b>Tabla 20.</b>	Producción de biomasa y basidiocarpos de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en el testigo y en los tratamientos con AAS 10 mM, AAS 100 µM y AAS 1 µM cultivada en aserrín de encino, con n =14 y 2000 g en peso húmedo de sustrato por cada réplica.....	70
<b>Tabla 21.</b>	Días del ciclo de cultivo, eficiencia biológica, rendimiento e índice de degradación del sustrato de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.) como testigo y en los tratamientos con AAS 10 mM, AAS 100 µM y AAS 1 µM, con n = 14 y 2000 g en peso húmedo de sustrato en cada réplica.....	71
<b>Tabla 22.</b>	Medidas del estípote y del píleo de los basidiocarpos obtenidos en el cultivo de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en aserrín de <i>Quercus</i> spp. como testigo y con adición de AAS 10 mM, 100 µM y AAS 1 µM. Con n = 14 y 2000 g en peso húmedo por tratamiento.....	81
<b>Tabla 23.</b>	pH inicial y final del sustrato conformado por aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.) en el cual se desarrolló la cepa	

CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> con tres concentraciones de ácido acetilsalicílico.....	74
---	----

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Diagrama de trabajo para el cultivo de nueve cepas de <i>Ganoderma</i> ; la determinación del efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en la producción de lacasas y proteínas en la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , así como la obtención de basidiocarpos en aserrín de encino con adición de AAS en tres concentraciones.....	34
<b>Figura 2.</b>	Primordios de fructificación de cepas de <i>Ganoderma</i> cultivadas en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.), excepto la cepa CP-399 cultivada en la formulación COLPOS-17. 1: CP-145; 2: CP-405; 3: CP-450; 4: CP-395; 5: CP-399; 6: CP-434; 7: CP-514; 8: CP-389 y 9: CP-447.....	46
<b>Figura 3.</b>	Basidiocarpos adultos de las cepas de <i>Ganoderma</i> cultivadas en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.). CP-434: 1 y 2 cara superior del píleo, 3 cara inferior. CP-405: 4 y 5 cara superior del píleo, 6 cara inferior. CP-389: 7 y 8 cara superior del píleo, 9 cara inferior. CP-447: 10 y 11 cara superior del píleo, 12 cara inferior. CP-395: 13 cara superior del píleo, 14 cara inferior.....	49
<b>Figura 4.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en el desarrollo micelial ( <i>pellets</i> ) de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en PDB en agitación a 120 rpm y temperatura entre 28 °C a 29.5 °C. Fotografías a partir del día 10 al día 40 de incubación. En el testigo números: 1-3, <i>pellets</i> en matraces; 4-6, <i>pellets</i> en papel filtro. En el tratamiento con AAS 100 $\mu$ M números: 7-9, <i>pellets</i> en matraces; 10-12, <i>pellets</i> en papel filtro.....	58
<b>Figura 5.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en el peso del micelio deshidratado de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en medio PDB con agitación a 120 rpm, entre 28 °C y 29.5 °C, en comparación con el testigo, durante 35 días de incubación. Se realizó el ANOVA con n = 4; la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con $\alpha$ = 0.05 (SAS, ver. 9.0).....	59
<b>Figura 6.</b>	Efecto del pH en el tratamiento con AAS 100 $\mu$ M en relación con el testigo, en la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en PDB con agitación a 120 rpm entre 28 °C a 29.5 °C, durante 40 días de	

	incubación. Se realizó el ANOVA con $n = 4$ , la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, ver. 9.0).....	61
<b>Figura 7.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu\text{M}$ en la producción de la enzima lacasa en la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , cultivada en PDB con agitación a 120 rpm y a temperatura entre 28 °C y 29.5 °C, durante 40 días de incubación.....	62
<b>Figura 8.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu\text{M}$ en la producción de proteínas en la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , cultivada en PDB con agitación a 120 rpm y a una temperatura entre 28 °C y 29.5 °C. Se realizó el ANOVA con $n = 4$ , la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, ver. 9.0).....	64
<b>Figura 9.</b>	Primordios de fructificación a 63 días de incubación de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.). Los primordios surgen de la biomasa color café rojiza. A: testigo; B: tratamiento con AAS 10 mM; C: tratamiento con AAS 100 $\mu\text{M}$ y D: tratamiento con AAS 1 $\mu\text{M}$ . Con $n = 14$ y 2000 g en peso húmedo de substrato en cada réplica.....	69
<b>Figura 10.</b>	Basidiocarpos de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , cultivada en aserrín de encino ( <i>Quercus</i> spp.) como testigo y con adición de AAS 10 mM, AAS 100 $\mu\text{M}$ y AAS 1 $\mu\text{M}$ . A: basidiocarpos del testigo. B: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 10 mM. C: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 100 $\mu\text{M}$ . E: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 1 $\mu\text{M}$ .....	73
<b>Figura 11.</b>	Diagrama propuesto para la estrategia a desarrollar en el cultivo de especies de <i>Ganoderma</i> .....	82
<b>Figura 12.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu\text{M}$ en el crecimiento del área micelial de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en medio PDA, con mediciones del día 7 al día 21 de incubación. Se realizó el ANOVA con $n = 3$ , la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, ver. 9.0).....	111
<b>Figura 13.</b>	Características del micelio de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> desarrollada en PDA y con la	

	adición de AAS 100 $\mu$ M. Día 7 de incubación: 1 (testigo) y 2 (tratamiento): densidad regular, textura fibrosa a ligeramente lanosa, color blanquecino. Día 14 de incubación: 3 (testigo) y 4 (tratamiento): densidad abundante, textura fibrosa a ligeramente lanosa, color blanco con tonalidades amarillentas. Día 21 de incubación: 5 (testigo) y 6 (tratamiento): densidad abundante, textura fibrosa y color café amarillento con tonalidades blanquecinas.....	113
<b>Figura 14.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en el desarrollo micelial de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en PDB. Día 7 de incubación: 1 (testigo) y 2 (tratamiento). Día 21 de incubación: 3 (testigo) y 4 (tratamiento). Día 28 de incubación: 5 (testigo) y 6 (tratamiento).....	115
<b>Figura 15.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en el peso del micelio seco de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en el medio PDB, durante 28 días de incubación. Se realizó el ANOVA con n = 3, la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con $\alpha$ = 0.05 (SAS, ver. 9.0).....	117
<b>Figura 16.</b>	Determinación de la enzima lacasa en el testigo (PDA) y en el tratamiento PDA con adición de AAS 100 $\mu$ M, en el micelio de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> a los 28 días de incubación.....	118
<b>Figura 17.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en la producción de lacasas de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> empleando micelio homogéneo y no homogéneo (n = 3), cultivado en medio líquido PDB sin agitación a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio (25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; en oscuridad).....	119
<b>Figura 18.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en la producción de proteínas de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivada en el medio PDA a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio (25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; en oscuridad).....	120
<b>Figura 19.</b>	Efecto del AAS 100 $\mu$ M en la producción de proteínas de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> empleando micelio homogéneo y no homogéneo (n = 3), cultivado en el medio PDB sin agitación a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio (25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; en oscuridad).....	127

## 1. INTRODUCCIÓN

Con base a que no se tienen en México suficientes investigaciones en el cultivo de especies del género *Ganoderma*, se cultivaron en aserrín de encino (*Quercus* spp.) nueve cepas de este género, de las cuales se desconocen las condiciones ambientales para su fructificación. Se experimentó en el laboratorio en medio líquido de papa dextrosa (PDB) el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en el desarrollo del micelio y en la producción de las enzimas lacasas y de proteínas de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*. Por otra parte, esta misma cepa se cultivó en aserrín de encino con la adición de AAS en tres concentraciones con la finalidad de corroborar el efecto que presentó el AAS en el laboratorio y para determinar su efecto en la producción de basidiocarpos.

*Planteamiento del problema:* Las especies de *Ganoderma* tienen compuestos bioactivos que son eficientes en el tratamiento del cáncer, diabetes, hipertensión, entre otros. En México, no se ha realizado el cultivo comparativo de diversas especies de *Ganoderma* para conocer sus propiedades funcionales y medicinales. Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (AAS) ha demostrado tener efectos metabólicos relevantes sobre especies vegetales y animales. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre el desarrollo micelial y reproductivo de los hongos comestibles, particularmente del género *Ganoderma*.

### *Hipótesis*

1. Las cepas de *Ganoderma* de recursos genéticos nativos, cultivadas en aserrín de encino, desarrollan basidiocarpos bien diferenciados con buenos rendimientos.
2. La adición del ácido acetilsalicílico en cultivo líquido de una cepa de *G. lucidum*, tiene efecto positivo como inductor en la producción de lacasas y proteínas.
3. La adición del ácido acetilsalicílico en tres concentraciones en cultivo sólido (aserrín de encino) de una cepa de *G. lucidum* incrementa el rendimiento en la producción de basidiocarpos.



## Objetivos

1. Realizar el cultivo en aserrín de encino (*Quercus* spp.) de recursos genéticos nativos del género *Ganoderma* para determinar las condiciones ambientales en que se desarrollan y analizar sus rendimientos.
2. Cultivar una cepa seleccionada de *G. lucidum* en medio líquido (PDB) con la adición de AAS como inductor para determinar la actividad volumétrica de lacasas y proteínas.
3. Cultivar una cepa de *G. lucidum* en aserrín de encino con la adición de tres concentraciones de AAS para evaluar la producción de basidiocarpos.
4. Formular una estrategia tecnológica con potencial de aplicación en la producción comercial de especies de *Ganoderma*.

*Resultados.* De nueve cepas de *Ganoderma*, se logró la formación de basidiocarpos en cinco de ellas sobre el aserrín de encino. No se tienen datos de su cultivo en México, por lo que, es una aportación importante. En los estudios a nivel de laboratorio, el AAS 100  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto positivo en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas en la cepa CP-145 de *G. lucidum* en comparación con el testigo. El cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en aserrín de encino con la adición de AAS en tres concentraciones, demostró que en la concentración AAS 100  $\mu\text{M}$  hubo un efecto altamente significativo al lograr un mayor rendimiento de basidiocarpos que en el resto de los tratamientos. Con base a los resultados, se puede tener la posibilidad de cultivar cepas de *Ganoderma* en substratos forestales, en especial la cepa CP-145 con AAS 100  $\mu\text{M}$  en diferentes regiones del país.

## **2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1. Características morfológicas de *Ganoderma lucidum***

Existe una gran confusión taxonómica asociada a *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y sus especies afines. Los basidiocarpos tienen laca que varía de color rojo-naranja a negro con varias graduaciones de color café. Los basidiocarpos son estipitados o sésiles. El contexto es de color que va desde blanco a marrón. La superficie de los poros es de color claro. La capa exterior del píleo se compone de pilocistidios. Las esporas tienen doble pared, poco a fuertemente equinuladas y truncadas en el ápice. Los primeros poliporáceos con laca fueron descritos en Europa a finales del siglo XVIII. En 1881, Karsten estableció el género *Ganoderma* con *Boletus lucidus* como las únicas especies, de las cuales no se tiene material (Moncalvo *et al.*, 1995a).

En los basidiocarpos de *G. lucidum* hay una gran diversidad morfológica, por lo que, las descripciones son muy contrastantes, como lo señalaron Seo y Kirk (2000): los basidiocarpos son sésiles, estipitados, imbricados y no imbricados. El color de la superficie del píleo y del himenóforo varía de rojo intenso, no laqueado, laqueado y amarillo brillante a blanco. La variación morfológica parece estar afectada por las condiciones ambientales en el desarrollo del basidiocarpo. Cuando el estípote está presente puede ser excéntrico, central o imbricado. Estos mismos autores hacen la comparación de la morfología y otras características de *G. lucidum* señaladas en otros trabajos (**Tabla 1**).

En *G. tornatum* el tamaño de las basidiosporas varía con la altitud y la latitud; en *G. lucidum* el color del contexto se torna moreno en colecciones procedentes de latitudes del sur del continente Europeo (Moncalvo *et al.*, 1995b).

*G. lucidum* crece en árboles de madera dura y en coníferas (Seo y Kirk, 2000); en *Acrocarpus* sp., árboles deciduos, *Betula* sp., *Quercus hypoleuroides* y en árboles de coníferas (Moncalvo *et al.*, 1995a). De acuerdo a Guzmán (1980), en México crece en jacarandas, casuarinas, fresno y eucaliptos.

**Tabla 1.** Comparación de algunas características de los basidiocarpos de *Ganoderma lucidum*.

<b>Caracteres (Tamaño, color)</b>	<b>Melo (1986)</b>	<b>Ryvarden (1994)</b>
Pileo (tamaño)	Más de 15 cm	2-16 cm
Estípite (Largo) y (Diámetro)	(12.5 cm) (---)	(1-3 cm) (1-3.5 cm)
Poros (tamaño)	4-6 poros mm <sup>-1</sup>	4-6 poros mm <sup>-1</sup>
Color de la superficie de los poros	Blanco a crema	Blanco-crema, café pálido
Color del píleo	Rojo-púrpura, rojizo y rojo negruzco	Blanco, crema-rojizo o rojo negruzco.
Color del estípite	Púrpura, café-rojizo, rojizo-negruzco	Marrón a negruzco
Color del contexto	Color madera, café oscuro	Color madera a café pálido
Tamaño y color de esporas	8.2-13.5 x 6.8-8.1 μm, truncadas, ovoides, café claro a café oscuro	---

Fuente: Seo y Kirk (2000).

## 2.2. Taxonomía y distribución

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. pertenece a la Familia Polyporaceae (o Ganodermaceae), al Orden Aphyllophorales y a la Clase Basidiomycetes. Otra forma de clasificar a *G. lucidum* es la de pertenecer al Reino Fungi, Subreino Dicaria, División Basidiomycota y Familia Polyporaceae. El basidiocarpo es conocido en Japón como “Reishi” o “Mannetake”, en China y Korea como “Ling Zhi”, “Ling Chu” y “Ling Chih”. Es un hongo medicinal muy popular en China, Japón, Korea y otros países Asiáticos (Erkel, 2009; Zhou *et al.*, 2012; Manavalan *et al.*, 2012).

La taxonomía tradicional de *Ganoderma* se basa en sus características morfológicas, tanto del basidiocarpo como del tamaño y forma de las esporas, entre otros aspectos (Ryvarden, 2000). Otro nombre en la categoría de Familia es Ganodermataceae, la cual contiene cuatro géneros: *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Haddowia* y *Humphreya*. El género *Ganoderma* contiene al subgénero *Ganoderma*, que incluye la sección *Ganoderma* y sección *Phaenema*; al subgénero *Elfvigia* y subgénero *Trachyderma* (Zheng *et al.*, 2009).

Hay aceptación general en el sentido de que el género *Ganoderma* incluye especies con la textura de la superficie superior del basidiocarpo laqueada (subgénero *Ganoderma*) y especies con la superficie opaca, no laqueada (subgénero *Elfvigia*) (Moncalvo *et al.*, 1995b, Smith y Sivasithamparam, 2000).

Algunos trabajos que reconocen a los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvigia*, son aquellos realizados en Sudamérica que incluyeron al subgénero *Ganoderma* (complejo *Ganoderma lucidum*) (Gottlieb y Wright, 1999a), al subgénero *Elfvigia* (Complejo de *Ganoderma applanatum*) (Gottlieb y Wright, 1999b), así como al subgénero *Ganoderma* en América Tropical (Ryvarden, 2000; Gottlieb *et al.*, 2000).

Cao *et al.* (2012), señalaron que el tipo genérico de *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. fue originalmente reportado de Peckham, Inglaterra, Reino Unido. Se distribuye desde el Amazonas a regiones del sur de Norteamérica y gran parte de Asia. Moncalvo y Ryvarden (1998), señalaron que su distribución es en regiones tropicales y subtropicales.

Los estudios en México comprendidos del año 2002 al año 2012 sobre la distribución de especies de *Ganoderma* y los substratos o tipos de vegetación en que se han colectado, se presentan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Distribución en México de especies de *Ganoderma*, substratos o hábitat en que se desarrollan.

Estado/Entidad	Especies	Substrato/hábitat	Referencias
Colima, Guanajuato y Jalisco	<i>G. lucidum</i> ) y <i>G. curtisii</i>	En troncos de encino ( <i>Quercus</i> )	Alvarado-Rosales <i>et al.</i> (2007)
Sonora	<i>G. adspersum</i> , <i>G. curtisii</i> y <i>G. lucidum</i>	Bosques de pino-encino, diversos bosques, vegetación tipo matorral	Montaño <i>et al.</i> (2006)
Veracruz	<i>G. sessile</i> (= <i>G. resinaceum</i> )	No especificado	Suarez-Medellín <i>et al.</i> (2012)
Aguascalientes	<i>G. lucidum</i>	En árboles jóvenes y maduros, vivos o muertos de <i>Quercus potosina</i>	Moreno-Rico <i>et al.</i> (2010)
Hidalgo	<i>G. applanatum</i> , <i>G. brownii</i> , <i>G. curtsii</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. lucidum</i>	Bosque mesófilo de montaña y en bosque de <i>Abies</i>	Romero-Bautista <i>et al.</i> (2010)
Durango	<i>G. lucidum</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. curtisii</i> , <i>G. tsugae</i>	Bosques de pino y pino-encino	Díaz <i>et al.</i> (2005)
Chihuahua	<i>G. lucidum</i> , <i>G. lobatum</i>	Bosques de pino, pino-encino, bosque de tascate, selva baja caducifolia	Díaz-Moreno <i>et al.</i> (2009)
Querétaro y parte de Guanajuato	<i>G. lucidum</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. applanatum</i>	En bosque de <i>Quercus</i> spp.	Valenzuela <i>et al.</i> (2002); Landeros <i>et al.</i> (2006)
Jalisco, Hidalgo, Morelos	<i>G. curtisii</i>	Bosques de pino-encino	Torres-Torres y Guzmán-Dávalos (2005)
Puebla, México, Morelos	<i>G. applanatum</i>	En <i>Quercus</i> sp., y <i>Pinus</i> sp.	Tello (2010)
Guerrero, Morelos	<i>G. curtisii</i>	En <i>Quercus</i> sp. y madera en descomposición	
Morelos	<i>G. subamboinense</i> , <i>G. resinaceum</i> , <i>G. sessile</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. colossus</i>	En <i>Quercus</i> sp., en <i>Casuarina</i> sp., en <i>Ficus</i> sp. en <i>Sphathodea campanulata</i>	
Puebla, Jalisco, Morelos	<i>G. lucidum</i>	En <i>Quercus</i> sp.	
Veracruz	<i>Ganoderma</i> spp.	No especificado	

### **2.3. Caracterización y análisis molecular**

Debido a que las especies de *Ganoderma* son morfológicamente muy complejas de definir, se han realizado estudios filogenéticos en los que se han empleado métodos que se basan en la amplificación de las secuencias del DNA, mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), en el análisis molecular de la región ITS (Región de Espaciadores Internos Transcritos), por el ADN polimorfismo amplificado al azar (DNA RAPD), por el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), por marcadores moleculares de secuencia amplificada de polimorfismo (SRAP), entre otros (Smith y Sivasithamparam, 2000; Gottlieb *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2009; Yang y Feng, 2013).

Se ha realizado la caracterización de cepas de *Ganoderma* considerando la morfología micelial, los medios de cultivo sintéticos y las condiciones ambientales en las que mejor se desarrollan. De esta manera se tiene la caracterización de varias cepas nativas de México, en las que se incluyeron dos cepas nativas de *Ganoderma* definidas como *Ganoderma curtisii* y *Ganoderma lucidum* originarias del estado de Morelos, las que se encuentran depositadas en el laboratorio de cultivo de hongos comestibles y medicinales del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla (Sobal *et al.*, 2007).

Se realizó el estudio macro y micromorfológico de especímenes de *Ganoderma curtisii* procedentes de Jalisco, Hidalgo y Morelos. Se encontró que es una especie muy variable macromorfológicamente (Torres-Torres y Guzmán-Dávalos, 2005).

Se realizaron análisis moleculares de la región ITS-ADN de cepas de *Ganoderma*, procedentes de varias regiones de México. Con ello, se determinaron las relaciones filogenéticas de estos recursos genéticos nativos empleando cepas de referencia (depositadas en Inglaterra) para el análisis comparativo. Esto ha permitido establecer programas de mejoramiento con

una amplia base genética. Con el análisis, se identificaron tres sublinajes de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. *sensu lato* en México. Asimismo, un segundo linaje incluye cinco cepas de *Ganoderma* sp. que muestran distancia genética con respecto a las especies más cercanas, tales como *G. australe*, *G. gibbosum*, *G. lobatum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*, *G. tornatum* y *G. tsugae* (Morales *et al.*, 2010).

Un espécimen de *Ganoderma* originario del estado de Veracruz se identificó de acuerdo a su afinidad filogenética, combinando el enfoque molecular con el morfológico tradicional. En la identificación molecular se estudiaron las regiones ITS1 e ITS2, incluyendo el gen 5.8S del ADNr. El espécimen fue definido como *Ganoderma sessile* (= *G. resinaceum*) (Suarez-Medellín *et al.*, 2012).

#### **2.4. Composición química**

Más de 180 sustancias químicas se han aislado de especies de *Ganoderma*, las cuales mayormente incluyen: polisacáridos, triterpenos, nucleósidos, ergosteroles, ácidos grasos, proteínas/péptidos y elementos traza (Gao y Zhou, 2003).

Se tiene registrado que la composición del extracto de *Ganoderma* (% de peso seco) fue de material Folin-positivo (68.9%), glucosa (11.1%), proteína (7.3%) y metales (10%) (K, Mg y Ca, principalmente, con Ge como quinto metal más abundante, con una concentración de 489 µg/g) (Chiu *et al.*, 2000). Sin embargo, hay diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química de los productos de *Ganoderma*, dependiendo de las especies, el origen, los procesos de extracción y las condiciones del cultivo (Wasser y Weis, 1999).

*Ganoderma* contiene principalmente proteínas, grasas, hidratos de carbono y fibra. Los componentes nutrimentales son similares entre especies silvestres y

cultivadas; en los extractos, aumentan significativamente las cantidades de proteína y carbohidratos, y se elimina la fibra cruda. En la **Tabla 3**, se presenta esta comparación de acuerdo a Gao y Zhou (2003).

Se hizo el análisis de los componentes del basidiocarpo de *G. lucidum* que incluyeron además las ramificaciones sin pileo. En el análisis, se hace la comparación de los componentes con *G. tsugae* en especies silvestres y cultivadas, así como en el extracto. Se presenta el análisis proximal (**Tabla 4**), el contenido de azúcares solubles (**Tabla 5**) y el contenido de aminoácidos libres (**Tabla 6**) (Mau *et al.*, 2001).

En fermentación sólida, *G. lucidum* mostró diferencias con el testigo sin fermentación. Con la fermentación, hay aumento de proteínas y de azúcares reducidos, mientras que hay descenso en los almidones (Han *et al.*, 2005) (**Tabla 7**).

**Tabla 3.** Componentes nutrimentales de *Ganoderma lucidum* (g/100 g de materia seca) comparados con hongos silvestres y cultivados, y en el extracto.

<b>Componentes</b>	<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>		
	<b>Silvestre</b>	<b>Cultivada</b>	<b>Extracto</b>
Humedad	10.0	9.80	4.0
Proteína cruda	11.82	9.71	23.70
Grasa cruda	2.51	6.21	2.40
Carbohidratos totales	25.5	22.90	59.10
Fibra cruda	48.80	41.0	ND
Ceniza cruda	1.63	1.41	4.2

ND = no detectada. Fuente: Gao y Zhou (2003).



**Tabla 4.** Composición proximal (%) de *Ganoderma lucidum* y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con *Ganoderma tsugae*.

<b>Componentes</b>	<b><i>G. lucidum</i></b>	<b><i>G. lucidum</i>, ramificaciones del estípite</b>	<b><i>G. tsugae</i></b>
Humedad	8.98 ± 0.11	9.54 ± 0.06	5.46 ± 0.13
Materia seca	91.02 ± 0.11	90.46 ± 0.06	94.54 ± 0.13
Ceniza	1.77 ± 0.05	1.70 ± 0.30	0.72 ± 0.01
Carbohidratos	26.02 ± 1.58	27.78 ± 1.71	21.83 ± 1.71
Grasa cruda	5.13 ± 0.19	3.85 ± 0.06	4.62 ± 0.20
Fibra cruda	59.16 ± 0.85	59.49 ± 1.51	65.29 ± 1.36
Proteína cruda	7.92 ± 0.54	7.18 ± 0.42	7.54 ± 0.44

Fuente: Mau *et al.* (2001).

**Tabla 5.** Contenido de azúcares solubles (mg/g en peso seco) de *Ganoderma lucidum* y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con *Ganoderma tsugae*.

<b>Azúcar</b>	<b><i>G. lucidum</i></b>	<b><i>G. lucidum</i>, ramificaciones del estípite</b>	<b><i>G. tsugae</i></b>
Glucosa	ND	ND	ND
Manitol	3.58 ± 1.01	ND	ND
Myo-inositol	ND	ND	2.70 ± 1.0
Trealosa	2.80 ± 0.24	1.68 ± 0.33	5.67 ± 1.26
<b>Total</b>	6.38 ± 1.06	1.68 ± 0.33	8.37 ± 1.48

ND = no detectada. Fuente: Mau *et al.* (2001).

**Tabla 6.** Contenido de aminoácidos libres (mg/g de materia seca) de *Ganoderma lucidum* y de las ramificaciones de su estípite, en comparación con *Ganoderma tsugae*.

<b>Aminoácidos</b>	<b><i>G. lucidum</i></b>	<b><i>G. lucidum</i>, ramificaciones del estípite</b>	<b><i>G. tsugae</i></b>
L-Alanina	1.28 ± 0.02	0.25 ± 0.07	0.15 ± 0.03
L-Arginina	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.03 ± <0.01
L-Ácido aspártico	0.06 ± <0.01	0.20 ± 0.08	0.22 ± 0.02
L-Ácido glutámico	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.06 ± 0.01
Glicina	0.03 ± 0.01	0.37 ± 0.11	0.04 ± 0.01
L-Histidina*	ND	ND	0.03 ± <0.01
L-Isoleucina*	1.08 ± 0.37	0.16 ± 0.05	0.54 ± 0.02
L-Leucina*	1.32 ± 0.18	0.17 ± 0.06	2.40 ± 0.14
L-Lisina*	3.96 ± 0.31	0.45 ± 0.05	3.66 ± 0.05
L-Metionina*	1.04 ± 0.02	0.75 ± 0.09	1.14 ± 0.05
L-Fenilalanina*	1.85 ± 0.02	0.01 ± <0.01	1.59 ± 0.02
L-Serina	0.04 ± <0.01	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.01
L-Treonina*	0.03 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.03 ± <0.01
L-Triptofano*	0.48 ± 0.05	ND	0.32 ± 0.04
L-Tirosina	1.69 ± 0.29	0.75 ± 0.09	1.75 ± 0.21
L-Valina*	0.76 ± 0.08	0.43 ± 0.06	0.68 ± 0.05
<b>Total</b>	<b>13.8 ± 0.58</b>	<b>4.25 ± 0.17</b>	<b>12.70 ± 0.07</b>

\* Aminoácidos esenciales.

ND = no detectada. Fuente: Mau *et al.* (2001).

**Tabla 7.** Componentes nutrimentales de *Ganoderma lucidum* con y sin fermentación sólida, en base seca.

<b>Componentes (%)</b>	<b>Testigo</b>	<b>Con fermentación</b>
Proteínas	11.0 ± 0.5	16.5 ± 0.7
Grasa cruda	10.3 ± 0.6	8.5 ± 0.3
Almidón	64.5 ± 1.5	25.3 ± 0.8
Azúcares reducidos	4.2 ± 0.2	20.6 ± 0.8

Fuente: Han *et al.* (2005).

## **2.5. Actividad biológica y funciones farmacológicas**

*G. lucidum* ha sido usado por miles de años en la medicina tradicional en China, Japón y en otros países de Asia para el tratamiento de varias enfermedades que incluyen: cáncer, desórdenes inmunológicos, hepatitis, artritis, nefritis, bronquitis, asma, arterioesclerosis, hipertensión, úlcera gástrica, insomnio, leucopenia, anorexia, diabetes, leucemia, entre otras. El extracto de *G. lucidum* tiene compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidativa, antitumoral, cardiovascular, antialérgica, hepatoprotectora, antidiabética; los cuales pueden ser una alternativa a los antibióticos, antimicóticos, antioxidantes y citostáticos comerciales (Paterson, 2006; Čilerdžić *et al.*, 2014; Cör *et al.*, 2014; Heleno *et al.*, 2012; Calviño *et al.*, 2012; Zong *et al.*, 2012).

