



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**MADERA DE VID COMO SUSTRATO POTENCIAL
PARA EL CULTIVO SÓLIDO DE *Ganoderma* spp.**

Por:

Rosa Idaly Morales Estrada

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Son.

Diciembre 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rosa Idaly Morales Estrada, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Martín C. Esqueda Valle
Director de Tesis



Dr. Rigoberto Gaitán Hernández
Asesor



Dr. Agustín Rascón Chu
Asesor



M. en C. Aldo Hiram Gutierrez Saldaña
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A los ciudadanos mexicanos que por medio de CONACYT apoyaron la realización del presente trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por la oportunidad de realizar los estudios de maestría.

Al Dr. Martin Esqueda por la oportunidad de entrar a su equipo de trabajo y por todo el apoyo recibido durante el proceso de mis estudios de maestría. Gracias por ser un ejemplo de trabajo y de perseverancia!!

Al Dr. Rigoberto Gaitán por estar presente en cada una de las etapas del presente trabajo, con acertados comentarios y correcciones, además por la hospitalidad brindada durante mi estancia en INECOL. Gracias por compartir sus conocimientos sobre el bello mundo del cultivo de hongos.

A la Biol. Georgina Vargas por toda su ayuda, tanto en el cultivo como en las determinaciones químicas. Así como el apoyo brindado durante el transcurso de la estancia. Por toda tu amabilidad, compañía, risas y el invaluable cariño brindado. Gracias Geo.

Al M. en C. Aldo Gutierrez Saldaña por su gran ayuda en la realización de este trabajo, desde la planeación del cultivo, el montaje del mismo, hasta esos pequeños detalles que hacen una enorme diferencia en nuestro día y en el trabajo. Muchisimas Gracias.

Al M. en C. Alberto Jiménez por su constante apoyo durante el desarrollo de este trabajo, por todos sus consejos y por su ayuda brindada en cada etapa del cultivo. Mil Gracias.

A todos mis compañeros de laboratorio Geo, Aldo, Beto, Eduardo, Damián, Rosita, Carolina, Conchita y Gaby, así como a Toño, Alfonso, Alberto, Javier, por todos los consejos brindados para el mejoramiento y desarrollo de este trabajo, por los gratos momentos de convivencia, mil gracias!!! Ustedes fueron parte fundamental de esta bella experiencia.

Al Dr. Agustín Rascón Chu, por sus consejos y ayuda brindada durante el desarrollo del presente trabajo.

M. en C. Antonio Orozco por toda la ayuda proporcionada durante el desarrollo del experimento, ayuda que fue fundamental para el término del presente trabajo. Gracias Toño.

Al. M. en C. Alfonso Sánchez por sus consejos y material proporcionado.

Al. Biól Carlos Ortega por todo el apoyo técnico, durante mi estancia en INECOL. Así mismo agradezco toda su ayuda a Gilberto, Betty, Mony y Anahí por su amabilidad, trato. Gracias chicos hicieron de mi estancia una experiencia muy enriquecedora.

Al laboratorio de Análisis de alimentos, específicamente al M. en C. Luis Enrique González Siqueiros y Amparo Nieblas, por su ayuda técnica y hospitalidad durante la determinación proximal.

A la Q.B. María del Carmen Granados Nevarez y al M. en C. Nicolás Alberto Rodríguez Martínez, por todo el apoyo técnico, los materiales proporcionados, pero sobre todo por la confianza depositada y trato amable.

A la Dra. María Islas Osuna, a la Dra. Carmen Contreras, por las facilidades proporcionadas para la realización de esta tesis, Gracias por su paciencia y consejos.

A la M. en C. Armida Rodríguez y a la M. en C. Judith Fortiz por su paciencia y ayuda en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Ayala por sus valiosos consejos y equipo proporcionado, para la realización de la tesis.

Al laboratorio de antioxidantes y alimentos funcionales, especialmente a Mónica Villegas, Elena, Alejandra, Maribel, Ramón y Gustavo, por su gran ayuda en las determinaciones fenólicas, pero sobre todo por la amabilidad con que siempre lo hicieron.

Al Dr. Luis Robles, Luz del Carmen Montoya, Anahí Cosai Montiel así como a Yesica Núñez Martínez del laboratorio de Ingeniería de alimentos planta piloto. Por su ayuda técnica y por su trato amable.

Al M. en C. Jorge Mercado por su apoyo técnico y amabilidad

A Francisco Soto por su apoyo técnico.

A Blanca Olivia Briceño Torres por las facilidades otorgadas y su amabilidad.

Muy especialmente al Dr. Marcos Lizarraga y a la Dra. Helvia Pelayo porque todas sus enseñanzas me han acompañado a lo largo de este trabajo.

Al. Dr. Guillermo Bojórquez por todos sus valiosos consejos de laboratorio que fueron de gran ayuda en este trabajo.

Muy especialmente a mis amigos y compañeros de generación, Daniela Téllez, Armida Orrantía, Lucía Angulo, Gaby Carranza, Elena Moreno, José María Anaya, Eliezer Sánchez, Aarón Santiaguín, Eduardo Trillo. Gracias chicos, por todos los agradables momentos de convivencia y por su ayuda. Sin ustedes esta aventura no hubiera sido la misma.

Con todo mi cariño a mi amigos Bertha, Maribel, Mayra, Elia, Carlos M.

DEDICATORIA

A mi madre Rosy Estrada por ser una mujer excepcional a quien le debo todo lo que soy, por su gran ejemplo de amor y trabajo que impulsan cada uno de mis pasos

A mi padre que aunque no me vio terminar esta meta, sus consejos estuvieron y estarán presentes cada día

A mis queridos hermanos Omer e Ivan Morales por ser los hombres valientes que son

A mis amados sobrinos, quienes han llenado de amor mi vida y siempre serán mi inspiración

A la familia Estrada por todo el apoyo y amor que he recibido a lo largo de mi vida

A la familia Jiménez por todo el cariño y apoyo que me han brindado desde un inicio

Al amor y compañero de mi vida, Alberto Jiménez por toda su ayuda, apoyo, paciencia pero sobre todo por su amor. Gracias por todo.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Ganoderma</i> : Taxonomía, Distribución e Importancia Ecológica	3
II.2 <i>Ganoderma</i> , Un Género De Interés Comercial y Farmacológico.....	5
II.3 Generalidades y Requerimientos para el Cultivo Sólido de <i>Ganoderma</i> ...	7
II.4 Residuos Agroindustriales como Fuente de Carbono para el Cultivo Sólido de <i>Ganoderma</i> spp.	10
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
IV.1 General.....	15
IV.2 Particulares	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	16
V.1 Cepas	16
V.2 Preparación de Inóculo.....	16
V.3 Preparación del Sustrato	17
V.4 Inoculación del Sustrato	17
V.5 Etapa de Fructificación	18
V.6 Cosecha de Carpóforos.....	18

V.7 Análisis de la Composición Química del Sustrato	18
V.8 Análisis de la Composición de los Cuerpos Fructíferos.....	19
V.9 Diseño Experimental	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
VI.1 Periodo de Colonización.....	20
VI.2 Aparición de Primordios y Desarrollo de Carpóforos.....	21
VI.3 Eficiencia Biológica.....	22
VI.4 Composición Proximal de los Carpóforos.....	28
VI.5 Análisis Proximal de Sustratos	32
VI.5.1 Proteína	32
VI.5.2 Minerales	34
VI.5.3 Humedad.....	36
VI.5.4 Extracto etéreo	38
VI.5.6 Azúcares	46
VI.5.7 Fenoles totales	47
VI.5.8 Relación carbono nitrógeno.....	50
VII. CONCLUSIONES.....	52
VIII. REFERENCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cultivo en etapa de fructificación	22
2	Carpóforos de <i>G. oerstedii</i> desarrollados en diferentes sustratos	23
3	Carpóforos de <i>G. subincrustatum</i> desarrollados en diferentes sustratos	24
4	Carpóforos de <i>G. lucidum</i> desarrollados en diferentes sustratos	25

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Productividad de tres cepas de <i>Ganoderma</i> en madera de vid, encino y dos mezclas de estas maderas.	27
2 Composición proximal de los carpóforos de tres cepas de <i>Ganoderma</i> obtenidos en madera de vid, encino y dos mezclas de estas.	30
3 Contenido de azúcares y fenoles totales de los carpóforos de tres cepas de <i>Ganoderma</i> obtenidos en madera de vid, encino y dos mezclas de estas maderas.	31
4 Porcentaje de proteína (%N*4.38) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	33
5 Contenido de minerales (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	35
6 Contenido de humedad (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	37
7 Contenido de grasa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	39
8 Contenido de hemicelulosa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	41
9 Contenido de celulosa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	43
10 Contenido de lignina (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	45
11 Contenido de azúcares totales (mg/g) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	47

LISTA DE CUADROS (Continuación)

12	Contenido de fenoles totales (mgEAG/g) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha	49
13	Relación C:N en madera de vid, madera de encino y mezclas antes y después de la inoculación con tres cepas de <i>Ganoderma</i> .	51

RESUMEN

Debido a la demanda de sustratos que reduzcan los tiempos de producción de carpóforos de especies de *Ganoderma*, en el presente trabajo se evaluó a la madera de vid. Se utilizaron dos cepas nativas: *Ganoderma oerstedii*, *G. subincrustatum* y como testigo una cepa comercial de *Ganoderma lucidum*. Se cultivaron en madera de vid 100% (V), encino 100% (E), dos mezclas VE-70/30% y VE-30/70%. Se obtuvo un tiempo corto de colonización (15 d) en V-100% y la aparición de primordios a los 21-22 d en los cuatro sustratos. El porcentaje más altos de eficiencia biológica se observó en la cepa de *G. oerstedii* (34.1%) en V-100%, así mismo en tasa de producción y rendimiento encontrándose diferencias con los demás sustratos ($p < 0.05$). La composición proximal de los carpóforos y sustratos así como la cuantificación de fenoles totales fue analizada. En los carpóforos de las cepas nativas, los porcentajes de proteína, grasa y humedad fueron más altos en V-100%, mientras que en la cepa testigo se incrementaron en la mezcla VE-30/70%. Los porcentajes más altos de minerales se registraron en VE-70/30%. Las concentraciones de azúcares oscilaron de 241 a 838 mg/g y en fenoles totales de 6.36 a 11.49 mg EAG/g, siendo variable según cepa y sustrato. En cuanto a los sustratos, se observó un mayor porcentaje de grasa, proteína y hemicelulosa en V-100%, mientras que en E-100% hubo mayor contenido de celulosa y lignina. Los resultados muestran que los residuos de madera de vid pueden ser aprovechados para el cultivo de especies de *Ganoderma*, con un desarrollo variable de los carpóforos según la cepa.

Palabras clave: Fermentación sólida, hongos medicinales, reishi

ABSTRACT

Because the demand for substrates that reduce production times of fruiting bodies of *Ganoderma* species, in this study was evaluated vineyard pruning. Two native strains *Ganoderma oerstedii*, *G. subincrustatum* and a commercial strain of *Ganoderma lucidum* as a control were used. Vineyard pruning 100% (V), oak sawdust 100% (O), and two mixtures VO-70-30% and VO-30-70% were used as substrates. It was obtained a short time of colonization at 15 d in the V-100% substrate, the appearance of primordia at 21-22 d in the four substrates. The highest percentage of biological efficiency was obtained in the strain of *G. oerstedii* (34.1%) in V-100%, also in production rate and yield differences were found with the other substrates ($p < 0.05$). The components of fruiting bodies and substrates as well as quantification of total phenols were analyzed. Native strains in the percentages of protein, fat and moisture fruiting bodies were higher in V-100%, whereas the control strain grew on the mixture VO-30:70%. The highest percentages of minerals in the three strains were observed in VO-70:30%. The sugar concentrations ranged from 241-838 mg/g, of total phenols was 6.36 to 11.49 mg GAE/g, being variable according to strain and substrate. In Substrates a higher percentage of fat, protein and hemicellulose was observed at V-100%, while in O-100% was higher content of cellulose and lignin. The results show that the vineyard pruning waste can be utilized for the cultivation of *Ganoderma* species, with varying development of fruiting bodies depending on the strain.

Keywords: Solid Fermentation, medicinal mushrooms, reishi, recycling

I. INTRODUCCIÓN

El género *Ganoderma* (P. Karst) comprende más de 300 especies, las cuales se distribuyen ampliamente alrededor del mundo (Bhosle *et al.* 2010). En las últimas décadas algunas de estas especies se han investigado, debido a los compuestos bioactivos descubiertos en ellas. Estas especies han tenido gran atención por sus propiedades medicinales y se han consumido desde hace miles de años en algunas culturas asiáticas como la china, japonesa y coreana (Hsieh y Yang, 2004).

Se han utilizado para prevenir y curar un gran número de enfermedades entre las que destacan hepatitis, diabetes, hipertensión, bronquitis y varios tipos de cáncer como el de colon y pulmón (Zhou *et al.*, 2007). Por ello, existe una variedad de investigaciones con distinto enfoque alrededor del mundo. Por ejemplo como nutracéuticos (Sliva *et al.*, 2003), fitopatógenos (Karthikeyan *et al.*, 2009), pero sobre todo por sus bioactivos con potencial farmacológico (Paterson, 2006).

