



CERZOS
CONICET

Cultivo y propiedades medicinales de *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta*



Departamento de Biología
Bioquímica y Farmacia,
Universidad Nacional del Sur
CERZOS- CONICET
Bahía Blanca, Argentina
2012

**Tesis de Doctorado
en Biología
Pablo D. Postemsky**



Universidad Nacional del Sur
Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia
Cerzos-CCT- Conicet
Bahía Blanca, Argentina

Tesis Doctor en Biología de Pablo Daniel Postemsky

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra.

La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el CERZOS-CTT-CONICET Bahía Blanca, durante el período comprendido entre Septiembre de 2006 y Marzo de 2012 bajo la dirección del Dr. Néstor Curvetto, ex Profesor Titular de la cátedra de Fisiología Vegetal del Depto. de Agronomía de la UNS. Director del Lab. de Hongos Comestibles y Medicinales del CERZOS (CONICET-UNS).

Índice

Resumen	15
Summary	20

Capítulo I **Introducción general**

1.1. Hongos comestibles y medicinales	25
1.2. Aspectos nutracéuticos, nutricéuticos, farmacéuticos y cosmeceúticos	25
1.3. Hongos políporos	26
1.4. El género <i>Grifola</i>	27
2. <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i>	29
2.1. <i>Grifola gargal</i>	29
2.2. <i>Grifola sordulenta</i>	33
3. Campañas de recolección	34
3.1. Primera campaña de recolección	34
3.2. Segunda campaña de recolección	36
3.3. Tercera campaña de recolección	36
3.4. Cuarta campaña de recolección	38
3.5. Bosques de <i>Nothofagus obliqua</i>	38
3.6. ¿Baja capacidad de colonización, de competencia o de fructificación?	40
4. Madera y podredumbre	40
4.1. Madera de roble	40
4.2. Madera de coihue	42
4.3. Podredumbre del roble causada por <i>G. gargal</i>	42
5. Cultivo de hongos en Argentina	45
6. Cultivo de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i>	46
6.1. Cepas utilizadas	47
6.2. Conservación del micelio	48
6.3. <i>Pool</i> de fructificaciones de <i>Grifola gargal</i>	48
7. Objetivos generales de la tesis	49

Capítulo II **Cultivo en medio nutritivo semisólido**

Cultivo de micelio en medio nutritivo semisólido	53
Experimentación	53
Ensayos	54

A. Análisis del crecimiento micelial de *Grifola* spp. en agar nutritivo

1. Introducción	55
1.1. Hipótesis	56
1.2. Objetivos	56
2. Materiales y métodos	56
2.1. Cepas utilizadas	56
2.2. Medio, pH y temperatura	56
2.3. Agregado de suplementos al medio con agar	56
2.4. Establecimiento del vigor de <i>Grifola sordulenta</i> y de diferentes cepas de <i>G. gargal</i>	57
2.5. Análisis de los datos	57
3. Resultados y discusión	57
3.1. Temperatura y pH	57
3.2. Agregado de suplementos	57
3.3. Estudio de vigor y evaluación de nuevas cepas	58
4. Conclusiones	60

B. Morfología de los cultivos

1. Introducción	61
1.1. Hipótesis	61
1.2. Objetivos	61
2. Materiales y métodos	62
2.1. Cepas y cultivo	62
2.2. Estudio de las muestras	62
3. Resultados y discusión	62
3.1. <i>Grifola frondosa</i>	62
3.2. <i>Grifola gargar</i>	67
3.3. <i>Grifola sordulenta</i>	76
4. Conclusiones	83

C. Fotomorfogénesis

1. Introducción	84
1.1. Morfogénesis	84
1.2. La luz como variable en la morfogénesis	85
1.3. Luz azul	86
1.4. Luz roja	87
1.5. Luz verde	88
1.6. Políporos	88
1.7. Hipótesis	88
1.8. Objetivos	89
2. Materiales y métodos	89
2.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo de <i>Grifola gargar</i>	89
2.1.1. Tipo de irradiación lumínica	92
2.2. Fotomorfogénesis en <i>Grifola gargar</i> y <i>G.sordulenta</i>	92
2.2.1. Tipos de irradiación lumínica	93
3. Resultados y discusión	95
3.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo y la morfogénesis de <i>Grifola gargar</i>	95
3.1.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo	95
3.1.2. Efecto de la luz en la morfogénesis	96
3.2. Fotomorfogénesis en <i>Grifola gargar</i> y <i>G. sordulenta</i>	98
3.2.1. Cultivo en oscuridad y choque térmico	98
3.2.2. Efecto de la luz en colonias maduras y tratadas con choque térmico de <i>Grifola gargar</i> y <i>G. sordulenta</i>	99
4. Conclusiones	101

D. Crecimiento en medios diferenciales

1. Introducción	102
1.1. Degradación de lignocelulosa	102
1.2. Degradación de carbohidratos	105
1.3. Hipótesis	106
1.4. Objetivos	106
2. Materiales y métodos	107
2.1. Análisis de crecimiento de <i>Grifola</i> spp. en presencia de compuestos fenólicos	107
2.2. Análisis de crecimiento de <i>Grifola</i> spp. en presencia de diferentes fuentes de carbono	107
2.3. Análisis de los datos	108
3. Resultados y discusión	108
3.1. Cultivo en medios diferenciales conteniendo ácido gálico, tánico, azure B y poly R478	108
3.1.1. Características del cultivo en medio gálico y tánico	111
3.1.2. Decoloración de azure B y poly R478	112
3.2. Cultivo en medios con diferentes fuentes de carbohidratos	114
4. Conclusiones	117

Capítulo III Cultivo en medios líquidos

Cultivo de micelio en medios líquidos	119
Condiciones de cultivo y morfología del micelio	119
Ensayos	121

A. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. gargal* en medio líquido en Erlenmeyers de 250 ml

1. Introducción	122
1.1. Hipótesis	122
1.2. Objetivos	122
2. Materiales y métodos	122
2.1 Cepas e inóculo	122
2.2 Medio de cultivo	122
2.3 Cultivo líquido	123
2.4 Análisis de los datos	123
3. Resultados y discusión	123
4. Conclusiones	124

B. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. gargal* en medios complejos en frascos de 3 litros

1. Introducción	125
1.1. Hipótesis	125
1.2. Objetivos	125
2. Materiales y métodos	126
2.1. Cepas e inóculo	126
2.2. Medios de cultivo	126
2.3 Determinaciones	127
2.4. Análisis de los datos	127
3. Resultados y discusión	127
4. Conclusiones	131

C. Cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en medio líquido en Erlenmeyers de 500 ml. Efecto de la bencilaminopurina

1. Introducción	132
1.1 Hipótesis	132
1.2. Objetivos	132
2. Materiales y métodos	133
2.1 Preparación de inóculo líquido	133
2.2 Cultivo sumergido de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> . Efecto de BAP	133
2.3. Análisis de los datos	134
3. Resultados y discusión	134
3.1. Preparación de inóculo líquido	134
3.2 Efecto de BAP sobre el crecimiento de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en cultivo sumergido	134
4. Conclusiones	135

D. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. frondosa* en condiciones de cultivo líquido estacionario