Los polisacáridos y triterpenos han sido los compuestos más investigados en *G. lucidum* y especies relacionadas; sin embargo, los esteroides, lectinas y proteínas también han sido estudiadas (Shiao, 2003; Paterson, 2006). Estos compuestos están relacionados con una gran actividad biológica. En la **Tabla 8** se presentan algunos compuestos que tienen efecto terapéutico contra varias enfermedades.

**Tabla 8.** Algunos compuestos bioactivos y su efecto terapéutico contenidos en *Ganoderma lucidum*.

<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>Efecto terapéutico/actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
Triterpenoides	Anticancerígeno, neurotrófico, antiviral, antioxidante	Guan <i>et al.</i> (2008); Trajković <i>et al.</i> (2009); Thyagarajan <i>et al.</i> (2010); Li <i>et al.</i> (2013); Ruan <i>et al.</i> (2014); Zhang <i>et al.</i> (2014); Zhang <i>et al.</i> (2011); Smina <i>et al.</i> (2011)
Ácido ganodérico	Apoptosis en cáncer pulmonar, células cancerosas	Tang <i>et al.</i> (2006); You <i>et al.</i> (2012)
Ganodermanontriol	Cáncer de mama	Jiang <i>et al.</i> (2011)
Ácidos grasos	En esporas. Antitumor	Gao <i>et al.</i> (2012)
Polisacáridos	Hepatoprotectora, antidiabético, efecto inmuno-modulador, disminución de estrés oxidativo en músculo esquelético, antioxidante, en tratamiento de Alzheimer	Gao <i>et al.</i> (2005); De Silva <i>et al.</i> (2012); Gao <i>et al.</i> (2004); Zhonghui <i>et al.</i> (2014); Ma <i>et al.</i> (2013); Cör <i>et al.</i> (2014)
Ácidos triterpénicos y esteroides	Antiinflamatorio, antitumor	Akihisa <i>et al.</i> (2007)
Proteoglucanos	Antidiabético	Pan <i>et al.</i> (2015)
Fenoles	Antioxidantes	Heleno <i>et al.</i> (2012); Chien <i>et al.</i> (2011)
Ácido p-hidroxibenzoico y ácido cinnámico	Antimicrobiano	Heleno <i>et al.</i> (2013)
Extractos	Anti-inflamatorio, antiperoxidativo, antimutagénico, antimicrobiano, apoptosis en leucemia, mieloma y linfoma, protector de células renales, apoptosis en carcinoma gástrico, antimicrobiano, citotóxico, inhibidor de tirosinasa	Lakshmi <i>et al.</i> (2003); Ofodile <i>et al.</i> (2005); Müller <i>et al.</i> (2006); Lai <i>et al.</i> (2006); Jang <i>et al.</i> (2010); Čilerdžić <i>et al.</i> (2014); Chien <i>et al.</i> (2008)

## 2.6. Otras aplicaciones

Se han adicionado compuestos de *G. lucidum* a varios cosméticos con la finalidad de revitalizar y fortalecer la piel, para evitar su envejecimiento y las arrugas (Hyde *et al.*, 2010).

*G. lucidum* en medios de cultivo líquido ha demostrado su capacidad para biodegradar a dos hidrocarburos aromáticos policíclicos como son el fenantreno y pireno (Ting *et al.*, 2011) o en la decoloración de recalcitrantes tintes textiles como es el colorante de antraquinona Remazol Brillante Blue (Murugesan *et al.*, 2007) y la biodegradación y decoloración de tintes textiles en aguas residuales (Selvakumar *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha experimentado con *G. lucidum* para determinar su resistencia a herbicidas como el bentazon y diuron, por lo que, se puede utilizar para reducir la contaminación por herbicidas (Da Silva Coelho *et al.*, 2010). Otro herbicida estudiado es el picloram que fue removido con la biomasa de *G. lucidum* tratada con calor (Maciel *et al.*, 2013).

Otra aplicación de *G. lucidum* fue el adicionarlo en la fermentación del vino de arroz coreano (yakju) para darle un valor agregado e incrementar la funcionalidad farmacéutica en sus propiedades antihipertensivas (Kim *et al.*, 2004). Un aspecto similar es el de utilizar los compuestos bioactivos de *G. lucidum* en la industria cervecera como materia prima para la producción de cerveza con propiedades funcionales (Leskosek-Cukalovic *et al.*, 2010).

Se experimentó con los productos obtenidos en la fermentación ( $\beta$ -D-glucanos) de *G. lucidum* en cultivo sumergido y se adicionaron al alimento de cerdos destetados para observar el efecto en el crecimiento, rendimiento y la inmunocompetencia. Se obtuvieron resultados positivos al aumentar los anticuerpos y descender la glucosa en la sangre (Chen *et al.*, 2008).

## **2.7. *G. lucidum* como parásito en plantas**

*G. lucidum* y otras especies de este género, son causantes de la pudrición de la raíz y el tallo de muchas plantas tropicales perennes, lo que causa grandes pérdidas en las cosechas. Algunas plantas hospederas son: la palma de aceite (*Elais guineensis*), la palma de coco (*Cocos nucifera*), nuez de betel (*Areca catechu*), té (*Camellia sinensis*) (Paterson, 2007; Glen *et al.*, 2009; Kandan *et al.*, 2010; Rajendran *et al.*, 2014). Otras plantas o árboles que son atacadas son las especies de los géneros: *Acacia*, *Acrocarpus*, *Albizia*, *Anacardium*, *Aquilaria*, *Artocarpus*, *Azadirachta*, *Bambusa*, *Bombax*, *Caesalpinia*, *Cajanus*, *Cassia*, *Casuarina*, *Cedrus*, *Dalbergia*, *Delonix*, *Eucalyptus*, *Guazuma*, *Jacaranda*, *Leucaena*, *Mangifera*, *Melia*, *Quercus*, *Tamarindus*, *Terminalia*, *Theobroma*, entre otros (Sankaran *et al.*, 2005).

## **2.8. Las enzimas en *G. lucidum* y su aplicación**

*G. lucidum* pertenece al grupo de los hongos de podredumbre blanca. Este hongo produce enzimas ligniolíticas extracelulares como son las lacasas, lignino peroxidasas y Mn peroxidasas oxidantes que participan en la modificación y degradación de la lignina, y de compuestos aromáticos estructuralmente similares, de bajo peso molecular (Simonić *et al.*, 2010).

Las lacasas (bencenediol: oxígeno reductasa, EC 1.10.3.2.) pertenecen a la familia multicobre oxidasas. Estas enzimas catalizan la oxidación de diversos substratos con la reducción de oxígeno molecular a agua. Las lacasas fueron descubiertas por Yoshida en 1883, después de observar el látex del árbol *Rhus vernicifera* que se endurecía con la presencia del aire. La actividad de las lacasas se ha encontrado en plantas, algunos insectos y bacterias. Sin embargo, muchas lacasas se han reportado de hongos y la mayoría de las lacasas útiles son de origen fúngico. Más de 60 cepas pertenecientes a Ascomyta, Zygomycota y especialmente Basidiomycota muestran actividad de lacasas. Las lacasas fúngicas son en su mayoría inducibles, extracelulares,

glicoproteínas monoméricas, con hidratos de carbono entre 10 y 20%, lo que puede contribuir a su estabilidad. La cadena contiene alrededor de 520 a 550 incluyendo un péptido de secreción N-terminal. Las lacasas son enzimas multinucleadas. El sitio activo de la lacasa comprende cuatro átomos de cobre en tres grupos, referidos como T1, T2 y T3. Los átomos de cobre difieren entre sí en sus señales de resonancia paramagnética. El cobre T1 es el responsable del azul de la enzima y tiene una absorbancia alrededor de 610 nm. El cobre T2 es incoloro y no se detecta espectrofotométricamente, pero sí con la señal de resonancia paramagnética. El cobre T3, es binuclear y diamagnético, muestra una absorbancia espectral fluorescente en la región de 330 nm. Las lacasas son las primeras enzimas ligninolíticas secretadas a los medios circundantes del hongo, que normalmente oxida sólo a aquellos compuestos modelo de lignina que tienen un grupo fenólico libre, formando radicales fenoxi, como los mediadores que son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Maciel *et al.*, 2010).

Las enzimas lignino peroxidasas (EC 1.11.1.14, LiPs) pertenecen a la familia de las oxidoreductasas y fueron descritas por primera vez en el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall (Orden Corticiales) en 1983. Esta enzima (LiP) se ha registrado en hongos Basidiomycetes de podredumbre blanca y en Actinomycetes. LiP es una hemoproteína extracelular, dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con un alto potencial redox y con bajo pH óptimo, por lo cual es capaz de oxidar una variedad de sustratos, incluyendo la reducción de polímero por lo que, tiene un gran potencial para su aplicación en diversos procesos industriales. LiP muestra poca especificidad de sustratos, reaccionando con una amplia variedad de compuestos de lignina modelo e incluso con moléculas no relacionadas. Es capaz de oxidar anillos aromáticos metoxilados sin un grupo libre fenólico, generando radicales de cationes que pueden reaccionar por una variedad de vías, incluyendo la apertura del anillo, desmetilación y fenol dimerización. La LiP en contraste con las lacasas, no requiere de

mediadores, pero necesita peróxido de hidrógeno para iniciar la catálisis (Maciel *et al.*, 2010).

Las enzimas manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13, MnP) pertenecen a la familia de las oxidoreductasas. Estas enzimas se descubrieron en el mismo hongo *Phanerochaete chrysosporium* después de la enzima LiP, como otra enzima degradante de la lignina. La enzima MnP se encuentra en casi todos los hongos de podredumbre blanca, oxida de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  los cuales oxidan estructuras fenólicas de los radicales fenoxilo. El producto  $Mn^{3+}$  es altamente reactivo con quelantes de ácido orgánico, como oxalato o malato, los cuales son producidos por el hongo. El potencial redox de la MnP es menor que la LiP y tiene capacidad para oxidar substratos fenólicos *in vitro*. Además puede oxidar  $Mn^{2+}$  sin  $H_2O_2$  con la descomposición de los ácidos y la producción concomitante de radicales peroxilo que pueden afectar a la estructura de la lignina (Maciel *et al.*, 2010).

La posible aplicación de las enzimas ligninolíticas en biotecnología, ha estimulado su investigación, y la comprensión de los mecanismos fisiológicos que regulan su síntesis en la bioconversión de la lignocelulosa; podría ser útil para mejorar el proceso tecnológico en la producción de hongos comestibles y medicinales (Songulashvili *et al.*, 2007).

Las demandas fisiológicas para la producción de enzimas ligninolíticas varían entre las especies de hongos de podredumbre blanca, incluso entre cepas de una especie. Los factores que afectan significativamente la producción de enzimas son el tipo de cultivo (sumergido o de estado sólido), fuentes y concentraciones de carbono y nitrógeno, la presencia o ausencia de diferentes inductores, el pH del medio, la temperatura, agitación, período de cultivo, etc. Diversos residuos agrícolas y forestales son los mejores substratos para la producción de enzimas que la glucosa u otros sacáridos simples (Songulashvili *et al.*, 2006; 2007). Se ha observado que la lacasa se produce hasta cuatro



veces más en cultivos con alto contenido de nitrógeno (7.9% en tallo de maíz contra 0.8% en aserrín de la vid) (Simonić *et al.*, 2010).

El estudio y la aplicación de las lacasas se ha extendido a procesos industriales relacionados con la biorremediación, delignificación de compuestos lignocelulósicos, blanqueado del papel, remoción de colorantes textiles, pesticidas, tratamiento de aguas residuales, en la industria de alimentos o bebidas, entre otros (Paterson, 2007; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014; Desai y Nityanand, 2011; Ting *et al.*, 2011; Majeau *et al.*, 2010; Cañas y Camarero, 2010).

La producción de enzimas (lacasa y manganeso peroxidasa) depende de las especies y de las cepas. La fuente de carbono en el substrato lignocelulósico juega un papel crucial en la producción de enzimas. Aumenta la producción de lacasas cuando la concentración de glucosa desciende a niveles críticos (como en *Trametes pubescens*). Los compuestos aromáticos regulan la síntesis de las enzimas lignilolíticas, aunque su efecto es muy específico dependiendo de las peculiaridades fisiológicas del hongo (Elishasvili y Kachlishvili, 2009).

## **2.9. Inductores para incrementar lacasas en *G. lucidum***

En la naturaleza las especies de *Ganoderma* producen pocas cantidades de lacasas. Por esta razón, muchos inductores o mediadores se han estudiado y agregado a los medios de cultivo. El primer inductor utilizado es el ABTS [(2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico)]. Otros inductores que se han utilizado para incrementar la producción de las lacasas o la producción de metabolitos secundarios, son entre otros, el glicerol y cáscara de mandarina (Elishashvili y Kachlishvili, 2009), sulfato de cobre (Fonseca *et al.*, 2010), ácido ferúlico y cobre (Kuhar y Papinutti, 2014), etanol, ácido gálico, alcohol veratril, xilidina y cáscara del fruto de tamarindo (Manavalan *et al.*, 2013), coixenolida (Zhou *et al.*, 2014), fenobarbital (Liang *et al.*, 2010) y aceite de maíz (Huang *et al.*, 2009).

Al utilizar como inductor a residuos de alimentos como la cáscara de mandarina, aumenta considerablemente la producción de lacasas (la presencia de lignocelulosa es prerrequisito) en cepas de *G. lucidum* (Elishasvili y Kachlishvili, 2009).

Se tiene el estudio de Spezzia (2012) quien desarrolló el micelio de una cepa de *G. lucidum* en medio líquido con extracto de malta (EMB), suplementado con 0.1 mM de sulfato de cobre como inductor, obteniendo un incremento poco significativo al registrar sólo 1 U/mL de actividad de lacasa, por lo cual, el sulfato de cobre no fue un buen inductor para esta especie.

En la **Tabla 9**, se presentan algunos inductores que incrementaron la producción de lacasas en *G. lucidum*. Se incluyen además otras especies de *Ganoderma*. Se señalan las condiciones del cultivo, los sustratos enzimáticos como son el ABTS, guayacol, *o*-dianisidina y 2,6-dimetoxifenol (DMP) y las concentraciones que se utilizaron para determinar los valores de las lacasas. De manera general, se observan incrementos en la actividad volumétrica de las lacasas.

**Tabla 9.** Inductores que incrementaron la producción de lacasas en *Ganoderma lucidum* y en otras especies de este género.

<b>Especie</b>	<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Actividad de lacasas</b>	<b>Referencia</b>
<i>G. spp.</i>	4 cepas, en cultivo líquido con agitación. 1mM de <i>o</i> -dianisidina	Cepa 1: 0.581 U/mL, cepa 2: 6.057 U/mL, cepa 3: 49.519 U/mL y cepa 4: 2.561 U/mL	De Souza Silva <i>et al.</i> (2005)
<i>G. adspersum</i>	Fermentación sumergida. Con cáscara de mandarina, salvado de trigo y residuo de grano en la producción de alcohol. ABTS 1 mM	En el control 100 U/L. Con cáscara de mandarina: 34,000 U/L. Con residuo de grano: 8,000 U/L; salvado de trigo: 600 U/L	Songulashvili <i>et al.</i> (2006)
<i>G. lucidum</i>	Fermentación sumergida. Adición de cáscara de mandarina, salvado de trigo y residuo de grano en la producción de alcohol. ABTS 1 mM	Con cáscara de mandarina: 35,980 U/L. Con residuo de grano: 57,740 U/L; salvado de trigo: 97,340 U/L	Songulashvili <i>et al.</i> (2007)
<i>G. sp.</i>	Cultivo líquido, con agitación. Con adición de alcohol veratril 0.85 mM. ABTS 2.5 mM	En testigo, 20 U/mL. Con alcohol veratril, 240 U/mL	Teerapatsakul <i>et al.</i> (2007)
<i>G. lucidum</i>	Cultivo sumergido con adición de glicerol o cáscara de mandarina. ABTS 1mM	Medio con glicerol = 0.1 a 0.3 U/mL. Medio con cáscara de mandarina = 20 a 75.4 U/mL	Elisashvili y Kachlishvili (2009)
<i>G. lucidum</i>	Salvado de trigo como medio sólido. ABTS 1mM	En el medio sólido: 2,540 U/g de substrato seco	Murugesan <i>et al.</i> (2007)
<i>G. lucidum</i>	10 cepas de diferentes países. Fermentación sólida con residuos agrícolas. ABTS 50 mM	En cepa China: 129.46 U/L en tallos de maíz, con 20 mM de concentración de N. En paja de arroz 129.01 U/L, con 10 mM de N	Simonić <i>et al.</i> (2010)
<i>G. applanatum</i>	Cultivo líquido, estático, 10 días de incubación. 5 mM de DMP	En testigo, 44.89 U/L. Con adición de CuSO <sub>4</sub> 1,856.81 U/L	Fonseca <i>et al.</i> (2010)
<i>G. lucidum</i>	Cultivo salino con adición de residuos del fruto amarillo de la pasión ( <i>Passiflora edulis</i> ). ABTS	En el medio de cultivo utilizado: 9,600 U/L	Zilly <i>et al.</i> (2011)
<i>G. lucidum</i>	Cultivo líquido en agitación. Adición de etanol, CuSO <sub>4</sub> , ácido gálico, alcohol veratril y cáscara de tamarindo. ABTS y guayacol	Con etanol: 2.53 U/mL. Con ácido gálico: 3.79 U/mL. Con CuSO <sub>4</sub> : 1.5 U/mL. En mezcla con cáscara de tamarindo: 74.84 U/mL)	Manavalan <i>et al.</i> (2013)

## 2.10. El cultivo de *G. lucidum* en sustrato sólido

Con base a que las lacasas son secretadas por los hongos y tienen la capacidad de degradar la lignina de diversos materiales lignocelulósicos, se ha realizado el cultivo de hongos comestibles y medicinales utilizando como sustrato diversos subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales, ya sea solos o en varias mezclas, con o sin adición de suplementos al sustrato. Algunos ejemplos del cultivo de *G. lucidum* son la utilización de las cáscaras de la semilla del girasol, paja y cascarilla de arroz, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, residuos de la industria del café, entre otros (González-Matute *et al.*, 2002; Postemsky *et al.*, 2014; Manavalan *et al.*, 2012; Čilerdžić *et al.*, 2014; Jaramillo *et al.*, 2010).

En la **Tabla 10**, se presentan algunos resultados del cultivo de *G. lucidum* en sustrato sólido.

**Tabla 10.** Substratos utilizados en el cultivo de *Ganoderma lucidum*, tiempo de colonización del micelio, ciclo de cultivo y eficiencia biológica obtenida.

Substratos	Colonización micelial, días y temperatura de incubación		Formación de primordios de fructificación, días, temperatura en la formación y humedad relativa (HR)			Ciclo de cultivo (días)	Eficiencia biológica (%)	Referencias
	Días	°C	Días	°C	HR (%)			
Cáscara de semilla de girasol y malta	10-13	24±1	NS	24±3	90-95	20-25	7.6-10	González-Matute <i>et al.</i> (2002)
Aserrín y residuos de té	NS*	25±2	NS	25±2	80-90	90	16.6-34.9	Peksen y Yakupoglu (2009)
Aserrines y cereales	12	25±2	14-15	30-32	85-90	60	13.5-18.6	Erkel (2009).
Subproductos de la industria del café	30-35	28	70	20	80-93	90-100	24.2±9.1	Jaramillo <i>et al.</i> (2010)
Bagazo de caña de azúcar	10-15	30	15-20	30±2	85-95	40	80±15	Manavalan <i>et al.</i> (2012)

En cuanto al cultivo de *G. lucidum* sobre el substrato conformado por aserrines, se tiene el estudio del aserrín de *Acacia confusa* suplementado con residuo de soya, en donde los basidiocarpos se diferenciaron en las relaciones C/N 80 y C/N 70. En la relación C/N 60 se formaron estípites sin píleo, mientras que en las relaciones entre 30 y 50 no hubo formación de basidiocarpos. Además, al comparar la composición de los basidiocarpos en la relación 80, el contenido de los polisacáridos fue el doble del contenido en la relación 70 (Hsieh y Yang, 2004).

Se estudiaron los efectos de las mezclas de los aserrines del álamo, roble y haya, suplementados con salvado de trigo, arroz y maíz. El mejor substrato fue el aserrín de roble con los tres tipos de salvado (Erkel, 2009).

Dos cepas de *G. lucidum* se cultivaron en el aserrín de *Carpinus betulus* en mezcla con residuos de hojas del té. La mejor proporción fue la de 80:20 (Peksen y Yakopoglu, 2009).

Es importante considerar que en el cultivo de diversos hongos sobre substratos sólidos, el rendimiento depende de la especie, de la cepa, del substrato y de las condiciones ambientales en que se lleve a cabo.

Los trabajos en México que hacen referencia a especies de *G. lucidum*, son aquellos que muestran la factibilidad de realizar el cultivo artificial del hongo en residuos agroindustriales (Rodríguez *et al.*, 1997; Palacios y Ramírez, 2000).

Se realizó el cultivo de *G. lucidum* sobre bagazo de maguey tequilero combinado con 5% de cáscara de cacahuete o con 5% de cáscara de algodón. La eficiencia biológica obtenida fue de 5.06% para el bagazo de maguey, 7.84% para la mezcla con cáscara de cacahuete y de 8.46% para la mezcla con cáscara de algodón. Además, de los basidiomas se obtuvieron extractos que fueron probados en cultivos de linfocitos. Se incrementó hasta en 600% la formación de linfocitos en presencia de los extractos probados (Soto-Velazco *et al.*, 2002).

Se obtuvieron basidiocarpos bien diferenciados de ocho cepas del subgénero *Ganoderma* y una cepa del subgénero *Elfvigia*, al utilizar la formulación COLPOS-17 (Sobal *et al.*, 2010) como sustrato, conformada por bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, aserrín de encino y de *Bursera*, olote de maíz, carbonato y sulfato de calcio. Los rendimientos máximos fueron de 202 g/kg de peso seco del sustrato para las ocho cepas del subgénero *Ganoderma*, y para la cepa del subgénero *Elfvigia* fueron de 68 g/kg de peso seco del sustrato. La eficiencia biológica registrada no fue mayor al 10% (Tello, 2010).

Con base a Zhou *et al.* (2012), las condiciones ambientales para el cultivo de *G. lucidum* son: para el desarrollo micelial, temperatura óptima entre 25 °C a 30 °C; para la formación de primordios de fructificación de 18 °C a 25 °C; para el desarrollo de basidiocarpos entre 24 °C y 28 °C. A temperaturas inferiores a 20 °C, el basidiocarpo detiene su crecimiento. En el desarrollo micelial, la humedad en el sustrato debe estar entre 60% y 70%, la humedad relativa en la formación de primordios entre 85% a 90% y para el desarrollo de los basidiocarpos entre 85% a 95% en el ambiente. Cuando la concentración de CO<sub>2</sub> es inferior a 0.1%, el basidiocarpo tiene un desarrollo anormal. Durante la formación de los primordios de fructificación, se requiere una iluminación de 500 a 1,000 lx; en el desarrollo de basidiocarpos de 3,000 to 50,000 lx; con 3,000–10,000 lx, el estípite y el píleo se desarrollan normalmente. El valor óptimo del pH en el desarrollo micelial es de 5.0 a 5.5.

### **2.11. Producción de *Ganoderma* en México**

En México la producción anual de hongos asciende aproximadamente a 47,468 ton de hongos frescos, por lo cual, es el mayor productor de Latinoamérica y se ubica como el 16° productor mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando 25 mil empleos directos e indirectos. Con el cultivo de hongos se reciclan más de 474,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales.

Los géneros de hongos que se cultivan comercialmente en México son *Agaricus* (95.35%), *Pleurotus* (4.62%), *Lentinula* (0.038%), *Ganoderma* y *Grifola*. De estos dos últimos géneros, no se tiene una producción consistente, sólo se han registrado pruebas comerciales. Para el caso de *Ganoderma*, se tiene su cultivo en la empresa Cultivamex, S. P. R. (antes Hongos Michoacanos, S. A.; Acuitzio, Michoacán) (Martínez-Carrera *et al.*, 2007; Martínez-Carrera y López-Martínez, 2010).

### **2.12. El ácido salicílico (AS) y el ácido acetilsalicílico (AAS)**

Siglos antes de que científicos médicos identificaran los numerosos efectos terapéuticos de los salicilatos, los habitantes del viejo y nuevo mundo descubrieron de forma independiente que las hojas y las cortezas del árbol del sauce (*Salix* sp.) curaban dolores y la fiebre. En el siglo IV aC., Hipócrates les daba a masticar hojas de sauce a las mujeres para calmar el dolor durante el parto. Mucho antes de la llegada de Cristóbal Colón, en América del Norte, los indios usaban un puré de extractos de la corteza del sauce en forma de compresas para aliviar dolores. Científicos franceses y alemanes siguieron el folclore, sobre los poderes curativos de la corteza del sauce. En 1828, Johann Buchner, trabajando en Munich, aisló una pequeña cantidad de salicina, un glucósido alcohol salicílico, que fue el principal salicilato en la corteza del sauce. El nombre de ácido salicílico (AS) proviene del latín *Salix* (del árbol del sauce) y fue dado por Raffaele Piria en 1838. Durante el siglo XIX, el ácido salicílico y otros salicilatos, principalmente ésteres metílicos y glucósidos, fácilmente convertibles a ácido salicílico, se aislaron de una variedad de plantas, incluyendo a *Spirea* y *Gaultheria*. La primera producción comercial del ácido salicílico sintético fue en Alemania en 1874. La aspirina, un nombre comercial para el ácido acetilsalicílico (AAS), fue producida por la compañía alemana Bayer en 1898 y rápidamente se convirtió en uno de los medicamentos más vendidos del mundo. La aspirina resultó tan efectiva como

el ácido salicílico, pero causó menos irritación al sistema digestivo humano (Raskin, 1992; Vlot *et al.*, 2009).

El AS se considera como una hormona debido a sus diferentes papeles en la vida de la planta. Tiene un papel regulador en varias etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas: germinación de las semillas, flores y producción de frutos (Vlot *et al.*, 2009; Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011). El AS es un compuesto fenólico que posee un anillo aromático con un grupo hidroxilo o sus derivados funcionales. En estado libre, se encuentra en forma de polvo cristalino con punto de fusión entre 157-159 °C y un pH de 2.4 (Hayat *et al.*, 2010).

El AS se ha encontrado en 36 plantas pertenecientes a diversos grupos. En plantas como el arroz, pastos, cebada y soya, el nivel del AS es aproximadamente de 1 µg/g en peso fresco. En las piezas florales de siete especies y en las hojas de 27 especies, se encontró una variación substancial en el nivel del AS (Hayat *et al.*, 2010).

Un papel fundamental del AS, es la respuesta que ha demostrado al estrés biótico y abiótico. En particular, después de los ataques de patógenos, el AS se acumula en grandes cantidades en los órganos de las plantas infectadas y a la vez, activa una cascada de eventos biológicos que conducen a la iniciación de la respuesta hipersensible y a la activación de la respuesta sistémica adquirida (RSA). El AS desempeña un papel en la respuesta de la planta a una variedad de tensiones ambientales (metales pesados, temperatura, radiación UV y salinidad). Varios experimentos han demostrado que el AS alivia los efectos tóxicos o genera tolerancia a tales tensiones. Estos efectos a largo plazo implican la regulación de genes, pero además, a corto plazo afecta a procesos fisiológicos tales como la absorción y transporte de iones, la tasa de fotosíntesis, la transpiración y la conducta estomática. Por otra parte, osmorregula el movimiento de los iones del pulvínulo del peciolo de las hojas



(Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011; Fu y Dong, 2013; Dédaldéchamp *et al.*, 2014).

Un patógeno no virulento no tan solo desencadena la respuesta de defensa a nivel local, sino también induce la producción de señales tales como el ácido salicílico, el ácido metil salicílico, ácido azelaico, glicerol-3-fosfato y abietano diterpenoide dehidroabietinal. Estas señales conducen a la expresión sistémica de los genes (patogénesis relacionada) en el tejido distal no inoculado, para proteger al resto de la planta de infecciones secundarias. Este fenómeno es conocido como resistencia sistémica adquirida. Esta resistencia también puede ser inducida por la aplicación exógena del AS o sus análogos sintéticos ácido 2,6-dicloroisonicotínico y benzotiadiazol S-metil ester. La RSA tiene un amplio espectro, proporciona resistencia contra hongos patógenos, oomicetos, virus y bacterias. La RSA mantiene una “memoria” inmunológica en las plantas, que puede durar semanas o meses, incluso en todo el tiempo del crecimiento de la planta.

Por lo que respecta en la aplicación en el hombre y en varios mamíferos, el ácido acetilsalicílico (AAS) se utiliza con el nombre comercial de aspirina, la cual tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas, regula el sistema cardiovascular, porque inhibe la producción de la enzima ciclooxigenasa (COX 2), la cual sintetiza mediadores inflamatorios como son las prostaglandinas y los tromboxanos (Gilroy, 2005; Dinarello, 2010).