El consumo de suplementos hechos a base de hongos de *Ganoderma*, se incrementa anualmente a nivel mundial, tan solo el mercado de *G. lucidum* en 2003, era de 2.5 billones de dólares. La industria del cultivo de estos hongos va en aumento tanto en Asia como en otras partes del mundo (Wang *et al.* 2012). De esta misma forma aumentan las estrategias para el cultivo de estas especies, siendo la búsqueda de sustratos viables, uno de los puntos de mayor interés (Stamets, 1993; Soto-Velazco *et al.* 2002). El cultivo sólido presenta ventajas económicas entre ellas, la factibilidad de utilizar residuos agroindustriales, los cuales son abundantes y de bajo costo; además de ser una fuente de carbono ideal para especies lignícolas como *Ganoderma*.

A nivel mundial se generan anualmente millones de toneladas de residuos agroindustriales, los cuales no son aprovechados y por el contrario, una gran cantidad son incinerados y llevados a vertederos donde causan contaminación ambiental (Hsieh y Yang, 2004).

Dentro de los residuos más abundantes en Sonora, se encuentra la madera de vid, al ser el principal estado productor de uva en el país (Vázquez, 2010). Anualmente se generan toneladas de residuos producto de la poda de la uva, una porción de esta madera se incorpora al suelo; sin embargo, la mayor parte es incinerada.

En la última década, estos residuos se han utilizado para el cultivo del hongo medicinal y comestible *Lentinula edodes*, obteniendo eficiencias biológicas y rendimientos altos en comparación con la paja de trigo, sustrato comúnmente utilizado en el cultivo sólido de hongos (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006). Así mismo, Sánchez *et al.* (2008) obtuvieron una eficiencia biológica más alta, al cultivar *Pleurotus ostreatus* en madera de vid vs. orujo de uva.

Las características de la composición química de la madera de vid como el alto contenido de azúcares y el contenido de compuestos susceptibles a la rápida oxidación entre otros, favorece el desarrollo de carpóforos. Por lo que este residuo puede considerarse como un sustrato con alto potencial para el cultivo de especies de *Ganoderma*, siendo alternativo para su cultivo sólido.

II. ANTECEDENTES

II.1 Ganoderma: Taxonomía, Distribución e Importancia Ecológica

En la actualidad *Ganoderma* se considera un género ampliamente distribuido con más de 300 especies (Bhosle *et al.*, 2010). Pertenece a la familia Ganodermataceae del orden Polyporales. Generalmente desarrollan el cuerpo fructífero sobre troncos, pueden ser anuales o perianuales en forma de repisa, pileados, sésiles y estipitados al centro o lateralmente; la superficie del píleo puede ser lisa, opaca o brillante.

Estos hongos poseen una cutícula característica de color marrón claro a púrpura oscuro, presentan poros pequeños a medianos, con tubos por lo general estratificados, ocráceos, en ocasiones blanquecinos y el contexto varía de blanco a marrón (Wang *et al.*, 2012). De manera específica estas son las características morfológicas de importancia taxonómica del género: Color del contexto, forma del margen y presencia/ausencia de laca en el píleo, con/sin estípite (Pérez *et al.*, 2005). Dentro de los caracteres microscópicos se encuentra el color, textura, tamaño y forma de las basidiosporas, presencia o ausencia de clamidosporas en cultivos *in vitro*, entre otros (Seo y Kirk, 2000).

Ganoderma se dividió en dos subgéneros: *Ganoderma*, basidiomas lacados con una capa cerosa y brillante en la superficie del cuerpo fructífero y el subgénero *Elfvigia*, que incluye a las especies no lacadas (Steyaert, 1980). A pesar de los esfuerzos de los científicos por poner orden en este género, el concepto de especie es aun universalmente impreciso (Gottlieb,

2000). Diversos experimentos han demostrado que la morfología y la cantidad de metabolitos presentes en los basidiomas, difieren según las condiciones de crecimiento como la zona de cultivo, temperatura, humedad relativa, luminosidad, disponibilidad y cantidad de nutrientes del sustrato. Lo que indica que existe un gran número de sinónimos, debido a la cantidad de especies identificadas, solo con base en sus características morfológicas (Stamets, 1993).

En años recientes, los estudios se apoyan en herramientas moleculares como una alternativa para la identificación de las especies de *Ganoderma* (Trigos y Medellín, 2011). Entre las técnicas utilizadas se encuentra la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR), en especial las relacionadas con el análisis de la región espaciadora interna transcrita (ITS), incluyendo fragmentos polimórficos de restricción (RFLP's) (Karthikeyan *et al.*, 2009). Adicionalmente se han realizado otras estrategias de identificación en este género, entre las que destacan la electroforesis con isoenzimas; la quimiotaxonomía basada en el análisis del patrón de producción de metabolitos secundarios mediante HPLC y ensayos inmunológicos tipo ELISA (Hong y Jung, 2004; Smith y Sivasithamparam, 2000). Gracias a estas herramientas se ha demostrado que *Ganoderma* es monofilético, incluyendo las especies de ambos subgéneros (Smith y Sivasithamparam, 2000), las cuales son cosmopolitas.

En su mayoría las especies de *Ganoderma* pueden encontrarse creciendo bajo condiciones elevadas de calor y humedad, principalmente en regiones tropicales y templadas, incluyendo Norteamérica, Sudamérica, África y Europa, además *Ganoderma lucidum* se desarrolla de los 1000 a 2000 msnm y se ha demostrado que la forma del basidiocarpo es afectada por las condiciones ambientales, observándose cambios en el color y la forma de las esporas, por la latitud y altitud (Stamets, 1993).

Son hongos saprobios o parásitos facultativos de diversas plantas, incluyendo cultivos perennes como palmas aceiteras, café y árboles de madera dura, en donde causan pudrición blanca al degradar principalmente celulosa y lignina, para lo cual producen enzimas lignolíticas como

peroxidasas y lacasas (Goh *et al.*, 2014). Es común que *G. lucidum* crezca en troncos de *Quercus* spp., mientras que *G. oregonense* y *G. tsugae*, en coníferas (Staments, 1993).

II.2 Ganoderma, Un Género De Interés Comercial y Farmacológico

Distintas especies de *Ganoderma* como *G. tsugae*, *G. applanatum*, *G. colossum*, *G. concinna*, *G. pfeifferi*, *G. neo-japonicum* y *G. oerstedii* entre otras, han sido sujetas a investigación, principalmente por sus bioactivos (Mendoza *et al.*, 2011). Estos micoquímicos tienen un marcado potencial farmacológico, los cuales están siendo ampliamente investigados alrededor del mundo, en especial los encontrados en *G. lucidum*. Este hongo se ha utilizado por más de 2000 años dentro de la cultura medicinal de países asiáticos como China, Japón y Corea (Ping *et al.*, 2009).

A *G. lucidum* se le ha conocido como " el hongo de la inmortalidad ", ya que se ha utilizado para tratar diferentes tipos de enfermedades como diabetes, hepatitis, hipertensión, gastritis, problemas cardiovasculares, asma, distintos tipos de cáncer. Esta versatilidad se debe al gran número de compuestos bioactivos aislados de estos hongos, la mayoría de los metabolitos biológicamente activos se dividen en dos grupos principales, los derivados de lanosterol y polisacáridos (Trigos y Medellín, 2011).

Los basidiocarpos, el micelio y las esporas de *G. lucidum* contienen aproximadamente 400 diferentes compuestos bioactivos, que incluyen principalmente triterpenoides, polisacáridos, esteroides, esteroides, ácidos grasos y proteínas (Sanodiya, 2009). Por esta razón, todas las partes del hongo son investigadas con propósitos farmacéuticos, ya sea en extractos líquidos o concentrado, o también pulverizados (Smith *et al.*, 2002). Entre los triterpenos de interés se encuentran los Ganoderan A, B y C, los cuales se han aislado de los cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, demostrando un efecto hipoglucémico en ratas (Chang y Miles, 2004).

Los glucanos más activos son los β (1,3) D-glucanos, referidos en ocasiones como (1,3) (1,6), por poseer ramificaciones en el carbono sexto de la cadena principal, todas comparten como estructura común, una cadena de unidades de glucosas (Zhang *et al.*, 2002). En las últimas décadas las investigaciones se han centrado en el potencial terapéutico de las especies de *Ganoderma*, principalmente en la actividad anticancerígena, realizándose estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Lin *et al.*, 2004).

Algunas de las investigaciones relacionadas con el efecto de *Ganoderma* spp. en cáncer demuestran la inhibición de la angiogénesis, proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral. Además se demostró la inhibición del crecimiento de cáncer en vejiga (Trigos y Medellín, 2011).

Respecto a la actividad antioxidante de estas especies Hoang-Minh *et al.* (2010) reportan el barrido de radicales libres, antioxidante y de protección contra rayos UV de extractos de *G. pfeifferi*. Así mismo Heleno *et al.* (2012) reportan un alta actividad antioxidante de extractos fenólicos y de polisacáridos obtenidos de cuerpos fructíferos, esporas y micelio de *G. lucidum*. Si tomamos en cuenta que los compuestos antioxidante tienen una gran cantidad de usos en la industria como conservadores de alimentos o en la industria cosmética, lo que nos indica que estos hongos tienen un papel prometedor, al ser fuente de diversos antioxidantes naturales (Finley *et al.*, 2011).

La actividad antioxidante que muestra los extractos de *Ganoderma* está relacionada con su contenido de polisacáridos, así como su contenido total de fenoles. Kosarski *et al.* (2012) reportaron en *G. applanatum* y *G. lucidum* un total de 35 % y 83% de glucanos de los extractos de polisacáridos respectivamente. A diferencia de la mayoría de los productos farmacéuticos, los compuestos biológicamente activos extraídos de hongos medicinales tienen una toxicidad baja, aún en dosis altas, pudiendo de esta forma mejorar la calidad de la salud humana (Chang y Buswell, 1996).

Además de los efectos mencionados atribuidos a *Ganoderma* spp. existen otros como inmunomodulación, antiaterosclerótico, antiinflamatorio,

analgésico, quimiopreventivo, antibacteriano, antiviral (incluyendo anti-VIH), hipolipidémico, antifibrótico, hepatoprotector, antidiabéticos, antiandrogénico, antiangiogénico (Trigos y Medellín, 2011).

Actualmente se comercializan diferentes preparaciones a base de micelio, esporas y basidiomas completos de *Ganoderma* spp, incrementándose anualmente el mercado de suplementos dietarios de *G. lucidum*. Este se estima en alrededor de 5 a 6 billones de dólares anuales, de los cuales 1.6 billones corresponden tan solo al consumo en Estados Unidos (Wang, 2012).

Aunque estos hongos se encuentran en la naturaleza, la cantidad no es suficiente para cubrir la creciente demanda del mercado, lo que lleva a una constante optimización de los cultivos sólidos, para la rápida obtención de los carpóforos, ya que el cultivo sólido es el tipo de cultivo que permite su obtención y así poder ser utilizados tanto en investigaciones relacionadas con bioactivos como para su comercialización.

II.3 Generalidades y Requerimientos para el Cultivo Sólido de *Ganoderma*

En 1970 se logró por primera vez la producción en masa de los carpóforos de *G. lucidum* y desde ese momento los procesos se han desarrollado rápidamente. Los cultivos sólidos fueron ampliamente adoptados por los cultivadores para su producción comercial, los cual se llevan a cabo en madera leñosa o tocones de árboles, así como en mezclas de aserrín enriquecido con fuentes de carbono y nitrógeno (Stamets, 1993).

Las especies de *Ganoderma* se han cultivado tradicionalmente en medios sólidos, con el fin de obtener los cuerpos fructíferos, los cuales son de importancia económica, ya que se comercializan las esporas y los basidiomas. Por esta razón el cultivo sólido se sigue desarrollando, aunque en la actualidad existan otras técnicas como el cultivo líquido. El interés en los basidiomas radica en los bioactivos encontrados tanto en carpóforos completos como en esporas, donde existe cantidad importante de sustancias

bioactivas, que muestran una actividad antitumoral y antienvjecimiento significativa (Jungjing *et al.*, 2007).

Aunque en México, el consumo de hongos comestibles y medicinales data de la época prehispánica (Guzmán, 2000), el interés por *Ganoderma* ha crecido considerablemente en los últimos años. Por lo que en diversas instituciones de investigación se han iniciado trabajos para el aislamiento y caracterización de cepas nativas de hongos medicinales, con el fin de desarrollar los métodos adecuados para su cultivo (Soto-Velazco *et al.*, 2002).

Los métodos de cultivo sólido involucran convencionalmente cinco etapas: 1) elaboración del inóculo, 2) siembra, 3) formación del primordios, 4) desarrollo del carpóforos y 5) cosecha (Chen y Yu, 1999). El desarrollo de los carpóforos toma algunos meses, dependiendo de los factores ambientales. Lo que se busca en un cultivo es obtener altos rendimientos, que están estrechamente relacionados con las condiciones del cultivo, es decir, el sustrato, temperatura, humedad, pH, luz, CO₂, entre otros.