1. Introducción	137
1.1 Hipótesis	137
1.2. Objetivos	137
2. Materiales y métodos	137
2.1. Especies e inóculo	137
2.2. Fermentación sumergida en condiciones de cultivo estacionario	137
2.3. Análisis de los datos	138
3. Resultados y discusión	138
4. Conclusiones	141

Capítulo IV Cultivo en sustratos conteniendo granos de cereales y oleaginosas para la producción de blanco de hongo

1. Introducción	142
1.1. Hipótesis	143
1.2. Objetivos	143
2. Materiales y métodos	144
2.1. Procedimiento general para la producción de <i>spawn</i>	144
2.2. Efecto de la temperatura en la colonización de <i>spawn</i>	144
2.3. Test de crecimiento lineal (TCL) para la evaluación del crecimiento de micelio en diferentes granos	144
2.4. Velocidad de colonización en botellas	145
2.5. Análisis de los datos	145
3. Resultados y discusión	147
3.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento	147
3.2. Ensayo de velocidad de crecimiento lineal de micelio	148
3.3. Obtención del <i>spawn</i> en botellas	150
4. Conclusiones	151

Capítulo V Cultivo en medio sólido sobre sustrato a base de cáscara de girasol

Fermentación de micelio en estado sólido	153
Cáscara de girasol como sustrato	153
Suplementos y aditivos	154
Ensayos	155

A. Estudio de variables culturales para el crecimiento de *Grifola gargar* y *G. sordulenta*, Parte I

1. Introducción	156
1.1. Hipótesis	156
1.2. Objetivos	157
2. Materiales y métodos	157
2.1. Test de crecimiento lineal	157
2.2. Formulaciones de sustrato	157
2.3. Contenido proteico y actividad de lacasas de los sustratos colonizados	158
2.3.1. Determinación del contenido de proteínas	158
2.3.2. Determinación de la actividad de lacasa	158
2.4. Estudio de la degradación de los componentes del sustrato	158
2.4.1. Método para determinación de materia seca	159
2.4.2. Determinación de fibra detergente neutro	159
2.4.3. Determinación del contenido celular	160
2.4.4. Método para determinar fibra detergente ácido	160
2.4.5. Determinación de lignina detergente ácido y del contenido de cenizas	161
2.4.6. Método para determinación de materia orgánica	161
2.5. Análisis de los datos	161
3. Resultados y discusión	162
3.1. Propiedades del sustrato previo a la colonización	162
3.1.1. Densidad del sustrato	162
3.1.2. Humedad relativa y pH	162
3.1.3. Contenido de proteínas y actividad de lacasas en los sustratos iniciales	162
3.1.4. Análisis de fibra previo a la colonización	164
3.2. Crecimiento de <i>Grifola gargar</i>	166
3.2.1. Fórmulas de sustratos	166
3.2.2. Influencia de la densidad del sustrato en el crecimiento	171
3.2.3. Humedad relativa y pH	172
3.2.4. Incremento en el contenido de proteínas y en la actividad de lacasas	172

3.2.5. Contenido de fibra en sustratos posterior a la colonización <i>Grifola gargal</i>	174
3.3. Crecimiento de <i>Grifola sordulenta</i>	177
3.3.1. Fórmulas de sustratos	177
3.3.2. Influencia de la densidad del sustrato en el crecimiento	181
3.3.3. Humedad relativa y pH	181
3.3.4. Incremento en el contenido de proteínas y en la actividad de lacasas	182
3.3.5. Análisis de contenido fibra posterior a la colonización <i>Grifola sordulenta</i>	183
4. Conclusiones	185

B. Estudio de variables culturales para el crecimiento de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*, Parte II

1. Introducción	186
1.1. Hipótesis	187
1.2. Objetivos	187
2. Materiales y métodos	188
2.1. Sustrato basal	188
2.2. Ensayos de las fórmulas de sustratos con el TCL	188
2.3. Análisis de los datos	188
3. Resultados y discusión	190
3.1. El crecimiento de <i>Grifola gargal</i> en sustratos suplementados	190
3.2. Crecimiento de <i>Grifola sordulenta</i> en sustratos suplementados	193
3.3. Comentarios finales	196
4. Conclusiones	196

C. Estudios preliminares para el cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos formulados con cáscara de girasol

1. Introducción	197
1.1. Hipótesis	198
1.2. Objetivos	199
2. Materiales y métodos	200
2.1. Cepas	200
2.2. <i>Spawn</i>	200
2.3. Formulaciones de sustratos y elaboración de los troncos sintéticos	200
2.4. Condiciones ambientales	202
2.4.1. Corrida del micelio	202
2.4.2. Inducción de primordios	202
2.4.3. Fructificación	202
2.5. Operaciones durante las diferentes fases del cultivo	203
2.6. Degradación de componentes del sustrato	204
3. Resultados y discusión	206
3.1. Inoculación y <i>spawn</i>	206
3.2. Corrida del micelio	207
3.3. Inducción de exudados y primordios	210
3.4. Fructificación	214
3.5. Degradación de componentes del sustrato	220
4. Conclusiones	223

Capítulo VI Propiedades antioxidantes en *Grifola* spp.

1. Introducción	225
1.1. Propiedades antioxidantes en los hongos	225
1.2. Extracción de metabolitos antioxidantes	226
1.3. Estudio <i>in vitro</i> de las propiedades antioxidantes	226
1.4. Hipótesis	227
1.5. Objetivos	227
2. Materiales y métodos	227
2.1. Fuentes de micelio	227

2.2 Extracción	228
2.3 Extinción de radicales DPPH	228
2.4 Poder reductor total	229
2.5 Contenido de compuestos fenólicos	229
2.6 Cromatografía en capa fina de compuestos en extractos metanólicos	230
2.6.1. Revelado de sustancias antioxidantes	230
2.6.2. Revelado de compuestos fenólicos	230
2.6.3. Revelado de hexosas	231
2.7. Análisis de los datos	231
3. Resultados y discusión	233
3.1. Rendimiento de las extracciones metanólicas	233
3.1.1. <i>Grifola gargal</i>	233
3.1.2. <i>Grifola sordulenta</i>	234
3.1.3. <i>Grifola frondosa</i>	234
3.2. Actividad antioxidante	237
3.2.1. Actividad antioxidante en <i>Grifola gargal</i>	240
3.2.1.1. Actividad antioxidante en fructificaciones	240
3.2.1.2. Actividad antioxidante en micelio cultivado en frascos con medios complejos	241
3.2.1.3. Efecto de la BAP sobre la actividad antioxidante en micelio cultivado en Erlenmeyers	242
3.2.1.4. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados	243
3.2.2. Actividad antioxidante en <i>Grifola sordulenta</i>	243
3.2.2.1. Actividad antioxidante en micelio cultivado en frascos con medios complejos	244
3.2.2.2. Efecto de la BAP sobre la actividad antioxidante en micelio cultivado en Erlenmeyers	245
3.2.2.3. Actividad antioxidante en micelio de cultivo estacionario en fuentes	245
3.2.2.4. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados	246
3.2.3. Actividad antioxidante en <i>Grifola frondosa</i>	247
3.2.3.1. Actividad antioxidante en micelio de cultivo estacionario en fuentes	247
3.2.3.2. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados por <i>Grifola frondosa</i> y en la harina control	247
3.3. Compuestos antioxidantes de <i>Grifola</i> spp.	249
3.3.1. Compuestos antioxidantes en <i>Grifola gargal</i>	252
3.3.2. Compuestos antioxidantes de <i>Grifola sordulenta</i>	256
3.3.3. Compuestos antioxidantes de <i>Grifola frondosa</i>	258
4. Conclusiones	260

Capítulo VII Propiedades antigenotóxicas en *Grifola* spp.