### **2.13. Aplicación del AS en plantas de importancia económica**

El AS participa en la respuesta de la planta al estrés causado por alta salinidad (Munné-Bosch *et al.*, 2007; Arfana *et al.*, 2007). Al aplicarse de manera exógena en plantas de cereales, leguminosas o en la postcosecha de frutos o raíces comestibles, disminuye el ataque por fitopatógenos, hay un incremento significativo en la cosecha y se prolonga la vida de anaquel de los frutos (Popova *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Fatemi *et al.*, 2013;

Reza *et al.*, 2013; Gimenez *et al.*, 2014). En la **Tabla 11**, se presentan algunas aplicaciones del AS en plantas o frutos.

**Tabla 11.** Algunas aplicaciones y efecto del ácido salicílico en plantas de importancia económica.

<b>Ácido Salicílico</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
100 $\mu\text{M}$	En hojas de calabaza ( <i>Cucurbita pepo</i> cv. Eskandarani), contra el virus del mosaico amarillo	Reducción de los síntomas causados por el virus, en el pretratamiento y después de la inoculación	Radwan <i>et al.</i> (2006)
1 y 2 mM L <sup>-1</sup>	Planta y frutos de la fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> cv. Selva), contra el hongo <i>Botrytis cinerea</i>	Disminución del ataque del hongo y prolongación de la calidad de los frutos en postcosecha	Babalar <i>et al.</i> (2007)
1 mM	Plantas de maíz ( <i>Zea mays</i> L., Hamidiye F1) expuestas a 40 mM de NaCl. Se reduce el peso en la materia seca	Se incrementa el peso de materia seca en condiciones de salinidad	Gunes <i>et al.</i> (2007)
100 mM	En las hojas de haba ( <i>Vicia faba</i> cv Giza 461) contra el virus del mosaico amarillo	Reduce los síntomas, incremento en el número de hojas y en la altura	Radwan <i>et al.</i> (2008)
1 mM	Aplicación foliar en la planta de cacahuate	Redujo el ataque de <i>Alternaria alternata</i>	Chitra <i>et al.</i> (2008)
200 $\mu\text{M}$	Aplicación foliar y a través de la raíz, contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en tomate	Hubo una alta resistencia sistémica adquirida	Mandal <i>et al.</i> (2009)
500 $\mu\text{M}$	Plantas de Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> L., cv. Ran) expuestas a 5 $\mu\text{M}$ de Cadmio, muestran los efectos tóxicos	Las semillas pretratadas con AS, restauraron en 33% los niveles de clorofila	Popova <i>et al.</i> (2009)
1 y 2 mM	En frutos de granada ( <i>Punica granatum</i> ) puestos en refrigeración	Se redujo el daño por la refrigeración y mantuvo su calidad nutritiva	Sayyari <i>et al.</i> (2009; 2011)
1, 0.01, 0.0001 $\mu\text{M}$	Aspersión en plántulas de fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> ) variedad Aromosa a 20 días de cultivo, con tratamiento hasta 40 días	Se incrementó la altura de la planta, número de hojas y flores. Con 0.0001 $\mu\text{M}$ se incrementó en 23% el número de frutos	Anchondo-Aguilar <i>et al.</i> (2011)
50 mM	En el desarrollo de las plántulas del pepino <i>Cucumis sativus</i>	Incrementó el porcentaje de germinación, la longitud de la raíz y la masa seca	Singh y Chaturvedi (2012)

#### **2.14. El efecto del AS en hongos fitopatógenos**

El AS se ha adicionado a medios de cultivo sólidos o líquidos en contra de hongos fitopatógenos. Se ha sugerido que el AS no tiene actividad antifúngica directa, pero sí altera varios niveles en el desarrollo del hongo. Se observó inhibición en la formación de esclerocios en *Sclerotium roffsii* y en *Sclerotinia minor* (Georgiou *et al.*, 2000). Inhibió el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Eutypa lata*. En una concentración de 1 mM y a pH 5.5 actuó como fungistático ya que modificó estructuralmente la pared, mitocondrias, vacuolas y núcleo del hongo. Entre las concentraciones de 2 a 10 mM y con pH 4 tuvo un efecto fungicida (Amborabé *et al.*, 2002).

El AS en concentraciones de 200 a 2000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y a pH 5.5 inhibió el desarrollo micelial de *Fusarium oxisporum* (Saikia *et al.*, 2003). En la concentración de 800  $\text{mg L}^{-1}$  inhibió el crecimiento del micelio y redujo la germinación de las conidias. Sin embargo, en las concentraciones de 200 y 400  $\text{mg L}^{-1}$  se observó un efecto contrario, ya que estimuló el desarrollo micelial de *F. oxisporum*. En la concentración de 100  $\text{mg L}^{-1}$  el AS redujo el peso de la biomasa seca del micelio en un 52% (Wu *et al.*, 2008). En la concentración de 4  $\text{pmol ml}^{-1}$  redujo el crecimiento micelial de los hongos *Alternaria* y *Verticillium* en 13% y en *Sclerotinia* en 17% (Forchetti *et al.*, 2010).

En la concentración de 800  $\mu\text{M}$  a 1 mM de AS, no hubo germinación de las conidias de *Fusarium graminearum* y en concentraciones entre 3 a 20 mM, no hubo desarrollo micelial de este fitopatógeno que parasita a la planta del trigo (Qi *et al.*, 2012).

#### **2.15. Aplicación y efecto del AAS**

En la aplicación del AAS en especies de *Ganoderma*, se tiene únicamente el siguiente estudio:

Se adicionó el AAS, como aspirina, a medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y medio líquido con dextrosa y papa (PDB) en el desarrollo micelial de una cepa de *G. lucidum*. La finalidad fue inducir aumento en la producción del ácido ganodérico, provocando la apoptosis celular. Sin embargo, en este estudio no se determinó la actividad volumétrica de lacasas ni de proteínas (You *et al.*, 2013).

Finalmente, como se observó, existen pocos trabajos en el cultivo de especies de *Ganoderma* en substrato sólido, igualmente en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México tiene una gran cantidad de recursos genéticos nativos que deben ser aprovechados para obtener de ellos los mejores beneficios. De manera particular, los hongos pertenecientes al género *Ganoderma* se han estudiado muy poco en México y no se ha realizado el cultivo comparativo de sus especies para determinar sus propiedades funcionales y medicinales. Varias especies de *Ganoderma* han adquirido alta relevancia en la medicina moderna, debido a que presentan compuestos bioactivos, que han demostrado ser eficientes en el tratamiento de varias enfermedades como el cáncer, hepatitis, artritis, leucemia, diabetes, hipertensión, entre otras (Paterson, 2006; Čilerdžić *et al.*, 2014; Cör *et al.*, 2014; Postemsky *et al.*, 2014; Heleno *et al.*, 2012; Calviño *et al.*, 2012; Zong *et al.*, 2012).

Debido a la importancia que tiene *G. lucidum* como un hongo funcional con propiedades nutra y nutricéuticas, se requiere de un intenso cultivo para satisfacer la gran demanda que hay en los mercados internacionales. Particularmente en México, anualmente se generan 474,000 ton de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2007) que en parte se pueden aprovechar para el cultivo de especies de *Ganoderma*.

Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (AAS) ha demostrado tener efectos metabólicos relevantes sobre especies vegetales y animales. Sin embargo, no se ha investigado su efecto en las especies fúngicas; se desconoce el efecto del AAS sobre el crecimiento, desarrollo micelial y reproductivo de los hongos comestibles, particularmente del género *Ganoderma*.

En esta investigación se cultivaron comparativamente nueve cepas del género *Ganoderma* en aserrín de encino; se estudió a nivel de laboratorio el efecto del AAS como inductor en el desarrollo micelial y en la producción de proteína y enzimas (lacasas), de una cepa seleccionada, y el cultivo de esta misma cepa

en substrato sólido (aserrín de *Quercus* spp.) con la adición de AAS en tres concentraciones.

Con los resultados se puede tener la posibilidad de cultivar cepas de *Ganoderma* en substratos forestales en diferentes regiones del país.

#### **4. HIPÓTESIS**

- 4.1 Las cepas de *Ganoderma* de recursos genéticos nativos, cultivadas en aserrín de encino, desarrollan basidiocarpos bien diferenciados con buenos rendimientos.
  
- 4.2 La adición del ácido acetilsalicílico en cultivo líquido de una cepa de *G. lucidum*, tiene efecto positivo como inductor en la producción de lacasas y proteínas.
  
- 4.3. La adición del ácido acetilsalicílico en tres concentraciones en cultivo sólido (aserrín de encino) de una cepa de *G. lucidum* incrementa el rendimiento en la producción de basidiocarpos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Obtener basidiocarpos de cepas de *Ganoderma* de recursos genéticos nativos y determinar el efecto del AAS en el cultivo de una cepa de *G. lucidum* tanto en medio líquido como en medio sólido, en la producción de lacasas y proteínas, y de basidiocarpos respectivamente.

### **5.2. Objetivos particulares**

5.2.1. Realizar el cultivo en aserrín de encino (*Quercus* spp.) de recursos genéticos nativos del género *Ganoderma* para determinar las condiciones ambientales en que se desarrollan y analizar sus rendimientos.

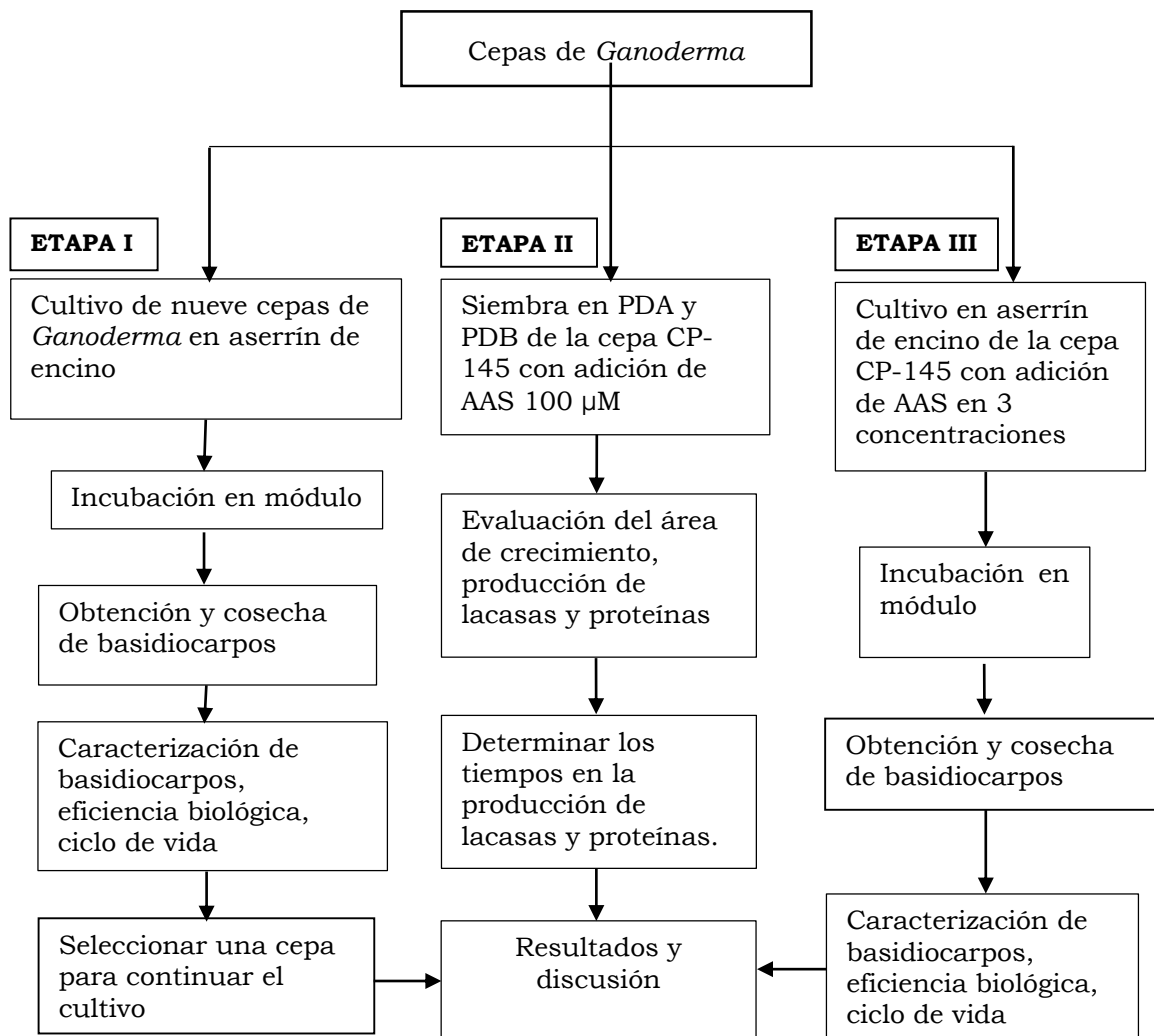
5.2.2. Cultivar una cepa seleccionada de *G. lucidum* en medio líquido (PDB) con la adición de AAS como inductor para determinar la actividad volumétrica de lacasas y proteínas.

5.2.3. Cultivar una cepa de *G. lucidum* en aserrín de encino con la adición de tres concentraciones de AAS para evaluar la producción de basidiocarpos.

5.2.4. Formular una estrategia tecnológica con potencial de aplicación en la producción comercial de especies de *Ganoderma*.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 1.** Diagrama de trabajo para el cultivo de nueve cepas de *Ganoderma*; la determinación del efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en la producción de lacasas y proteínas en la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*, así como la obtención de basidiocarpos en aserrín de encino con adición de AAS en tres concentraciones.

## **6.1. Material biológico**

Se utilizaron nueve cepas del género *Ganoderma* que se encuentran depositadas en la Unidad de Recursos Genéticos de hongos comestibles y medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, las cuales tienen las siguientes claves o registros: CP-145, CP-389, CP-395, CP-399, CP-405, CP-434, CP-447, CP-450 y CP-514. La mayoría de las cepas provienen del Estado de Morelos, México.

Con base al análisis de las secuencias de la región ITS-DNA, las cepas CP-145, CP-389, CP-395, CP-399 y CP-405 están identificadas como *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y las cepas CP-434, CP-447, CP-450 y CP-514 como *Ganoderma* sp. (Morales *et al.*, 2010).

## **6.2. Análisis estadístico**

En la realización de las experimentaciones se utilizó el diseño completamente aleatorio. Los datos obtenidos, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a los valores de medias se les aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey con  $\alpha = 0.05$  para determinar los mejores tratamientos. El análisis se realizó con el programa de cómputo Statistical Analysis System (SAS, ver. 9.0).

## **7. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **ETAPA I**

#### **7.1. CULTIVO DE NUEVE CEPAS DE *Ganoderma* EN ASERRÍN DE *Quercus* spp.**

##### **7.1.1. Resumen**

Se cultivaron en substrato sólido (aserrín de *Quercus* spp.) nueve cepas del género *Ganoderma*. El cultivo se realizó en aserrín con adición de cal y yeso. Se hicieron reposiciones de las UP's con desarrollo lento, sobre el substrato sin cal y sin yeso o en la formulación COLPOS-17. Todas las cepas tuvieron un buen desarrollo y formaron primordios de fructificación, pero sólo cinco de ellas formaron basidiocarpos diferenciados. Durante la incubación y la formación de primordios de fructificación, las condiciones ambientales fueron: temperatura de  $24 \pm 2.47$  °C como máxima y  $12.82 \pm 1.86$  °C como mínima, con humedad relativa máxima de  $54.81 \pm 6.77\%$  y mínima de  $34.92 \pm 5.61\%$ . En la maduración de los basidiocarpos la temperatura fue de  $25.5 \pm 1.02$  °C como máxima y  $18.08 \pm 2.4$  °C como mínima, con humedad relativa máxima de  $90.2 \pm 7.76\%$  y mínima de  $81.73 \pm 8.74\%$ , con iluminación natural difusa e indirecta. El ciclo de cultivo requirió de 160 a 187 días; la máxima eficiencia biológica fue de 11.02% y la mínima de 2.23%; el mayor rendimiento fue de 111.53 g/kg de peso seco del substrato y el menor fue de 22.48 g/kg de peso seco. El índice de degradación del substrato osciló entre 35.51% a 44.76%. Los basidiocarpos presentaron la forma típica de su estado silvestre. Los resultados indican la posibilidad de realizar el cultivo de las cinco cepas de *Ganoderma* en subproductos forestales a nivel regional.

### **7.1.2. Introducción**

Como se señaló, hay muy pocos trabajos en México sobre el cultivo de especies de *Ganoderma* en sustrato sólido. De ahí la importancia de cultivar cepas nativas para conocer las condiciones ambientales en que se desarrollan. Por lo cual, se hizo el cultivo de nueve cepas de *Ganoderma* con la utilización del aserrín de encino (*Quercus* spp.) como sustrato.

### **7.1.3. Materiales y métodos**

#### **7.1.3.1. Propagación de cepas y obtención de inóculos**

El medio de cultivo utilizado para la propagación de las cepas de *Ganoderma* fue papa dextrosa y agar (PDA, Bioxon). La preparación del medio se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (39 g en 1000 mL de agua). Enseguida, se disolvió al calentarse en un horno de microondas, se esterilizó en olla de presión a 121°C durante 25 minutos. Una vez tibio el medio, se vació en cajas Petri de 60 x 15 mm o de 90 x 15 mm con aproximadamente 12 o 30 mL, respectivamente, en una cámara de flujo laminar (VECO, México). Las cajas Petri se incubaron por 48 h para asegurarse de que no había contaminación.

Para obtener los inóculos, a las cajas Petri de 90 x 15 mm con medio PDA se les colocó en el centro un disco de 5 mm de diámetro y se incubaron a temperatura ambiente por 12 días. Una vez desarrollado el micelio, se procedió a tomar nuevamente discos de 5 mm de diámetro para inocularse en los medios de cultivo PDA o medio líquido de papa y dextrosa (PDB), con o sin adición del AAS para continuar con el estudio de la o las cepas.

#### **7.1.3.2. Preparación del inóculo o “semilla”**

En la preparación de la “semilla”, se siguieron las siguientes etapas: a) humedad y esterilización de grano de trigo, b) inoculación de la “semilla”.

a) *Humedad y esterilización del grano de trigo.* El grano de trigo se hirvió en agua durante 20 minutos, tiempo en el que alcanzó buena hidratación y se dejó en el agua caliente por otros 20 minutos. Posteriormente, se colocó en una canastilla de plástico con orificios para eliminar el exceso de humedad. Enseguida, se colocó en una tina de plástico y se le agregaron 4 g de cal y 12 g de yeso por cada kg de trigo en peso seco, se homogeneizó manualmente y se colocaron aproximadamente 250 g de este grano en frascos de boca ancha con tapa de plástico, los que se esterilizaron en olla de presión a 121°C durante 1.5 h; se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 14 h para pasar a la siguiente etapa.

b) *Inoculación de la “semilla”.* A los frascos con grano esterilizado se les inoculó con fragmentos del micelio previamente desarrollado en PDA de las cepas a estudiar. Se incubaron a temperatura ambiente ( $22 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ) con 12 h de iluminación y 12 h de obscuridad durante 20 días, tiempo en el cual el micelio invadió totalmente al grano de trigo. Se prepararon tres frascos con semilla por cada una de las cepas. A estos frascos con micelio, se les conoce como micelio master o F1.

### **7.1.3.3. Preparación del substrato**

De cada una de las nueve cepas se prepararon 4 réplicas (UP = unidades de producción) en aserrín de encino (*Quercus* spp.) con 1000 g en peso húmedo. Al aserrín de encino se le agregó cal y yeso. Sin embargo, al haber algunas UP's con crecimiento micelial lento, se hizo la reposición de ellas utilizando aserrín de encino sin cal y sin yeso o con la formulación COLPOS-17.

*Preparación del aserrín con cal y yeso.* Se pesaron 20 kg de aserrín de encino (*Quercus* spp.) y se colocaron en una tina de plástico, se agregaron 615.2 g de cal  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  y 2,460.6 g de yeso ( $\text{CaSO}_4$ ) y se homogeneizó agregando 27.34 L de agua para obtener 65% de humedad. Enseguida, de esta mezcla húmeda se colocaron 1000 g en bolsas de polipropileno de 13.5 x 47 cm con filtro

(Unicorn Imp. E. U. A.), las cuales se cerraron con pinzas metálicas y se esterilizaron en ollas de presión a 121°C durante 1.5 h; se dejaron enfriar durante 14 h para continuar con la siguiente etapa.

*Preparación de la formulación COLPOS-17.* Esta formulación se preparó de acuerdo a Sobal *et al.* (2010), que contiene los siguientes componentes (kg en peso seco): 1.280 de bagazo de caña de azúcar, 2.970 de salvado de trigo, 6.430 de aserrín de encino, 1.230 de aserrín de *Bursera*, 2.720 de olote de maíz, 0.450 de hidróxido de calcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] y 1.800 de sulfato de calcio (CaSO<sub>4</sub>). Se agregaron 26 L de agua para alcanzar 64.4% de humedad. Una vez homogeneizados, se colocaron 1000 g de este substrato en bolsas de polipropileno de 13.5 x 47 cm con filtro (Unicorn Imp. E. U. A.), se cerraron y esterilizaron de la misma manera en que se realizó con el aserrín de encino.

#### **7.1.3.4. Siembra en el substrato**

A cada bolsa con substrato esterilizado, se le agregó aproximadamente 100 g de inóculo (F1) que se distribuyó homogéneamente en todo el substrato. En la resiembra de las UP's en aserrín de encino (*Quercus* spp.) sin cal y sin yeso, se tiene las siguientes cepas: CP-395, CP-434 y CP-514. Con la formulación COLPOS-17 se resembraron las cepas: CP-389, CP-399 y CP-514.

Todas las bolsas (UP's) se sellaron en la parte superior con un sellador termoeléctrico (Impulse Sealer, UL) y en su parte externa se les anotó el tipo de substrato, la clave de la cepa, fecha de siembra y número secuencial. Todo este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.

#### **7.1.3.5. Determinación del peso seco, pH y temperatura del substrato**

*Peso seco.* El peso seco del substrato (aserrín de *Quercus* spp.) se determinó después de su esterilización. Se tomaron cinco muestras con 10 g en peso

húmedo por cada una, se deshidrataron en un horno (Felisa, México) a 95°C durante 24 h. Enseguida se registró el peso seco de cada muestra.

*pH.* La determinación del pH del substrato se realizó después de su esterilización. Se hicieron repeticiones con 10 g en peso húmedo del substrato y se agregaron 10 mL de agua destilada y estéril (Hycel). En las lecturas se utilizó un potenciómetro (Conductronic 20) previamente calibrado con pH 7 y con pH 4 (J:T: Baker, México). Al mismo tiempo se tomó la temperatura en °C.

Además en el substrato residual, después de la cosecha, se midió el pH y la temperatura en 3 UP con 5 g de substrato húmedo y 10 mL de agua destilada, por cada cepa cultivada.

#### **7.1.3.6. Incubación de las unidades de producción**

Las cepas se incubaron en las condiciones ambientales de un módulo construido con material de herrería de acero inoxidable y láminas de policarbonato, cuyas medidas son de 3.5 m de largo x 3.0 m de ancho y 2.5 m de altura. Durante la incubación se observó el porcentaje y los días en los que el micelio cubrió al substrato, los días para la formación de primordios de fructificación y los días para la abertura de las UP's.

#### **7.1.3.7. Fructificación y cosecha de los basidiocarpos**

Tres de las nueve cepas, fueron más precoces en la colonización micelial y formación de los primordios de fructificación y se llevaron al módulo de producción del COLPOS *Campus* Puebla. Las seis cepas restantes permanecieron en el módulo de herrería con láminas de policarbonato, hasta la diferenciación de basidiocarpos en algunas cepas. Al formarse los primordios de fructificación, a las bolsas se les eliminaron las partes superiores con unas tijeras y se inició un riego fino con agua purificada. Cuando los basidiocarpos alcanzaron su estado adulto se cosecharon con un

cuchillo eléctrico (Cuisinart) cortándolos al ras del sustrato, incluyendo la biomasa que algunos de ellos formaron.

La biomasa es el micelio compactado que tiene forma plana, semiplana a semiesférica, blanquecina o blanco grisácea, de la cual surgen los primordios de fructificación para formar los basidiocarpos.

El basidiocarpo y la biomasa se pesaron por separado en una balanza (METTRIA, TH-II) y ambos se cortaron en fragmentos de 1 a 1.5 cm con el cuchillo eléctrico y se deshidrataron en un horno (Felisa, México) a 35 °C durante 48 h. Se obtuvo el peso seco de ambos y por separado se colocaron dentro de una bolsa plástica, la cual se etiquetó y selló con un sellador termoelectrico (Impulse Sealer, UL) y se refrigeraron a -20 °C.

#### ***7.1.3.8. Caracterización de los basidiocarpos***

En los basidiocarpos cosechados se consideraron las características macroscópicas del píleo como son la forma, color, ancho, largo, grosor, y color del himenio. Del estípite se consideró el color, largo, ancho y grosor. En las UP's se observó el número de basidiocarpos bien diferenciados.

#### ***7.1.3.9. Rendimiento, eficiencia biológica e índice eficiente de degradación***

El rendimiento de la producción de los basidiocarpos se determinó mediante la fórmula:

$$Y = X/S$$

En la que se expresa el peso en gramos del basidiocarpo por kilogramo de sustrato en peso seco (g/kg Ps). El rendimiento (Y) es el promedio de los basidiocarpos o biomasa (X) de cada UP multiplicado por 1000 entre el peso seco del sustrato (Pss) (Sánchez y Royse, 2001).



La eficiencia biológica (EB) se calculó de acuerdo a Royse y Sánchez (2008) y se determina como la relación entre el peso fresco de los basidiocarpos producidos (Pfb) y el peso seco del sustrato (Pss), expresado en porcentaje. La fórmula es la siguiente:

$$EB = (Pfb / Pss) \times 100$$

Se determinó el índice eficiente de degradación del sustrato, y para ello, se tomaron muestras residuales de cada una de las cepas en estudio. La fórmula para la determinación es:

$$\frac{\text{Peso seco inicial del sustrato} - \text{peso seco final después de la cosecha}}{\text{Peso seco inicial del sustrato}} \times 100$$

#### **7.1.4. Resultados**

Las cepas en estudio forman parte de la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles y Medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla. En la **Tabla 12**, se presenta el número de registro, la especie, procedencia y el sustrato en que se encontraron creciendo los especímenes.

**Tabla 12.** Cepas de *Ganoderma* utilizadas en el presente estudio.

<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Procedencia</b>	<b>msnm</b>	<b>Substrato</b>
CP-145	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Estado de Morelos	2000	Madera en descomposición
CP-389	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Buena Vista del Monte, Morelos	2300	<i>Quercus</i> sp.
CP-395	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Buena Vista del Monte, Morelos	2300	<i>Quercus</i> sp.
CP-399	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Cd. Chapultepec, Morelos	1200	<i>Casuarina</i> sp.
CP-405	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Estado de Morelos	1800	<i>Quercus</i> sp.
CP-434	<i>Ganoderma</i> sp.	Sierra Norte, Puebla	3100	<i>Pinus</i> sp.
CP-447	<i>Ganoderma</i> sp.	Mexicalcingo, Estado de México	3200	<i>Quercus</i> sp.
CP-450	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Tepoztlán, Morelos	2000	<i>Quercus</i> sp.
CP-514	<i>Ganoderma</i> sp.	Reserva La Mancha, Veracruz	0	No determinado

#### **7.1.4.1. Variables evaluadas**

##### *Incubación y formación de primordios de fructificación*

Las temperaturas en el interior del módulo de herrería durante la incubación y formación de primordios de fructificación, fueron de  $24 \pm 2.47$  °C como máxima y de  $12.82 \pm 1.86$  °C como mínima, con humedad relativa máxima de  $54.81 \pm 6.77\%$  y mínima de  $34.92 \pm 5.61\%$ , con 12 h de luz natural difusa y 12 h de obscuridad.

Las cepas que formaron primordios de fructificación sembradas en aserrín con cal y yeso fueron: CP-145, CP-389, CP-447, CP-450, CP-434, CP-405; las sembradas en aserrín solo: CP-395 y CP-514; en la formulación COLPOS-17: CP-399. A pesar de lo anterior, no todas las cepas formaron basidiocarpos adultos.

A quince días de incubación, el micelio de las cepas CP-145 y CP-450 cubrió al substrato en un 100%, mientras que en las cepas CP-395 y CP-405 el micelio lo cubrió en un 90% a los 11 y 20 días, respectivamente. El resto de las cepas requirieron de 20 a 35 días para la colonización e inclusive formaron primordios con el substrato parcialmente cubierto por el micelio.