La temperatura es uno de los factores más importantes para el crecimiento del micelio, aunque *Ganoderma* presenta los requerimientos de temperatura más divergentes. La especie más cultivada de este género es *G. lucidum*, la cual tiene una temperatura óptima de crecimiento de 21-27 °C, teniendo 27 °C como máxima temperatura para desarrollar su micelio. Coincidiendo estos datos con los descritos por Hsieh y Yan (2004), donde se empleó residuo de soya como sustrato y 30 °C como temperatura de incubación y 25 – 33 °C en la etapa de fructificación, obteniendo una velocidad de crecimiento de 6 mm/d. Asimismo Gurung *et.al.* (2012), reportan un desarrollo micelial a 28 -30 °C y de los carpóforos entre 30 -32 °C. Griffin *et al.* (1994), describen a *G. lucidum* como un hongo mesofílico donde su crecimiento de micelio puede desarrollarse en temperaturas por arriba de los 0 °C y debajo de los 50 °C, con un intervalo óptimo de 15-40°C.

Otro de los factores de mayor importancia en el cultivo de especies de *Ganoderma* es la humedad, ya que crecen y desarrollan sus fructificaciones en un ambiente de humedad relativa alta (Stamets, 1993). De igual forma, en

los cultivos se debe proporcionar una humedad alta, para obtener basidiomas bien desarrollados y por lo tanto altos rendimientos, así también a un alto porcentaje de eficiencia biológica (EB), definida ésta como la proporción del peso fresco de los hongos entre el peso seco del sustrato expresado en porcentaje (Gaitán-Hernández *et al.* 2006).

Aunque los intervalos de humedad relativa varían de 60 % a 95%, los mejores rendimientos se obtienen entre 90 % y 95%. Manavalan *et al.* (2012), en la fase inicial de fructificación la humedad relativa fue 90-95%, en el crecimiento de primordios de 70 a 80% y en la fase de formación de carpóforos de 85-95%. La EB obtenida fue de 85 % \pm 15%, por cada 500 g de sustrato, lo que se considera alto comparado con otros autores donde la eficiencia biológica no llega al 50%.

Peksen y Yakupoglu (2009) reportaron una humedad de 85 a 95% para la formación de primordios y de 80-90% durante el desarrollo de los carpóforos con lo que lograron una EB de 31-35%. Erckel (2009) utilizó una humedad de 85 a 90 % para todo el proceso de colonización y desarrollo de carpóforos y logró, una EB de 13 a 20 %.

Otro factor que influye en la EB es el CO₂, el cual pocos autores reportan en sus trabajos, una excepción es Manavalan *et al.* (2012), que reportan un valor de 5% de CO₂ en la etapa de colonización. Sin embargo en la etapa de fructificación fue de 0.04 % a 0.05 %, pudiendo ser un factor crucial en la obtención de EB altas (85%). Stamets (1993) menciona que en general los Polyporales son muy sensibles al CO₂, proponiendo los siguientes porcentajes para las distintas etapas de crecimiento de las especies de *Ganoderma*: 5% en colonización, 2-4 % en la formación de primordios y en el desarrollo de los carpóforos menor al 2 %.

En cuanto a los métodos empleados para el cultivo sólido de *Ganoderma*, inicialmente se utilizaba el método tradicional, el cual consiste en inocular troncos de maderas, donde estos organismos crecen de forma natural. Estos troncos son puestos sobre el suelo o enterrados superficialmente, en un lugar

húmedo y en unos casos cubiertos con malla para reducir la evaporación y la exposición a la luz. Esta técnica permite la formación de basidiomas con aspecto natural, sin embargo está limitada a lugares muy húmedos (Stamets, 1993). Por esta razón el cultivo de interior o protegido ha sido adoptado con gran éxito alrededor del mundo, siendo Japón y China los principales cultivadores (Wang *et al.* 2012). En este tipo de cultivo, todo se realiza al interior, bajo condiciones controladas, para cada uno de las etapas del cultivo (inoculación, colonización y fructificación), como luz, temperatura, humedad y CO₂, así también para evitar la contaminación. Este tipo de cultivo permite el uso de residuos agroindustriales que además de reducir el costo del cultivo, también permite reducir el efecto negativo al medio ambiente que estos provocan (Gurung *et al.*, 2012).

II.4 Residuos Agroindustriales como Fuente de Carbono para el Cultivo Sólido de *Ganoderma* spp.

Anualmente se producen en el mundo 200 billones de toneladas de biomasa producto de la fotosíntesis, la mayor parte de esta materia no es aprovechada ni por los humanos ni por animales domésticos, convirtiéndose en un residuo y automáticamente en un contaminante (Zhang, 2008).

De los residuos provenientes de cultivos, 4 billones pertenecen a cereales, algunos ejemplos son rastrojo de maíz, pastos, tallos de caña, tallos de algodón, mazorcas de maíz, restos de poda de vid, bagazo de coco, residuos de plátano, hojas de maíz, pulpa de café, semilla de algodón, semilla de girasol, cascara de arroz (Fan *et al.*, 2000; Pandey *et al.* 2000). Estos residuos son ricos en lignocelulosa, y son considerandos una materia prima renovable y muy abundante, por lo que existen grandes posibilidades de ser aprovechada en procesos biotecnológicos (Webb *et al.*, 2004).

La lignocelulosa se compone de lignina, hemicelulosa y celulosa. La celulosa se caracteriza por ser un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando

una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. Como segundo componente esta la hemicelulosa la cual es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Cuervo *et al.*, 2009).

Como tercer componente de la lignocelulosa está la lignina que es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que dan estructura y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Cuervo *et al.*, 2009). Las propiedades químicas de los componentes de la lignocelulosa lo hacen un sustrato de enorme valor en el cultivo de hongos lignícolas.

El cultivo de hongos es un proceso biotecnológico que le da un valor a los residuos agroindustriales ricos en compuestos orgánicos que pueden ser recuperados y transformados, estos son utilizados en fermentaciones sólidas para la producción de distintas especies de hongos comestibles y medicinales. El cultivo de hongos representa una biotecnología económicamente importante alrededor del mundo, es un proceso eficiente donde a partir de material lignocelulósico se producen alimentos con alto contenido proteico y una considerable cantidad de bioactivos (Philippoussis, 2009). Ya sea en cultivos en pequeña o gran escala, es un efectivo y corto proceso de aprovechamiento de estos materiales lignocelulósicos, utilizando la capacidad de degradación de los hongos (Chiu y Moore, 2001).

Ganoderma es un hongo degradador de madera, por lo que la opción de utilizar residuos agroindustriales es conveniente, ya que contienen importantes cantidades de celulosa y lignina las cuales son aprovechadas como fuente de carbono para estas especies. Este tipo de hongos secretan un amplio grupo de enzimas capaces de modificar los carbohidratos y la lignina presente (Martínez *et al.*, 2005). La degradación de la lignina es un punto clave en la descomposición de la lignocelulosa, en este proceso intervienen enzimas hidrolíticas y oxidativas, de manera específica los

hongos de pudrición blanca excretan tres principales enzimas las cuales son: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa. Estas enzimas participan de manera directa o indirectamente en la degradación de la lignina, estas son indispensables para que los organismos realicen una bioconversión eficiente de los residuos (Kersten y Cullen, 2007).

Algunos equipos de investigación han cultivado en este tipo de residuos especies como *G. lucidum*, obteniendo resultados positivos. Como los reportados por Hisieh y Yang (2004), quienes utilizaron bagazo de soya en combinación con *Acacia confusa* Merr., en bolsas de polipropileno; reportaron una colonización y desarrollo de carpóforos en 30-33 días desde su inoculación. Así mismo Manavalan *et al.* (2012), cultivaron esta misma especie en bagazo de caña y obtuvieron fructificaciones a los 30-35 días. Por su parte, Gurung *et al.* (2012) emplearon virutas de *Alnus nepalensis* D. Don, para el cultivo sólido de *G. lucidum*, realizaron combinaciones con polvo de trigo, garbanzo, maíz y arroz, logrando fructificaciones en todas las combinaciones en un periodo de 60 días.

Sin embargo es de gran importancia encontrar residuos que sean accesibles en cada región y que proporcionen ventajas contra los ya utilizados de manera tradicional como la madera de encino. De esta manera contribuir al reciclaje de estos residuos y a su vez obtener carpóforos en menor tiempo y con las características buscadas.

México es un agrícola, por lo que cuenta con una gran producción de residuos, en el 2007, la zona norte del país tuvo una producción de 1,982,873 t. de productos como soya, arroz, frijol, maíz y específicamente en Sonora, destaca el cultivo de frutas y hortalizas donde en 39,000 ha se producen 703,000 t de hortofrutícolas, siendo el cultivo de vid uno de los principales del estado, ya que Sonora es el principal productor de uva del país, con 123,000 t por año (Vázquez, 2010).

La industria del vino genera toneladas de residuos que son altamente contaminantes y costosos de tratar, uno de los principales subproductos de la producción de vino, son los tallos generados durante la poda de vid sin embargo estos residuo son ricos en compuestos orgánicos como azúcares y

celulosa. Además son biodegradables y naturalmente ricos en nutrientes, esto los hace un sustrato ideal para procesos de bioconversión, (Jin y Kelly, 2009).

Fragoso *et al.* (2004) reportaron diferencias en un cultivo de *Lentinula edodes* en donde se utilizó como sustrato madera de vid, encino y manzano, obteniendo los valores más altos de EB en la madera de vid con un 31.97 %.

Así mismo Gaitán-Hernández *et al.* (2006) utilizaron madera de vid, paja de trigo y cebada como sustrato para el cultivo sólido de *L. edodes*, obteniendo altos porcentajes de eficiencia biológica en la madera de vid, hasta un 93.25% y el periodo más corto para la formación de primordios (28 d).

Cabrera (2013) sugiere que la poda de vid es un sustrato favorable para el crecimiento de *L. edodes* debido al elevado contenido de compuestos fenólicos, los cuales pueden ser rápidamente oxidados y de esta forma permiten una colonización rápida del micelio.

Por estas razones la poda de vid puede considerarse como un sustrato potencial para el cultivo de *Ganoderma*, hongo que aún no ha sido cultivado en madera de poda de vid, sin embargo puede ser un residuo conveniente, no solo por las grandes cantidades disponibles en el estado de Sonora, sino también por sus características lignocelulósicas, y así proponer un sustrato alternativo con mayores ventajas que los utilizados hasta el momento.

III. HIPÓTESIS

La composición química de la madera de vid promueve una mayor eficiencia biológica, tasa de producción y rendimiento en cepas de *Ganoderma* spp. en comparación con el encino.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar la capacidad de adaptación de *Ganoderma* spp. en madera de vid con base en la eficiencia biológica, tasa de producción y rendimiento, además de determinar la composición proximal de carpóforos, con el fin de proponer un sustrato alternativo para su cultivo.

IV.2 Particulares

1.-Determinar la eficiencia biológica, rendimiento y tasa de producción de tres cepas de *Ganoderma* spp. cultivadas en madera de vid, encino y combinaciones de ambos sustratos.

2.-Determinar la composición química de la madera de vid, encino y dos combinaciones de ambas maderas, así como la composición proximal de los basidiomas obtenidos de las tres cepas de *Ganoderma* spp.

3.-Determinar los fenoles totales de madera de vid, encino y sus combinaciones, así mismo de los carpóforos obtenidos de diferentes cepas de *Ganoderma*, cultivadas en madera de vid, encino y mezclas de los mismos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Cepas

Se evaluaron dos cepas de *Ganoderma* nativas de Sonora, *G. oerstedii* (Fr.) Murrill y *G. subincrustatum* Murrill y una cepa comercial de *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst (34D) adquirida en Fungi Perfecti, EUA. Estas cepas se encuentran depositadas en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Las cepas se mantuvieron en extracto de malta agar (EMA) (Becton Dickinson) a 26° C.

V.2 Preparación de Inóculo

Se utilizó semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.), los granos se lavaron repetidas veces y se colocó un total de 160 g en frascos de boca ancha de 250 mL. Se prepararon 7 frascos para cada cepa y se agregaron 200 mL de agua destilada para su hidratación por inmersión durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se drenó el exceso de agua. El grano alcanzó una humedad del 65 %. Posteriormente se esterilizaron en autoclave por 1 h a 121°C. Bajo campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, cada frasco se inoculó con 4 implantes de 8 mm diám. de agar con micelio de la cepa de *Ganoderma* correspondiente. Cada implante se cortó con ayuda de un sacabocado del micelio periférico de la placa, se colocó entre el grano y el vidrio en cada lado del frasco, con un total de 7 frascos por cepa. Los frascos inoculados se incubaron durante 8 d en oscuridad a 26°C.

V.3 Preparación del Sustrato

Se utilizó madera de vid (*Vitis vinífera* L.) producto de la poda de 2014 de un lote de variedad ruby seedless, cultivado en La Costa de Hermosillo, Sonora. Así también se utilizó madera de encino (*Quercus* sp.) proporcionada por un aserradero del municipio de Yécora, Sonora. Ambos sustratos se trituraron en molino eléctrico, a un tamaño de partícula de 2 a 3 cm de longitud. Tanto la madera de vid como de encino fueron cernidas para separar y desechar las partículas < 2 cm. Estas dos maderas se emplearon para preparar dos mezclas y así obtener cuatro sustratos para el cultivo. A saber, madera de vid 100% (V), encino 100% (E) y dos mezclas de encino y madera de vid en un porcentaje de VE-30/70% y VE-70/30%. Cada sustrato se hidrató por inmersión durante 24 h; se tomaron muestras para determinar el pH con un potenciómetro, encontrándose en el intervalo óptimo (5.5-6.5). Después de 24 h, se drenó el exceso de agua y se tomaron muestras para determinar el porcentaje de humedad (peso húmedo) de cada sustrato.