1. Introducción	262
1.1. Genotoxicidad y hongos como alimentos funcionales	262
1.2. Bionesayo <i>SMART</i> (<i>somatic mutation and recombination test</i>)	263
1.3. Agentes genotóxicos	264
1.4. Hipótesis	264
1.5. Objetivos	265
2. Materiales y métodos	265
2.1. Promutágeno	265
2.2. Fuentes de micelio de <i>Grifola</i> spp.	265
2.3. Cultivo de <i>Drosophila</i>	266
2.4. Evaluación de la toxicidad	266
2.5. Bioensayo <i>SMART eyes</i>	267
2.6. Análisis de los datos	267
3. Resultados y discusión	268
3.1. Toxicidad	268
3.1.1. Toxicidad del DMBA	268
3.1.2. Toxicidad de las muestras en presencia del solvente del DMBA	269
3.1.3. Toxicidad de las muestras en presencia de 25 μ mol DMBA	269
3.2. Gentoxicidad	270
3.2.1. Genotoxicidad del DMBA	273

3.2.2. Genotoxicidad de las muestras en presencia del solvente del DMBA	274
3.2.3. Geno/antigenotoxicidad de las muestras fúngicas en presencia de 25 $\mu\text{mol/vial}$ de DMBA	275
3.3. Análisis de la geno/antigenotoxicidad en diferentes estadios larvales	276
4. Conclusiones	279

Conclusiones finales	280
----------------------	-----

Apéndice 1. Características taxonómicas de <i>Grifola</i> spp.	282
Apéndice 2. Ensayo de fotomorfogénesis	290
Apéndice 3. Contenido nutritivo de <i>Grifola</i> spp.	294
Apéndice 4. Cuantificación de micelio en granos de trigo	303

Bibliografía	306
--------------	-----

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Sitios donde fueron halladas y descritas fructificaciones de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	31
Figura 2. <i>Grifola gargal</i> fructificaciones y primordios.	32
Figura 3. <i>Grifola sordulenta</i> , árboles de coihue (A, B) y fructificación (C).	34
Figura 4. Fructificaciones de <i>Grifola gargal</i> sobre <i>Nothofagus obliqua</i> halladas en el árbol caído.	35
Figura 5. Fructificaciones de <i>Grifola gargal</i> recolectadas en especímenes de <i>Nothofagus obliqua</i> en pie durante la 1° campaña.	37
Figura 6. Larvas de insectos de la familia <i>Mycetophilidae</i> (Diptera) halladas en el contexto de <i>Grifola gargal</i> .	38
Figura 7. Distribución fitogeográfica de los bosques de <i>Nothofagus obliqua</i> en Chile y Argentina.	39
Figura 8. Madera de roble pellín (<i>Nothofagus obliqua</i>).	41
Figura 9. Madera de coihue (<i>Nothofagus dombeyi</i>).	42
Figura 10. Podredumbre blanca en roble pellín (<i>Nothofagus obliqua</i>) causada por <i>Grifola gargal</i> .	44
Figura 11. Detalles de la podredumbre blanca producida por <i>Grifola gargal</i> en un árbol de <i>Nothofagus obliqua</i> .	45
Figura 12. Pool de fructificaciones de <i>Grifola gargal</i> .	49

Capítulo II

Figura 13. Velocidad de colonización de diferentes cepas de <i>Grifola</i> spp. en medio MYPA modificado.	59
Figura 14. Micelio de <i>Grifola frondosa</i> en medio MYPA modificado (I).	64
Figura 15. Micelio de <i>Grifola frondosa</i> en medio MYPA modificado (II).	65
Figura 16. Clamidosporas de <i>Grifola</i> spp. en medio MYPA modificado.	66
Figura 17. Valores de longitud y ancho de las clamidosporas observadas en micelio de <i>Grifola</i> spp. creciendo en medio MYPA modificado.	67
Figura 18. <i>Grifola gargal</i> , detalle de la formación de agregados, poros y micelio.	68
Figura 19. Primordios de <i>Grifola gargal</i> formados en cajas de Petri.	69
Figura 20. <i>Grifola gargal</i> , detalle de la formación de exudados, primordios, agregados y lamelas.	71
Figura 21. Micelio de <i>Grifola gargal</i> sin diferenciación superficial.	72
Figura 22. Micelio de <i>Grifola gargal</i> asociado a poros y exudados en cultivo sólido en agar.	73
Figura 23. Micelio envejecido de <i>Grifola gargal</i> .	74
Figura 24. Himenio de <i>Grifola gargal</i> con probasidios, basidios y basidiósporas.	75
Figura 25. Tinción de <i>Grifola gargal</i> con reactivo de <i>Feulguen</i> y azul de toluidina.	76

Figura 26. <i>Grifola sordulenta</i> , micelio de avance.	78
Figura 27. <i>Grifola sordulenta</i> , micelio de zonas envejecidas.	79
Figura 28. <i>Grifola sordulenta</i> , micelio de un agregado algodonoso.	80
Figura 29. <i>Grifola sordulenta</i> , lamelas con forma de bastoncitos.	81
Figura 30. Lamela de <i>Grifola sordulenta</i> que creció hacia afuera de la caja de Petri.	82
Figura 31. Tinción de <i>Grifola sordulenta</i> con reactivo de <i>Feulguen</i> y azul de toluidina.	83
Figura 32. Fotorreceptores en <i>bacteria</i> y <i>eucarya</i> .	86
Figura 33. Horarios del amanecer, ocaso y duración del fotoperíodo en el Parque Nacional Lanín.	90
Figura 34. Cuarto de cultivo e irradiación de luz.	90
Figura 35. Placas que muestran los efectos de los tratamientos a los 30 días del comienzo del ensayo.	91
Figura 36. Evolución de las temperaturas máxima (●), mínima (□), y rango térmico (×) registrados durante el período del ensayo.	91
Figura 37. Espectros de absorción de los filtros preparados con hojas de celofán.	92
Figura 38. Espectros de absorción de los filtros de acrílico medidos con espectrofotómetro.	94
Figura 39. Valores promedio de crecimiento de <i>Grifola gargal</i> en medio MYPA modificado bajo diferentes condiciones de irradiación.	96
Figura 40. Interacción de las enzimas fúngicas y la veratril alcohol oxidasa con mediadores y radicales que intervienen durante la transformación de lignocelulosa.	105
Figura 41. Análisis de crecimiento de micelio de <i>Grifola gargal</i> (cepas A, B y G9), <i>G. sordulenta</i> , <i>G. frondosa</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> (cepas 47 y S) cultivados en medios diferenciales contenidos en cajas de Petri (n=3).	110
Figura 42. Análisis de crecimiento de micelio de <i>Grifola gargal</i> (cepas A y B), <i>G. sordulenta</i> , <i>G. frondosa</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> (cepas 47 y S) cultivados en medios diferenciales conteniendo: pectina (PEC), almidón soluble (AMI), carboximetilcelulosa (CEL), xilulosa (XIL).	116
Capítulo III	
Figura 43. Morfología de micelio en medios líquidos.	120
Figura 44. Producción de biomasa de micelio de <i>Grifola sordulenta</i> y <i>G. gargal</i> en medio líquido MYP modificado.	124
Figura 45. Micelio de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> cultivado en medios nutritivos líquidos durante 30 días, a 20 ±1°C, oscuridad y 30 rpm.	128
Figura 46. Valores promedio de la biomasa de micelio (g) obtenida por unidad experimental de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	129
Figura 47. Representación <i>Box-Whisker</i> que muestra el contenido de glucosa (g) remanente luego de 30 días de cultivo.	129
Figura 48. Correlación del peso fresco vs. peso seco (gramos) del micelio de <i>Grifola gargal</i> y de <i>G. sordulenta</i> cultivados en frascos.	130
Figura 49. Correlación entre pH (medido al final del cultivo) y biomasa del micelio fúngico (peso seco en gramos) a los 30 días de cultivo líquido de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en medios estacionarios.	130
Figura 50. Correlación entre conductividad (μS/cm) y biomasa del micelio fúngico (peso seco en gramos) de todas las unidades experimentales a los 30 días de cultivo de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en medio líquido bajo agitación suave.	131
Figura 51. Producción de biomasa micelial de <i>Grifola gargal</i> o <i>G. sordulenta</i> en medio líquido sumergido después de 20 días de cultivo en diferentes concentraciones de BAP (0-10 mg/l).	135