Las primeras cepas en presentar primordios de fructificación fueron: CP-145, CP-405 y CP-450, entre 20 y 33 días de incubación y las bolsas se abrieron entre 50 y 53 días, con los primordios bien desarrollados y se colocaron en el interior del módulo de cultivo del COLPOS, *Campus* Puebla, para promover la formación de basidiocarpos. Sin embargo, a los 10 días, los primordios detuvieron su crecimiento y murieron (excepto la cepa CP-405, que logró formar segundos primordios) a pesar de que se rehidrataron con agua fría.

Las condiciones ambientales en el módulo del COLPOS fueron: temperatura de  $20.87 \pm 2.34$  °C como máxima y  $15.5 \pm 1.83$  °C como mínima, con un promedio de  $72.9 \pm 9.53\%$  de humedad relativa.

Las seis cepas restantes formaron primordios entre los 38 y 72 días de incubación y la abertura de las bolsas fue entre 83 y 87 días (**Tabla 13, Figura 2**). Estas cepas (incluyendo la cepa CP-405) permanecieron en el interior del módulo de herrería hasta la formación y diferenciación de basidiocarpos.

Las cepas CP-389, CP-434, CP-447 y CP-514 primeramente formaron masas a manera de costras (biomasa) con poros diminutos en la superficie superior y de aquí, posteriormente surgieron los basidiocarpos (**Figura 2**).

**Tabla 13.** Días de incubación, colonización del sustrato (aserrín de *Quercus* spp.) y formación de primordios de fructificación de nueve cepas de *Ganoderma*.

Cepa	% y (días de colonización micelial)	Días para la formación de primordios de fructificación	Días de apertura de las UP's
CP-145	100 (15)	23 a 25	53
CP-389	95 (35)	50 a 65	85
CP-447	95 (23)	41 a 43	86
CP-450	100 (15)	31 a 33	53
CP-399	90 (25)	45-48	87
CP-434	80 (20)	38 a 47	83
CP-405	90 (20)	20	50
CP-395	90 (11)	25 a 27	53 a 55
CP-514	50 (11)	47 a 51	72



**Figura 2.** Primordios de fructificación de cepas de *Ganoderma* cultivadas en aserrín de encino (*Quercus* spp.), excepto la cepa CP-399 cultivada en la formulación COLPOS-17. 1: CP-145; 2: CP-405; 3: CP-450; 4: CP-395; 5: CP-399; 6: CP-434; 7: CP-514; 8: CP-389 y 9: CP-447.

### *Fructificación y rendimiento de las cepas*

Cinco cepas formaron basidiocarpos diferenciados en una sola producción, de las cuales, las cepas: CP-389, CP-405 (segundos primordios), CP-434 y CP-447, fueron sembradas en aserrín con cal y yeso; las cepas CP-395 y CP-434 fueron sembradas en aserrín solo. Como se observa, la cepa CP-434, produjo basidiocarpos en ambos substratos. En el ciclo de cultivo, la cepa CP-395, fue la más precoz al requerir de 160 días para la cosecha de los basidiocarpos, mientras que en las otras cepas el ciclo fue entre 183 y 187 días (**Tabla 14**).

La cepa CP-405 formó más de cuatro primeros primordios de fructificación a los 20 días de incubación, mientras que las cepas restantes formaron de uno a dos primordios entre 25 y 65 días.

Las condiciones ambientales durante la maduración de los basidiocarpos en el módulo de herrería, fueron de  $25.5 \pm 1.02$  °C como máxima y de  $18.08 \pm 2.4$  °C como mínima, con una humedad relativa máxima de  $90.2 \pm 7.76\%$  y mínima de  $81.73 \pm 8.74\%$ , con iluminación natural difusa e indirecta.

El máximo rendimiento fue para la cepa CP-434 con  $111.53 \pm 33.8$  g/kg de peso seco del substrato y el mínimo fue para las cepas CP-395 y CP-405 (segundos primordios) con  $22.48 \pm 10.28$  g/kg y  $41.0 \pm 10.2$  g/kg de peso seco del substrato, respectivamente; mientras que las cepas CP-447 y CP-389 mostraron buenos rendimientos con  $94.77 \pm 14.7$  g/kg y  $92.31 \pm 24.9$  g/kg de peso seco del substrato, respectivamente.

Las eficiencias biológicas fueron bajas, los valores estuvieron entre  $2.23 \pm 1.02\%$  y  $11.02 \pm 3.34 \%$ . En el índice de degradación del substrato, las cepas CP-434, CP-389 y CP-447, alcanzaron  $43.37 \pm 1.6\%$ ,  $44.7 \pm 6.0\%$  y  $44.76 \pm 1.9\%$ , respectivamente y las cepas CP-395 y CP-405, obtuvieron  $35.51 \pm 4.7\%$  y  $37.84 \pm 0.3\%$ , respectivamente (**Tabla 14**).

**Tabla 14.** Días del ciclo de cultivo, eficiencia biológica, rendimiento e índice de degradación del sustrato (aserrín de encino, *Quercus* spp.) en cinco cepas de *Ganoderma* con n = 4.

Cepa	Ciclo de cultivo (días)	Eficiencia biológica (%)	Rendimiento (g/kg Pss*)	Índice de degradación (%)
CP-389	187	9.29 ± 2.5	92.31 ± 24.9	44.7 ± 6.0
CP-395	160	2.23 ± 1.02	22.48 ± 10.28	35.51 ± 4.7
CP-405	184	4.1 ± 1.02	41.0 ± 10.2	37.84 ± 0.3
CP-434	183	11.02 ± 3.34	111.53 ± 33.8	43.37 ± 1.6
CP-447	187	9.6 ± 1.5	94.77 ± 14.7	44.76 ± 1.9

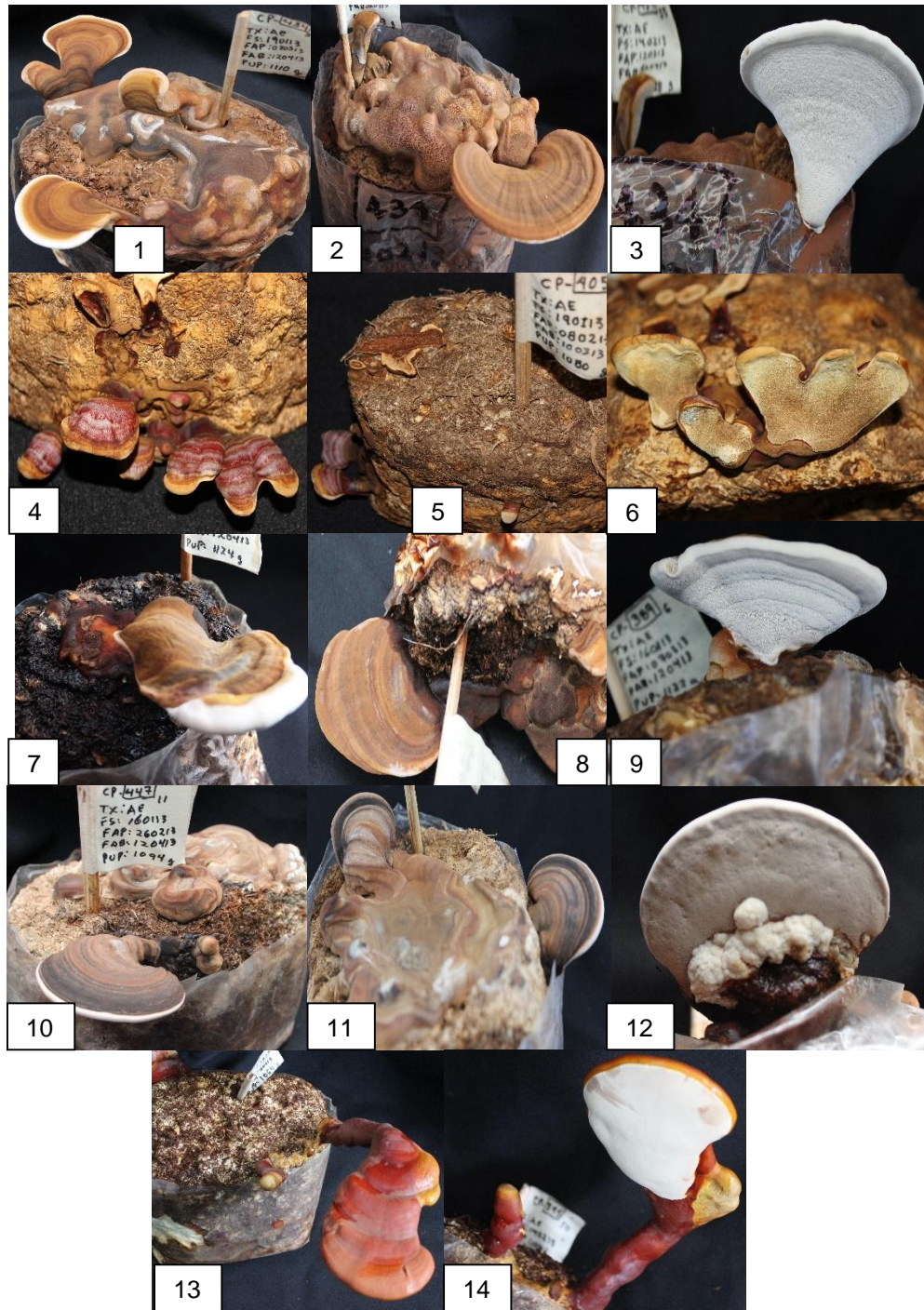
\*Pss = peso seco del sustrato

Para calcular la eficiencia biológica, se tomó como promedio del peso seco en 1000 g de aserrín de encino húmedos la cantidad de 439.59 g.

#### *Caracterización de los basidiocarpos*

La morfología de los basidiocarpos fue como de abanico, de riñón y auriculada. El color del píleo fue variable, café amarillento, grisáceo y rojizo; el himenio fue blanquecino y blanco-grisáceo. El diámetro del píleo fue variable y algunos basidiocarpos no presentaron estípites. Las medidas del píleo y del estípites, se presentan en la **Tabla 15**.

Al parecer, los basidiocarpos obtenidos presentaron la forma típica de los especímenes silvestres (**Figura 3**). Esto corrobora que las condiciones ambientales para el cultivo y las fructificaciones de las cepas fueron adecuadas. No así para aquellas cepas que no lograron formar basidiocarpos.



**Figura 3.** Basidiocarpos adultos de las cepas de *Ganoderma* cultivadas en aserrín de encino (*Quercus* spp.). CP-434:1 y 2 cara superior del píleo, 3 cara inferior. CP-405: 4 y 5 cara superior del píleo, 6 cara inferior. CP-389: 7 y 8 cara superior del píleo, 9 cara inferior. CP-447: 10 y 11 cara superior del píleo, 12 cara inferior. CP-395: 13 cara superior del píleo, 14 cara inferior.



**Tabla 15.** Características morfológicas y medidas de los basidiocarpos de las cepas cultivadas en aserrín de encino (*Quercus* spp.), pertenecientes al género *Ganoderma*.

Cepa	Tipo de crecimiento	Forma del píleo	Color del píleo	Laca	Cutícula	Color del himenio	Largo, ancho y grosor del píleo (cm)	Largo, ancho y grosor del estípote (cm)
CP-389	Solitario	Abanico	Café rojizo	Ausente	Lisa a rugosa	Blanco	9.2 x 9.8 x 1.9 4 x 6.4 x 1.7	4.6 x 3.6 x 2 2.8 x 2.2 x 2
CP-395	Solitario	Abanico	Rojizo	Presente	Lisa	Blanco	8.5 x 6.7 x 2.1	9.4 x 2 x 1.4
CP-405	Agregado	Auriculada	Rojo oscuro	Presente	Lisa	Blanco, café al madurar	4.5 x 2.5 x 0.8 2.5 x 2.4 x 0.9	Sin estípote
CP-434	Solitario	Reniforme	Café rojizo	Ausente	Lisa	Blanco	7.4 x 10.4 x 1.6 2.4 x 2.8 x 0.9	4 x 3 x 1.6
CP-447	Solitario	Abanico	Grisáceo café	Ausente	Lisa	Blanco grisáceo	4.5 x 5 x 1.1 1.8 x 2.7 x 1.5	Sin estípote

#### *pH inicial y final en los substratos*

En la **Tabla 16** se presentan los valores del pH y la temperatura en °C, en el substrato esterilizado antes de inocularlo y en el substrato residual después de la cosecha de los basidiocarpos. El pH inicial fue cercano a 7, mientras que el pH final descendió a valores cercanos a 4, lo que significa que el micelio fue acidificando el substrato a medida que se desarrollaron los basidiocarpos.

**Tabla 16.** Valores de pH y temperatura en el substrato de aserrín de *Quercus* spp. antes de la siembra y después de la cosecha de los basidiocarpos en cepas de *Ganoderma*.

Cepa	pH inicial	Temperatura inicial °C	pH final	Temperatura final °C
CP-389	6.7	23.1	3.8	25.3
CP-395	6.92	20.15	4.05	24.9
CP-405	6.92	20.15	4.35	24.5
CP-434	6.92	20.15	4	24.9
CP-447	6.7	23.1	4.32	23.9

### 7.1.5. Discusión

Los resultados aquí obtenidos, son similares en parte con reportes previos en el cultivo de *G. lucidum* sobre aserrín de diferentes plantas o en residuos agroindustriales, pero son inferiores en el ciclo de cultivo (en este estudio: 160-187 días contra 20-25 días presentados por González-Matute *et al.*, 2002) y en la EB (en este estudio: 2.23%-11% contra 34.9% y 80%, registradas por Peksen y Yakupoglu, 2009; Manavalan *et al.*, 2012, respectivamente) (**Tabla 10**).

Probablemente, la variación en la temperatura ( $25.5 \pm 1.02$  °C como máxima y de  $18.08 \pm 2.4$  °C como mínima), la concentración de CO<sub>2</sub> (no registrada) y la iluminación (luz natural y difusa), fueron factores determinantes en el ciclo de cultivo y en la formación y maduración de los basidiocarpos, ya que no se mantuvo la temperatura entre 24 °C y 28 °C durante el desarrollo de los basidiocarpos como lo señalaron Zhou *et al.* (2012) (sección 2.10). Tal vez la no maduración de basidiocarpos en las cuatro cepas, fue afectada por las condiciones ambientales anotadas y por la falta de algún suplemento.

Se ha comprobado que al agregar salvado de trigo o malta al aserrín, se eleva el rendimiento (González-Matute *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Erkel, 2009) (**Tabla 10**). Es importante considerar que en el cultivo sobre substratos sólidos, el rendimiento depende de la especie, de la cepa, del substrato y de las condiciones ambientales en que se lleve a cabo, tal y como lo señalaron Zhou *et al.* (2012).

En este estudio, el valor del pH inicial del substrato fue entre 6.7 y 6.92; el final fue entre 3.9 y 4.35 (**Tabla 16**). Peksen *et al.* (2011) cultivaron *G. lucidum* sobre aserrín de *Quercus* sp. y señalaron que los valores del pH descendieron al final del cultivo, lo cual coincide con el presente trabajo.

La morfología de los basidiocarpos fue como de abanico o de riñón. El color del píleo fue café amarillento, grisáceo o rojizo; predominó la cutícula lisa; el himenio fue blanquecino y blanco-grisáceo. Las medidas del píleo fueron entre

1.8 cm x 2.7 cm x 1.5 cm y 9.2 cm x 9.8 cm x 1.9 cm (largo, ancho y grosor), mientras que las medidas del estípite cuando estuvo presente fueron entre 2.8 cm x 2.2 cm x 2 cm y 9.4 cm x 2 cm x 1.4 cm (largo, ancho y grosor) (**Figura 3, Tabla 15**).

Las medidas del píleo coinciden en parte con trabajos previos en el cultivo de *G. lucidum* en aserrín de *Acacia confusa* y residuo de soya, cuyas medidas fueron de 7 cm de largo x 5 cm de ancho (Hsieh y Yang, 2004), y en el cultivo sobre aserrín de *Acacia confusa* en diferentes mezclas con grano de vinaza y salvado de trigo, fueron de 4.1 cm x 3.2 cm y de 11 cm x 7.5 cm (largo y ancho) (Yang *et al.*, 2003).

Con el presente estudio, al obtener basidiocarpos diferenciados en cinco cepas de *Ganoderma*, se logró un avance importante en el conocimiento de las condiciones ambientales en que se obtuvieron los basidiocarpos. Las cepas CP-434, CP- 447 y CP-389, mostraron potencial para continuar con el cultivo sobre subproductos forestales.

## ETAPA II

### 7.2. EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL Y EN LA ACTIVIDAD DE LACASAS Y PROTEÍNAS EN LA CEPA CP-145 DE *Ganoderma lucidum*, CULTIVADA EN PDB CON AGITACIÓN

#### 7.2.1. Resumen

Se realizó el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en el medio PDB con testigo y un tratamiento con ácido acetilsalicílico (AAS) en concentración 100  $\mu\text{M}$  puestos en agitación a 120 rpm y temperatura entre 28 °C y 29.5 °C. Para determinar el efecto del AAS como inductor en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas, se hicieron muestreos cada 5 días hasta el día 40 de incubación. El tratamiento tuvo un efecto positivo en el desarrollo micelial, ya que el peso deshidratado de los *pellets*, fue estadísticamente superior a aquellos del peso del testigo. Para la determinación de las lacasas, se utilizó como sustrato el ABTS a 5 mM, las cuales se detectaron en los días 35 y 40 de incubación en el tratamiento con AAS registrando valores de  $8.99 \pm 0.09$  U/mL y  $8.9 \pm 0.88$  U/mL, respectivamente; mientras que en el testigo no se detectó su presencia durante los 40 días de incubación. En la producción de proteínas, los valores entre el testigo y el tratamiento no mostraron diferencias estadísticas, excepto en el día 30 de incubación, en donde el tratamiento mostró el máximo valor con más de 60  $\mu\text{g/mL}$ , que superó al valor del testigo con 70%. Los resultados indican la posibilidad de utilizar el AAS 100  $\mu\text{M}$  como un agente que estimula el desarrollo micelial, la producción de lacasas en el micelio de los hongos pertenecientes al género *Ganoderma*.

### **7.2.2. Introducción**

En la aplicación del ácido acetilsalicílico (AAS) en hongos macromicetos, existe un solo trabajo en donde se adicionó como aspirina a los medios de cultivo de una cepa de *G. lucidum* para incrementar la producción del ácido ganodérico.

En el presente estudio se determinó el efecto del AAS en el desarrollo micelial (*pellets*) y en la producción de la enzima lacasa y proteínas, en el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en medio PDB y en agitación.

### **7.2.3. Materiales y métodos**

#### **7.2.3.1. Medios de cultivo, inoculación e incubación**

El medio PDB (Difco) para el testigo y el tratamiento, se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (24 g en 1000 mL de agua). Al agua destilada y estéril para el tratamiento, se le adicionó el AAS en concentración 100  $\mu$ M. Una vez disuelto el medio, se vaciaron 30 mL en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapa de baquelita y se esterilizaron en autoclave a 12 °C durante 25 minutos. Los matraces se incubaron 48 h para estar seguros de que no había contaminación. Se prepararon 50 matraces para el testigo y 50 para el tratamiento (n = 50).

Los matraces del testigo y del tratamiento se inocularon en condiciones de esterilidad con tres discos de 5 mm de diámetro con micelio de la cepa CP-145 de *G. lucidum* desarrollado previamente en papa dextrosa agar (PDA) y enseguida se colocaron en un equipo termo-agitador (Max<sup>Q</sup> 4000, Barnstead/Lab-Line) a 120 rpm a temperatura entre 28 °C y 29.5 °C, con 12 h de luz natural y 12 h de obscuridad, durante 40 días de incubación.

#### **7.2.3.2. Obtención de muestras**

El muestreo se realizó en el testigo y en el tratamiento a partir del día de la inoculación (día 0) y después a cada 5 días, hasta los 40 días de incubación.

Se utilizaron 4 matraces del testigo y 4 del tratamiento, en donde los *pellets* estuvieron más desarrollados.

El contenido de los matraces seleccionados del testigo y del tratamiento (n = 4), con los *pellets* en desarrollo, se filtró en papel filtro (peso conocido) del número 2 colocado en un embudo de cola larga y éste en el interior de un matraz quitazato, el cual se conectó a una bomba de vacío para facilitar la filtración. La cola del embudo se introdujo a la vez en un tubo de ensayo en el cual se recolectó el filtrado. El sobrenadante obtenido, se colocó en viales de vidrio, los que se etiquetaron con la fecha del muestreo, señalando además, si procede del testigo o del tratamiento. Enseguida, se realizó la determinación de las lacasas y de las proteínas. Todo este proceso se hizo en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar. Después los viales con el sobrenadante se llevaron a refrigeración a 4 °C.

#### **7.2.3.3. Determinación del peso de los *pellets***

El papel filtro (con peso conocido) con los *pellets* de las muestras procesadas, se llevó a deshidratación en un horno (Felisa) a 90 °C durante 24 o más horas, hasta obtener un peso seco constante (biomasa seca).

#### **7.2.3.4. Determinación de pH**

Se midió el pH antes y después de ser esterilizado el medio PDB en el testigo y en el tratamiento. Después se midió durante los días del muestreo hasta el día 40 de incubación. Las lecturas se hicieron en el potenciómetro Conductronic 20.

#### **7.2.3.5. Determinación de lacasas**

En la determinación de la actividad volumétrica de la enzima lacasa, se siguió la metodología de Bourbonnais y Paice (1990). Se preparó buffer de acetato de sodio (J.T. Baker) 0.1 M con pH 5. Para ello, se prepararon y mezclaron dos soluciones: la primera contuvo 3.4012 g de acetato de sodio (0.1 M) que se

disolvió en 100 mL de agua destilada, la segunda tuvo 0.572 mL de ácido acético grado reactivo (0.1 mM) (J.T. Baker) en 100 mL de agua destilada. Enseguida, la segunda solución se agregó lentamente a la primera, hasta que el pH fue de 5. La primera solución estuvo en agitación y la lectura se hizo en el potenciómetro Conductronic pH 120. Hecha la mezcla, se aforó a 250 mL con agua destilada y se colocó en un frasco que se etiquetó con el nombre de la solución y la fecha de su preparación.

Para la reacción y determinación de la lacasa, se utilizó como substrato indicador la sal diamónica del ácido 2, 2'-Azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma) en una concentración de 5 mM. El ABTS se disolvió en 10 mL de etanol grado reactivo. La solución se resguardó en un contenedor ámbar y se mantuvo a 4 °C.

Una vez obtenida la muestra a analizar, se determinó la enzima lacasa en microplacas de 96 pozos con fondo en "U". El procedimiento se hizo por columnas. En los pozos de la primera columna se colocaron 160 µL de buffer de acetatos; 20 µL de agua (blanco) en los pozos A y E; 20 µL de cada muestra en el resto de los pozos; 20 µL de ABTS (5 mM) en toda la columna e inmediatamente se hizo la lectura a 420 nm de absorción en el espectrofotómetro (lector de microplacas, Epoch BioTek), a través del programa de análisis GEN 5. La oxidación del substrato enzimático se llevó a cabo en aproximadamente 8 minutos para presentar las lecturas. La unidad de actividad enzimática de la lacasa se definió como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar 1 µM de substrato por minuto y se expresó en U/mL.

#### **7.2.3.6. Determinación de proteínas**

Para la determinación de las proteínas, se siguió la metodología propuesta por Bradford (1976). Para ello, primero se hizo una curva de calibración con concentraciones que van de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL de albúmina bovina (BSA) (Sigma). Se utilizó una microplaca de 96 pozos en forma de "U".

De cada concentración se colocaron 80  $\mu\text{L}$  en los siguientes pozos: del pozo 1 A al pozo 4 A se agregó el blanco; del pozo 1 B al pozo 4 B se agregó la concentración 10, del pozo 1 C al pozo 4 C se agregó la concentración 20 y así sucesivamente hasta llegar a los pozos 1G al 4 G con la concentración 100; en los pozos 1 H al 4 H se agregó agua destilada. A partir de la columna 5, en cada uno de sus pozos se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras. Enseguida, a todos los pozos de las columnas utilizadas, se les agregaron 20  $\mu\text{L}$  de colorante Bio-Rad Protein Assay, y la microplaca se dejó reposar durante 30 minutos en obscuridad. Al término del tiempo, se hizo la lectura en el espectrofotómetro Epoch BioTek a 595 nm. Las concentraciones de proteínas se reportaron en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **7.2.4. Resultados**

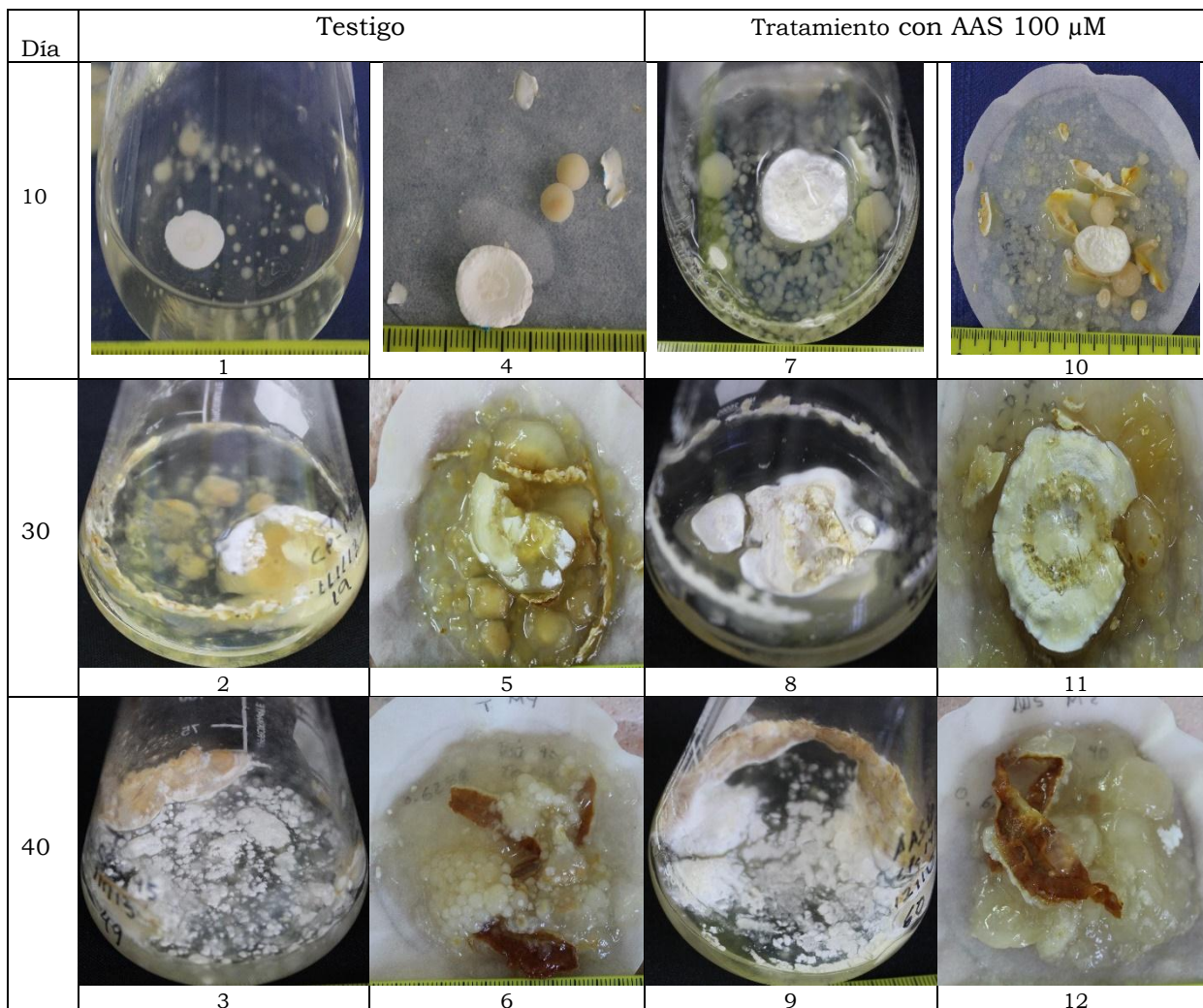
##### **7.2.4.1. Variables evaluadas**

###### *Desarrollo y características de los pellets*

En los primeros 5 y 10 días de incubación se observó que los *pellets* del tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  se desarrollaron de mejor manera. A los 20 días de incubación, los *pellets* del testigo y del tratamiento se mostraron como pequeñas masas globosas a semiglobosas de color café-blanquecinas y formaron una especie de costra café oscura en las paredes del matraz. Además, el color del medio fue tornándose de amarillo claro a blanco amarillento. A los 25 y 30 días de incubación, los *pellets* llenaron por completo el medio PDB, el cual presentó consistencia gelatinosa y se redujo considerablemente la cantidad del medio líquido.