Posteriormente se realizó el llenado de bolsas de polipropileno de 18 X 26 cm, donde se colocaron 700 g de sustrato húmedo. Se prepararon 10 réplicas por cepa, con un total de 40 bolsas por cepa. Todas las bolsas se esterilizaron durante 1.5 h a 121 °C. Una vez estériles se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura ambiente (25 °C) y se reservaron para su inoculación.

V.4 Inoculación del Sustrato

La inoculación se realizó bajo campana de flujo laminar. La tasa de inoculación fue de 3% (base húmeda). Una vez inoculadas las bolsas con sustrato, se taparon colocando en la abertura de la bolsa un tapón de algodón para permitir intercambio gaseoso. Todas las bolsas se incubaron en un cuarto de aclimatación en oscuridad a una temperatura de 27 ± 1 °C, para su colonización.

V.5 Etapa de Fructificación

Al término de la incubación, es decir cuando se observó una colonización del sustrato del 100%, las muestras se expusieron a un fotoperiodo de 12 h con lámparas de luz fría, a una temperatura de 27 ± 1 °C, con una humedad relativa de 90-100%. Así mismo se midió la concentración de CO₂, al inicio y durante el cultivo, manteniéndose en un intervalo entre 500 y 1000 ppm. Con una iluminación de 48 a 58 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

V.6 Cosecha de Carpóforos

Los carpóforos de las tres especies fueron cosechados al momento de terminar su maduración. En *Ganoderma* se considera el margen de los carpóforos, una vez que desaparece la coloración blanca del margen, se determina que ha terminado su crecimiento. Posterior a la cosecha, los carpóforos se pesaron y secaron en estufa a 50 °C. Con los datos de peso, se determinó la eficiencia biológica (EB) (peso fresco de los carpóforos/peso seco del sustrato inicial, expresado en porcentaje); tasa de producción (TP) (EB/número de días de producción, partiendo de la inoculación hasta el día de la cosecha); rendimiento (R) (peso fresco de los carpóforos/peso fresco del sustrato inicial, expresado en porcentaje). Para las determinaciones químicas se eligieron carpóforos de tres muestras de cada condición, los cuales se molieron manualmente.

V.7 Análisis de la Composición Química del Sustrato

Para el análisis químico se tomaron muestras en tres etapas: Inicial (previo a la inoculación), Primordio (al inicio de la formación de los primordios) y en la Etapa Final (después de la cosecha de los carpóforos). Las muestras se secaron en estufa a 50°C, se utilizaron tres muestras al azar por cada condición, los cuales se mezclaron y tomaron tres replicas para cada determinación proximal, excepto para proteína donde se utilizaron 2 réplicas.

Se siguieron las metodologías recomendadas por la AOAC (2000); humedad (943.01), minerales totales (942.05), grasa (920.39), proteína por el método de combustión en un equipo Leco FP-528, utilizando el factor de conversión ($N \times 4.38$). Además se determinó Fibra por la técnica de Goering y Van Soest (1970). El valor de la relación C/N se determinó según lo descrito por Sánchez y Royse (2001). Se cuantificó azúcares totales mediante el método fotocolorimétrico de fenol-sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956), utilizando D-glucosa como estándar y para la extracción de polisacáridos se siguió la metodología citada por Shi *et al.* (2013). La cuantificación de fenoles totales se realizó con la técnica de Folin-Ciocalteu (Álvarez-Parrilla *et al.*, 2007), utilizando ácido gálico como estándar y expresándose los resultados en equivalentes de ácido gálico (EAG).

V.8 Análisis de la Composición de los Cuerpos Fructíferos

A los carpóforos se les determinó la composición proximal de acuerdo a la AOAC (2000), azúcares totales y fenoles totales, siguiendo las metodologías antes mencionadas.

V.9 Diseño Experimental

Para este trabajo se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3×4 y se empleó una comparación de medias por Tukey-Kramer ($p < 0.05$) en caso de existir diferencias significativas. Los factores son las 4 combinaciones de sustrato y las 3 cepas de *Ganoderma* spp., mientras que las variables de respuesta fueron los valores de composición química de los sustratos y carpóforos, así como los valores de producción (EB, TP y R). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Periodo de Colonización

Uno de los principales objetivos en la búsqueda de sustratos alternativos para el cultivo de *Ganoderma* spp., es disminuir el tiempo de colonización y fructificación. Las tres cepas colonizaron a los 15 d los sustratos con vid 100%. En encino 100% como en las mezclas, la colonización total se registró entre los 18 y 20 d, mostrándose al final de la incubación un exudado color marrón en el micelio lo que indica su maduración, similar a lo observado en especies como *Lentinula edodes* (Gaitán-Hernández *et al.*, 2014). Estos resultados muestran una reducción en los tiempos de colonización en comparación con lo reportado por otros autores. Gurung *et al.* (2012) evaluaron *Shorea robusta* y *Alnus nepalensis*, con un tiempo de colonización de 46 y 43 d respectivamente. Peksen *et al.* (2010) reportan una colonización de 45 a 55 d en el cultivo de *Ganoderma lucidum* en mezclas de aserrín de encino y carpe. Manavalan *et al.* (2012) obtuvieron un tiempo de colonización de 15 d con bagazo de caña. Cabe señalar que la tasa de inoculación utilizada en el presente trabajo fue de 3% (base húmeda); es decir, con una menor cantidad de inóculo en comparación con otros autores, la velocidad de crecimiento fue más alta con las tres cepas, en el sustrato de V-100%.

Además de los nutrientes del sustrato, la temperatura y el pH influyen en el desarrollo del micelio. En el presente trabajo los intervalos de estos dos parámetros se encontraron dentro de lo óptimo reportado por Jo *et al.* (2009) y Rolim *et al.* (2013); quienes señalan que de 6-9 es el rango adecuado de pH, para un óptimo desarrollo del micelio, así como una temperatura cercana a los 30 °C, coincidiendo en que *Ganoderma* tolera un amplio intervalo de pH,

pero no así en la temperatura donde se recomienda > 20 y $< 35^{\circ}\text{C}$, citando como óptimo 28°C .

VI.2 Aparición de Primordios y Desarrollo de Carpóforos

La aparición de primordios inició entre los 21 y 22 d en todos los sustratos. Esta formación de primordios a los 22 d en los cuatro sustratos, es un periodo corto comparado con Gurung *et al.* (2012), quienes utilizaron dos tipos de aserrines suplementados con harina de granos (garbanzo, maíz, trigo y arroz) y registraron la aparición de primordios de 40 a 46 d. Stamets (1993) citó un intervalo de 30 a 40 d para la aparición de primordios en cultivos de *G. lucidum*, señalando como factores de importancia una humedad relativa alta (95-100%), temperatura entre 21 y 27°C y CO_2 entre 2000 y 5000 ppm. Las condiciones ambientales en los tratamientos evaluados fueron adecuadas para la aparición de primordios. Sin embargo, durante las siguientes etapas de desarrollo de los carpóforos, se observaron diferencias entre los distintos sustratos y cepas.

Las cepas de *G. oerstedii* y *G. subincrustatum* produjeron carpóforos de mayor tamaño y peso en V-100% y VE-70/30%. En *G. oerstedii* el peso seco de carpóforos por muestra fue de 21.5 g en V-100% y en *G. subincrustatum* 14.7g en este mismo sustrato, en comparación con E-100% donde el peso promedio fue 6.72 y 5.51g respectivamente. En *G. oerstedii* se obtuvieron carpóforos con las características propias de la especie descritas por Torres-Torres *et al.* (2015). No obstante en *G. subincrustatum* sólo se observaron carpóforos con desarrollo de poros, en algunas muestras de V-100%, con la coloración y estructuras morfológicas descritas por dichos autores. El resto de las fructificaciones fueron alargadas con una coloración normal, pero sin la forma arriñonada típica de *Ganoderma* y las dimensiones de los estípites alcanzaron hasta 20×4 cm. Ello refleja la variabilidad intrínseca de la especie, con una mayor sensibilidad a las condiciones de cultivo comparada con las otras dos especies.

Los dos factores principales que influyen en la formación de este tipo de fructificaciones son el CO₂ y la iluminación. Stamets (1993) cita que las condiciones con poca luz desaceleran la elongación del estípite y el micelio entra en una etapa de formación del basidioma; asimismo considera que *G. lucidum* presenta un marcado fototropismo positivo. Los hongos poseen proteínas sensibles a la luz que intervienen en su metabolismo; aunque poco se ha estudiado en *Ganoderma* (Takala *et al* 2013; Tang *et al.* 2013).

El otro factor de gran impacto en la elongación del estípite es el CO₂. Stamets (1993), recomienda un intervalo entre 2000 y 5000 ppm para la primera etapa de formación del carpóforo y por debajo de 2000 ppm en la etapa final de maduración. En el presente cultivo, los niveles de CO₂ se monitorearon mas no controlaron, siendo menor a 2000 ppm como lo sugerido para la primera etapa. Esto aunado a la iluminación pudo afectar el desarrollo de los carpóforos. En el caso de la cepa comercial de *G. lucidum* se obtuvieron carpóforos con crecimiento arriñonado y otros con alargamientos en una misma muestra.



Figura 1. Cultivo en etapa de fructificación

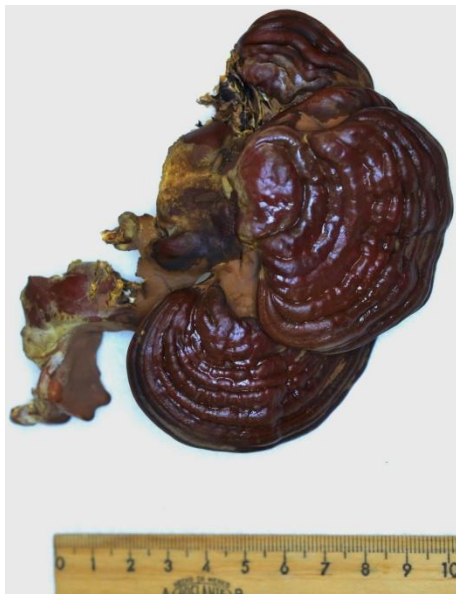
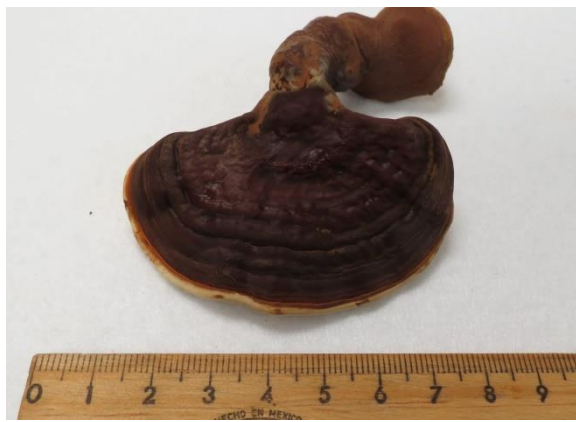


Figura 2. Carpóforos de *G. oerstedii* desarrollados en diferentes sustratos:
a) V-100%, b) E-100%, c) VE-70/30%, d) VE-30/70%.



Figura 3. Carpóforos de *G. subincrustatum* desarrollados en diferentes sustratos: a) V-100%, b) E-100%, c) VE-70/30%, d) VE-30/70%.



Figura 4. Carpóforos de *G. lucidum* desarrollados en diferentes sustratos: a) V-100%, b) E-100%, c) VE-70/30%, d) VE-30/70%.

VI.3 Eficiencia Biológica

Las cepas nativas mostraron las eficiencias biológicas (EB) más altas en V-100% (Cuadro 1). En el caso de la cepa comercial, la mayor EB se observó en la mezcla de VE- 30/70%. Los porcentajes más altos se obtuvieron con *G. oerstedii*: 34.2% en V-100% y 24.6% en VE-70/30%, encontrándose diferencias significativas entre ellos y el resto de las cepas y sustratos. Las EB obtenidas en *G. subincrustatum* oscilaron de 7.85 a 17.15%, encontrándose diferencias significativas entre V-100% y E-100%, mientras que la EB más bajas fueron en *G. lucidum* (5.91 a 9.44%), sin diferencias entre sustratos ($p>0.05$).

Estos porcentajes son similares a los reportados por Erckel (2009), al cultivar *G. lucidum* en combinaciones hechas a base de tres sustratos (aserrín de álamo, haya y encino) y tres suplementos (salvado de maíz, arroz y trigo). Las EB más altas (20.85%) se registraron en la combinación de aserrín de álamo suplementado con salvado de trigo y como segunda más alta (20.74%), la combinación de aserrín de encino suplementada con salvado de maíz. Concluyeron que existen diferencias significativas según el sustrato y suplemento. En el presente trabajo las maderas no fueron suplementadas; sin embargo, las EB alcanzadas en V-100% con *G. oerstedii* son más altas que las reportadas por Erckel (2009). Así, una suplementación a base de trigo podría aumentar la EB. Rolim *et al.* 2013, reportaron EB similares (36%) en formulaciones a base de *Pennisetum purpureum* Schumacher y diferentes tipos de suplementos con cepas nativas de Brasil vs. cepas Chinas, con un amplio intervalo de EB y R según formulaciones de los sustratos.