Figura 52. Secuencia de la preparación del inóculo líquido para el cultivo líquido de dos especies de <i>Grifola</i> spp. en cultivo sumergido, en Erlenmeyers de 500 ml, y el resultado del cultivo correspondiente.	136
Figura 53. Cultivo de micelio en medios líquidos estacionarios.	139
Figura 54. Cultivos estacionarios de <i>Grifola sordulenta</i> y de <i>G. frondosa</i> a los 48 días de cultivo.	140
Figura 55. Representación <i>Box-Whisker</i> que muestra los rendimientos de biomasa (peso seco del micelio por u.e.) de <i>Grifola sordulenta</i> y <i>G. frondosa</i> obtenido en cultivo en medio líquido estacionario.	140

Capítulo IV

Figura 56. Porcentaje del sustrato (granos de trigo en botellas) que resultó ser colonizado a distintos tiempos (20, 25 y 30 días) a partir de la inoculación con <i>spawn</i> de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	148
Figura 57. Imágenes del TCL de <i>Grifola gargal</i> y de <i>G. sordulenta</i> , a los 30 días de cultivo.	150
Figura 58. Las placas fotográficas muestran los sustratos colonizados que se obtuvieron en la preparación del <i>spawn</i> de <i>Grifola</i> spp.	152

Capítulo V

Figura 59. Diagrama del análisis de fibra.	159
Figura 60. Placas fotográficas representativas de la colonización de micelio de <i>Grifola gargal</i> de sustratos en el TCL.	168
Figura 61. Velocidad de colonización de sustratos de diferentes fórmulas, medida en miligramos de sustrato seco colonizado por <i>Grifola gargal</i> por día.	170
Figura 62. Análisis de regresión de la velocidad de colonización de <i>Grifola gargal</i> vs. densidad de los sustratos de diferentes formulaciones (representadas por círculos).	171
Figura 63. Placas fotográficas representativas de la colonización de micelio de <i>Grifola sordulenta</i> de sustratos en el TCL.	180
Figura 64. Velocidad de colonización de diferentes fórmulas de sustrato, medida en miligramos de sustrato seco colonizado por <i>Grifola sordulenta</i> por día.	181
Figura 65. Imágenes representativas de cultivos de <i>Grifola gargal</i> a los 35 días de colonización.	193
Figura 66. Imágenes representativas de cultivos de <i>Grifola sordulenta</i> a los 35 días de colonización.	196
Figura 67. Estados iniciales de la corrida de micelio de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en sustrato a base de cáscara de girasol.	207
Figura 68. Colonización con micelio de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en sustratos de diferentes fórmulas a distintos tiempos durante la fase de corrida.	210
Figura 69. Formación de exudados en <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	211
Figura 70. Imágenes de primordios de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	213
Figura 71. Basidiomas de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> obtenidas en el E1.	215
Figura 72. Basidiomas en etapa de <i>cerebro</i> de <i>Grifola sordulenta</i> (A) y <i>G. gargal</i> (B y C) durante el E2.	216
Figura 73. Formaciones morfogénicas de <i>Grifola gargal</i> cultivado en F1 (A) y basidioma iniciando la etapa de <i>coliflor</i> de <i>G. sordulenta</i> cultivada en F1 (B) durante el E3.	217
Figura 74. Basidiomas de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> durante el E4.	218
Figura 75. Mata de micelio marrón de <i>Grifola gargal</i> formadas durante el E5 (A, B, C) y basidioma de <i>G. sordulenta</i> iniciando la fase de <i>cerebro</i> (D).	219
Figura 76. Fructificaciones en etapa de <i>racimo</i> de <i>Grifola gargal</i> formadas durante el E5 (A, B, C) y sistema de ventilación forzada realizada con la ayuda de un compresor de aire (D).	220
Figura 77. Evolución de la degradación de la cáscara de girasol por <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	222
Figura 78. Degradación de diferentes componentes de la cáscara de girasol luego de 210 días de colonización por <i>Grifola gargal</i> en diferentes sectores del tronco sintético.	222

Figura 79. Degradación de diferentes componentes de la cáscara de girasol por hongos basidiomicetes.	223
Capítulo VI	
Figura 80. Actividad SR y PR de <i>Grifola gargal</i> en función de la concentración del extracto metanólico.	244
Figura 81. Actividad SR y PR de <i>Grifola sordulenta</i> en función de la concentración del extracto metanólico.	246
Figura 82. Actividad SR y PR de <i>Grifola frondosa</i> y harina de trigo sin colonizar en función de la concentración del extracto metanólico, y de las soluciones de sustancias patrones disueltas en metanol.	248
Figura 83. Análisis de regresión de actividad SR (EqAA _{SR}) vs. contenido de compuestos fenólicos (EqAG) en <i>Grifola</i> spp.	251
Figura 84. Análisis de regresión de actividad PR (EqAA _{PR}) vs. el contenido de compuestos fenólicos (EqAG) en <i>Grifola</i> spp.	251
Figura 85. Imágenes representativas de la cromatografía de capa delgada (TLC).	261
Capítulo VII	
Figura 86. Bioensayo SMART.	268
Figura 87. Genotoxicidad del DMBA evaluado mediante <i>SMART eyes</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> .	274
Figura 88. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los tres estadios larvales de <i>Drosophila</i> .	278
Figura 89. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los estadios larvales de <i>Drosophila</i> .	278
Figura 90. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los estadios larvales de <i>Drosophila</i> .	279

Índice de Tablas.