A los 35 y 40 días de incubación, prácticamente el medio estaba semisólido, los *pellets* se transformaron en grandes masas globosas y semiesféricas de color café claro a blanco grisáceo e invadieron aún más las paredes del matraz (**Figura 4**).



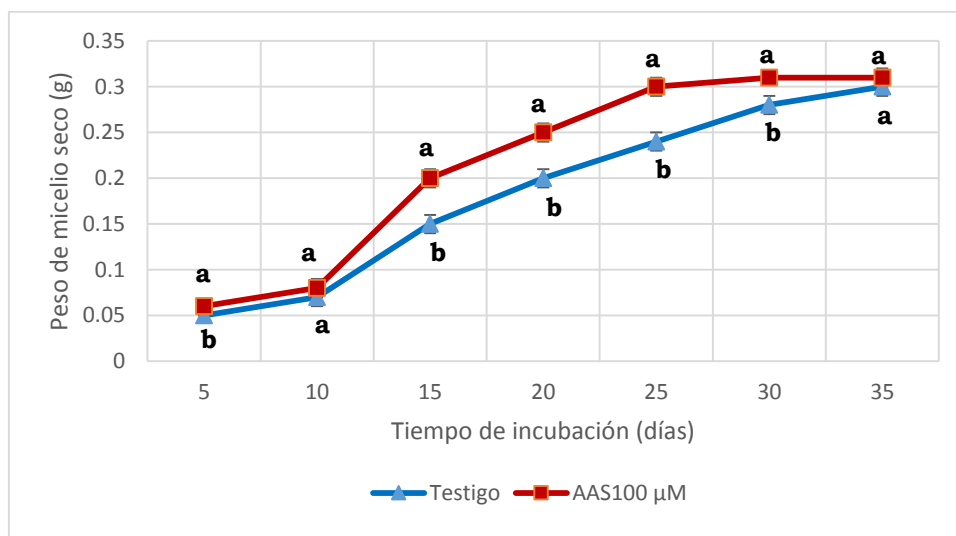


**Figura 4.** Efecto del AAS 100  $\mu\text{M}$  en el desarrollo micelial (*pellets*) de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en PDB en agitación a 120 rpm y temperatura entre 28 °C a 29.5 °C. Fotografías a partir del día 10 al día 40 de incubación. En el testigo números: 1-3, *pellets* en matraces; 4-6, *pellets* en papel filtro. En el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  números: 7-9, *pellets* en matraces; 10-12, *pellets* en papel filtro.

*Efecto del AAS 100  $\mu$ M en el peso deshidratado (biomasa) de los pellets*

El tratamiento con AAS tuvo un efecto positivo en el desarrollo de los *pellets*, ya que prácticamente en todos los días de muestreo, los pesos (g) deshidratados fueron significativamente superiores a aquellos del testigo (**Figura 5**).

En el porcentaje de dominancia, el tratamiento con AAS superó al testigo a partir del día 15 al día 30 con 25% a 9.7%; sin embargo, a los 35 días de incubación, ya no hubo dominancia del tratamiento.



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)						
	5	10	15	20	25	30	35
Testigo	0.05±0 <b>b</b>	0.07±0.01 <b>a</b>	0.15±0.01 <b>b</b>	0.2±0.01 <b>b</b>	0.24±0.01 <b>b</b>	0.28±0.01 <b>b</b>	0.3±0 <b>a</b>
AAS100 $\mu$ M	0.06±0 <b>a</b>	0.08±0.01 <b>a</b>	0.2±0.01 <b>a</b>	0.25±0.01 <b>a</b>	0.3±0.01 <b>a</b>	0.31±0 <b>a</b>	0.31±0.01 <b>a</b>

**Figura 5.** Efecto del AAS 100  $\mu$ M en el peso del micelio deshidratado de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en medio PDB con agitación a 120 rpm, entre 28 °C y 29.5 °C, en comparación con el testigo, durante 35 días de incubación. Se realizó el ANOVA con n = 4; la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con  $\alpha$  = 0.05 (SAS, ver. 9.0).

*pH del medio PDB y del tratamiento, antes y después de esterilizados*

En la **Tabla 17**, se presentan los respectivos valores del pH en el medio PDB solo y con la adición del AAS 100  $\mu\text{M}$ , antes y después de haberse esterilizado.

*pH en testigo y tratamiento durante la incubación*

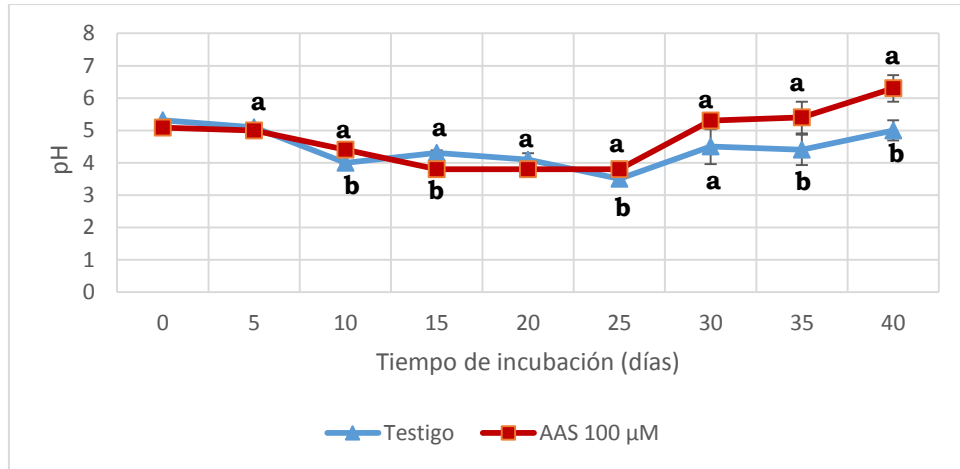
El pH inicial (día 0) en el testigo y en el tratamiento fue similar al pH del medio de cultivo esterilizado. En los siguientes días de muestreo, en el testigo a partir del día 5 al día 35 de incubación, el pH mostró valores de 3.53 a 4.36 y para el día 40, mostró un valor cercano a 5. En el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  a partir del día 5 al día 25 de incubación, el pH descendió con valores de 4.99 a 3.75 y del día 30 al día 40 de incubación, los valores del pH aumentaron de 5.24 a 6.41 (**Tabla 18, Figura 6**).

**Tabla 17.** Valores de pH y temperatura en el medio de cultivo PDB solo y con adición de AAS 100  $\mu\text{M}$  antes y después de su esterilización.

Medio	No esterilizado		Esterilizado	
	pH	Temperatura °C	pH	Temperatura °C
PDB	5.23	24	5.38	24.9
PDB+AAS 100 $\mu\text{M}$	5.07	22.8	5.10	23.9

**Tabla 18.** pH en el testigo y en el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  en la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en PDB con agitación a 120 rpm, entre 28 °C a 29.5 °C, durante 40 días de incubación.

Días de muestreo	Testigo		Tratamiento con AAS 100 $\mu\text{M}$	
	pH	Temperatura °C	pH	Temperatura °C
0	5.31	24.1	5.09	23.2
5	5.1 $\pm$ 0.04	23.2 $\pm$ 0.09	4.99 $\pm$ 0.06	22.6 $\pm$ 0.14
10	4.06 $\pm$ 0.02	23.8 $\pm$ 0.22	4.35 $\pm$ 0.16	20.5 $\pm$ 0.96
15	4.28 $\pm$ 0.08	23.7 $\pm$ 0.15	3.79 $\pm$ 0.2	24.25 $\pm$ 0.86
20	4.09 $\pm$ 0.19	22.5 $\pm$ 0.21	3.79 $\pm$ 0.02	23.6 $\pm$ 0.17
25	3.53 $\pm$ 0.01	26.6 $\pm$ 0.2	3.75 $\pm$ 0.03	23.55 $\pm$ 0.07
30	4.54 $\pm$ 0.54	22.45 $\pm$ 0.07	5.25 $\pm$ 0.12	23.8 $\pm$ 0.72
35	4.36 $\pm$ 0.47	22.9 $\pm$ 0.95	5.24 $\pm$ 0.49	23.77 $\pm$ 0.74
40	4.99 $\pm$ 0.31	22.02 $\pm$ 0.17	6.41 $\pm$ 0.41	23.35 $\pm$ 0.05



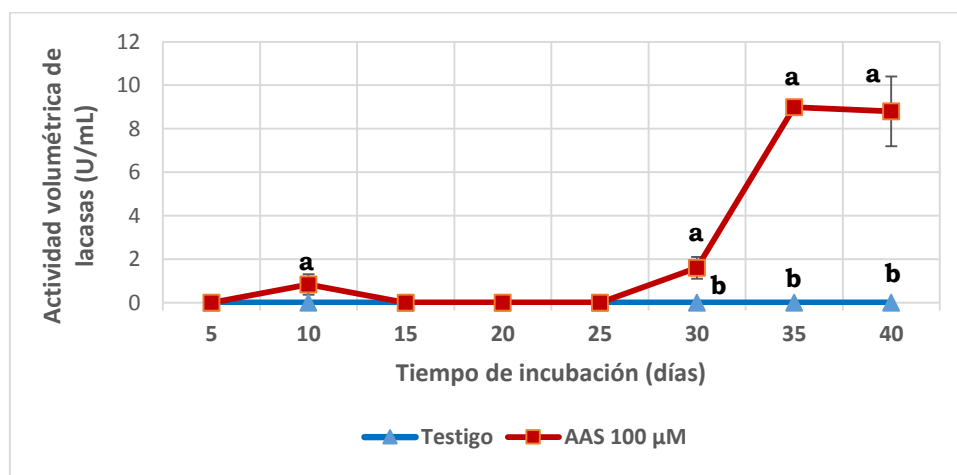
Tiempo de incubación y de muestreo (días)									
Tratamiento	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Testigo	5.31	5.1 ± 0.04 <b>a</b>	4.3 ± 0.02 <b>b</b>	4.3 ± 0.08 <b>a</b>	4.1 ± 0.19 <b>a</b>	3.5 ± 0 <b>b</b>	4.5 ± 0.54 <b>a</b>	4.4 ± 0.47 <b>a</b>	5.0 ± 0.31 <b>b</b>
AAS10-4	5.09	5.0 ± 0.06 <b>b</b>	4.4 ± 0.16 <b>a</b>	3.8 ± 0.2 <b>b</b>	3.8 ± 0.02 <b>a</b>	3.8 ± 0.03 <b>a</b>	5.3 ± 0.12 <b>a</b>	5.4 ± 0.49 <b>a</b>	6.3 ± 0.41 <b>a</b>

**Figura 6.** Efecto del pH en el tratamiento con AAS 100 µM en relación con el testigo, en la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en PDB con agitación a 120 rpm entre 28 °C a 29.5 °C, durante 40 días de incubación. Se realizó el ANOVA con n = 4, la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con α= 0.05 (SAS, ver. 9.0).

### Determinación de lacasas

La presencia de lacasas se detectó en los días 30, 35 y 40 de incubación en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M, con valores de  $1.6 \pm 0.5$  U/mL,  $8.99 \pm 0.09$  U/mL y  $8.9 \pm 0.88$  U/mL, respectivamente (**Figura 7**).

En el testigo, durante los 40 días de incubación, no se detectó la presencia de lacasas. Por lo cual, el AAS definitivamente tuvo efecto positivo en la producción de lacasas en la cepa CP-145 de *G. lucidum*, por lo que, se considera un buen inductor que puede incrementar la producción de lacasas en especies del género *Ganoderma*.



Tiempo de incubación y muestreo (días)								
Tratamientos	5	10	15	20	25	30	35	40
Testigo	0	0 <b>b</b>	0	0	0	0 <b>b</b>	0 <b>b</b>	0 <b>b</b>
AAS 100 $\mu$ M	0	0.84 $\pm$ 0.47 <b>a</b>	0	0	0	1.6 $\pm$ 0.5 <b>a</b>	8.99 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	8.9 $\pm$ 0.88 <b>a</b>

**Figura 7.** Efecto del AAS 100  $\mu$ M en la producción de la enzima lacasa en la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*, cultivada en PDB con agitación a 120 rpm y a temperatura entre 28 °C y 29.5 °C, durante 40 días de incubación.

### *Determinación de proteínas*

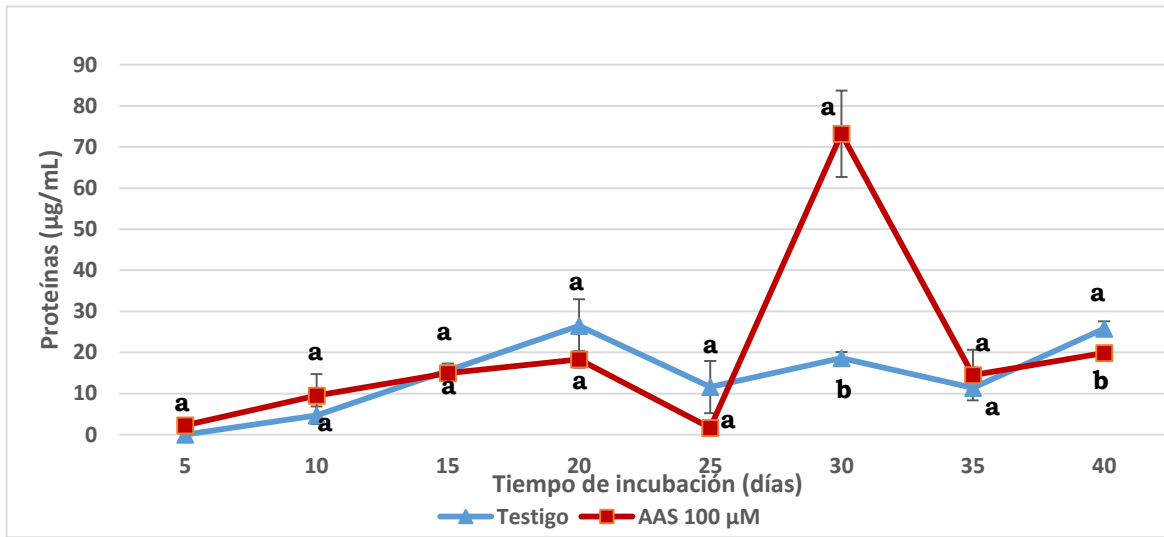
Los valores de proteínas en el testigo como en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M no mostraron diferencias estadísticas entre sí, excepto en el día 30 de incubación, en donde el tratamiento mostró 63.4  $\mu$ g/mL, con lo cual superó al testigo en un 70% cuyo valor fue de 18.6  $\mu$ g/mL. En el día 25 de incubación hubo un descenso en los valores del testigo y del tratamiento y después en los días 35 y 40 mostraron ligero incremento (**Figura 8**).

### **7.2.5. Discusión**

Los valores aquí obtenidos de las lacasas, no tienen comparativo, ya que no existen estudios previos sobre la utilización del AAS como inductor para la producción de lacasas en especies de *Ganoderma*. Sin embargo, fueron superiores a aquellos obtenidos con otros inductores, como el sulfato de cobre (Spezzia, 2012), *o*-dianisidina (De Souza Silva *et al.*, 2005), DMP (Fonseca *et al.*, 2010), residuos agrícolas (Simonić *et al.*, 2010), residuos del fruto amarillo de la pasión (Zilly *et al.*, 2011) y etanol, ácido gálico y sulfato de cobre (Manavalan *et al.*, 2013) (**Tabla 9**).

Por otra parte, el pH del tratamiento con el AAS, comenzó a incrementarse hacia el valor de pH 6 en los días 30, 35 y 40 de incubación, precisamente cuando se detectó la presencia de las lacasas. Probablemente hay una relación entre los valores cercanos a pH 6, con la producción de lacasas (**Figura 6**).

De igual manera, no se tienen comparativos en la producción de proteínas con la adición de AAS al medio de cultivo. Sin embargo, los valores de este estudio superaron a aquellos (0.022 mg/mL y 0.025 mg/mL) registrados por De Souza Silva *et al.* (2005) en el cultivo de dos cepas de *Ganoderma* spp. en medio líquido con adición de salvado de trigo. Pero son inferiores a aquél obtenido en medio líquido con adición de CuSO<sub>4</sub> en concentración 0.5 mM, con un valor 60  $\mu$ g/mL (Fonseca *et al.*, 2010).



Tiempo de incubación y muestreo (días)								
Tratamientos	5	10	15	20	25	30	35	40
Testigo	0	4.7 ± 2.1 <b>a</b>	15.6 ± 1.64 <b>a</b>	26.5 ± 6.47 <b>a</b>	11.6 ± 6.3 <b>a</b>	18.6 ± 1.47 <b>b</b>	11.4 ± 0.56 <b>a</b>	25.8 ± 1.76 <b>a</b>
AAS100 µM	2.5 <b>a</b>	9.5 ± 5.2 <b>a</b>	14.9 ± 1.37 <b>a</b>	18.3 ± 2 <b>a</b>	2.5 ± 0.38 <b>a</b>	63.4 ± 10.9 <b>a</b>	14.5 ± 6.15 <b>a</b>	19.9 ± 1.62 <b>b</b>

**Figura 8.** Efecto del AAS 100 µM en la producción de proteínas en la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*, cultivada en PDB con agitación a 120 rpm y a una temperatura entre 28 °C y 29.5 °C. Se realizó el ANOVA con n = 4, la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con α= 0.05 (SAS, ver. 9.0).

**NOTA:** La metodología y los resultados del cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en PDA, y en medio líquido PDB sin agitación, se presentan en el Anexo 1.

## ETAPA III

### 7.3. EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL CULTIVO DE LA CEPA CP-145 DE *Ganoderma lucidum* EN SUBSTRATO SÓLIDO

#### 7.3.1. Resumen

Para corroborar el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) mostrado a nivel de laboratorio (Etapa II), se cultivó la cepa CP-145 de *G. lucidum* en 2000 g de aserrín de encino (*Quercus* spp.) en peso húmedo por cada réplica (n = 14), con un testigo y tres tratamientos con la adición del AAS en tres concentraciones (10 mM, 100  $\mu$ M y 1  $\mu$ M). Las condiciones ambientales en la incubación fueron de  $25.85 \pm 2.09$  °C como máxima y de  $13.95 \pm 1.64$  °C como mínima, con humedad relativa máxima de  $55.48 \pm 5.94\%$  y  $33.67 \pm 7.45\%$  como mínima, con 12 h de luz y 12 h de obscuridad; mientras que en la etapa de fructificación fueron de  $25.49 \pm 0.95$  °C como máxima y de  $18.07 \pm 2.43$  °C como mínima, con humedad relativa máxima de  $90.92 \pm 6.05\%$  y  $82.68 \pm 5.6\%$  como mínima, con luz natural indirecta y difusa. El testigo y los tratamientos formaron primordios de fructificación, pero no todos lograron el estado adulto. El tratamiento con AAS 100  $\mu$ M mostró un efecto positivo en la producción de basidiocarpos al alcanzar una eficiencia biológica de  $5.78 \pm 3.6\%$ , un rendimiento de  $58.88 \pm 36.8$  g/kg de peso seco del substrato y un índice de degradación de  $41.16 \pm 3.12\%$ , en comparación con el testigo y con los otros dos tratamientos cuyas eficiencias biológicas oscilaron entre  $3.13 \pm 1.84\%$  y  $4.83 \pm 2.6\%$ , los rendimientos entre  $31.6 \pm 18.7$  g/kg de peso seco y  $45.92 \pm 24.37$  g/kg de peso seco del substrato y el índice de degradación entre  $26.2 \pm 2.45$  y  $33.68 \pm 5.9\%$ . El ciclo de cultivo fue de 130 a 145 días. Los resultados indican la factibilidad de realizar el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* sobre subproductos forestales regionales con la adición de AAS en concentración 100  $\mu$ M.



### **7.3.2. Introducción**

No se tienen referencias sobre el cultivo en aserrín de encino de la cepa CP-145 de *G. lucidum* y se desconoce el efecto que pueda tener el AAS en la producción de basidiocarpos. En este estudio, se realizó el cultivo de esta cepa con la adición del AAS en tres concentraciones, para determinar el efecto en la producción de basidiocarpos.

### **7.3.3. Materiales y métodos**

#### **7.3.3.1. Material biológico**

Se cultivó la cepa CP-145 de *G. lucidum* en aserrín de encino (*Quercus* spp.).

#### **7.3.3.2. Preparación de las UP's**

*Preparación de testigo.* Cada réplica se preparó de manera individual. En una tina de plástico, se colocó 1 kg de aserrín en peso seco, se le adicionaron 1300 mL de agua purificada (de garrafón) y se homogeneizó manualmente. De este substrato húmedo se colocaron 2000 g en una bolsa de polipropileno de 13.5 x 47 cm con filtro (Unicorn Imp. E. U. A.), se cerró en la parte superior con pinzas metálicas.

*Preparación de tratamientos con AAS.* Las bolsas de los tratamientos se prepararon de manera similar a la del testigo, excepto que en el agua purificada (1300 mL) se adicionó el AAS en cada una de las tres concentraciones requeridas. De igual manera, el peso del substrato fue de 2000 g húmedos. El resto de las etapas fue como se describe en la preparación del testigo.

Las bolsas del testigo y de los tratamientos una vez esterilizadas (secciones 7.1.3.3 y 7.1.3.4) se inocularon con 200 g de inóculo preparado previamente y se distribuyó homogéneamente en el substrato. Todo este proceso se realizó en

una cámara de flujo laminar. En el testigo y en los tres tratamientos con AAS, se trabajó con  $n = 14$ .

### **7.3.3.3. Determinación de las variables de estudio**

Las determinaciones del peso seco del substrato, pH y temperatura, incubación de las UP's, fructificación y cosecha de basidiocarpos, caracterización de los basidiocarpos, el rendimiento, la eficiencia biológica y el índice de degradación del substrato, se realizaron de la misma manera en que se presentaron en la Etapa I, desde la sección 7.1.3.5 hasta la sección 7.1.3.9.

### **7.3.4. Resultados**

#### *Incubación y formación de primordios de fructificación*

El substrato del testigo y de los tratamientos fue colonizado por el micelio al 100% entre 11 y 20 días de incubación. Entre los 18 a 30 días de incubación, se formaron masas semiglobosas (biomasa) blanco grisáceo, que posteriormente se tornaron café rojizas y de ellas surgieron los primordios de fructificación. A los 45 y 47 días de incubación, se diferenciaron los primordios y fue cuando se eliminó la parte superior de la bolsa plástica para permitir la formación de basidiocarpos (**Tabla 19 y Figura 9**).

Durante la incubación, las condiciones ambientales dentro del módulo fueron: temperatura máxima de  $25.85 \pm 2.09$  °C, mínima de  $13.95 \pm 1.64$  °C; humedad relativa máxima de  $55.48 \pm 5.94\%$  y mínima de  $33.67 \pm 7.45\%$ ; con 12 h de luz natural difusa y 12 h de obscuridad.

#### *Fructificación y cosecha de basidiocarpos*

La fructificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura máxima de  $25.49 \pm 0.95$  °C, mínima de  $18.07 \pm 2.43$  °C; con

humedad relativa máxima de  $90.92 \pm 6.05\%$  y mínima de  $82.68 \pm 5.6\%$ . La iluminación fue natural, indirecta y difusa.

En la cosecha, el peso fresco de la biomasa fue superior al peso de los basidiocarpos húmedos. Esto es porque la biomasa se formó en varias partes del sustrato pero no siempre surgieron basidiocarpos en ella.

El tratamiento con AAS  $100 \mu\text{M}$  tuvo efecto positivo, ya que el peso de la biomasa y de los basidiocarpos fue superior a aquellos pesos del testigo, y a la vez, mantuvo una proporción equilibrada entre los basidiocarpos diferenciados y no diferenciados. Los tratamientos con el AAS  $10 \text{ mM}$  y AAS  $1 \mu\text{M}$  no mostraron efecto positivo, ya que no superaron a aquellos valores del testigo en el peso de la biomasa, ni en el peso y número de basidiocarpos diferenciados (**Tabla 20**).

**Tabla 19.** Colonización, formación de primordios de fructificación y abertura de las unidades de producción en el cultivo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en aserrín de encino como testigo y en los tratamientos con adición de AAS  $10 \text{ mM}$ , AAS  $100 \mu\text{M}$  y AAS  $1 \mu\text{M}$  (2000 g de sustrato en peso húmedo con  $n = 14$ ).

<b>Tratamiento</b>	<b>%, (días de colonización micelial)</b>	<b>Días para la formación de primordios de fructificación</b>	<b>Días de abertura de las unidades de producción</b>
Testigo	100% (11)	19 a 22	47
AAS $10 \text{ mM}$	100% (20)	23 a 30	45
AAS $100 \mu\text{M}$	100% (11)	18 a 22	46
AAS $1 \mu\text{M}$	100% (11)	18 a 22	47



A



B



C



D

**Figura 9.** Primordios de fructificación a 63 días de incubación de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en aserrín de encino (*Quercus* spp.). Los primordios surgen de la biomasa color café rojiza. A: testigo; B: tratamiento con AAS 10 mM; C: tratamiento con AAS 100  $\mu$ M y D: tratamiento con AAS 1  $\mu$ M. Con n = 14 y 2000 g en peso húmedo de sustrato en cada réplica.

**Tabla 20.** Producción de biomasa y basidiocarpos de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en el testigo y en los tratamientos con AAS 10 mM, AAS 100  $\mu$ M y AAS 1  $\mu$ M cultivada en aserrín de encino, con n =14 y 2000 g en peso húmedo de sustrato por cada réplica.

Tratamiento	Peso húmedo de biomasa (g)	Peso húmedo de basidiocarpos (g)	Peso deshidratado de basidiocarpos (g)	Basidiocarpos diferenciados	Basidiocarpos no diferenciados
Testigo	944.2	591.6	250.6	14	5
AAS 10 mM	671.4	407.3	251.5	6	15
AAS 100 $\mu$ M	1244.6	758.6	350.9	9	9
AAS 1 $\mu$ M	837.7	529.3	240.4	9	16

#### *Ciclo de cultivo, eficiencia biológica y rendimiento*

El ciclo del cultivo del testigo y de los tratamientos fue entre 130 a 145 días. La diferencia que se observa, es por haber realizado los cortes y la deshidratación de los basidiocarpos en días espaciados para cada tratamiento.

La eficiencia biológica se determinó solo para los basidiocarpos, ya que son el objeto del cultivo, no así las biomásas. Las eficiencias biológicas alcanzadas por el testigo y por los tratamientos, se consideran bajas, ya que no rebasaron el 6%. La mejor eficiencia biológica fue para el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con  $5.78 \pm 3.6\%$ , seguido por el testigo y el tratamiento con AAS 1  $\mu$ M, con  $4.83 \pm 2.6\%$  y  $4.03 \pm 3.24\%$ , respectivamente. El valor más bajo lo presentó el tratamiento con AAS 10 mM con  $3.13 \pm 1.84\%$ .

El mayor rendimiento fue para el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con  $58.88 \pm 36.8$  g/kg de peso seco del sustrato, y el menor fue para el tratamiento con AAS 10 mM con  $31.6 \pm 18.7$  g/kg de peso seco del sustrato. Los rendimientos

para el testigo y el tratamiento con AAS 1  $\mu\text{M}$  fueron de  $45.92 \pm 24.37$  y  $41.08 \pm 33.14$  g/kg de peso seco del sustrato, respectivamente (**Tabla 21**).

**Tabla 21.** Días del ciclo de cultivo, eficiencia biológica, rendimiento e índice de degradación del sustrato de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en aserrín de encino (*Quercus* spp.) como testigo y en los tratamientos con AAS 10 mM, AAS 100  $\mu\text{M}$  y AAS 1  $\mu\text{M}$ , con  $n = 14$  y 2000 g en peso húmedo de sustrato en cada réplica.