Cuadro 1. Productividad de tres cepas de *Ganoderma* en madera de vid, encino y dos mezclas de estas maderas.

Cepa	Sustrato	EB ^a	R ^b	TP ^c
<i>G. oerstedii</i>	V-100 %	34.29 ± 3.02 ^a	9.60 ± 0.84 ^a	0.49 ± 0.05 ^a
	VE-70/30%	24.68 ± 2.33 ^b	7.65 ± 0.72 ^a	0.27 ± 0.13 ^{b-d}
	VE-30/70%	15.82 ± 1.80 ^{cd}	4.90 ± 0.56 ^b	0.22 ± 0.04 ^{bc}
	E-100%	10.47 ± 1.64 ^{c-e}	2.93 ± 0.46 ^{b-d}	0.14 ± 0.03 ^{b-d}
<i>G. subincrustatum</i>	V-100 %	17.15 ± 5.51 ^c	4.80 ± 1.54 ^b	0.24 ± 0.10 ^b
	VE-70/30%	12.28 ± 1.34 ^{c-e}	3.81 ± 0.42 ^{bc}	0.16 ± 0.03 ^{b-d}
	VE-30/70%	10.84 ± 1.63 ^{c-e}	3.36 ± 0.51 ^{b-d}	0.15 ± 0.03 ^{b-d}
	E-100%	7.85 ± 3.98 ^e	2.20 ± 1.11 ^{cd}	0.11 ± 0.06 ^{cd}
<i>G. lucidum</i>	V-100 %	7.79 ± 5.44 ^e	2.18 ± 1.52 ^{cd}	0.12 ± 0.10 ^{b-d}
	VE-70/30%	9.38 ± 5.64 ^{de}	2.91 ± 1.75 ^{b-d}	0.13 ± 0.08 ^{b-d}
	VE-30/70%	9.44 ± 4.15 ^{de}	2.93 ± 1.41 ^{b-d}	0.14 ± 0.07 ^{b-d}
	E-100%	5.91 ± 2.99 ^e	1.67 ± 0.78 ^d	0.09 ± 0.04 ^d

^a)Eficiencia biológica (%), ^b)Rendimiento (%), ^c) Tasa de producción (%). Los valores son medias ± desviación estándar de seis repeticiones. Letras distintas en una misma columna muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey).

VI.4 Composición Proximal de los Carpóforos

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis bromatológico de los carpóforos. El porcentaje de minerales osciló de 1.32 a 4.01%. En cada una de las cepas el porcentaje más alto de mineralización se observó en la mezcla VE-70/30%, siendo significativa ($p < 0.05$) en comparación con los otros tres sustratos. En cada especie los porcentajes más altos se registraron en los tratamientos con mayor contenido de madera de vid. La mineralización más alta ocurrió en *G. lucidum* con algunas similitudes ($p > 0.05$) entre cepas nativas. Estos porcentajes están dentro del intervalo reportado por Hsieh y Yang (2004) en carpóforos de *G. lucidum* (2.11-3.91%), donde también encontraron diferencias significativas en la mineralización, con diferentes proporciones de *Acacia confusa* Merr. y residuos de soya.

En cuanto a la humedad de los cuerpos fructíferos no hubo diferencias estadísticas entre las cepas y sustratos. Los porcentajes fluctuaron de 4.37 a 6.49%, siendo más altas en vid y encino 100%, coincidiendo con los porcentajes iniciales de los sustratos.

La interacción cepa sustrato en el contenido de grasa fue significativa ($p < 0.05$). En las tres especies los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos V-100 y VE-70/30%. En el caso de la cepa comercial, el porcentaje más alto fue 1.55% en VE-70/30%. En el caso de las cepas nativas, el valor más alto fue en V-100% con 1.72 y 1.20% en *G. oerstedii* y *G. subincrstatum*, respectivamente. Estos valores se encuentran por debajo a lo obtenido por Hsieh y Yang (2004), con 4.6 a 4.96% de grasa en los carpóforos cultivados sobre residuos de soya con un 16.1% de grasas totales. Esto es un ejemplo del efecto de la composición química del sustrato sobre la composición de los carpóforos. Otro factor importante es el método de extracción y el solvente utilizado.

El contenido de proteína de los carpóforos desarrollados en V-100% y VE-70/30% fue mayor con respecto a E-100% y VE-30/70%, observado en las tres especies, *G. oerstedii* fue la que mostró el porcentaje más alto (13.58%), siendo diferente ($p < 0.05$) a lo obtenido en los otros tres sustratos y especies. El porcentaje más bajo (5.78%) se registró en *G. lucidum* en el sustrato VE-

30/70%. Estos resultados muestran una similitud con los obtenidos en sustratos, donde a mayor contenido de madera de vid, el porcentaje de proteína fue más alto, en las tres especies. Lo que sugiere que si se busca un alto porcentaje de proteína en los carpóforos, los sustratos deben contener un alto contenido de compuestos nitrogenados. En el caso de las especies de *Ganoderma*, el porcentaje de proteína en los carpóforos es importante ya que se han reportado un importante número de proteínas con actividad antitumoral, mitogénica, inmunomoduladora, antiproliferativa, además de formar complejos con polisacáridos y fenoles y de esta forma estar relacionadas con actividad antioxidante, estas proteínas de importancia farmacológica se han encontrado en micelio, carpóforos y en las esporas de *Ganoderma* spp. (Paterson, 2006). Por estas razones es de suma importancia evaluar sustratos que incrementen su porcentaje, quedando abierto a futuros estudios el aislamiento y caracterización de las proteínas de estas cepas nativas.

El contenido de azúcares totales de los carpóforos de las tres cepas se muestra en el Cuadro 3. Se obtuvieron valores entre 241.8 y 838 mg/g, obteniendo el valor más alto en los carpóforos de *G. subincrustatum* y *G. lucidum* en el sustrato de encino 100%, mientras que en *G. oerstedii* los valores fueron más altos en vid 100%, sin diferencias entre *G. subincrustatum* y *G. oerstedii* ($p > 0.05$). Estas concentraciones elevadas son comparables a las citadas por Kosarski *et al.* (2012) quien reportó concentraciones de 566 y 635 mg/g en una cepa de *G. lucidum* y *G. applanatum*, respectivamente. Estas altas concentraciones encontradas son de importancia ya que los polisacáridos junto con los triterpenos son los dos grupos de bioactivos de mayor relevancia encontrados en *Ganoderma*, atribuyéndoseles actividad antitumoral e inmunomoduladora principalmente además de una marcada actividad antioxidante (Paterson *et al.* 2006; Heleno *et al.* 2012).

El contenido de fenoles varió de 6.36 a 11.49 mg/g. Las concentraciones más altas de las tres cepas fueron encontradas en los carpóforos desarrollados en VE-30/70%, correspondiendo el más alto a *G. lucidum* aunque similar ($p > 0.05$) a lo obtenido en los otros tres sustratos. Siendo estos compuestos

de interés por su actividad antioxidante, los cuales están siendo investigados en diferentes especies del género (Hu *et al* 2013; Tan *et al.* 2015).

Cuadro 2 Composición proximal de los carpóforos de tres cepas de *Ganoderma* obtenidos en madera de vid, encino y dos mezclas de estas maderas.

Cepa	Sustrato	% Minerales	%Humedad	%Grasa	%Proteína
<i>G. subincrustum</i>	V-100%	1.72±0.03 ^{fg}	5.14±0.96 ^a	1.20±0.01 ^{cd}	13.58±0.39 ^a
	VE-70/30%	2.18±0.01 ^d	4.67±0.15 ^a	0.96±0.03 ^e	12.35±0.48 ^b
	VE-30/70%	1.63±0.05 ^{gh}	4.37±0.51 ^a	0.85±0.02 ^e	9.90±0.08 ^c
	E-100%	1.60±0.06 ^h	4.47±0.56 ^a	1.03±0.07 ^{de}	9.37±0.39 ^{cd}
<i>G. oerstedii</i>	V-100%	1.62±0.01 ^{gh}	6.49±0.68 ^a	1.72±0.08 ^a	11.91±0.26 ^b
	VE-70/30%	1.75±0.05 ^f	5.68±0.77 ^a	1.49±0.03 ^b	11.43±0.08 ^b
	VE-30/70%	1.32±0.00 ^j	5.81±0.54 ^a	1.38±0.04 ^{bc}	10.07±0.17 ^c
	E-100%	1.48±0.05 ⁱ	6.48±0.27 ^a	0.92±0.13 ^e	8.63±0.35 ^d
<i>G. lucidum</i>	V-100%	3.87±0.01 ^b	6.19±0.29 ^a	1.19±0.08 ^{cd}	9.24±0.21 ^{cd}
	VE-70/30%	4.01±0.02 ^a	5.01±0.96 ^a	1.55±0.08 ^{ab}	9.37±0.00 ^{cd}
	VE-30/70%	2.34±0.01 ^c	4.65±1.29 ^a	0.97±0.07 ^e	5.78±0.21 ^e
	E-100%	1.94±0.01 ^e	6.00±3.5 ^a	1.03±0.01 ^{de}	6.04±0.00 ^e

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas, exceptuando proteína (dos replicas). Letras distintas en una misma columna muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 3. Contenido de azúcares y fenoles totales de los carpóforos de tres cepas de *Ganoderma* obtenidos en madera de vid, encino y dos mezclas de estas maderas.

Cepa	Sustrato	Azúcares totales (mg/g)	Fenoles totales (mgEAG/g)
<i>G. lucidum</i>	V-100 %	347.5±70 ^{cd}	9.78 ± 0.74 ^{ab}
	VE-70/30%	530.2±152 ^{b-d}	9.37 ± 1.05 ^{a-c}
	VE-30/70%	663.5±94 ^{ab}	11.49 ± 1.06 ^a
	E-100%	838±166 ^a	11.15 ± 1.04 ^a
<i>G. oerstedii</i>	V-100 %	432.8±83 ^{b-d}	6.67 ± 0.17 ^d
	VE-70/30%	241.8±42 ^d	6.54 ± 0.64 ^d
	VE-30/70%	399±122 ^{b-d}	7.58 ± 0.76 ^{b-d}
	E-100%	314.1±164 ^{cd}	6.78 ± 1.18 ^d
<i>G. subincrustatum</i>	V-100 %	518.9±54 ^{b-d}	7.08 ± 0.31 ^{cd}
	VE-70/30%	508±22 ^{b-d}	6.36 ± 0.41 ^d
	VE-30/70%	544.7±16 ^{a-c}	8.60 ± 0.81 ^{b-d}
	E-100%	655±82 ^{ab}	6.63 ± 0.41 ^d

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Letras distintas en una misma columna muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey).

VI.5 Análisis Proximal de Sustratos

VI.5.1 Proteína

Los porcentajes de proteína en la etapa inicial fueron diferentes entre sustratos ($p < 0.05$). El porcentaje más alto (2.10%) se observó en V-100% y el menor valor (0.04%) en E-100% (Cuadro 4). El contenido de nitrógeno de la madera de vid fue mayor a los porcentajes reportados por Peksen *et al.* (2011) en residuos como salvado de trigo, residuos de té y maderas como encino y carpe. Donde también reporta un aumento en los porcentajes durante el cultivo, esto se pudo observar también en nuestros resultados.

En la etapa de formación de primordios, los porcentajes de proteína aumentaron en las tres cepas y en los cuatro sustratos, manteniéndose las diferencias significativas observadas antes de la inoculación. La cepa con mayor aumento en los cuatro sustratos fue *G. lucidum*, con un aumento de 1.35% en VE-30/70%, seguido de *G. oerstedii* en V-100%. Esto puede estar relacionado con las eficiencias biológicas de cada cepa, ya que el sustrato donde se observó mayor aumento de proteína, es el sustrato donde las cepas mostraron mayor EB, R y TP. El aumento de proteína en los sustratos también se observó en el residuo después de la cosecha. Tanto en la etapa de primordios y final, *G. oerstedii* y *G. lucidum* mostraron mayor contenido de proteína vs. *G. subincrustatum*. Este comportamiento no se observó en los carpóforos, donde *G. subincrustatum* contenía mayor cantidad de proteína en los carpóforos desarrollados en V-100%.

Estos resultados sugieren que la madera de vid tiene mayor cantidad de compuestos nitrogenados disponibles para la formación de carpóforos, en comparación con el encino. Phillippoussis y Daimantopoulou (2011) señalan que el contenido de nitrógeno de los sustratos afecta la fructificación, ya sea retardando o acelerando el desarrollo de carpóforos y por tanto la productividad, ya que a su vez está directamente relacionado con la proporción C/N de los sustratos y el desarrollo del micelio.