Capítulo I

Tabla 1. Algunos políporos y sus compuestos patentados. _____	27
Tabla 2. Cepas utilizadas en esta tesis. _____	48

Capítulo II

Tabla 3. Influencia del pH del medio MYPA modificado sobre la tasa de crecimiento del diámetro de la colonia (mm/día) y la producción de biomasa (mg /día, peso seco) de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> . _____	58
Tabla 4. Fases y condiciones del experimento para el estudio de la fotomorfogénesis en <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> . _____	93
Tabla 5. Respuestas fotomorfogénicas de <i>Grifola gargal</i> frente a la luz blanca, azul, roja o verde u oscuridad. _____	97
Tabla 6. Respuestas morfogénicas de <i>Grifola gargal</i> (cepa A y cepa B, 30 u.e.) y <i>G. sordulenta</i> (33 u.e.) en respuesta a diferentes condiciones de cultivo. _____	98
Tabla 7. Fotomorfogénesis en <i>Grifola gargal</i> , cepas A y B (A) y en <i>G. sordulenta</i> (B) en respuesta a tratamientos lumínicos. _____	100
Tabla 8. Tiempo (días) transcurridos hasta el crecimiento de una colonia fúngica de 5 cm de diámetro en <i>Grifola</i> spp. y <i>Ganoderma lucidum</i> en medios de cultivo diferenciales conteniendo MYPA modificado (M), ácido gálico (G), ácido tánico (T), azure B (A) y poly R478 (P). _____	109
Tabla 9. Máxima velocidad de crecimiento y de biotransformación de los colorantes en el medio de cultivo colonizado por <i>Grifola gargal</i> (cepas A, B y G9), <i>G. sordulenta</i> , <i>G. frondosa</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> (cepas 47 y S) cultivadas en cajas de Petri conteniendo medio basal MYPA modificado y medios Gálico (G) Tánico (T) azure B (A) y poly R478 (P). _____	113
Tabla 10. Tiempo (días) transcurridos hasta el inicio en la presentación de exudados y/o agregados en <i>Grifola</i> spp. y <i>Ganoderma lucidum</i> en medios de cultivo diferenciales conteniendo MYPA modificado (M), ácido gálico (G), ácido tánico (T), azure B (A), poly R478 (P). _____	114
Tabla 11. Tiempo (días) transcurridos para el crecimiento de una colonia fúngica de 5 cm de diámetro. _____	115
Tabla 12. Resultados de las reacciones de revelado con colorantes realizada a los 44 días de crecimiento, tiempo en el que la colonia alcanza 5 cm de diámetro. _____	117

Capítulo III

Tabla 13. Composición de los medios de cultivo usados para <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> . _____	126
Tabla 14. Comparación del rendimiento de biomasa micelial (peso seco) entre las especies de <i>Grifola</i> estudiadas en relación al tipo de recipiente y volumen de medio. _____	141

Capítulo IV

Tabla 15. Composición de las fórmulas de sustrato para la obtención de <i>spawn</i> y valores de los parámetros usados para evaluar el crecimiento de micelio de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> mediante el TCL. _____	146
Tabla 16. Composición de las fórmulas de sustrato para la obtención de <i>spawn</i> preparado en botellas de 1 litro. _____	146
Tabla 17. TCL con <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> . _____	149
Tabla 18. Valores promedio de los granos colonizados por gramo fresco de <i>spawn</i> de <i>Grifola gargal</i> o de <i>G. sordulenta</i> . _____	151

Capítulo V

Tabla 19. Composición de los diferentes sustratos empleados en el TCL antes de la colonización por <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	164
Tabla 20. Contenido de fibras (FDN, FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en diferentes fórmulas (T1-T20), anteriores a la colonización por micelio de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> , expresado en % sobre la base de peso seco.	166
Tabla 21. Velocidad de colonización del micelio de <i>Grifola gargal</i> en diferentes sustratos determinada mediante el ensayo de test lineal.	167
Tabla 22. Variación del contenido de proteínas en el sustrato después de la colonización por micelio de <i>Grifola gargal</i> (valores promedios en Tabla 23).	174
Tabla 23. Variación de la actividad de lacasas en el sustrato después de la colonización por micelio de <i>Grifola gargal</i> (valores promedios en Tabla 23).	174
Tabla 24. Contenido de fibras (FDN y FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en sustratos de diferentes fórmulas de (T1-T20, 500 mg de sustrato seco de c/u), expresados en % sobre la base de peso seco, luego de 45 días de colonización por micelio de <i>Grifola gargal</i> .	176
Tabla 25. Variación entre el porcentaje final e inicial del contenido celular, fibras y cenizas luego de 45 días de colonización de sustratos (T1-T20) por micelio de <i>Grifola gargal</i> .	177
Tabla 26. Velocidad de colonización de micelio de <i>Grifola sordulenta</i> en sustratos de fórmulas diferentes (T1-T20) preparadas con cáscara de girasol, sustrato gastado remanente del cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , molidos o enteros y sus combinaciones, en ausencia o presencia de salvado de trigo (20%) determinada mediante el test de crecimiento lineal.	178
Tabla 27. Variación del contenido de proteínas en el sustrato después de 45 días de colonización por micelio de <i>Grifola sordulenta</i> (valores promedios en Tabla 26).	183
Tabla 28. Variación de la actividad de lacasas en el sustrato después de 45 días de colonización por micelio de <i>Grifola sordulenta</i> (valores promedios en Tabla 26).	183
Tabla 29. Contenido de fibras (FDN y FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en sustratos de diferentes fórmulas (T1-T20, 500 mg de sustrato seco de c/u), expresados en % sobre la base de peso seco, luego de 45 días de colonización por micelio de <i>Grifola sordulenta</i> .	184
Tabla 30. Variaciones entre el porcentaje final e inicial del contenido celular, fibras y cenizas luego de 45 días de colonización de sustratos por micelio de <i>Grifola sordulenta</i> .	185
Tabla 31. Fórmulas de sustrato para el crecimiento micelial de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> .	189
Tabla 32. Características físicas (densidad, pH, humedad relativa) de los sustratos previos a la colonización de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en el segundo TCL.	189
Tabla 33. Velocidad de colonización por micelio de <i>Grifola gargal</i> de diferentes sustratos a base de cáscara de girasol, a los 35 días de cultivo.	192
Tabla 34. Velocidad de colonización por micelio de <i>Grifola sordulenta</i> de diferentes sustratos a base de cáscara de girasol, a los 35 días de cultivo.	195
Tabla 35. Parámetros ambientales y operativos del cultivo de <i>Grifola frondosa</i> según otros autores.	199
Tabla 36. Composición de las fórmulas (F1-F3) de los sustratos para el cultivo de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en troncos sintéticos (g/100 gramos de sustrato).	201
Tabla 37. Cuadro resumen de las características principales de los ensayos de cultivo de <i>Grifola gargal</i> y <i>G. sordulenta</i> en troncos sintéticos, realizados separadamente.	201
Tabla 38. Parámetros ambientales y operativos del cultivo en las diferentes fases del crecimiento de <i>Grifola gargal</i> y de <i>G. sordulenta</i> cultivados en troncos sintéticos formulados a base de cáscara de girasol.	205
Tabla 39. Síntesis de los materiales y métodos sugeridos por la experimentación que se presenta en este capítulo para el cultivo de <i>Grifola gargal</i> (cepa A) y <i>G. sordulenta</i> (única cepa disponible) en sustratos formulados a base de cáscara de girasol.	224