Tratamiento	Ciclo de cultivo (días)	Promedio del peso seco (g) del sustrato en 2000 g húmedos	Eficiencia biológica (%) de basidiocarpos	Rendimiento (g/kg Pss*)	Índice de degradación (%)
Testigo	130	874.84	$4.83 \pm 2.6$ ab	$45.92 \pm$	$26.2 \pm 2.4$
AAS 10 mM	145	929.13	$3.13 \pm 1.84$ b	$31.6 \pm 18.7$	$32.32 \pm 0.7$
AAS 100 $\mu\text{M}$	137	939.6	$5.78 \pm 3.6$ a	$58.88 \pm 36.8$	$41.16 \pm 3.12$
AAS 1 $\mu\text{M}$	139	937.6	$4.03 \pm 3.24$ ab	$41.08 \pm$	$33.68 \pm 5.9$

\*Pss = peso seco del sustrato

### Caracterización de los basidiocarpos

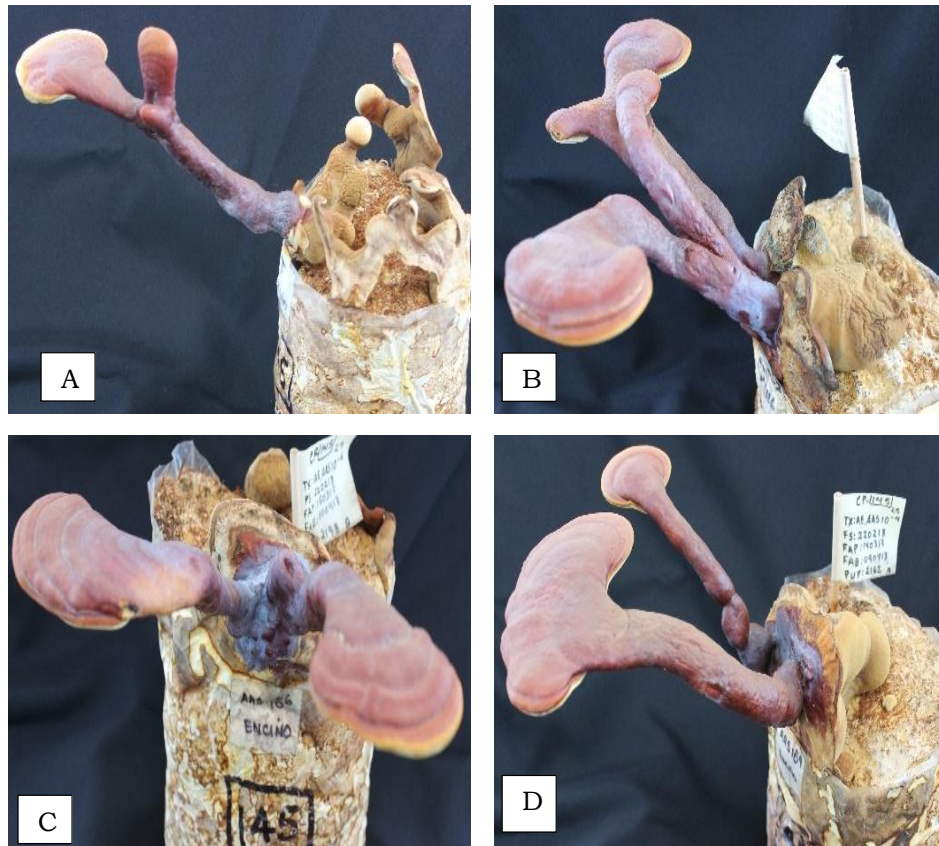
Todas las UP's del testigo y de los tratamientos formaron primordios de fructificación en la biomasa cercana al filtro de la bolsa. En el sustrato se formaron de uno a dos basidiocarpos y en algunos casos el estípite se bifurcó pero generalmente un solo píleo se diferenció. Los estípites tuvieron un alargamiento que al parecer no es normal. Los píleos se desarrollaron de manera típica de acuerdo a la especie, manteniendo la forma de abanico. Los basidiocarpos jóvenes presentaron en la parte superior del píleo hacia el margen, un color rojo amarillento y en su borde externo un color blanquecino.

En estado adulto, el píleo adquirió un color café rojizo con la superficie lisa, con bandas concéntricas bien marcadas. El himenio fue blanco, con pequeños poros. Los basidiocarpos diferenciados produjeron esporas, las cuales en esporada son de color rojo intenso. Fue característica de los basidiocarpos la presencia de laca (**Figura 10**).

En lo que respecta al estípote, el menor tamaño fue de 2.7 cm de largo x 2.0 cm de ancho x 2.0 cm de grosor y el mayor fue de 26.5 cm de largo x 4.1 cm de ancho x 2.1 cm de grosor. El menor tamaño del píleo fue de 3.0 cm de largo x 2.4 cm de ancho x 1.7 cm de grosor y el mayor fue de 9.0 cm de largo x 4.5 cm de ancho x 1.6 cm de grosor (**Tabla 22**).

#### *Determinación de pH y temperatura inicial y final*

El pH y la temperatura inicial en el testigo y en los tratamientos se determinaron en el substrato esterilizado. El pH final y la temperatura se determinaron enseguida de haberse realizado la cosecha de los basidiocarpos. El pH al final del cultivo fue ácido en comparación con el pH inicial (**Tabla 23**).



**Figura 10.** Basidiocarpos de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*, cultivada en aserrín de encino (*Quercus* spp.) como testigo y con adición de AAS 10 mM, AAS 100  $\mu$ M y AAS 1  $\mu$ M. A: basidiocarpos del testigo. B: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 10 mM. C: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M. E: basidiocarpos en el tratamiento con AAS 1  $\mu$ M.



**Tabla 22.** Medidas del estípite y del pileo de los basidiocarpos obtenidos en el cultivo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en aserrín de *Quercus* spp. como testigo y con adición de AAS 10 mM, 100  $\mu$ M y AAS 1  $\mu$ M. Con n = 14 y 2000 g en peso húmedo por tratamiento.

<b>Tratamientos</b>	<b>Medidas del estípite (largo x ancho x grosor) en cm</b>	<b>Medidas del pileo (largo x ancho x grosor) en cm</b>
Testigo	4 x 1.9 x 2.3 22.8 x 3.2 x 1.6	3 x 2.4 x 1.7 9 x 4.5 x 1.6
AAS 10 mM	6.8 x 2 x 1.6 22 x 3.4 x 1.6	4.6 x 4 x 1.6 6.6 x 5.9 x 1.8
AAS 100 $\mu$ M	11 x 1.5 x 1.2 26.5 x 4.1 x 2.1	5 x 6.4 x 1.8 8.9 x 8.8 x 1.8
AAS 1 $\mu$ M	2.7 x 2 x 2 16.5 x 2.2 x 1.6	4.1 x 2.5 x 1.4 7.7 x 9.3 x 1.9

**Tabla 23.** pH inicial y final del sustrato conformado por aserrín de encino (*Quercus* spp.) en el cual se desarrolló la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* con tres concentraciones de ácido acetilsalicílico.

<b>Tratamiento</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Temperatura inicial (°C)</b>	<b>pH final</b>	<b>Temperatura final (°C)</b>
Testigo	4.63	24.4	3.78	25.3
AAS 10 mM	4.93	22.6	3.84	24.5
AAS 100 $\mu$ M	5.37	23.8	3.77	25.5
AAS 1 $\mu$ M	5.07	23.4	3.91	24.56

### 7.3.5. Discusión

El cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* se realizó en las mismas condiciones ambientales en que se cultivaron las nueve cepas de *Ganoderma*. El ciclo de cultivo de esta cepa fue de 130 a 145. En el cultivo de las nueve cepas de *Ganoderma* (Etapa I), se hizo la comparación con trabajos previos, en los que se utilizaron como sustrato diferentes tipos de aserrín con adición de suplementos y en varias condiciones ambientales de cultivo (**Tabla 10**).

El pH inicial del sustrato fue entre 4.93 y 5.3; el pH final fue entre 3.77 y 3.91, por lo que, el sustrato se acidificó durante el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* (**Tabla 23**), lo cual coincide con Peksen *et al.* (2011).

El tamaño del píleo fue entre 3.0 cm x 2.4 cm x 1.7cm y 9.0 cm x 4.5 cm x 1.6 cm (largo, ancho y grosor); el tamaño del estípite fue entre 2.7 cm x 2.0 cm x 2.0 cm y 26.5 cm x 4.1 cm x 2.1 cm (largo, ancho y grosor) (**Tabla 22**). Estas medidas coinciden con aquellas registradas por Yang *et al.* (2003) en el cultivo de *G. lucidum* en la mezcla de aserrín de *Acacia confusa* con residuos del grano de destilados y salvado de trigo en diferentes proporciones. Estos mismos autores señalaron que la formación de basidiocarpos diferenciados se presentó en la proporción 80:20:00, mientras que entre las proporciones 70:20:10 y 50:50:0, los basidiocarpos fueron pequeños, algunos se ramificaron y no formaron píleo. La alta concentración del grano de destilados provocó anomalías en los basidiocarpos.

Por otra parte, Hsieh y Yang (2004) en el cultivo de *G. lucidum* sobre aserrín de *Acacia confusa* con adición de residuo de soya, determinaron que en la relación C/N 80 (control) y C/N 70, se formaron cuerpos fructíferos diferenciados entre 30 y 33 días, respectivamente; mientras que en la relación C/N 60 se formaron estípites sin píleo. En relaciones inferiores de C/N 50, no se formaron cuerpos fructíferos.

En el presente estudio, la formación de cuerpos fructíferos con estípites ramificados (sin píleo), puede atribuirse en parte al efecto que causó la adición del AAS. En el testigo, los basidiocarpos diferenciados registraron una proporción 3:1 con aquellos no diferenciados. En la concentración AAS 100  $\mu$ M, la proporción fue 1:1, mientras que en las concentraciones AAS 10 mM y AAS 1  $\mu$ M, las proporciones de basidiocarpos diferenciados fueron de 1:3 y 1:2 con aquellos no diferenciados, respectivamente (**Tabla 20**).

## 8. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

En relación a la primera hipótesis sobre el cultivo de las nueve cepas de *Ganoderma*, se planteó que se obtendrían basidiocarpos con buenos rendimientos; sin embargo, solamente cinco de ellas formaron basidiocarpos adultos, con diferencias en la colonización del substrato (aserrín de encino), en la formación de primordios de fructificación, en el ciclo de cultivo y en el rendimiento. Es probable que las bajas temperaturas durante el cultivo hayan sido determinantes para la no maduración de los basidiocarpos en las cuatro cepas restantes, además de que el aserrín de encino requiera de alguna suplementación.

De las cinco cepas que formaron basidiocarpos, tres de ellas mostraron potencial para continuar con su cultivo y proceden de altitudes entre 2300 y 3200 msnm.

Por lo tanto, la hipótesis planteada no se sostiene.

En la segunda hipótesis, se corroboró que el ácido acetilsalicílico en cultivo líquido tuvo efecto positivo como inductor en la producción de lacasas. El AAS tal vez alteró uno o varios procesos metabólicos e influenció la vía o ruta de algún precursor para la expresión de las lacasas. Se sugiere también que el AAS fue un substrato para algunas enzimas o coenzimas que regularon el metabolismo intracelular y tal vez estimularon la expresión de uno o más genes.

Entre las lacasas de los hongos, hay una gran variabilidad de isoenzimas dependiendo del mecanismo de inducción, siendo algunas constitutivas y otras inducibles. En algunas especies de hongos, la adición de inductores a los medios de cultivo, resultan en la biosíntesis de nuevas formas extracelulares (Saraiva *et al.*, 2012), lo que probablemente sucedió en la cepa CP-145.

Por otra parte, el AAS no tuvo efecto positivo en la producción de proteínas, ya que los valores entre el testigo y el tratamiento no tuvieron diferencias significativas, excepto en el día 30 de incubación en donde fue mejor el tratamiento. Por lo anterior, la segunda hipótesis no se sostiene.

Por lo que respecta a la tercera hipótesis, se planteó un efecto igual en todas las concentraciones del AAS adicionadas al aserrín de encino. Sin embargo, la concentración 100  $\mu\text{M}$  registró el mejor rendimiento y el mayor índice de degradación del substrato en comparación con las concentraciones 10 mM y 1  $\mu\text{M}$  e inclusive con aquellos del testigo.

La adición del AAS 100  $\mu\text{M}$  tuvo una actividad como inductor, ya que incrementó la secreción de lacasas y probablemente la producción de otras enzimas oxidativas como las celulasas y hemicelulasas, lo cual se corrobora con el mayor porcentaje alcanzado en el índice de degradación del substrato.

Sin embargo, la hipótesis no se sostiene ya que que hubo un efecto diferenciado en la adición del AAS en los tratamientos estudiados.

## 9. CONCLUSIONES

1. Por primera vez en México se realizó el cultivo de nueve cepas de recursos genéticos nativos de *Ganoderma*, en donde se logró la obtención de basidiocarpos en cinco de ellas en substrato sólido conformado por aserrín de encino (*Quercus* spp.). Con lo anterior, se hace una contribución al conocimiento de las condiciones ambientales en que se desarrollan.
2. Se determinó por primera vez, que el AAS 100  $\mu\text{M}$  a nivel de laboratorio, es un buen inductor para la producción de lacasas en el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en el medio PDB puesto en agitación.
3. De igual manera, por primera vez se logró el cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* sobre substrato sólido (aserrín de *Quercus* spp.) con la adición del AAS en concentraciones 10 mM, 100  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ . Con ello, se contribuye al conocimiento sobre las condiciones ambientales en que se desarrollaron los basidiocarpos y a los tiempos en que se lleva a cabo el ciclo de cultivo.

## **10. ESTRATEGIA PROPUESTA**

Con los resultados obtenidos, es posible la aplicación del AAS 100  $\mu\text{M}$  en el cultivo de cepas de *Ganoderma* spp. a nivel de laboratorio y en cultivo en sustrato sólido en subproductos forestales. Sin embargo, antes de la aplicación de la metodología para sectores sociales, se proponen algunas actividades a realizar.

### **10.1. Actividades a realizar**

- Realizar el cultivo de diferentes especies de *Ganoderma* en medios líquidos (PDB, EMB, entre otros).
- Determinar otros tipos de enzimas que probablemente sean estimuladas por el AAS.
- Realizar estudios para determinar el efecto antioxidante y antimicrobiano en los basidiocarpos producidos en sustrato sólido con la adición del AAS.
- Realizar el cultivo en sustratos sólidos, diferentes al aserrín de *Quercus* spp.
- Determinar la inocuidad de los compuestos bioactivos obtenidos en los basidiocarpos cultivados con adición de AAS.

### **10.2. Desarrollo de la estrategia**

El conocimiento generado sobre el AAS en el cultivo de *G. lucidum* se llevó a cabo en el laboratorio de hongos comestibles y medicinales del COLPOS Campus Puebla, por lo cual, es esta institución la que debe realizar la transferencia de tecnología considerando los siguientes aspectos, que entre otros son:

- Contar con personal altamente calificado para el manejo de las cepas de *Ganoderma* y contar con las habilidades para proporcionar asesoría al personal interesado en el cultivo de hongos, en las diferentes etapas para obtener los basidiocarpos.
- Dedicar infraestructura, equipo, reactivos, etc., para la producción de basidiocarpos en substratos adicionados con AAS.
- Obtener finalmente los compuestos bioactivos para su venta o distribución.

### **10.3. Los actores de la estrategia**

Es deseable que el conocimiento generado en esta investigación sea directamente dirigido a los sectores sociales que viven en zonas rurales, para que obtengan un beneficio económico con la producción de estos hongos medicinales.

Sin embargo, se necesita de la participación de diversas instituciones gubernamentales y de las organizaciones interesadas en el cultivo de *Ganoderma* para obtener apoyo financiero e implementar la infraestructura necesaria para el cultivo del hongo. Pero sobre todo, tener un amplio mercado para la venta del o de los productos del hongo.

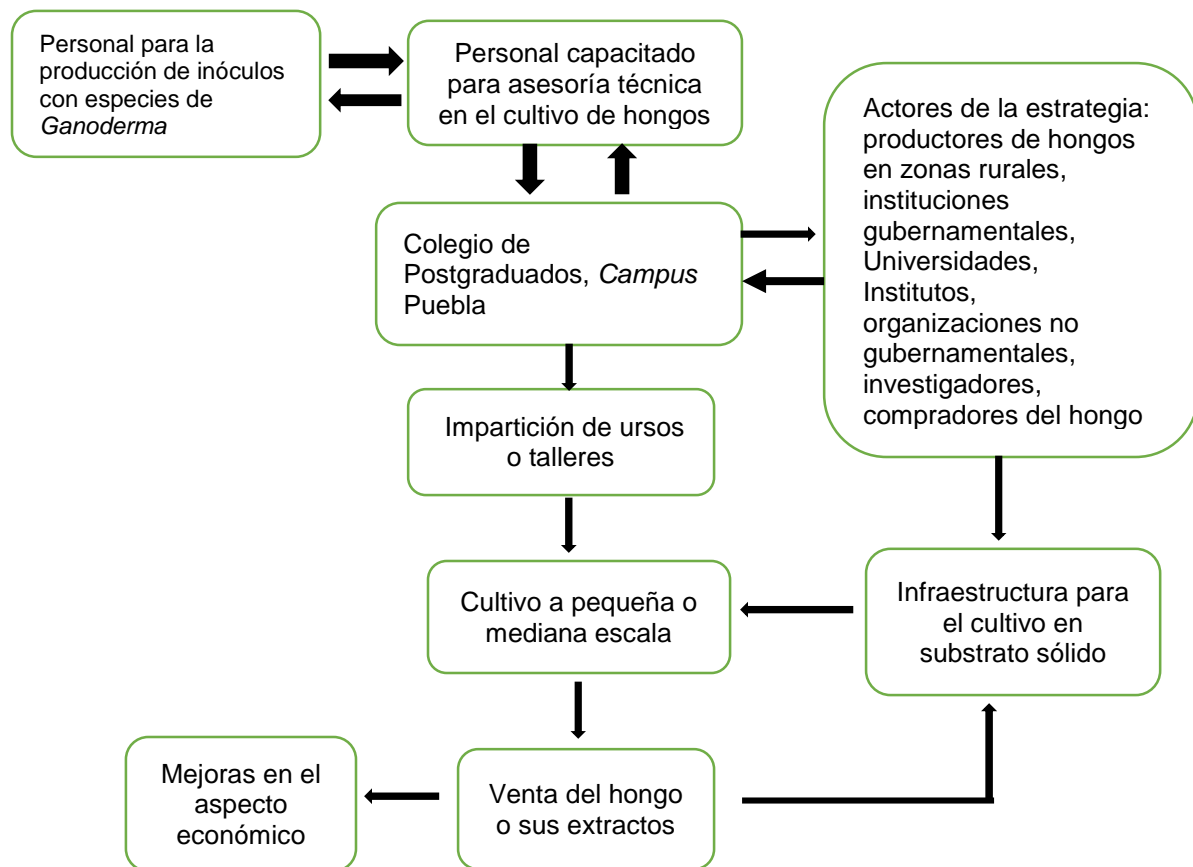
También es importante la participación de investigadores que se encuentran en centros académicos como son las universidades públicas o privadas.

El conocimiento generado en esta investigación, abre la posibilidad de aprovechar los recursos genéticos nativos para incrementar la producción de los basidiocarpos de especies de *Ganoderma* y por ende, una mejor producción de compuestos bioactivos.



#### 10.4. Paquete tecnológico

En la realización del cultivo en sustrato sólido de especies de *Ganoderma*, se requiere de manera fundamental tener el inóculo o “semilla”. Para esto, es recomendable establecer convenios con los productores del hongo para que adquieran el inóculo en el laboratorio de hongos del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla.



**Figura 11.** Diagrama propuesto para la estrategia a desarrollar en el cultivo de especies de *Ganoderma*.

En el cultivo sobre sustrato sólido (aserrín de *Quercus* spp.), se requiere tener las siguientes áreas, materiales y equipo:

### *1. Área de almacenamiento y preparación del sustrato*

Se requiere de una especie de almacén para guardar y conservar en buen estado los materiales forestales a utilizar. Puede ser un área de 4 m de largo x 3.5 m de ancho y 2.80 m de altura. Para esta área se recomienda que se tengan unas dimensiones de 3 m de ancho por 3 m de largo y la altura de 3 m. Es necesario mantener bajas humedades relativas. Un espacio al lado de esta área, para preparar (cortar o aserrar los troncos del encino), humectar y llenar las bolsas a sembrar con la cepa o cepas de *Ganoderma*. El área puede ser de 3 m largo x 2.5 m de ancho x 2.5 m de alto, con ventilación, de preferencia con extractor eléctrico.

Material:

- Máquina cortadora de leños para obtener el aserrín de encino.
- Cajas de plástico para guardar el aserrín.
- Báscula granataria para pesos de sustrato de 1 a 10 kg.
- Tina de plástico grande para humectar y homogeneizar el aserrín.
- Pala de metal para mezclar los diversos ingredientes
- Báscula granataria con capacidad máxima de 2 kg.
- Ollas de presión de 21 litros o de preferencia 1 autoclave.
- 4 Parrillas con quemadores para gas LP.
- Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm (Unicorn Imp. E.U.A).
- Pinzas de presión metálicas.
- Probetas graduadas de 500 a 1 litro.
- Pinzas metálicas para cerrar las bolsas ya con el sustrato.
- Marcadores de tinta negra.
- Masking Tape.
- Mesa metálica para colocar las bolsas mientras se preparan antes de su esterilización.

En cuanto al peso recomendado del sustrato formado por el aserrín de encino, se propone que sea de 2000 g húmedos, sin adición de cal o yeso.

## *2. Área de inoculación o siembra en el sustrato*

Se requiere de un espacio de 3 m de largo x 2.5 m de ancho. Se debe evitar la entrada de aire ambiental. Esta área de preferencia debe estar desinfectada. Aún más, el aire circulante, de ser posible que sea estéril.

Materiales y equipo:

- Campana de flujo laminar con norma ISO 9002 (filtro tipo HEPA).
- Balanza granataria de 1 a 10 kg.
- Desinfectante (alcohol o hipoclorito de sodio al 5%).
- Papel absorbente (toallas o servilletas).
- Frascos o bolsas con el inóculo o semilla (200 g húmedos) para 2000 g de sustrato.
- Sellador eléctrico (para sellar las bolsas inoculadas).
- Tijeras.
- Marcadores de tinta indeleble.
- Libreta o cuaderno.
- Masking tape.

## *3. Cuarto para incubación de las bolsas inoculadas*

Es un cuarto de 3 m de largo x 3.5 m de ancho x 2.5 m de alto. Se debe evitar la entrada de polvo, insectos y sobre todo de roedores. En el interior, debe haber una iluminación natural pero indirecta.

Material:

- Estantes metálicos con 3 o 4 entrepaños.
- Termómetro
- Higrómetro

#### 4. Área de fructificación y cosecha

En esta área debe haber el suficiente espacio para almacenar y permitir la fructificación de las bolsas con el substrato plenamente colonizado por el micelio del hongo *Ganoderma*. El área sería de 4 m de largo x 4 m de ancho y 3 m de alto. La iluminación debe ser natural e indirecta.

Materiales:

- Estantes metálicos con entrepaños
- Cuchillo de acero o eléctrico para cortar y fragmentar los hongos
- Mesa para colocar los hongos cosechados
- Horno de más de 100 °C para deshidratar los hongos
- Bolsas de plástico para almacenar los hongos deshidratados
- Aspersora para el riego de los substratos y de los hongos.
- De preferencia con riego automatizado.
- Extractor de aire eléctrico.
- Hidrómetro
- Termómetro de temperatura máxima y mínima.

## 11. LITERATURA CITADA

- Akihisa, T., Y. Nakamura, M. Tagata, H. Tokuda, K. Yasukawa, E. Uchiyama, T. Suzuki and Y. Kimura. 2007. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity* 4: 224-231.
- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra-Romero, A. Almaraz-Sánchez, B. Tlapal-Bolaños, O. Trejo-Ramírez, J. M. Davidson, J. T. Kliejunas, S. Oak, J. G. O'Brien, F. Orozco-Torres y D. Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. *Polibotánica* 23: 1-21.
- Amborabé, B-E., P. Fleurat-Lessard, J-F. Chollet and G. Roblin. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1051-1060.
- Anchondo-Aguilar, A., A. Núñez-Barrios, T. Ruiz-Anchondo, J. Martínez-Tellez, S. Vergara-Yoisura y A. Larqué-Saavedra. 2011. Efecto del ácido salicílico en la bioproduktividad de la fresa (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (2): 293-298.
- Arfana, M., H. R. Atharb and M. Ashraf. 2007. Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *Journal of Plant Physiology* 164: 685-694.
- Babalar, M., M. Asghari, A. Talaei and A. Khosroshahi. 2007. Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of selva strawberry fruit. *Food Chemistry* 105: 449-453.
- Bourbonnais, R. and M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Calviño, E., L. Pajuelo, J. L. Manjón, P. Sancho, M. C. Tejedor, J. Gil, E. Fernández-Cruz and J. C. Diez. 2012. Active fraction from *Ganoderma lucidum* with apoptosis activity on peripheral blood mononuclear cells from chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Integrative Medicine* 4: 335-343.
- Cañas, A. I. and S. Camarero. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694-705.
- Cao, Y., S-H. Wu and Y-C. Dai. 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. *Fungal Diversity* 56: 49-62.
- Chen, S-D., M. C. Hsieh, M-T. Chiou, Y-S. Lai and Y-H. Gheng. 2008. Effects of fermentation products of *Ganoderma lucidum* on growth performance and immunocompetence in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition* 62 (1): 22-32.
- Chien, C-C., M-L. Tsai, C-C. Chen, S-J. Chang and C-H. Tseng. 2008. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. *Mycopathologia* 166: 117-120.
- Chien, Y. L., C. T. Ho, B. H. Chiang and L. S. Hwang. 2011. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium. *Food Chemistry* 126: 1586-1592.
- Chitra, K., N. Ragupathi, K. Dhanalakshmi, P. Mareeshwari, N. Indra, A. Kamalakannan, A. Sankaralingam and R. Rabindran. 2008. Salicylic acid induced systemic resistant on peanut against *Alternaria alternata*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(1): 50-56.
- Chiu, S. W., Z. M. Wang, T. M. Leung and D. More. 2000. Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and

- antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 38 (2): 173-178.
- Ćilerdžić, J., J. Vukojević, M. Stajić, T. Stanojković and J. Glamočlija. 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and comercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.036i>.
- Cör, D., T. Botić, Ž. Knez, U. Batista, A. Gregori, F. Pohleven and T. Bončina. 2014. Two-stage extraction of antitumor, antioxidant and antiacetylcholinesterase compounds from *Ganoderma lucidum* fruiting body. *Journal of Supercritical Fluids* 91: 53-60.
- Da Silva Coelho, J., C. G. M de Souza, A. L. de Oliveira, A. Bracht, M. A. F. Costa and R. M. Peralta. 2010. Comparative removal of bentazon by *Ganoderma lucidum* in liquid and solid state cultures. *Current Microbiology* 60: 350-355.
- Dédaldéchamp, F., S. Saeedi, P. Fleurat-Lessard and G. Roblin. 2014. Uptake and metabolic effects of salicylic acid on the pulvinar motor cells of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 125-132.
- Desai, S. S. and C. Nityanand. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 3 (2): 89-124.
- De Silva, D. D., S. Rapior, K. D. Hyde and A. H. Bahkali. 2012. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity* 56: 1-29.
- De Souza Silva, C. M. M., I. S. de Melo and P. R. de Oliveira. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 324-329.
- Díaz, M. R., J. G. Marmolejo M. y R. Valenzuela. 2005. Flora micológica de bosques de pino y pino-encino en Durango, México. *Ciencia UANL* 8 (3): 362-369.
- Díaz-Moreno, R., R. Valenzuela, J. G. Marmolejo y E. Aguirre-Acosta. 2009. Hongos degradadores de la madera en el estado de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 13-22.

- Dinarello, C. A. 2010. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell* 140: 935-950.
- Elisashvili, V. and E. Kachlishvili. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144: 37-42.
- Erkel, E. I. 2009. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 7 (3 and 4): 841-844.
- Fatemi, H., S. Mohammadi and M. H. Aminifard. 2013. Effect of postharvest salicylic acid treatment on fungal decay and some postharvest quality factors of kiwi fruit. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 1338-1345.
- Fonseca, M. I., E. Shimizu, P. D. Zapata and L. L. Villalba. 2010. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology* 46: 534-539.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, M. J. Izaguirre, S. Alemano, D. Álvarez and G. Abdala. 2010. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current Microbiology* 61: 485-493.
- Fu, Z. Q., and X. Dong. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839-863.
- Gao, Y. and S. Zhou. 2003. Cancer prevention and treatment by *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International* 19 (3): 275-325.
- Gao, Y., E. Chan and S. Zhou. 2004. Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International* 20 (2): 123-161.
- Gao, Y., H. Gao, E. Chan, W. Tang, X. Li, J. Liang and S. Zhou. 2005. Protective effect of *Ganoderma* (a mushroom with medicinal properties) against various liver injuries. *Food Reviews International* 21: 27-52.