Cuadro 4. Porcentaje de proteína (%N*4.38) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		2.10±0.00 ^a	1.36±0.04 ^b	0.66±0.04 ^c	0.04±0.00 ^d
	<i>G. oerstedii</i>	2.71±0.13 ^a	1.44±0.08 ^d	0.70±0.00 ^f	0.08±0.00 ^g
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	2.45±0.00 ^b	1.49±0.04 ^d	0.96±0.13 ^{fe}	0.31±0.00 ^g
	<i>G. lucidum</i>	2.80±0.04 ^a	2.01±0.08 ^c	2.01±0.04 ^c	1.01±0.04 ^e
	<i>G. oerstedii</i>	3.81±0.04 ^b	1.97±0.08 ^d	1.05±0.13 ^e	0.13±0.00 ^g
Final	<i>G. subincrustatum</i>	3.55±0.26 ^{bc}	1.93±0.04 ^d	1.01±0.04 ^e	0.44±0.04 ^{fg}
	<i>G. lucidum</i>	4.25±0.08 ^a	3.11±0.08 ^c	1.88±0.04 ^d	0.66±0.08 ^{ef}

Los valores son medias ± desviación estándar de dos réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Medias con literales distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey).

VI.5.2 Minerales

El contenido de minerales en la etapa inicial fue similar entre los cuatro sustratos ($p>0.05$). El mayor porcentaje (4.21%) se registró en VE 30/70% y el menor (3.06%) en V-100% (Cuadro 5). A medida que el cultivo se fue desarrollando se observaron diferencias significativas en la etapa de primordios y final. En la fase de primordios, la mineralización varió por cepa con respecto al tipo de sustrato ($p<0.05$). En esta etapa, *G. oerstedii* presentó el porcentaje más alto de minerales (4.68%) en V-100% y el valor más bajo (3.99%) en E-100%, siendo similares ($p>0.05$). No obstante la tendencia en esta cepa se mantuvo en la etapa final donde se obtuvieron los porcentajes más altos en los sustratos V-100% y VE-70/30, observándose diferencias significativas vs. VE-30/70% y E-100%. Contrariamente, en *G. subincrustatum* los valores más altos de minerales se lograron en sustratos con mayor porcentaje de encino (100 y VE-70/30%), tanto en la etapa de primordios como final ($p<0.05$).

En cuanto a la cepa comercial *G. lucidum*, a diferencia de las cepas nativas, el comportamiento entre las etapas fue distinto. En la etapa de primordio, el mayor porcentaje de minerales se observó en E-100%. Sin embargo en la etapa final, la mineralización fue mayor en VE-70/30% ($p<0.05$). En diversos estudios se ha comprobado la importancia de los minerales para el crecimiento de los hongos. Se ha observado que las concentraciones de fósforo, potasio, calcio y magnesio, afectan directamente el rendimiento del cultivo. La ausencia de alguno de ellos puede limitar por completo el desarrollo micelial (Sánchez y Royse, 2001).

Cuadro 5 Contenido de minerales (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustrato			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		3.06±0.47 ^a	4.01±0.63 ^a	4.21±0.51 ^a	4.20±0.38 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	4.68±0.26 ^{bc}	4.28±0.25 ^{cd}	4.59±0.06 ^{bc}	3.99±0.16 ^{cd}
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	3.74±0.48 ^d	4.16±0.09 ^{cd}	5.09±0.29 ^b	5.10±0.39 ^b
	<i>G. lucidum</i>	3.91±0.29 ^{cd}	5.13±0.08 ^b	7.17±0.11 ^a	7.69±0.27 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	9.33±0.43 ^a	8.96±0.09 ^a	6.45±0.22 ^{ef}	5.99±0.09 ^f
Final	<i>G. subincrustatum</i>	5.99±0.19 ^f	5.90±0.03 ^f	7.05±0.38 ^{cd}	6.88±0.28 ^{c-e}
	<i>G. lucidum</i>	8.01±0.20 ^b	9.54±0.59 ^a	7.47±0.25 ^{bc}	6.07±0.30 ^{ef}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.3 Humedad

La humedad es uno de los principales factores en un cultivo, ya que es determinante en la absorción de los nutrientes que se encuentran en el sustrato. No debe exceder, ni estar por debajo de los requerimientos óptimos de cada especie porque influye directamente en el desarrollo del micelio y por tanto en la producción de los carpóforos (Staments y Chilton, 1983).

La humedad (base seca) fue similar ($p>0.05$) entre las cepas y sustratos durante las tres etapas (Cuadro 6). Los porcentajes fluctuaron de 3 a 5%. Fragoso *et al.* (2004) encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de humedad de la madera de vid (8.2%) y la madera de encino y manzano (7.4%). Así mismo Gaitán-Hernández *et al.* (2006), reportaron diferencias entre la madera de vid (7.02%), la paja de cebada (4.62%) y paja de trigo (5.19%). Esta diferencia de resultados puede deberse a su composición disímil y variabilidad entre lotes. Adicionalmente, el peso húmedo inicial de E-100% y VE-30/70% fue de 69%, mientras que en los sustratos de V-100% y VE-70/30% del 72%. Estos valores están próximos a lo sugerido de 60 a 70% por Stamets (1993) para el cultivo de *G. lucidum*.

Previo a este estudio las condiciones óptimas de humedad para el cultivo sólido de las cepas de *Ganoderma* nativas de Sonora eran desconocidas. Los resultados muestran que los porcentajes de humedad alcanzados por los sustratos evaluados, fueron favorables tanto para el desarrollo del micelio en la etapa de colonización como para la formación de carpóforos.

Cuadro 6. Contenido de humedad (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		4.65±0.19 ^{ab}	5.05±0.15 ^a	4.96±0.07 ^a	4.29±0.17 ^b
	<i>G. oerstedii</i>	4.48±0.42 ^a	4.03±0.18 ^a	4.23±0.17 ^a	4.27±0.37 ^a
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	4.71±0.24 ^a	4.31±0.20 ^a	4.62±0.22 ^a	4.10±0.51 ^a
	<i>G. lucidum</i>	3.87±0.15 ^a	3.90±0.26 ^a	4.57±0.23 ^a	4.16±0.34 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	4.63±0.92 ^a	3.30±0.85 ^a	4.24±0.32 ^a	4.32±0.18 ^a
Final	<i>G. subincrustatum</i>	4.93±0.24 ^a	5.03±0.41 ^a	5.14±0.12 ^a	4.93±0.12 ^a
	<i>G. lucidum</i>	5.09±0.01 ^a	4.33±0.45 ^a	4.30±0.4 ^a	4.24±0.2 ^a

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.4 Extracto etéreo

En la etapa final del cultivo, el contenido de extracto etéreo varió significativamente entre sustratos y cepas ($p < 0.05$) (Cuadro 7). En la etapa inicial se registró un mayor porcentaje de grasa (0.96%) en vid 100% y el menor (0.81%) en la combinación de VE-30/70% encino. En la etapa de primordio, el contenido de grasa de *G. oerstedii* aumentó en los sustratos con mayor cantidad de vid y contrariamente, disminuyó en E-100% y VE-30/70%.

En la etapa final, la grasa disminuyó en los tres sustratos con madera de vid, obteniéndose el mayor decremento (0.56%) en V-100%. En *G. subincrustatum*, la reducción de grasa se presentó tanto en la etapa de primordio como final, con una disminución de 0.32% en VE-70/30%. En la cepa de *G. lucidum* a diferencia de las cepas nativas, se redujo su porcentaje de grasa en la etapa de primordios pero aumentó en la fase final. Este comportamiento se observó en los cuatro sustratos.

En la etapa de primordio, la diferencia en el contenido de grasa entre cepas podría deberse al tipo de enzimas como lipoxigenasas e hidropoxidadas, que intervienen en la oxidación y descomposición de ácidos grasos, que posteriormente el hongo utilizará para el desarrollo de los carpóforos. La actividad de estas enzimas depende de la composición de los sustratos. Belinky *et al.* (1994), observaron que las diferentes concentraciones de harina y aceite de soya en el sustrato, modifican la actividad lipoxigenasa y la producción de 1-3 octanol, producto de la oxidación de ácido linoleico.

Los sustratos inoculados con las cepas nativas que alcanzaron las EB y R más altos, registraron los mayores decrementos de grasa, observándose lo contrario en la cepa comercial, con la EB y R menores. Ello sugiere que influye la cantidad de grasa de los sustratos y la capacidad de la cepa para integrarla a su metabolismo.

Cuadro 7. Contenido de grasa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		0.96±0.09 ^a	0.89±0.12 ^a	0.81±0.12 ^a	0.89±0.23 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	1.35±1.2 ^a	1.22±0.58 ^a	0.77±0.05 ^a	0.82±0.09 ^a
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	0.62±0.04 ^a	0.61±0.15 ^a	0.62±0.03 ^a	0.99±0.08 ^a
	<i>G. lucidum</i>	0.62±0.07 ^a	0.56±0.19 ^a	0.42±0.09 ^a	0.56±0.14 ^a
Final	<i>G. oerstedii</i>	0.79±0.08 ^{ab}	0.88±0.08 ^a	0.63±0.06 ^{a-c}	0.85±0.16 ^a
	<i>G. subincrustatum</i>	0.45±0.09 ^{bc}	0.29±0.07 ^c	0.44±0.18 ^{bc}	0.76±0.19 ^{ab}
	<i>G. lucidum</i>	0.81±0.08 ^{ab}	0.75±0.02 ^a	0.65±0.03 ^{a-c}	0.73±0.03 ^a

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.5 Fibra

VI.5.5.1 Hemicelulosa. En las tres etapas se observaron diferencias estadísticas en el contenido de hemicelulosa ($p < 0.05$). En el Cuadro 8 se muestra una clara tendencia en los sustratos, a mayor cantidad de vid existe un aumento en el porcentaje de hemicelulosa. V-100% obtuvo 21.96 vs. 15.15% en E-100%. En la etapa de primordio se registró una disminución de hemicelulosa en las tres cepas. Las cepas nativas muestran una tendencia de degradación en los sustratos con mayor contenido de vid, la disminución en *G. oerstedii* y *G. subincrustatum* en vid 100% fue de 4.09 y 2.9% respectivamente. Sin embargo en la cepa de *G. lucidum*, el mayor porcentaje de degradación se observó en VE-30/70% (4.94%).

En la etapa final se mantuvo el comportamiento de degradación de las cepas nativas. La disminución de hemicelulosa en el residuo final en comparación con la etapa de primordio fue de 6.67 y 6.58% en *G. oerstedii* y *G. subincrustatum* respectivamente. Nuevamente el comportamiento de *G. lucidum* fue distinto a las cepas nativas. El porcentaje de hemicelulosa disminuyó solo en los sustratos de vid 100 y 70% (2.18 y 1.44%) respectivamente. Sin embargo, en VE-70/30% y E-100%, la hemicelulosa aumentó 1.62 y 0.74.

La degradación de hemicelulosa ocurrió en las tres cepas y durante todo el cultivo. No obstante el porcentaje de degradación dependió de la cepa y el sustrato, donde las condiciones del cultivo como la maquinaria enzimática de cada especie intervienen en estas diferencias y son determinantes en la producción de carpóforos. Entre las principales enzimas que se requieren para la hidrólisis de la hemicelulosa se encuentran las galactosidasas, manasas, acetilxilanasas, exo y endo 1-4- β xilanasas, así como α -galactosidasas. Manavalan *et al.* (2012), reportan la presencia de estas dos últimas en un cultivo sólido de *G. lucidum*, las cuales convierten la hemicelulosa en azúcares simples y oligosacáridos. Esto sugiere que además del tipo de enzimas que cada cepa sea capaz de producir, también influye la

composición de la hemicelulosa de cada madera reflejándose en la actividad de las enzimas.

La cepa comercial degradó principalmente hemicelulosa de los sustratos con mayor porcentaje de encino y por el contrario, las cepas nativas la hemicelulosa de los sustratos con alto contenido de vid. Por tanto en un cultivo es importante conocer las enzimas que produce la cepa evaluada y la estructura química del sustrato utilizado.

Cuadro 8. Contenido de hemicelulosa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		21.96±0.66 ^a	18.36±1.31 ^b	16.37±1.33 ^b	15.15±1.46 ^b
Primordio	<i>G. oerstedii</i>	17.87±2.04 ^{a-c}	15.75±0.66 ^{b-d}	13.9±1.38 ^{de}	13.98±2.2 ^{de}
	<i>G. subincrustatum</i>	19.06±1.01 ^{ab}	15.99±0.81 ^{b-d}	15.39±0.9 ^{cd}	14.22±1.14 ^{de}
	<i>G. lucidum</i>	19.95±1.33 ^a	16.33±0.37 ^{a-d}	11.43±1.13 ^e	10.76±0.23 ^e
Final	<i>G. oerstedii</i>	11.2±1.67 ^c	10.83±0.86 ^c	10±1.19 ^c	11.3±1.9 ^c
	<i>G. subincrustatum</i>	12.48±0.65 ^{bc}	12.9±0.37 ^{bc}	11.68±0.68 ^c	11±0.79 ^c
	<i>G. lucidum</i>	17.77±0.9 ^a	14.89±0.82 ^{ab}	13.05±1.14 ^{bc}	11.5±0.86 ^c

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.5.2 Celulosa. El porcentaje de celulosa fue mayor en madera de encino (Cuadro 9). En E-100%, el contenido de celulosa fue de 45.94%, siendo diferente a los demás sustratos ($p < 0.05$). En la etapa de desarrollo de primordio, las tres cepas aumentaron su contenido de celulosa. En las cepas nativas el incremento fue mayor en VE-70/30%, con 3.89 (*G. subincrustatum*) y 3.36% (*G. oerstedii*). Al igual que en la hemicelulosa, *G. lucidum* presentó un comportamiento disímil a las cepas nativas y la celulosa fue también mayor en VE 30/70%.