Capítulo VI

Tabla 40. Caracterización por cromatografía en capa fina de compuestos antioxidantes observados en diferentes longitudes de onda y bajo la exposición de vapores de amonio.	232
Tabla 41. Caracterización por cromatografía en capa fina de compuestos antioxidantes observados en luz visible luego de las reacciones para revelado de fenoles y oligosacáridos.	232
Tabla 42. Rendimiento de las extracciones metanólicas de <i>Grifola</i> spp. (g cada 100 g de materia seca).	236
Tabla 43. Actividad de extinción de radicales libres (SR) de extractos metanólicos de <i>Grifola</i> spp.	238
Tabla 44. Poder reductor (PR) de extractos metanólicos de <i>Grifola</i> spp.	239
Tabla 45. Contenido de compuestos fenólicos en muestras conteniendo micelio de <i>Grifola gargal</i> , <i>G. sordulenta</i> y <i>G. frondosa</i> .	250
Tabla 46. Resultados del análisis de la cromatografía en capa delgada de las sustancias empleadas como patrones.	254
Tabla 47. Resultados del análisis de TLC de <i>Grifola gargal</i> .	255
Tabla 48. Resultados del análisis de TLC de <i>Grifola sordulenta</i> .	257
Tabla 49. Resultados del análisis de TLC de micelio de cultivo líquido de <i>Grifola frondosa</i> y harina de granos de trigo biotransformados por esta especie y la harina de granos de trigo control (WF).	259

Capítulo VII

Tabla 50. Mortalidad en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .	271
Tabla 51. Resultados obtenidos con el SMART eyes en <i>Drosophila melanogaster</i> bajo exposición crónica a diferentes tratamientos conteniendo bioformas de <i>Grifola gargal</i> , <i>G. sordulenta</i> y <i>G. frondosa</i> en presencia de DMBA.	272

Resumen

Los hongos son fuente de alimento y medicina desde tiempos remotos. Por su valor nutracéutico y como fuente de nutracéuticos se han utilizado para mantener y mejorar la salud, preservar la juventud y promover la longevidad. También son fuente de compuestos químicos bioactivos útiles para la preparación de productos farmacéuticos.

De las 700 especies de hongos comestibles investigadas, sólo unos 50 hongos tienen valor medicinal y entre ellos *Grifola frondosa* es uno de los más notables e investigados, especialmente como estimulador del sistema inmune y por sus propiedades antitumorales en la lucha contra el cáncer. En los bosques andino patagónicos de Argentina y Chile existen dos representantes del género *Grifola*: *G. gargal* Singer y *G. sordulenta* (Mont.) Singer, para los cuales no se ha investigado suficientemente sobre su biología y por lo tanto no se ha desarrollado aún una tecnología apropiada para su cultivo, como tampoco se han hecho estudios sobre sus posibles propiedades medicinales y aplicaciones no solo terapéuticas sino también biotecnológicas.

Por ello se investigó la factibilidad de cultivarlos en condiciones controladas y a su vez se profundizó en el conocimiento de distintos aspectos biológicos de interés. Por otra parte, la actividad medicinal hallada en políporos y en especial en *Grifola frondosa* apoya la formulación de la hipótesis que plantea también la presencia de actividad antioxidante y/o antigenotóxica en estas especies. La confirmación de tales propiedades es necesaria para sostener más investigación sobre su uso medicinal y resulta de importancia en la propuesta de posibles variedades de productos a partir de ellos, lo cual otorgaría un plus como valor agregado de estos hongos.

Para comprender aún más las condiciones de crecimiento de estas especies se realizaron cuatro campañas recorriendo diferentes bosques de robles del Parque Nacional Lanín. Allí, con la ayuda de residentes del lugar y micólogos, se pudieron recolectar fructificaciones sólo en determinados lugares, así como también se tomaron datos de las colonias en crecimiento y muestras de *G. gargal* causando podredumbre. Asimismo, se aislaron dos cepas (cepa B y G9) de *G. gargal*, una proveniente de un árbol en pie y otra tomada de un roble caído que llevaba más de 20 años produciendo fructificaciones. La historia de los bosques de roble, informada por otros autores, revela que durante la última glaciación fueron fragmentados y en consecuencia se desarrollaron procesos de variabilidad genética entre los mismos. Algunas de estas variables son el contenido y calidad de ciertos compuestos polifenólicos los cuales se sabe que son importantes en la biología de los hongos degradadores de la madera. En consecuencia esto indicaría una variabilidad entre cepas de los diferentes bosques de robles para *G. gargal*. Dos cepas, correspondientes a *G. gargal* (cepa A) y *G. sordulenta*, fueron obtenidas del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).

Hallar las condiciones óptimas en la producción de micelio y cuerpos fructíferos es un paso fundamental para la producción optimizada de los compuestos con valor nutricional, y como fuente de nutracéuticos y fármacos hipotéticamente presentes en estos hongos.

El análisis del crecimiento micelial de *G. gargal* y *G. sordulenta* en agar nutritivo reveló que para ambas especies, las mejores condiciones de cultivo fueron pH 4, 18°C y medio de cultivo MYPA

suplementado con 0,4% de cáscara de girasol en polvo. Así, fue posible disminuir el tiempo para la obtención de inóculo de excelente calidad y el cultivo de las cepas en este medio fue posteriormente utilizado en forma rutinaria para su mantenimiento y para su uso como inóculo. Los resultados presentados fueron analizados por una posible pérdida de vigor (luego de tres años de subcultivos) y se halló que ambas cepas no perdieron vigor y que además hubo una mejora en la velocidad de colonización por *G. sordulenta* y ello se puede explicar por haber desarrollado una adaptación a los ingredientes del medio, concluyendo que las condiciones de rutina empleadas fueron adecuadas para conservar su vigor por más de 12 subcultivos. El aumento en contenido de polvo de cáscara de girasol no modificó la velocidad de colonización de la cepa A de *G. gargal* por lo que no se justifica su aumento en el medio de cultivo por encima del 0,4 % para esta especie; no se encontraron diferencias en la velocidad de colonización entre las cepa A, B y G9.

Usualmente se observa en el stock de cepas de los laboratorios de micología que algunas cepas producen primordios y/o verdaderos cuerpos fructíferos un tiempo después que son almacenadas. Esto llevó a utilizar este método de cultivo *in vitro* en condiciones controladas para dilucidar los procesos que subyacen en la morfogénesis fúngica, *i.e.*: la diferenciación del micelio vegetativo a micelio reproductivo. Las observaciones realizadas con lupa y microscopio a *G. frondosa*, *G. gargal* y *G. sordulenta*, fueron comparadas con las observaciones realizadas por otros autores en la bibliografía hallándose algunas diferencias de importancia taxonómica en cuanto a velocidad de crecimiento, morfología de las colonias, cambios de coloración en el medio de cultivo y tipo de degradación de compuestos fenólicos, estudiada *in vitro*. El aspecto al microscopio de las hifas generativas, gloeopleuras, esqueletales, presencia de clamidosporas y estructuras cristaloides, también en comparación con las observaciones de otras investigaciones, indicó algunas diferencias que permiten conocer mejor la variabilidad entre cepas de estas especies.