- Gao, P., T. Hirano, Z. Chen, T. Yasuhara, Y. Nakata and A. Sugimoto. 2012. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). *Fitoterapia* 83: 490-499.
- Georgiou, C. D., N. Tairis and A. Sotiropoulou. 2000. Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in phytopathogenic fungi. *Mycologia* 92: 825-834.
- Gilroy, D. W. 2005. The role of aspirin-triggered lipoxins in the mechanism of action of aspirin. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73: 203-210.
- Gimenez, M. J., J. M. Valverde, D. Valero, F. Guillén, D. Martínez-Romero, M. Serrano and S. Castillo. 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chemistry* 160: 226-232.
- Glen, M., L. Bougher, A. A. Francis, S. Q. Nigg, S. S. Lee, R. Irianto, K. M. Barry, C. L. Beadle and C. L. Mohammed. 2009. *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australasian Plant Pathology* 38: 345-356.
- González-Matute, R., D. Figlas, R. Devalis, S. Delmastro and N. Curvetto. 2002. Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micología Aplicada Internacional* 14 (2):19-24.
- Gottlieb, A. M. and J. E. Wright. 1999a. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103 (6): 661-673.
- Gottlieb, A. M. and J. E. Wright. 1999b. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvigia*. *Mycological Research* 103 (10): 1289-1298.
- Gottlieb, A. M., E. Ferrer and J. E. Wright. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104 (9): 1033-1045.

- Guan, S-H., J-M. Xia, M. Yang, X-M. Wang, X. Liu and D-A. Guo. 2008. Cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Asian Natural Products Research* 10 (8): 695-700.
- Gunes, A., A. Inal, M. Alpaslan, F. Eraslan, E. G. Bagci and N. Cicek. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736.
- Guzmán, G. 1980. *Identificación de los Hongos, comestibles, venenosos y alucinantes*. 1980. Editorial Limusa. México, Pp. 60-62.
- Han, J.R., C. H. An and J. M. Yuan. 2005. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional values. *Journal of Applied Microbiology* 99: 910-915.
- Hayat, Q., S. Hayat, M. Irfan and A. Ahmad. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Heleno, S. A., L. Barros, A. Martins, M. J. R. P. Queiroz, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira. 2012. Fruiting body, spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International* 46: 135-140.
- Heleno, S. A., I. C. F. R. Ferreira, A. P. Esteves, A. Ćirić, J. Glamočlija, A. Martins, M. Soković and M. J. R. P. Queiroz. 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology* 58: 95-100.
- Hsieh, C. and F-C. Yang. 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology* 91: 105-109.
- Huang, H-C., Chen C-I, Hung C-N and Liu Y-C. 2009. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in

- Ganoderma lucidum* submerged culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 217-224.
- Hyde, K. D., A. H. Bahkali and M. A. Moslem. 2010. Fungi—an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity* 43: 1-9.
- Jang, K-J., M-H. Han, B-H. Lee, B-W. Kim, C-H. Kim, H-M. Yoon and Y-H. Choi. 2010. Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 3(1): 24-31.
- Jaramillo, C., N. Rodríguez and S.T. Chang. 2010. Simple methodology for the cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in Colombian coffee farms. Pp. 397-405. In: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 22*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Jiang, J., A. Jedinak and D. Sliva. 2011. Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415: 325-329.
- Kandan, A., R. Bhaskaran and R. Samiyappan. 2010. *Ganoderma* – a basal stem rot disease of coconut palm in south Asia and Asia pacific regions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (15): 1445-1449.
- Kim, J. H., D. H. Lee, S. H. Lee, S. Y. Choi and J. S. Lee. 2004. Effect of *Ganoderma lucidum* on the quality and functionality of korean traditional rice wine, yakju. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (1): 24-28.
- Kuhar, F. and L. Papinutti. 2014. Optimization of laccase by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Revista Argentina de Micología* 46(2): 144-149.

- Lai, K. N., L. Y. Y. Chan, S. C. W. Tang and J. C. K. Leung. 2006. *Ganoderma* extract prevents albumin-induced oxidative damage and chemokines synthesis in cultured human proximal tubular epithelial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21: 1188-1197.
- Lakshmi, B., T. A. Ajith, N. Sheena, N. Gunapalan and K. K. Janardhanan. 2003. Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the ycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement* 1: 85-97.
- Landeros, F., J. Castillo, G. Guzmán y J. Cifuentes. 2006. Los hongos (macromicetos) conocidos en el Cerro Zamorano (Querétaro-Guanajuato), México. *Revista Mexicana de Micología* 22: 25-31.
- Leskosek-Cukalovic, I., S. Despotovic, N. Lakic, M. Niksic, V. Nedovic and V. Tesevic. 2010. *Ganoderma lucidum* - Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International* 43: 2262-2269.
- Li, P., Y-P. Deng, X-X. Wei and J-H. Xu. 2013. Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxic activities. *Natural Product Research* 27 (1): 17-22.
- Liang, C-X., Li. Y-B, Xu. J-W, Wang J-L, Miao X-L, Tang Y-J, Gu T and Zhong J-J. 2010. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1367-1374.
- Luo, Z., X. Wu, Y. Xie and C. Chen. 2012. Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment. *Food Chemistry* 131: 456-461.
- Ma, C-w., M. Feng, X. Zhai, M. Hu, L. You, W. Luo and M. Zhao. 2013. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44: 886-894.

- Ma, L., R. Zhuo, H. Liu, D. Yu, M. Jiang, X. Zhang and Y. Yang. 2014. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical Engineering Journal* 82: 1-9.
- Maciel, M. J. M., A. C. Silva and H. C. T. Ribeiro. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 <http://www.ejbiotechnology.info> DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-2.
- Maciel, G. M., C. G. M. de Souza, C. A. V. de Araújo, E. Bona, C. W. I. Haminiuk, R. Castoldi, A. Bracht and R. M. Peralta. 2013. Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. and *Trametes* sp. *Chemical Engineering Journal* 215-216: 331-338.
- Majeau, J-A., S. K. Brar and R. D. Tyagi. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101: 2331-2350.
- Manavalan, T., A. Manavalan, K. P. Thangavelu and K. Heese. 2012. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of Proteomics* 77: 298-309.
- Manavalan, T., A. Manavalan, K. P. Thangavelu, and K. Heese. 2013. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* 70: 106-114.
- Mandal, S., N. Mallick and A. Mitra. 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 642-649.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-

- consumo de los hongos comestibles. Pp. 209-224. *In: El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez Vázquez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal Lara. El Colegio de la Frontera Sur, México, D. F.
- Martínez-Carrera, D. y L. López-Martínez de Alva. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. Pp. 513-551. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 28*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Mau, J-L. H-C. Lin and C-C. Chen. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* 34: 521-526.
- Melo, I. 1986. Studies on Aphyllophorales of Portugal: The genus *Ganoderma*. *International Journal of Mycology and Lichenology* 2: 183-204.
- Moncalvo, J-M., H-F. Wang and R-S. Hseu. 1995a. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99 (12): 1489-1499.
- Moncalvo, J-M., H-H. Wang and R-S. Hseu. 1995b. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87(2): 223-238.
- Moncalvo, J. M. and F. Ryvarden. 1998. Nomenclature of Ganodermataceae. *Synopsis Fungorum* 11: 1-109.
- Montaño, A., R. Valenzuela, A. Sánchez, M. Coronado y M. Esqueda. 2006. Aphyllophorales de Sonora, México, I. Algunas Especies de la Reserva Forestal Nacional y Refugio de Fauna Silvestre Ajos-Bavispe. *Revista Mexicana de Micología* 23: 17-26.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa, E. Montielm y D. Martínez-

- Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. Pp. 91-108. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 7.* Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Moreno-Rico, O., R. Velásquez-Valle, G. Sánchez-Martínez, M. E. Siqueiros-Delgado, M. Cerda-Lemus y R. Díaz-Moreno. 2010. Diagnóstico fitopatológico de las principales enfermedades en diversas especies de encinos y su distribución en la sierra fría de Aguascalientes, México. *Polibotánica* 29: 165-189.
- Müller, C. I., T. Kumagai, J. O'Kelly, N. P. Seeram, D. Heber and P. Koeffler. 2006. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research* 30: 841-848.
- Munné-Bosch, S., J. Peñuelas and J. Llusià. 2007. A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed *NahG* transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science* 172: 756-762.
- Murugesan, K., I-H Nam, Y-M Kim and Y-S Chang. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1662-1672.
- Ofodile, L. N., N. U. Uma, T. Kokubun, R. J. Grayer, O. T. Ogundipe and M. S. J. Simmonds. 2005. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytotherapy Research* 19: 310-313.
- Palacios, A. y R. Ramírez. 2000. Perspectiva de cultivo de *Ganoderma lucidum* (Reishi). *In: Proceed. VII Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología.* Querétaro, México.
- Pan, D., L. Wang, C. Chen, B. Hu and P. Zhou. 2015. Isolation and characterization of a hyperbranched proteoglycan from *Ganoderma Lucidum* for anti-diabetes. *Carbohydrate Polymers* 117: 106-114.

- Paterson, R. R. M. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67: 1985-2001.
- Paterson, R. R. M. 2007. *Ganoderma* disease of oil palm—A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection* 26: 1369-1376.
- Peksen, A. and G. Yakupoglu. 2009. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 611-618.
- Peksen, A., G. Yakupoglu, T. Yakupoglu, C. Gulser, E. Ozturk and N. Ozdemir. 2011. Changes in chemical compositions of substrates before and after *Ganoderma lucidum* cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 637-642.
- Popova, L. P., L. T. Maslenkova, R. Y. Yordanova, A. P. Ivanova, A. P. Krantev, G. Szalai and T. Janda. 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 224-231.
- Postemsky, P. D., S. E. Delmastro and N. R. Curvetto. 2014. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. *International Biodeterioration and Biodegradation* 93: 25-32.
- Qi, P-F., A. Johnston, M. Balcerzak, H. Rocheleau, L. J. Harris, X-Y. Long, Y-M. Wei, Y-L. Zheng and T. Oullet. 2012. Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. *Fungal Biology* 116: 413-426.
- Radwan, D. E., K. A. Fayez, S. Y. Mahmoud, A. Hamad and G. Lu. 2006. Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zucchini yellow mosaic virus infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 172-181.
- Radwan, D. E. M., G. Lu, K. A. Fayez and S. Y. Mahmoud. 2008. Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 845-857.



- Rajendran, L., R. Akila, G. Karthikeyan, T. Raguchander, D. Saravanakumar and R. Samiyappan. 2014. Nucleic acid based detection technique for *Ganoderma lucidum* in coconut. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (6): 690-702.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- Reza, M. O., A. A. Almoneafy, Z. qi Cui, G-L. Xie, J. Zhang, C. Shang and B. Li. 2013. Application of acetyl salicylic acid and chemically different chitosans against storage carrot rot. *Postharvest Biology and Technology* 84: 51-60.
- Rivas-San Vicente, M. and J. Plascencia. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62 (10): 3321-3338.
- Rivera-Hoyos, C., E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez and J. M. Delgado-Boada. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* 27: 67-82.
- Rodríguez, R., C. Soto-Velazco, S. Fausto y J. Álvarez. 1997. Perspectivas de producción del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* en el estado de Jalisco, México. In: *Proceed. VI Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología*. Chiapas, México.
- Romero-Bautista, L., G. Pulido- Flores y R. Valenzuela. 2010. Estudio micoflorístico de los hongos poliporoides del estado de Hidalgo, México. *Polibotánica* 29: 1-28.
- Royse, D. J. and J. E. Sánchez. 2008. Supplementation of first break mushroom compost with hydrolyzed protein, comercial supplements and crystalline amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1333-1339.
- Ruan, W., A. H. H. Lim, L. G. Huang and D. G. Popovich. 2014. Extraction, optimisation and isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their effect on human carcinoma cell growth. *Natural Product Research* 28 (24): 2264-2272.

- Ryvarden, L. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma*? In: Buchanan, P. K., Hseu, R. S. and Moncalvo, J. M. (eds) *Ganoderma- Systematics, Phytopathology and Farmacology. Proceedings of contributed symposia 59 A, B, Fifth International Mycological Congress, Vancouver, August 14-21 1994*, pp. 19-24.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92(1): 180-191.
- Saikia, R., T. Singh, R. Kumar, J. Srivastava, A. K. Srivastava, K. Singh and D. K. Arora. 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research* 158: 203-213.
- Sánchez, J. E. y D. Royse. 2001. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* El Colegio de la Frontera Sur. Editorial Limusa. Grupo Noriega editores. 290 pp.
- Sankaran, K. V., P. D. Bridge and C. Gokulapalan. 2005. *Ganoderma* diseases of perennial crops in India – an overview. *Mycopathologia* 159: 143-152.
- Saraiva, J. A., A. P. M. Tavares and A. M. R. B. Xavier. 2012. Effect of the inducers veratryl alcohol, xyloidine, and ligninosulphonates on activity and thermal stability and inactivation kinetics of laccase from *Trametes versicolor*. *Applied BioChemistry and Biotechnology* 167: 685-693.
- Sayyari, M., S. Babalar, M. Kalantari, M. Serrano and D. Valero. 2009. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology* 53: 152-154.
- Sayyari, M., S. Castillo, D. Valero, H. M. Díaz-Mula and M. Serrano. 2011. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology and Technology* 60: 136-142.

- Selvakumar, S., R. Manivasagan and K. Chinnappan. 2013. Biodegradation and decolourization of textile dye wastewater using *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology* 3: 71-79.
- Seo, G-S. and P. M. Kirk. 2000. *Ganodermataceae*: nomenclatura y clasificación (1): 1-22. In: *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. Eds. Flood P. D. Bridge and M. Holderness. CAB international.
- Shiao, M-S. 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record* 3: 172-180.
- Simonić, J., J. Vukojević, M. Stajić and J. Glamočlija. 2010. Intraspecific diversity within *Ganoderma lucidum* in the production of laccase and Mn-Oxidizing Peroxidases during plant residues fermentation. *Applied BioChemistry and Biotechnology* 162: 408–415.
- Singh, P. K. and V. K. Chaturvedi. 2012. Effects of salicylic acid on seedling growth and nitrogen use efficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Biosystems* 146 (2): 302-308.
- Smina, T. P., J. Mathew, K. K. Janardhanan and T. P. A. Devasagayam. 2011. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. occurring in South India. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32: 438-446.
- Smith, B. J. and K. Sivasithamparam. 2000. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Mycological Research* 104 (8): 943-951.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales and S. Roussos. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19 (1): 15-23.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galván, D. Sihuana, F. Quiriz, M. Juárez y D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. Pp. 175-187. In: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica*.

- Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 13.* Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo and Y. Hadar. 2006. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters* 28:1425-1429.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. P. Wasser, E. Nevo and Y. Hadar. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 57-61.
- Soto-Velazco, C., M. C. López, E. Vázquez-Valls, and I. Álvarez. 2002. Cultivation of *Ganoderma lucidum* and its effect on the production of lymphocytes. *Proceeding of the Fourth International Conference.* Cuernavaca, México.
- Spezzia, M. T. 2012. Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de biorremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, México.
- Suarez-Medellín, J., M. Luna-Rodríguez, G. Mendoza, A. Salinas, M. L. S. Quiroz y Á. Trigos. 2012. Caracterización morfológica y molecular de una cepa silvestre mexicana perteneciente al género *Ganoderma*. *Revista Mexicana de Micología* 36: 33-39.
- Sun, S-J., W. Gao, S-Q. Lin, J. Zhu, B-G. Xie and Z-B. Lin. 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 537-543.
- Tang, W., J-W. Liu, W-M. Zhao, D-Z. Wei and J-J. Zhong. 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences* 80: 205-211.

- Teerapatsakul, C., R. Parra, C. Bucke and L. Chitradon. 2007. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-Alk4 by medium engineering. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1519-1527.
- Tello, S. I. 2010. Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *Ganoderma* (Fungi, Ganodermataceae), conocido como *Reishi* en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, México.
- Thyagarajan, A., A. Jedinak, H. Nguyen, C. Terry, L. A. Baldrige, J. Jiang and D. Sliva. 2010. Triterpenes from *Ganoderma Lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). *Nutrition and Cancer* 62(5): 630-640.
- Ting, W. T. E., S. Y. Yuan, S. D. Wu and B. V. Chang. 2011. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 238-242.
- Torres-Torres, M. G. y L. Guzmán-Dávalos. 2005. Notas sobre la variación morfológica de *Ganoderma curtisii* (Ganodermatales, Ganodermataceae) en México. *Revista Mexicana de Micología* 21: 39-47.
- Trajković, L. M. H., S. A. Mijatović, D. D. Maksimović-Ivanić, I. D. Stojanović, M. B. Momčilović, S. J. Tufegdžić, V. M. Maksimović, Z. S. Marjanović and S. D. Stošić-Grujičić. 2009. Anticancer Properties of *Ganoderma Lucidum* methanol extracts in vitro and in vivo. *Nutrition and Cancer* 61(5): 696-707.
- Valenzuela, R., C. P. De la Huerta y R. F. Nava. 2002. Los poliporáceos de México V. algunas especies del norte del Estado de Querétaro. *Polibotánica* 14: 85-122.
- Vlot, A. C., D. A. Dempsey and D. F. Klessig. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.

- Wang, Y. Y., B. Q. Li, G. Z. Qin, L. Li and S. P. Tian. 2011. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae* 129: 183-188.
- Wasser, S. P. and A. L. Weis. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Review in Immunology* 19: 65-96.
- Wu, H-S., W. Raza, J-Q. Fan, Y-G. Sun, W. Bao, D-Y. Liu, Q-W. Huang, Z-S. Mao, Q-R. Shen and W-G. Miao. 2008. Antibiotic effect of exogenously applied salicylic acid on *in vitro* soilborne pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Chemosphere* 74: 45-50.
- Yang, F-C., C. Hsieh and H-M. Chen. 2003. Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 39: 21-26.
- Yang, Z. L. and B. Feng. 2013. What is the Chinese “Lingzhi”? – a taxonomic mini-review. *Mycology* 4 (1): 1-4.
- You, B-J., H-Z. Lee, K-R. Chung, M-H. Lee, M-J. Huang, N. Tien, C-W. Chan and Y-H. Kuo. 2012. Enhanced production of ganoderic acids and cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* using solid-medium culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (8): 1529-1534.
- You, B-J., M-H. Lee, N. Tien, M-S. Lee, H-C. Hsieh, L-H. Tseng, Y-L. Ghung and H-Z. Lee. 2013. A Novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction. *PLoS ONE* 8(1): 53616. doi:10.1371/journal.pone.0053616.
- Zhang, X-Q., F. C. F. Ip, D-M. Zhang, L-X. Chen, W. Zhang, Y-L. Li, N. Y. Ip and W-C. Ye. 2011. Triterpenoids with neurotrophic activity from *Ganoderma lucidum*. *Natural Product Research* 25 (17): 1607-1613.
- Zhang, W., J. Tao, X. Yang, Z. Yang, L. Zhang, H. Liu, K. Wu and J. Wu. 2014. Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449: 307-312.

- Zheng, L., D. Jia, X. Fei, X. Luo and Z. Yang. 2009. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological Research* 164: 312-321.
- Zhonghui, Z., Z. Xiaowei and F. Fang. 2014. *Ganoderma lucidum* polysaccharides supplementation attenuates exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle of mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21: 119-123.
- Zhou, X-W., Su. K-Q and Zhang Y-M. 2012. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 941-963.
- Zhou, H., P. Bi, X. Wu, F. Huang and H. Yang. 2014. Improved polysaccharide production in submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the addition of coixenolide. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 1497-1505.
- Zilly, A., J. da S. Coelho-Moreira, A. Bracht, C. G. M. de Souza, A. E. Carvajal, E. A. Koehnlein and R. M. Peralta. 2011. Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 340-344.
- Zong, A., H. Cao and F. Wang. 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers* 90: 1395-1410.

## **12. ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **12.1. EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL Y PRODUCCIÓN DE LACASAS Y PROTEÍNAS EN LA CEPA CP-145 DE *Ganoderma lucidum*, CULTIVADA EN PDA, Y EN PDB SIN AGITACIÓN**

##### **12.1.1. Resumen**

Se realizó el cultivo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en los medios de cultivo PDA y PDB solos y con adición de AAS en concentración 100  $\mu$ M. La incubación y desarrollo del micelio en el medio PDB fue en condiciones estáticas. Inicialmente se incluyó la adición del AAS en concentración 10 mM en ambos medios. Sin embargo el medio PDA no gelificó, por lo que, se agregó 10% de agar base y aun así, no logró la consistencia normal. A pesar de ello, el micelio se inoculó en ambos medios preparados con AAS 10 mM, pero no hubo crecimiento micelial. Las muestras (sobrenadantes) que se obtuvieron de las cajas de Petri o de los matraces Erlenmeyer, dependiendo de la forma en que se manejó el micelio, se denominaron con micelio homogeneizado (MH) o no homogeneizado (MNH). Los muestreos se realizaron en los días 0, 7, 14, 21 y 28 de incubación. En el medio PDA, se evaluó el crecimiento del área micelial y en el medio PDB se evaluó el peso deshidratado del micelio. En ambos medios se determinó el efecto del AAS 100  $\mu$ M en la producción de lacasas y proteínas. En los resultados, en el medio PDA y en el tratamiento, no hubo diferencia significativa en el crecimiento del área micelial. En el medio PDB hubo un mejor desarrollo en el micelio no homogéneo (MNH) en el testigo y en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M, pero sin diferencias estadísticas entre ambos. El testigo y el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con el micelio homogeneizado (MH), mostraron valores menores que en el MNH, sin diferencia estadística entre



ellos. Las lacasas y proteínas, fueron evidentes hasta el día 28 de incubación, con valores para las lacasas de 2.36 y 1.78 U/mL y para las proteínas de 23.28 y 26.04 µg/mL, para el testigo y el tratamiento, respectivamente.

### **12.1.2. Introducción**

Con base a que no se tienen estudios a nivel de laboratorio sobre la aplicación del ácido acetilsalicílico, se realizaron las presentes investigaciones a manera de ensayo para definir las condiciones, los medios de cultivo en los que mejor se desarrolla el micelio de la cepa CP-145 de *G. lucidum* y en los que se determine de mejor manera la presencia de lacasas y proteínas.

### **12.1.3. Materiales y métodos**

#### **12.1.3.1. Material biológico**

Se cultivó la cepa CP-145 de *G. lucidum* que se encuentra depositada en el CREGENHC del laboratorio de hongos comestibles y medicinales del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, que proviene del Estado de Morelos, México.

#### **12.1.3.2. Medios de cultivo**

Se utilizaron los medios papa dextrosa agar (PDA, Bioxon) y caldo de papa y dextrosa (PDB, Difco). Su preparación fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para los tratamientos en PDA y PDB, al agua destilada y estéril para su preparación, se le adicionó el AAS en las concentraciones 10 mM y 100 µM. Todos los medios se disolvieron al calentarse en un horno de microondas; enseguida, del medio PDB se midieron 30 mL y se vaciaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapa de rosca de baquelita; del medio PDA se midieron otros 30 mL y se vaciaron en tubos de ensayo de vidrio con tapa de rosca de baquelita. Los matraces y tubos con los medios PDB y PDA se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 25 minutos. El medio de los

tubos de ensayo, se vació en cajas Petri de 92 mm x 15 mm. El medio de los matraces, permaneció en ellos. Cabe señalar que el medio PDA con la concentración 10 mM no gelificó, por lo que, se preparó nuevamente con la adición de agar base al 10% y con ello, gelificó sin alcanzar totalmente la solidez normal del medio de cultivo.

#### **12.1.3.3. Inoculación e incubación**

A las cajas Petri con PDA (testigo y tratamientos) se les inoculó en la parte central un disco de 5 mm de diámetro, con micelio de la cepa CP-145 de *G. lucidum* desarrollado previamente. A los matraces Erlenmeyer con PDB (testigo y tratamientos) se les inoculó con tres discos de 5 mm de diámetro. Todo esto se realizó bajo la cámara de flujo laminar. Las cajas Petri y los matraces se incubaron a temperatura ambiente y en obscuridad. Los matraces permanecieron de manera estática. El micelio comenzó a desarrollarse normalmente en los testigos y en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M, no así en el tratamiento con AAS 10 mM, en donde definitivamente el micelio no se desarrolló.

#### **12.1.3.4. Días de muestreo**

El muestreo se realizó durante los días: 0, 7, 14, 21 y 28 de incubación. En el muestreo del día 0 en el medio PDA (testigo y tratamiento) se utilizó una caja Petri. Se agregó al medio de cultivo un inóculo de 5 mm de diámetro, con micelio previamente desarrollado y se procesó para obtener la muestra (sobrenadante). Para el resto de los días de muestreo, se procesaron 3 cajas Petri (n = 3) con el micelio del testigo y 3 cajas Petri (n = 3) con el micelio del tratamiento.

Para el muestreo del día 0 en el medio PDB (testigo y tratamiento) se utilizó el contenido de un matraz Erlenmeyer al que se le agregaron tres inóculos de 5 mm de diámetro, con micelio de la cepa CP-145. Enseguida se procesó para obtener la muestra. En el resto de los días de muestreo, 6 muestras se

procesaron de tal manera que el micelio se homogeneizó y en otras 6, el micelio no se homogeneizó. En ambos casos 3 muestras del testigo y 3 del tratamiento.

#### **12.1.3.5. Obtención de muestras en PDA**

En cada día de muestreo se seleccionaron 3 cajas Petri del testigo y del tratamiento con micelio en desarrollo. El medio de cultivo contenido en la caja Petri se cortó en cuadros de 2 cm<sup>2</sup> aproximadamente, se vaciaron en un vaso metálico (estéril) y se agregaron 3 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 5, preparado fresco y ajustado con ácido acético glacial 1 M. Se homogeneizó el medio de cultivo en el equipo PRO SC-250 al colocar dentro del vaso metálico un rotor (estéril) de 2 cm de diámetro que se hizo girar a 15,000 rpm y en 2 a 3 minutos se obtuvo una mezcla semisólida, la cual, con la ayuda de una espátula metálica (estéril), se pasó a un tubo (estéril) de plástico duro y resistente de 50 mL de capacidad con tapa de baquelita (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene). Enseguida, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos (centrífuga SIGMA 4K15 Laboratory centrifuges). De cada tubo se extrajeron de 2.0 a 2.5 mL de sobrenadante y se colocaron en un vial de vidrio (estéril) con tapa de rosca, el cual se etiquetó con los datos correspondientes. El material sedimentado en el tubo se desechó. La muestra obtenida (sobrenadante) se destinó para determinar la presencia de lacasas y proteínas; el resto del sobrenadante en el vial se llevó a refrigeración a 4°C. Todo el proceso se hizo en una cámara de flujo laminar.

#### **12.1.3.6. Obtención de muestras en PDB**

La obtención de la muestra se realizó de dos formas:

1. El líquido y el micelio contenido en el matraz, se vaciaron dentro del vaso metálico (estéril), y se homogeneizó en el equipo PRO SC-250 de la misma manera en que se realizó para el medio PDA. La fase semilíquida se vació en el tubo (estéril) de plástico de 50 mL, el cual se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. Del sobrenadante se extrajeron 3 mL y se colocaron en un vial de

vidrio (estéril) con tapa de rosca de baquelita. Las muestras obtenidas (3 del testigo y 3 del tratamiento), se denominaron como micelio homogeneizado (MH). Por otra parte, el material sedimentado en el tubo de plástico de 50 mL, se filtró en papel filtro estéril del número 2 con peso conocido y se deshidrató en un horno (Felisa, México) a 95°C durante 24 h para obtener el peso seco del micelio. Todo el procedimiento se realizó dentro de una cámara de flujo laminar.

2. La fase líquida con el micelio de otros 3 matraces del testigo y 3 del tratamiento, se filtró en papel filtro estéril del número 2 (con peso conocido), colocado en un embudo de vidrio de cola larga (estéril). Del líquido filtrado se extrajeron de 2 a 3 mL y se colocaron en un vial de vidrio (estéril) con tapa de rosca de baquelita y se etiquetó con los datos correspondientes. Estas muestras se denominaron como micelio no homogeneizado (MNH), ya que no se utilizó el equipo PRO SC-250.

El material residual que quedó en el papel filtro, se deshidrató en un horno (Felisa) a 95°C durante 24 h para obtener el peso seco del micelio. El proceso para obtener la muestra se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar.

#### **12.1.3.7. Variables a evaluar**

##### *Determinación del crecimiento del área micelial en el medio PDA*

Se tomaron fotografías del micelio en crecimiento en las cajas Petri con PDA (testigo y tratamiento) durante los días en que se obtuvieron las muestras. Para determinar el área de crecimiento micelial se utilizó el programa de cómputo denominado ImageJ (National institutes of Health, ver. 2012).

##### *Características de las colonias*

Se consideró la forma, color, textura y densidad del micelio de los testigos y de los tratamientos en el medio PDA. Para el caso del micelio desarrollado en el

medio PDB, se tomaron fotografías para definir el color del micelio y del medio líquido.

#### *Determinación de lacasas y proteínas*

Para determinar la actividad volumétrica de la enzima lacasa, se siguió la metodología de Bourbonnais y Paice (1990). En la determinación de proteínas se siguió la metodología de Bradford (1976). La técnica para las determinaciones se presenta en las secciones 7.2.3.5. y 7.2.3.6.).