En la etapa final, el contenido de celulosa disminuyó variando entre cepas y sustratos ($p < 0.05$). *G. lucidum* mostró una reducción de celulosa de 8.7% en VE 70/30% y en *G. oerstedii*, de 11.56% en V-100%. Los sustratos con mayor degradación de celulosa son los tratamientos con altos porcentajes de EB y R, para estas dos cepas. No así para *G. subincrustatum*, donde el contenido de celulosa disminuyó 0.69% en VE-70/30% y 1.8% en vid 30%, mientras que en V-100% y encino se presentó un incremento de 0.35 y 1.64% respectivamente.

Para la degradación de la celulosa, las enzimas que intervienen son las glucanasas. Manavalan *et al.* (2012), reportan la producción por parte de *G. lucidum* de endo1,4- β -glucanasas, exo 1,4- β -glucanasas y β -glucosidasas, las cuales participan en la hidrólisis de la celobiosa a glucosa, haciendo accesibles los azúcares simples para el crecimiento y la formación de carpóforos. El sustrato con alto porcentaje de degradación por *G. lucidum* fue VE-30/70%, lo que pudo influir para la obtención de los valores más altos de EB, R y TP.

Cuadro 9. Contenido de celulosa (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		36.84±0.86 ^c	38.18±0.32 ^c	43.3±0.58 ^b	45.94±0.52 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	38.99±0.15 ^{ed}	41.54±0.62 ^{b-d}	44.19±1.21 ^{ab}	46.51±0.17 ^a
	<i>G. subincrustatum</i>	38.96±0.61 ^{ed}	42.07±0.3 ^{bc}	46.15±0.41 ^a	46.82±0.6 ^a
Primordio	<i>G. lucidum</i>	37.36±0.83 ^e	39.82±1.44 ^{cde}	40.27±1.66 ^{cd}	46.06±1.59 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	27.43±0.34 ^h	34.87±0.61 ^f	42.92±0.46 ^{cd}	46.48±.51 ^b
	<i>G. subincrustatum</i>	39.31±0.27 ^e	41.38±0.27 ^d	44.35±0.89 ^c	48.46±0.72 ^a
Final	<i>G. lucidum</i>	30.74±0.37 ^g	31.12±1.09 ^g	37.78±0.63 ^e	43.13±0.9 ^{cd}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.5.3 Lignina. En la etapa inicial, se observaron diferencias significativas en el contenido de lignina entre los sustratos VE-30/70%, E-100% y los demás sustratos, donde E-100% presentó el valor más alto (21.58%) y el menor (16.65%) V-100% (Cuadro 10). En la etapa de primordios, la interacción cepa sustrato es significativa, sin diferencias marcadas entre sustratos. En *G. oerstedii* se observó una mayor degradación en E-100% y VE-30/70%, siendo similar al comportamiento de *G. subincrustatum* disminuyó la lignina a 3.07 y 2.17% en VE-30/70% y E-100% respectivamente, manteniéndose las diferencias significativas entre E-100% y V-100%. En *G. lucidum* la degradación de lignina en esta etapa fue significativa, con un decremento de 8.57 y 7.9% en VE-30/70% y E-100% respectivamente, con un porcentaje similar a *G. subincrustatum* en V-100%. En la etapa final, la tendencia de degradación de la lignina en las cepas nativas fue similar a la etapa anterior; sin embargo, *G. lucidum* aumentó 1.14 y 1.36% su contenido de lignina en VE-30/70% y E-100%.

Contrario a lo observado en la degradación de celulosa y hemicelulosa, las tres cepas lograron la mayor degradación de lignina en los tratamientos con contenidos más altos de encino, lo que sugiere que producen enzimas similares para descomponer la lignina. Dentro de las principales se encuentran la lignina peroxidasa, glucosa oxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas (Manavalan *et al.*, 2012). Se ha citado que los compuestos fenólicos se encuentran involucrados en algunas reacciones enzimáticas, interviniendo de esta forma en la degradación de la lignina (Cabrera *et al.*, 2013).

El contenido de fenoles de la madera de encino es alto, lo que sugiere su influencia para una mayor degradación de lignina. No solo es importante la capacidad de degradación de las cepas, sino también para incorporar estos azúcares y utilizarlos en la formación de carpóforos. En el residuo final con las cepas nativas disminuyó más que en *G. lucium*, por lo que pudo influir en la EB, R y TP, observándose los valores más altos en las cepas nativas vs. cepa comercial.

Cuadro 10. Contenido de lignina (%) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		16.65±1.22 ^b	18.54±0.4 ^c	21.32±0.72 ^a	21.58±0.65 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	16.51±1.01 ^{bc}	16.83±0.69 ^{a-c}	17.39±0.94 ^{a-c}	18.2±0.46 ^{ab}
	<i>G. subincrustatum</i>	15.1±0.44 ^{c-e}	16.55±0.47 ^{bc}	18.25±1.09 ^{ab}	19.41±0.78 ^a
Primordio	<i>G. lucidum</i>	16.29±1.39 ^{b-d}	17.14±1.46 ^{a-c}	12.75±0.34 ^e	13.68±1.06 ^{de}
	<i>G. oerstedii</i>	12.73±1.28 ^{b-e}	12.54±1.02 ^{c-e}	13.7±1.05 ^{a-d}	12.95±0.13 ^{b-e}
	<i>G. subincrustatum</i>	10.99±0.26 ^e	13.06±0.72 ^{b-e}	12.07±0.61 ^{de}	12.37±0.35 ^{c-e}
Final	<i>G. lucidum</i>	15.84±1.06 ^a	14.44±0.52 ^{abc}	13.89±1.14 ^{a-d}	15.04±0.31 ^{ab}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.6 Azúcares totales

El contenido de azúcares totales (AT) entre sustratos fue similar ($p>0.05$) en cada una de las etapas, con un comportamiento disímil por especie (Cuadro 11). En los cuatro sustratos inoculados con *G. oerstedii* incrementaron los AT durante la formación de primordios. Aunque disminuyeron en la etapa final, con un decremento de hasta 386 y 260 mg/g en VE-70/30% y V-100% respectivamente.

Ganoderma subincrustatum redujo su contenido de AT en la etapa de primordios, con el mayor decremento del 96.6% en E-100% y únicamente aumentó (69.68 mg/g) en VE-30/70%. En la etapa final, esta cepa mostró mayor disminución en los sustratos con predominio de encino. *G. lucidum* se comportó similar a las cepas nativas. Sin embargo, el incremento de azúcares en la etapa de primordios fue deficiente en comparación con las cepas nativas, con el mayor incremento de 8.28 mg/g en E-100%. En la etapa final hubo un decremento en los cuatro sustratos registrándose en E-100% la mayor disminución (161.4 mg/g). Estos resultados sugieren que los azúcares cuantificados en la etapa de primordio se emplearon como fuente de carbono para el desarrollo de los cuerpos fructíferos, provocando su disminución en la etapa final.

Los valores obtenidos en madera de vid fueron más altos a los reportados por Gaitán-Hernández *et al.* (2006), con 209 mg/g antes de la inoculación, lo cual puede deberse a la variabilidad entre lotes.

Cuadro 11. Contenido de azúcares totales (mg/g) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		415.9±7 ^a	484.76±90 ^a	411.12±43 ^a	530.02±55 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	523.5±84 ^a	704.3±117 ^a	665.4±42 ^a	678.4±80 ^a
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	364.1±38 ^a	424.9±50 ^a	480.8±51 ^a	433.4±31 ^a
	<i>G. lucidum</i>	415.03±63 ^a	475.9±132 ^a	415.9±75 ^a	538.3±134 ^a
Final	<i>G. oerstedii</i>	262.8±49 ^{ab}	317.8±78 ^{ab}	411.6±83 ^{ab}	529.5±75 ^{ab}
	<i>G. Subincrustatum</i>	395.4±81 ^a	302.3±152 ^{ab}	242.1±2 ^{ab}	222.8±43 ^b
	<i>G. lucidum</i>	389.2±35 ^{ab}	390.1±11 ^{ab}	314.8±14 ^{ab}	376.9±52 ^{ab}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.7 Fenoles totales

El contenido de fenoles en la etapa inicial fue similar ($p>0.05$), con concentraciones altas en E-100% y V-100%, de 5.77 y 4.77 mg EAG/g respectivamente (Cuadro 12). En la formación de primordios, las concentraciones disminuyeron con las tres cepas, excepto en *G. lucidum* en VE-70/30% y VE-30/70% sin significancia en la interacción cepa vs. sustrato; sin embargo, sí entre cepas ($p>0.05$), siendo mayor el promedio de fenoles en *G. lucidum* vs. cepas nativas. Las concentraciones en el residuo final fueron diferentes entre etapa y sustrato ($p<0.05$). En las tres cepas las concentraciones aumentaron, con excepción de *G. lucidum* en VE-70/30% y E-100%. La concentración más alta de *G. oerstedii* ocurrió en V-100% y la más baja en E-100%. *G. subincrustatum* y *G. lucidum* mostraron el mayor incremento de fenoles en VE-30/70%.

Debido a la capacidad antioxidante de los extractos de especies de *Ganoderma*, en las últimas décadas se han estudiado ampliamente sus fenoles. Tan *et al.* (2015) reportaron una comparación en la concentración de fenoles totales de micelio en fermentaciones sólidas y cultivo sumergido, carpóforos cultivados y silvestres, así como diferentes técnicas de extracción. Nuestros resultados obtenidos con una extracción metanólica, son similares a estos reportados con extracción en agua caliente (5.05 mg EAG/g). Sin embargo, los métodos de extracción evaluados por estos autores tuvieron un efecto significativo (2.32 vs. 101.01 mgEAG/g). Así, el sustrato, las cepas y el tipo de extracción influyen en las concentraciones finales.

Cuadro 12. Contenido de fenoles totales (mgEAG/g) en madera de vid, encino y combinaciones antes de la inoculación, al formar primordios y después de la cosecha

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		4.77±0.77 ^{ab}	4.42±0.65 ^{ab}	3.4±0.35 ^b	5.77±0.75 ^a
	<i>G. Oerstedii</i>	2.49±0.33 ^a	3.18±0.23 ^a	2.59±0.19 ^a	3.35±0.65 ^a
	<i>G. subincrustatum</i>	3.11±0.19 ^a	2.35±0.22 ^a	2.98±0.76 ^a	3.5±0.20 ^a
Primordio	<i>G. lucidum</i>	4.70±0.40 ^a	5.13±1.3 ^a	3.98±.73 ^a	4.42±0.31 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	5.98±0.66 ^a	5.06±0.48 ^{a-d}	4.90±0.66 ^{a-e}	4.54±0.61 ^{a-e}
	<i>G. subincrustatum</i>	4.04±0.49 ^{c-e}	3.50±0.56 ^e	4.48±0.11 ^{b-e}	3.68±0.21 ^{de}
Final	<i>G. lucidum</i>	3.76±0.61 ^{de}	4.68±0.43 ^{a-e}	5.37±0.26 ^{abc}	5.66±0.47 ^{ab}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VI.5.8 Relación carbono nitrógeno

La relación C/N inicial fue similar en los cuatro sustratos entre 55.56 y 56.67 (Cuadro 12). Estos valores concuerdan a los registrados por Sánchez *et al.* (2008) con madera de vid en combinación con rastrojo de tomate con una relación C/N de 55.1. En la etapa de primordio, en encino 100% y vid 30% inoculados con *G. lucidum* se observaron los valores más bajos (53), siendo significativo con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$). En la etapa final, la C/N varió significativamente. En *G. oerstedii* se redujo a 52.59 y 52.80 en V-100% y VE-70/30%, respectivamente, estos valores difieren con los sustratos con menor contenido de madera de vid. La reducción de la relación C/N al final del cultivo fue citada por Sánchez y Royse (2001), en estudios previos de cultivo de *Pleurotus*, sugiriendo usos alternativos de estos residuos como abono para suelos.

Hsieh y Yang (2011) utilizaron la relación C/N para evaluar los intervalos óptimos de crecimiento del micelio de *G. lucidum*, así como su efecto en el desarrollo de las fructificaciones. La C/N entre 70 y 80 favorecían la velocidad de crecimiento del micelio y el desarrollo de las fructificaciones en comparación con los valores de 30 a 60. Sin embargo, los factores involucrados en el crecimiento y desarrollo de los hongos, a ser considerados para el éxito en su cultivo, son múltiples.

Cuadro 13. Relación C:N en madera de vid, madera de encino y mezclas antes y después de la inoculación con tres cepas de *Ganoderma*.