El estudio de las formaciones morfogénicas *in vitro* de *G. gargal* y *G. sordulenta* fue útil para detectar cambios producidos en estos cultivos luego de aplicar diferentes condiciones lumínicas. La irradiación con luz blanca durante el crecimiento vegetativo de *G. gargal* previno una demora significativa del crecimiento de micelio en cajas de Petri causadas por temperaturas desfavorables (*c.a.* 21°C). Las diferentes condiciones de luz produjeron cambios en el metabolismo secundario y en la diferenciación morfogénica de los cultivos. La respuesta a estas condiciones lumínicas fue mayor en *G. gargal* que en *G. sordulenta*. Los resultados indicaron que ambas especies de *Grifola* fueron sensibles a la irradiación lumínica, con respuestas morfogénicas de distinto tipo e intensidad, si bien la luz blanca fue más efectiva. En ausencia del estímulo luminoso, ambas especies del género fueron capaces de mostrar eventos morfogénicos. En el caso de *G. gargal*, en presencia del estímulo luminoso, la cepa A fue más sensible que la B en la presentación de respuestas fotomorfogénicas. Estos resultados registrados para los distintos anchos de banda de irradiación lumínica son sugerentes de la participación de más de una molécula fotorreceptora.

Para estimar la capacidad ligninolítica *in vitro*, se cultivó *G. gargal* y *G. sordulenta* en medios diferenciales conteniendo diferentes compuestos fenólicos. Para fines comparativos y para poder

extrapolar los resultados al cultivo, resultó útil realizar este estudio en forma simultánea con otras dos especies poliporales que tienen una buena performance en fermentaciones en estado sólido empleando cáscara de girasol como sustrato: *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum* (dos cepas). El estudio reveló la expresión de enzimas polifenol oxidasas en diferentes momentos del crecimiento y con diferentes patrones. Se sugiere que una de estas sería la enzima lignina peroxidasa (LiP). En otro estudio se verificó la actividad de lacasas. Asimismo, la presencia de la enzima con actividad de Mn-peroxidasa (MnP), fue también detectada, ya que en presencia de 20 ppm de Mn(II) en sustratos a base de cáscara de girasol la velocidad de crecimiento micelial fue mayor; asimismo en el caso de *G. sordulenta* causó un aumento en la densidad micelial aparente. En otro análisis similar se estudió el crecimiento de estas especies en medios diferenciales conteniendo diferentes fuentes de carbohidratos para determinar la actividad de la enzima celobiosa deshidrogenasa. El crecimiento fue en todos los casos moderado a bajo. Se determinó que *G. gargal* crece mejor en xilulosa y pectina, lo cual indicaría una preferencia por la fracción hemicelulósica de los sustratos. *Grifola sordulenta* por su parte, crece bien en celulosa y xilulosa y presentó actividad de la enzima celulosa deshidrogenasa. La velocidad de crecimiento y la densidad de la colonización en los medios de carbohidratos fue mayor en las colonias de *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum* superando a *G. gargal* y *G. sordulenta* que si bien crecieron en todos los medios, mostraron menor habilidad para colonizarlos. Por lo cual ambos estudios en medios diferenciales mostraron una menor performance *in vitro*, lo cual permitió prever un desempeño regular a bajo al extrapolar estos resultados al cultivo en sustratos basados en cáscara de girasol.

En algunas especies el cultivo de micelio en medios líquidos ofrece ciertas ventajas como reducción de las pérdidas por contaminación, utilización de espacios más reducidos, y fácil recolección de la biomasa y de los metabolitos disueltos en el medio. Se realizaron cultivos de *G. gargal* y *G. sordulenta* en medio líquido agitado empleando Erlenmeyers de 250 ml y 500 ml, y frascos de 3 l, así como también en medio líquido estacionario empleando fuentes de vidrio de 4 l. Se compararon los diferentes sistemas considerando el trabajo que requiere cada técnica y la cantidad de biomasa que produce. Para *G. gargal* se encontró favorable el cultivo en frascos de 3 l, y para *G. sordulenta* en Erlenmeyers de 250 ml, obteniéndose una biomasa de 4 y 18 g/l en 20 días de cultivo, respectivamente. En ambas especies la temperatura óptima para este cultivo fue de *c.a.* 18°C. En este trabajo se determinó que la suplementación con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y/o vitaminas o aminoácidos, o sólo con bencilaminopurina (0,1-10 mg/l) a los medios de ambas especies no incrementa significativamente la biomasa. Por otra parte, mediante el empleo de inóculo homogeneizado se consiguió disminuir la variabilidad dentro de los tratamientos en comparación con el uso de discos de micelio cultivado en agar como inóculo. Los diferentes protocolos suministraron material micelial con diferentes cualidades para ensayar posteriormente las propiedades antioxidantes de estas especies.

El *spawn* en granos es el material que se emplea para inocular grandes masas de sustrato en el cultivo de hongos. La evaluación del crecimiento de micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta* mediante el bioensayo de crecimiento lineal de Duncan (1997) reveló que ambas especies pueden ser cultivadas en

granos de trigo, girasol, maíz y combinaciones de trigo con mijo y maíz con girasol; se determinó que el mejor crecimiento se logra para ambas especies con el cultivo en granos de trigo en el rango de pH de 5,3 a 6,4. La colonización completa de los granos de trigo, según la técnica de producción habitual en botellas de un litro, se produce más rápidamente a 24°C, en comparación con el crecimiento del micelio en medios semisólidos y líquidos (*c.a.* 18°C). En el cultivo en granos no se hallaron diferencias en el número de botellas que completaron la colonización a los días 25 y 30. Para ambas especies y para todos los tipos de granos, la mayor proporción de botellas colonizadas se observó a los 30 días. Considerando la cantidad de granos por gramo de *spawn*, el empleo de granos de trigo es el más indicado.

Se empleó el test de crecimiento lineal de Duncan para evaluar la velocidad de colonización, la densidad aparente, el incremento del contenido de proteínas y de actividad de lacasas, y la degradación de fibras de *G. gargal* y de *G. sordulenta* en 20 formulaciones de sustrato a base de cáscara de girasol. Seguidamente se realizó otro ensayo para estudiar el efecto de ciertos suplementos en la velocidad de colonización y densidad aparente en 10 formulaciones más. Con la información recolectada se puede afirmar que ambas especies pueden crecer en estos sustratos, que la cáscara de girasol no necesita suplementos, como salvado o sustrato gastado de *Pleurotus ostreatus*, para sostener un buen crecimiento del micelio.

Para *G. gargal* la colonización mejoró con un tratamiento ácido del sustrato, o con el agregado de cofactores enzimáticos (Mn(II) y Zn(II)), o de otras fuentes lignocelulósicas como roble, álamo o paja de trigo; para *G. sordulenta* se encontró que la colonización mejora sólo en cuanto a la densidad con un tratamiento ácido del sustrato, o con el agregado de cofactores enzimáticos (NH₄(I), Mn(II) y Zn(II)).