#### *Medición de pH*

Se midió el pH inicial y la temperatura en el medio de cultivo de una caja Petri con el medio PDA solo y con el medio PDA adicionado con AAS 100  $\mu\text{M}$ . En otro matraz Erlenmeyer se midió el pH y la temperatura inicial del medio PDB en el testigo y en el tratamiento.

### **12.1.4. Resultados**

#### *Área de crecimiento micelial en PDA*

El área de crecimiento del micelio en el testigo y en el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  en PDA fue similar y no hubo diferencias estadísticas entre los valores obtenidos durante los muestreos. Por lo cual, el AAS 100  $\mu\text{M}$  no mostró efecto positivo en el crecimiento del área micelial. Los datos que se presentan corresponden hasta la lectura del día 21, porque el micelio cubrió totalmente el medio de cultivo entre los 15 y 17 días de incubación, por lo que, ya no había más área que medir (**Figura 12**).

#### **Simbología de la Figura 12:**

T PDA 7 = Testigo en PDA día 7

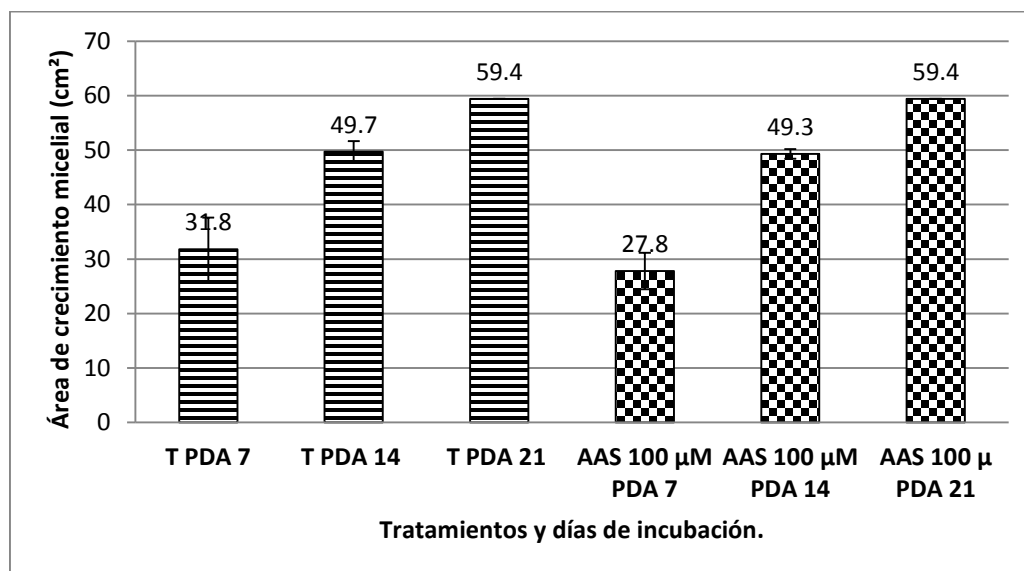
T PDA 14 = Testigo en PDA día 14

T PDA 21 = Testigo en PDA día 21

AAS 100  $\mu\text{M}$  PDA 7 = Ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  en PDA día 7

AAS 100  $\mu\text{M}$  PDA 14 = Ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  en PDA día 14

AAS 100  $\mu\text{M}$  PDA 21 = Ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  en PDA día 21

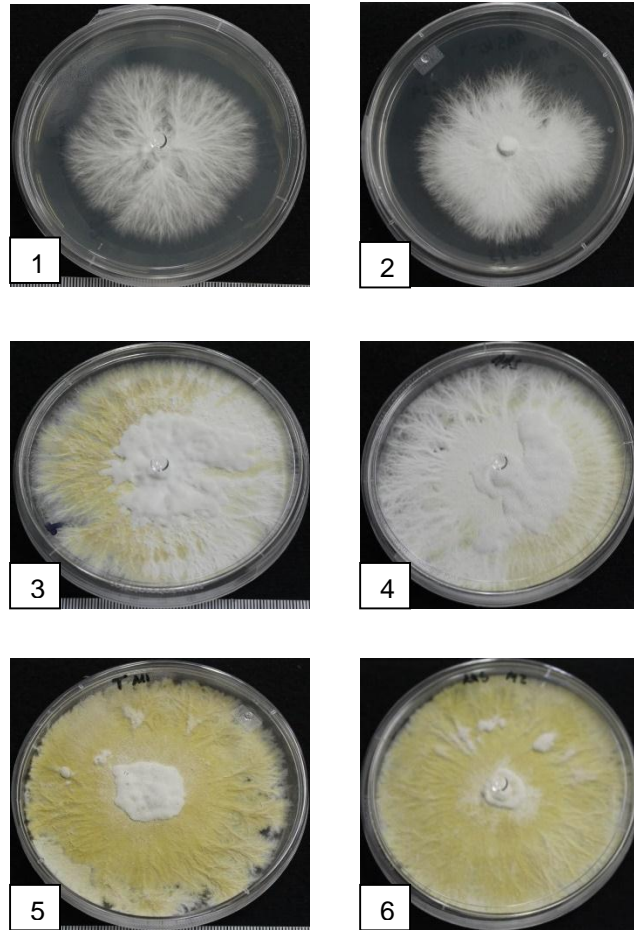


Días de incubación			
Tratamientos	7	14	21
Testigo PDA	31.8 $\pm$ 5.8 <b>a</b>	49.7 $\pm$ 1.9 <b>a</b>	59.4 $\pm$ 0 <b>a</b>
PDA + AAS 100 $\mu\text{M}$	27.8 $\pm$ 3.4 <b>a</b>	49.3 $\pm$ 0.9 <b>a</b>	59.4 $\pm$ 0 <b>a</b>

**Figura 12.** Efecto del AAS 100  $\mu\text{M}$  en el crecimiento del área micelial de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en medio PDA, con mediciones del día 7 al día 21 de incubación. Se realizó el ANOVA con  $n = 3$ , la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$  (SAS, ver. 9.0).

### *Características de las colonias*

En el testigo y en el tratamiento con el medio PDA, las características fueron similares, por lo que, el AAS 100  $\mu$ M no mostró efecto alguno en las colonias con respecto al testigo. En los primeros 7 días de incubación, la densidad fue regular, con textura fibrosa a ligeramente lanosa, con un color blanquecino. Para el día 14 de incubación, la densidad fue abundante, la textura fibrosa a ligeramente lanosa y color blanco con tonalidades amarillentas. Finalmente en el día 21 de incubación, la densidad fue abundante, con textura fibrosa y color café amarillento con tonalidades blanquecinas (**Figura 13**).

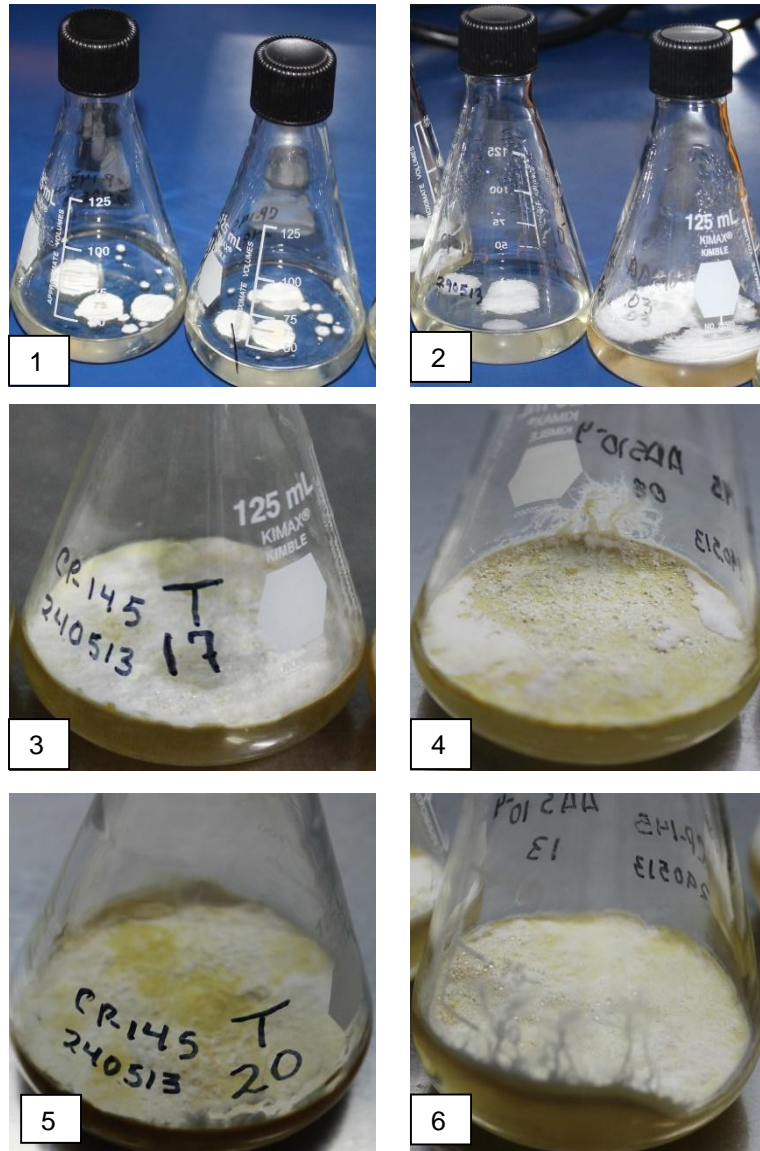


**Figura 13.** Características del micelio de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* desarrollada en PDA y con la adición de AAS 100  $\mu$ M. Día 7 de incubación: 1 (testigo) y 2 (tratamiento): densidad regular, textura fibrosa a ligeramente lanosa, color blanquecino. Día 14 de incubación: 3 (testigo) y 4 (tratamiento): densidad abundante, textura fibrosa a ligeramente lanosa, color blanco con tonalidades amarillentas. Día 21 de incubación: 5 (testigo) y 6 (tratamiento): densidad abundante, textura fibrosa y color café amarillento con tonalidades blanquecinas.



### *Características del micelio en PDB*

En el día 7 de incubación, el micelio del tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  se observó un poco más desarrollado que el micelio del testigo. En el día 14 de incubación, los micelios del testigo y del tratamiento cubrieron totalmente la superficie del medio PDB y ya no se observó diferencia en el crecimiento, además de que presentaron densidad abundante, textura algodonosa y color blanquecino. Para los días 21 y 28, el micelio en el testigo y en el tratamiento se tornó muy denso, compacto, con color blanquecino y manchas café amarillentas. El medio PDB se redujo considerablemente, inclusive al tomar las muestras, se obtenía más o menos 1 mL de sobrenadante; se espesó, tenía consistencia gelatinosa, el color cambió de amarillo claro a café amarillento. En el día 28 de incubación, el micelio del tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  creció sobre las paredes del matraz en mayor cantidad que el micelio del testigo. Probablemente hubo estimulación del AAS 100  $\mu\text{M}$  en el desarrollo micelial de la cepa CP-145 de *G. lucidum* (**Figura 14**).



**Figura 14.** Efecto del AAS 100  $\mu\text{M}$  en el desarrollo micelial de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en PDB. Día 7 de incubación: 1 (testigo) y 2 (tratamiento). Día 21 de incubación: 3 (testigo) y 4 (tratamiento). Día 28 de incubación: 5 (testigo) y 6 (tratamiento).

### *Peso micelial en el medio PDB*

El testigo y el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  con el micelio no homogéneo (MNH), mostraron un incremento en el peso micelial que fue significativamente superior al peso micelial del testigo y el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  con el micelio homogéneo (MH).

En el testigo y en los tratamientos, el peso micelial fue en aumento hasta el día 21 del muestreo, con un ligero descenso en el día 28. El peso del testigo con MNH fue significativamente superior al peso del testigo con MH. El peso del tratamiento con MNH fue estadísticamente superior al peso del tratamiento con MH (**Figura 15**).

A continuación, se presenta la simbología para interpretar las abreviaturas de la **Figura 15**:

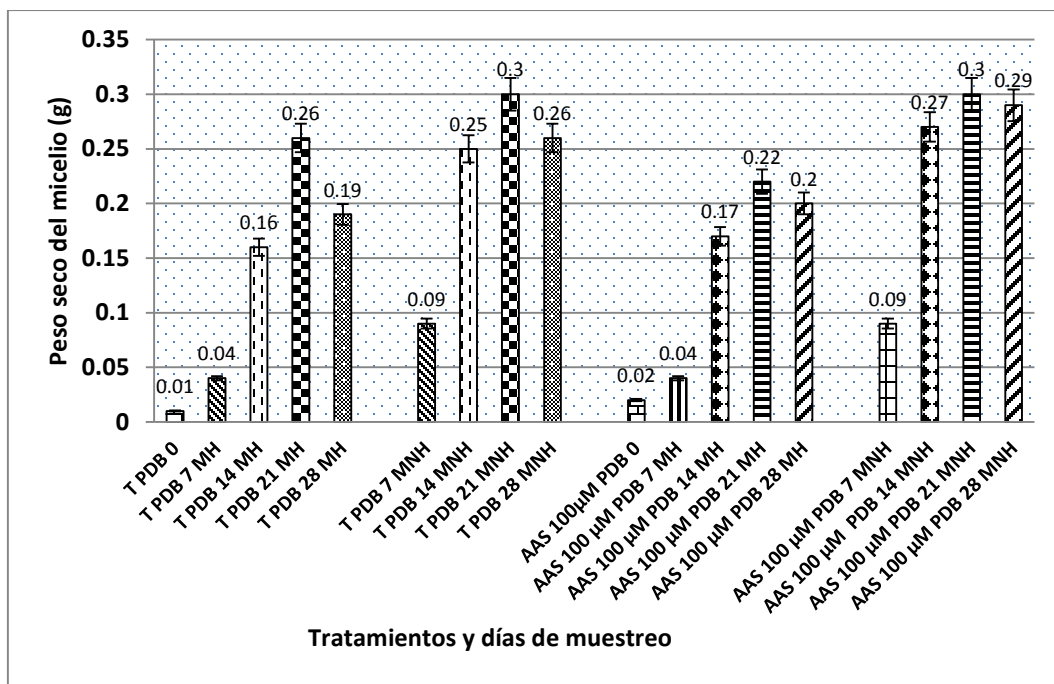
#### SIMBOLOGÍA:

T PDB 7 MH = Testigo en caldo de papa dextrosa agar PDB, con muestreo a los 7 días de incubación y la muestra tomada con micelio homogéneo.

T PDB 7 MNH = Testigo en PDB, con muestreo a los 7 días de incubación y la muestra tomada con el micelio entero, no homogéneo.

ASS100  $\mu\text{M}$  PDB 7 MH= Tratamiento con ácido acetilsalicílico en concentración AAS 100  $\mu\text{M}$ , en PDB, con muestreo a los 7 días de incubación y la muestra tomada con el micelio homogéneo.

AAS100  $\mu\text{M}$  PDB 7 MNH= Tratamiento con ácido acetilsalicílico en concentración AAS 100  $\mu\text{M}$ , en PDB, con muestreo a los 7 días de incubación y la muestra tomada con el micelio entero, no homogéneo.



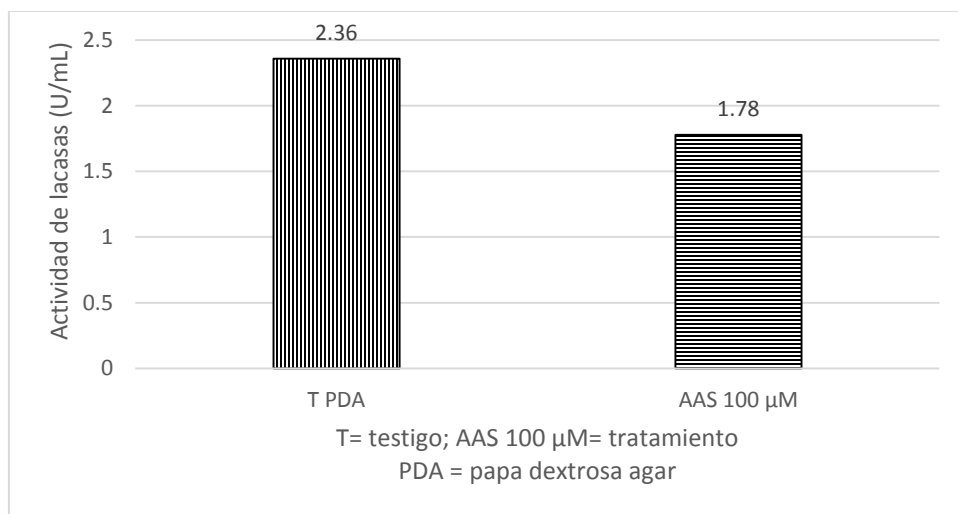
Días de muestreo y de incubación				
Tratamiento	7	14	21	28
T PDB MH	0.04 ± 0.008 <b>a</b>	0.16 ± 0.012 <b>b</b>	0.26 ± 0.17 <b>b</b>	0.19 ± 0 <b>d</b>
T PDB MNH	0.09 ± 0.006 <b>a</b>	0.25 ± 0.031 <b>a</b>	0.3 ± 0.008 <b>a</b>	0.26 ± 0 <b>b</b>
AAS 100 μM PDB MH	0.04 ± 0.02 <b>a</b>	0.17 ± 0.02 <b>b</b>	0.22 ± 0.005 <b>c</b>	0.2 ± 0 <b>c</b>
AAS 100 μM PDB MNH	0.09 ± 0.06 <b>a</b>	0.27 ± 0.02 <b>a</b>	0.3 ± 0.005 <b>a</b>	0.29 ± 0 <b>a</b>

**Figura 15.** Efecto del AAS 100 μM en el peso del micelio seco de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en el medio PDB, durante 28 días de incubación. Se realizó el ANOVA con n = 3, la comparación de medias fue con la prueba de Tukey con α= 0.05 (SAS, ver. 9.0).

### Determinación de lacasas

#### a) En PDA (testigo y tratamiento con AAS 100 $\mu$ M)

En los muestreos de los días 7, 14 y 21 de incubación, no hubo lacasas; fue hasta el día 28 del muestreo cuando en el testigo y en el tratamiento se determinó la presencia de esta enzima. El testigo mostró 2.36 U/mL de actividad volumétrica de la lacasa, valor que es superior al mostrado por el tratamiento que fue de 1.78 U/mL; sin embargo, no fue posible determinar su diferencia estadística, debido a que de tres lecturas, solo una fue positiva. Por lo que, se puede inferir que la enzima lacasa es producida en mínimas cantidades por el micelio de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en el medio de cultivo con varios días de incubación. Tal vez influya que el micelio en su desarrollo consume y agota los nutrimentos del medio, y esto obliga al micelio a liberar la enzima lacasa. Por los resultados obtenidos se puede determinar que hubo poco efecto positivo del AAS 100  $\mu$ M en la producción de la lacasa (**Figura 16**).

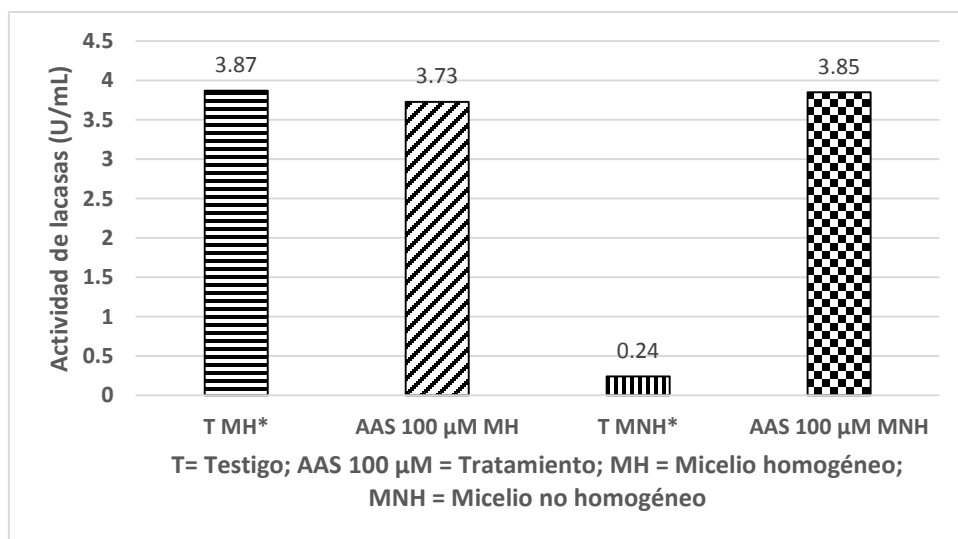


**Figura 16.** Determinación de la enzima lacasa en el testigo (PDA) y en el tratamiento PDA con adición de AAS 100  $\mu$ M, en el micelio de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* a los 28 días de incubación.

b) En PDB (testigo y tratamiento con AAS 100  $\mu$ M)

Durante los días 7, 14 y 21 de incubación y del muestreo, hubo variabilidad en los valores de las lacasas. Sin embargo, para el día 28 del muestreo, los valores fueron estables y consistentes en todos los tratamientos (**Figura 17**).

Los valores de la actividad volumétrica de las lacasas, fueron similares en el testigo con el micelio homogéneo (T MH), en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con el micelio homogéneo (AAS 100  $\mu$ M MH) y en el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con el micelio no homogéneo (AAS 100  $\mu$ M MNH), con 3.87, 3.73 y 3.85 U/mL, respectivamente. El valor más bajo se presentó en el testigo con el micelio no homogéneo (T MNH) con 0.24 U/mL de actividad volumétrica de lacasas.



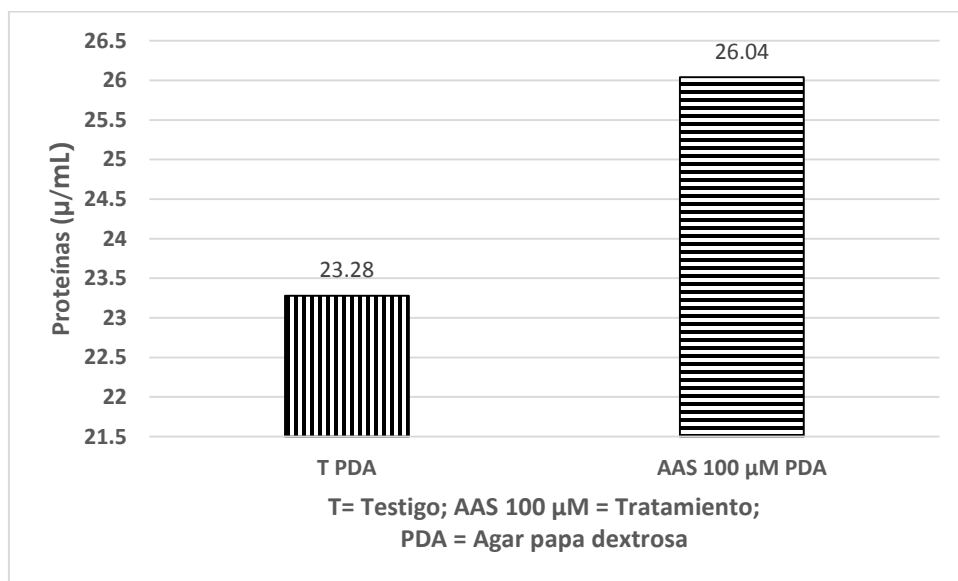
\*Datos de 1 -2 réplicas

**Figura 17.** Efecto del AAS 100  $\mu$ M en la producción de lacasas de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* empleando micelio homogéneo y no homogéneo (n = 3), cultivado en medio líquido PDB sin agitación a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio (25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C; en obscuridad).

### Determinación de proteínas

a) En PDA (testigo y tratamiento con AAS 100  $\mu$ M)

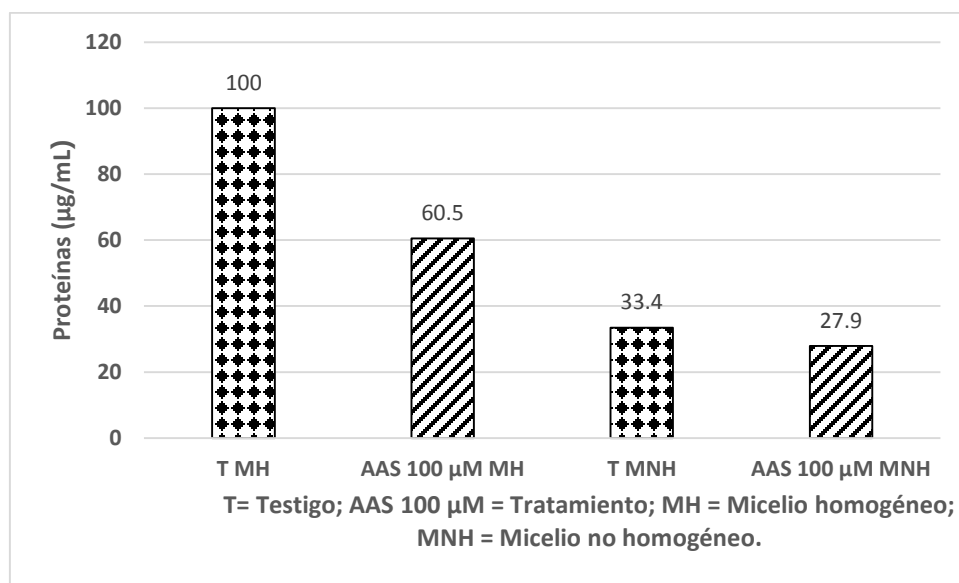
Los valores más altos de las proteínas se presentaron al día 28 del muestreo en el testigo y en el tratamiento. El tratamiento con AAS 100  $\mu$ M presentó 26.04  $\mu$ g/mL de proteínas que superó en 10.6% al valor del testigo, el cual fue de 23.28  $\mu$ g/mL; sin embargo, estadísticamente no hay diferencia significativa entre ellos. Con base a lo anterior, no hay un efecto positivo del tratamiento con AAS 100  $\mu$ M en la producción de proteínas en el medio PDA (**Figura 18**).



**Figura 18.** Efecto del AAS 100  $\mu$ M en la producción de proteínas de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* cultivada en el medio PDA a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$   $^{\circ}$ C; en obscuridad).

b) En PDB (testigo y tratamiento con AAS 100  $\mu$ M)

Los más altos valores de la proteína en el día 28 de incubación, correspondieron al testigo con el micelio homogéneo (MH) con 100  $\mu$ g/mL, seguido por el tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con 60.5  $\mu$ g/mL. Los valores obtenidos en el testigo con el micelio no homogéneo (MNH) y los valores del tratamiento con AAS 100  $\mu$ M con el micelio no homogéneo (MNH), fueron bajos, ya que presentaron 33.4  $\mu$ g/mL y 27.9  $\mu$ g/mL de proteínas, respectivamente (**Figura 19**).



**Figura 19.** Efecto del AAS 100  $\mu$ M en la producción de proteínas de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* empleando micelio homogéneo y no homogéneo (n = 3), cultivado en el medio PDB sin agitación a los 28 días de desarrollo en condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$   $^{\circ}$ C; en oscuridad).



### **12.1.5. Discusión**

De manera general, en el medio PDA con la adición del AAS 100  $\mu\text{M}$ , no hubo efecto positivo en la producción de lacasas y proteínas. Por lo cual, el medio PDA al parecer no es adecuado para que el hongo *G. lucidum* produzca lacasas y proteínas. Por otra parte, las lecturas de las lacasas y proteínas no fueron lo suficientemente consistentes en los primeros días del desarrollo micelial. Lo fueron hasta el día 28 de incubación. Esto fue mucho después de que el micelio ya había cubierto la superficie del medio de cultivo.

En el medio PDB sin agitación, el medio líquido se agotó de manera rápida y el micelio se compactó. También las lacasas se presentaron en los últimos días del muestreo. Es probable que el micelio al permanecer estático no produzca lacasas.

En cuanto a la determinación de las proteínas, éstas se encuentran mayormente en el micelio y al haber una homogeneización, son liberadas totalmente y con ello, hay un aumento considerable en su detección.

En el MNH la determinación de las proteínas se realizó en el sobrenadante sin haber homogeneización y por lo tanto, la mayoría de las proteínas permanecieron dentro del micelio, por lo cual, no fue posible determinar su totalidad y por ello, los valores son menores que aquellos del micelio homogeneizado (MH).

En esta experimentación, el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  con micelio homogéneo (MH) y con micelio no homogéneo (MNH), no mostró un efecto positivo al compararse con el testigo, ya sea con el micelio homogéneo (MH) o con el micelio no homogéneo (MNH).

A pesar de lo anterior, los valores del presente estudio superaron a aquellos obtenidos por Spezzia (2012) quien registró 1 U/mL de actividad volumétrica de lacasas en el cultivo de la cepa CP-205 de *G. lucidum* en el medio líquido

EMB adicionado con  $\text{CuSO}_4$  0.1 mM, entre los 8 y 9 días de incubación, con el medio en agitación.