Etapa	Cepa	Sustratos			
		V-100%	VE-70/30%	VE-30/70%	E-100%
Inicial		56.22±0.22 ^a	56.67±0.37 ^a	55.56±0.30 ^a	55.56±0.22 ^a
	<i>G. oerstedii</i>	55.28±0.15 ^{bc}	55.52±0.15 ^{ab}	55.34±0.04 ^{bc}	55.69±0.09 ^{ab}
Primordio	<i>G. subincrustatum</i>	55.83±0.28 ^a	55.58±0.05 ^{ab}	55.05±0.17 ^c	55.04±0.23 ^c
	<i>G. lucidum</i>	55.73±0.17 ^{ab}	55.02±0.05 ^c	53.84±0.06 ^d	53.54±0.16 ^d
Final	<i>G. oerstedii</i>	52.59±0.25 ^f	52.80±0.06 ^f	54.26±0.13 ^{a-c}	54.52±0.06 ^a
	<i>G. subincrustatum</i>	54.52±0.11 ^a	54.57±0.02 ^a	53.91±0.22 ^{dc}	54±0.16 ^{b-d}
	<i>G. lucidum</i>	53.35±0.12 ^e	52.47±0.34 ^f	53.67±0.15 ^{de}	54.48±0.18 ^{ab}

Los valores son medias ± desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se evaluaron por etapa. Letras distintas muestran diferencias ($p < 0.05$, Tukey)

VII. CONCLUSIONES

La madera de vid es un sustrato viable para el cultivo sólido de cepas nativas de *Ganoderma* spp., siendo alternativo al encino, con eficiencias biológicas, rendimientos y tasas de producción variables.

La composición química de la madera de vid varió durante su degradación dependiendo de la cepa utilizada, observándose los cambios principalmente en hemicelulosa, proteína y minerales e influyendo en la composición química de los carpóforos, principalmente en proteína, minerales y grasa.

La madera de vid en combinación con otras maderas influye en la composición química de los carpóforos, según las proporciones.

Se establece el primer protocolo para la obtención de carpóforos de cepas nativas de *Ganoderma* con base a madera de vid.

VIII. REFERENCIAS

- Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L., Martínez, N. y González A. 2007. Total phenols and antioxidant activity of comercial and wild mushrooms from Chihuahua, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5: 329-334.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 17th ed, Association of Analytical Communities. Gaithesburg, MD.
- Belinky, P., Masaphy, S., Levanon, D., -Hadar, Y. y Dosoretz C. 1994. Effect of médium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:629-633.
- Bhosle, S., Ranadive, K., Bapat, G., Garad, S., Deshpande, G. y Vaidya J. 2010. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere* 1 (3): 249-262.
- Cabrera, R., Valenzuela-Soto, E., Reyes-Vidal, Y., Esqueda, M. y Asaff A. 2013. Caracterización de los extracto metanólicos de poda de vid y paja de trigo y su oxidación por enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. *Revista Mexicana de Micología* 37: 61-67.
- Chan, S. y Miles P. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. 2nd edition. Boca Raton, CRC press. Pp. 32-45.
- Chang, S. y Buswell J. 1996 Mushroom research and development – equality and mutual benefit, in *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Royse, D. J. Ed., Pennsylvania State University, University Park. pp. 1-10.
- Chen, R. y Yu, D. 1999. Studies on the triterpenoid constituents of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.;Fr.) P. Krast. (Aphyllorphomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1:147-152.
- Chiu, S. y Moore, D. 2001. Threats to biodiversity caused by the traditional mushroom cultivation in China. In: Moore D, Nauta M, Rotheroe M (eds) *Fungal Conservation: The 21st Century issue*, Cambridge.

- Cuervo, L., Folch, J. y Quiroz, R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología* 13 (3): 11-18.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Erkel, A. 2009. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 4 (11), pp. 1331-1333.
- Fan, L., Pandey, A. y Mohan, R. 2000. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotecnologica* 20(1): 41–52.
- Finley, J.W., Kong, A.N., Hintze, K.J., Jeffery, E.H., Ji, L.L. y Lei, X.G. 2011. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 6837-6846.
- Fragoso, T., Gutiérrez, A., Sánchez, A., Villegas, E. y Esqueda, M. 2004. Cambios en la composición química de la madera de vid, manzano y encino por *Lentinula edodes* (Berk) Pegler. *Biotecnica* 6: 3-12.
- Gaitán-Hernández, R., Cortes, N. y Mata, G. 2014. Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn. *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (2), 467-474.
- Gaitán-Hernández, R., Esqueda, M., Gutierrez, A. y Mata, G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 432-439.
- Goering, H. y Van-Soest P. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents procedure and some applications). Agricultural Research Service. USDA. Agricultural Handbook No. 379. Washington, D.C. pp 1-20.
- Goh, K., Ganeson, M. y Supramaniam, C. 2014. Infection potential of vegetative incompatible *Ganoderma boninense* isolates with known lignolytic enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 13 (9): 1056-1066.
- Gottlieb, A. M., Ferrer, E. y Wright J. E. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104: 1033-1045.

- Griffin D.H. 1994. Chemical requirement for growth. *Fungal Physiology*. 2nd edition. New York: Wiley Liss. 130-157 pp.
- Gurung, O., Budathoki, U. y Parajuli, G. 2012. Effect of different substrates on the production of *Ganoderma lucidum*. *Our Nature*; 10:191-198.
- Guzmán G. 2000. Tropical Fungi of México. Diversity and distribution. Symposium Tropical Mycology, Abril 25-29, Liverpool.
- Heleno, S., Barros, L., Martinis, A., Queiroz, M., Buelga, C. y Ferreira I. 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 (1): 135-140.
- Hsieh, C. y Yang, F. 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Tehcnology* 91 (1): 105-109.
- Hoang-Minh, T., Le T.L., Kasbohm y J. Gieré. 2010. UV-protection characteristics of some clays. *Applied Clay Science* 48(3):349-357.
- Hong, S. y Jung S. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96(4): 742-755.
- Hu, LL., Ma, QY., Huang, SZ., Guo, ZK., Guo, JC., Dai, HF., y Zhao YX. 2013. Two new compounds from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 34: 884-886.
- Jin, B. y Kelly, J. 2009. Wine Industry Residues. In *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilisation*. Poonam Singh nee´ Nigam, Ashok Pandey editors.. Springer Press. 294-296.
- Jo, W., Cho, Y., Park, S., Yoo, Y. y Seok, S. 2009. Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiology* 37: 94-102.
- Jungjing, M.A., Zhengyi, F.U., Peiyan, M.A., Yanli, S.U. y Qingjie, Z. 2007. Breaking and characteristics of *Ganoderma lucidum* spores by high speed centrifugal shearing pulverizer. *J. Wuhan Univ. Tech-Mater. Sci. Ed.* 22: 617-621

- Karthikeyan, M., K. Radhika, R. Bhaskaran, S. Mathiyazhagan y Velazhahan, R. 2009. Rapid detection of *Ganoderma lucidum* and assessment of inhibition effect of various control measures by immunoassay and PCR. *African Journal of Biotechnology* 8(10): 2202-2208.
- Kersten, P. y Cullen, D. 2007. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics Biology*. 44: 77-87.
- Korsarki, M., Klaus, A., Niksic, M., Vrvic, M., Todorovic, N., Jakovljevic, y D., Van Griensven, L. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 144-153.
- Lin, N., Su, J. y Gao H. 2004. Clinical analysis of 66 cases of treatment with *Ganoderma lucidum* extract combined chemotherapy for tumors. *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine*, 18(5):457-458
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. y Heese, K. 2012. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of Proteomics* 77: 298-309.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A. y Del Rio, J. C. 2005. Biodegradacion of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Mendoza, G., Guzmán, G., Ramírez-Guillen, F., Luna, M. y Trigos, A. 2011. *Ganoderma oerstedii* (Fr.) murrill (higher Basidiomycetes), a tree parasite species in Mexico: taxonomic description, rDNA study, and review of its medical applications. *International Journal of Medicinal Mushrooms*.; 13(6):545-52.
- Pandey A, Socol CR, Nigam P. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Sugarcane bagasse. *Bioresources Technology* 74: 69–80.
- Paterson, R. 2006. *Ganoderma* a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 67: 1985-2001.

- Peksen, A. y Yakupoglu G. 2009. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 611-618.
- Pérez, L. I., A. Santerre, A. R. Villalobos, A. Galván, M. G. Torres-Torres, A. Rodríguez, L. y Guzmán-Dávalos, 2005. Extracción de DNA y amplificación de secuencias del ITS del DNAr de *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes) para su uso en el análisis filogenético. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* 450-457.
- Philippoussis A. 2009. Productions of mushrooms using Agro-Industrial Residues as Substrates. In *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilisation*. Poonam Singh nee Nigam, Ashok Pandey editors. Springer Press 165-175.
- Phillippoussis, A. y Daimantopoulou, P. 2011. Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. In *Proceeding of the seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products (ICMBMP7)*, Areachon, France: INRA. pp. 344-356.
- Ping, C., Yan, C., Bing, L., Guo, C, Yun, L. y Ping, L. 2009. Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carbohydr. Polym.* 77: 389-393.
- Rolim, L., Sales-Campo, C., Queiroz, M. y Fontes, A. 2013. Application of Chinese Jun-cao technique for the production of Brazilian *Ganoderma lucidum* strains. *Brazilian archives of Biology and technology.* 57: 367-373.
- Sánchez, A., Esqueda, M, Gaitán-Hernández, R., Córdova, A. y Coronado M. 2008. Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología.* (28): 17-24.
- Sánchez, J. y Royse D. 2001. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Limusa-Grupo, Noriega Editores. México.
- Sanodiya, B., Thakur, G., Baghel, R., Prasad, G. y Bisen, P. 2009. *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (26): 717-742.
- Seo, G., y Kirk, P. 2000. Ganodermataceae nomenclature and classification. In: *Ganoderma diseases of perennial crops*. J. Flood, P. D. Bridge y M. Holderness (Eds.) CABI Publishing, Nueva York. 3-22 pp.

- Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Wang, Y y Zhang Z. 2013. Evaluation of solid-state fermentation by *Ganoderma lucidum* using soybean curd residue. *Food and Bioprocess Technology*. 6:1856-1867.
- Sliva, D., Sedlak, M., Slivova, V., Valachovicova, T., Lloyd, F. y Ho, N. 2003. Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9(4):491-497.
- Smith, B. y Sivasithamparam, K. 2000. Isozmes of *Ganoderma* species in Australia. *Mycological Research* 104:952-961.
- Smith, J., Rowan, N. y Sullivan R. 2002. Medicinal mushrooms: A rapid developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* 24: 1839-1845.
- Soto-Velazco, C., M. C. López, E. Vázquez Valls y I. Álvarez. 2002. Cultivation of *Ganoderma lucidum* and its effect on the production of lymphocytes. *In: Sánchez et al.* (Eds). *Mushroom Biology and Mushroom Products* Word Society for Mushroom biology and mushroom products. Cuernavaca, México. pp. 379-382.
- Stamets, P. y Chilton, J. 1983. *The mushroom cultivator*. Agarikon Press. 1st ed. Olympia, WA. 415 pp.
- Stamets, P. 1993. *Growing gourmet & medicinal mushrooms*. 1st ed. Ten Speed Press. Berkeley CA. 554 pp.
- Steyaert R. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. Bull. Nat. Plantenium Belg.* 50, 135–186.
- Takala, H., Björling, A., Berntsson, O., Lehtivuori, H., Niebling, S., Hoernke, M., Kosheleva, I., Henning, R., Menzel, A., Ihalainen, J. y Westenhoff, S. Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. *Nature*. 509: 245-248.
- Tan, WC., Kuppusamy, UR., Phan, CW., Tan, YS., Raman, J., Anuar, AM. Y Sabaratnam, V. 2015. *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki revisited: Domestication study and antioxidant properties of its basidiocarps and mycelia. *Nature*. DOI: 10.1038/srep12515
- Tang, L., Jian, H., Song, C., Bao, D., Shang, X., Wu, D., Tan, Q. y Zhang, X. 2013. Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathway associated with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11:4977-4989

- Trigos, A. y Medellín, J. 2011. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of Myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología* 34: 63-83.
- Torres-Torres, M, Ryvarden, L. y Guzmán-Dávalos L. 2015. *Ganoderma* sub género *Ganoderma* en México. *Revista Mexicana de Micología*. 41:27-46.
- Vázquez, N. 2010. Asociación de Productores de Uva de Mesa. Modelo de la agricultura Moderna en México en el Siglo XXI. México: Editorial Leticia Deschamps Solórzano.
- Wang, X., Xi, R., Li, Y., Wang, D. y Yao Y. 2012. The Species Identity of the Widely Cultivated *Ganoderma*, '*G.lucidum*' (Ling-zhi), in China. *PLoS ONE* 7(7):e40857. doi: 10.1371/journal.pone.0040857
- Webb, C., Koutinas, A. A., Wang R 2004. Developing a sustainable bioprocessing strategy based on a generic feedstock. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 86: 195–268.
- Zhang, G., Wang, Y., Ni, W., Teng, H., y Lin, Z. 2002. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury on mice. *World Journal of Gastroenterology* 8: 728-733.
- Zhang, Y. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biofineries. *Journal Ind Microbiololgy Biotechnology* 35: 367–375.
- Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X. y Tang, K. 2007. *Ganodermataceae*: natural products and their related pharmacological functions. *American Journal of Chinese Medicine* 35 (4): 559-74.