Con el establecimiento de un cultivo axénico de *G. gargal* y *G. sordulenta* sobre troncos sintéticos artificiales empleando cáscara de girasol como sustrato, se encontró que ambas especies pueden colonizar bien el sustrato, si bien con un ciclo productivo más extenso y mayor riesgo de contaminación *a posteriori* que para otras especies cultivadas con la misma técnica. La inducción con choque térmico a 5°C produjo una sensible inducción de primordios, y se lograron algunas fructificaciones. El intercambio gaseoso es crucial para el desarrollo de los basidiomas, como era esperable según los antecedentes registrados en la literatura sobre la producción de *G. frondosa*. La secuencia de producción de ambas especies en las diferentes etapas es similar a la de *G. frondosa*: primordios granulares grises, que luego se diferencian en fructificaciones que se suceden en formas conocidas como *cerebro*, *coliflor* y *racimo*.

Las propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de cuerpos fructíferos, micelio de cultivo líquido y/o de cultivo de granos de trigo fueron analizadas en cuanto a sus propiedades de extinción de radicales (radical DPPH), y poder reductor, asimismo también se comparó el contenido de compuestos fenólicos y se caracterizaron los extractos metanólicos con la técnica de cromatografía de capa delgada. Los resultados hallados permitieron conocer las propiedades antioxidantes de *G. gargal* y *G. sordulenta*. Estas especies resultaron poseer muy buenos atributos antioxidantes, especialmente poder reductor. Las

diferentes bioformas de micelio y también las formas de cultivo modifican cuali y cuantitativamente el contenido de antioxidantes causando variaciones en la actividad secuestrante de radicales y en el poder reductor. También se encontró que el micelio puede ser inducido a modificar su contenido en antioxidantes usando reguladores de crecimiento vegetal, y que la variación en el contenido de una propiedad antioxidante es independiente de la producida en otra propiedad antioxidante. La actividad antioxidante se debió en parte a la presencia de compuestos fenólicos pero no fueron los únicos compuestos activos. El análisis de cromatografía de capa delgada reveló además que la mayoría de los compuestos antioxidantes eran de naturaleza polar, en éstos siempre se hallaron las características de revelado correspondientes a compuestos fenólicos, y además en algunas bandas también se reveló la presencia de flavonoides. Por su parte los metabolitos apolares se observaron en todos los cromatogramas de los extractos. En algunos casos podría asociarse a compuestos fenólicos, mientras que en otros podría deberse a metabolitos no fenólicos. En *G. sordulenta* se halló que la actividad antioxidante estuvo parcialmente asociada a compuestos flavonoides.

Las propiedades antígenotóxicas de cuerpos fructíferos y micelio de cultivo líquido de *G. gargal*; así como las harinas de granos de trigo fermentados con *G. gargal*, *G. sordulenta* y/o *G. frondosa*, fueron estudiadas con el test de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*. El agente químico utilizando para causar las mutaciones (promutágeno) fue el DMBA (7-12-dimetilbenzo(α)antraceno). Con el estudio de la toxicidad de DMBA en distintos tratamientos pudo observarse un incremento en la mortalidad de las larvas de 9 a 45%, sin embargo cuando se agregaron los extractos fúngicos esta mortalidad disminuyó. La mutación y recombinación se evaluó como el número de *spots* blancos por cada cien ojos, mostrando un aumento en la frecuencia en aquellos tratamientos que contenían DMBA, y una disminución en los co-tratamientos conteniendo ambos: DMBA, y extractos fúngicos en el siguiente orden: fructificación de *G. gargal*, las tres harinas de granos colonizados y micelio de cultivo líquido de *G. gargal*. Se concluyó que el material evaluado resultó no tóxico *per se* y en combinación con el promutágeno y procancerígeno DMBA pudieron disminuir su mortalidad y la genotoxicidad. La respuesta protectora de los materiales fúngicos activó mecanismos de detoxificación en la larva de *D. melanogaster* que pueden ser desmutagénicos o bioantimutagénicos, y que fueron causados por ciertos compuestos bioactivos presentes en estos hongos superiores con actividad antígenotóxica como p.e. fenólicos, ácido linoleico, polisacáridos y polipéptidos.

Luego de demostrar la ausencia de genotoxicidad, las propiedades antioxidantes y las propiedades antígenotóxicas de *G. gargal* y *G. sordulenta*, aun es necesario realizar estudios adicionales sobre la producción de cuerpos fructíferos por medio de la fermentación en estado sólido, y así facilitar su disponibilidad para su consumo como alimento. Hasta entonces una alternativa es la producción de micelio y metabolitos por medio del cultivo líquido. Finalmente, en un apartado final de la tesis se muestra información del contenido mineral y de diferentes nutrientes analizados en muestras de micelio, fructificaciones y granos de trigo colonizados, y como una novedad con potencial

biotecnológico se sugiere la obtención de una harina de trigo colonizado por estos hongos para ser empleada como un alimento funcional.

Summary

As of ancient times, fungi have been and still are a source of food and medicine. Due to their nutraceutical value, they have been used to maintain and improve health, preserve youth and promote longevity. They are also a source of bioactive chemical compounds, which are, in turn, useful for the preparation of nutraceutical and pharmaceutical products.

Of the 700 edible mushroom species investigated to date, only 50 have medicinal value. Among these 50 is *Grifola frondosa* which is one of the most thoroughly investigated, particularly as a stimulator of the immune system and for its antitumoral properties. *Grifola gargal* Singer and *G. sordulenta* (Mont.) Singer, two representatives of the genus *Grifola*, in the andean patagonian forest in Argentina and Chile, have not been fully studied to date. Nor have their medicinal properties with their corresponding therapeutic applications been investigated.

The purpose of this Ph. D. thesis was therefore to study the possibilities of cultivating *G. frondosa* under control conditions. On the other hand, the medicinal activity observed in polypores, particularly in *G. frondosa*, gives support to the hypothesis on the presence of antioxidant and /or antigenotoxic activity in these species. Confirming such properties is absolutely necessary to conduct further research in favor of its medicinal properties and to promote the proposal of possible varieties of products derived from them, which would, in turn increase the value of these fungi.

To further learn about the growth conditions of these species four campaigns were done in the oak forests located within Lanín National Park. With the help of mycologists and people living in the area, fruiting bodies were collected. Growth data and samples of rotting *G. gargal* were also collected. Two new strains (strain B and G9) of *G. gargal* were isolated, one from a standing tree and another from a fallen oak which had been producing fruits for a period longer than 20 years. Previous research on the history of oak forests reveals that during the last ice age they were fragmented, thus inducing the development of processes of genetic variability. Some of these sources of variability variables are the content and quality of certain polyphenolic compounds which are known to be important in the biology of fungal decomposers of wood. This could therefore be indicative of variability among different strains of oak woodlands to *G. gargal*. Two strains, corresponding to *G. gargal* (strain A) and *G. sordulenta*, were obtained from the Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).

Reaching to the optimal conditions for the production of mycelium and fruiting bodies is key to the optimized production of compounds with nutritional, nutraceutical and also as a source for nutraceuticals and pharmaceuticals hypothetically present in these fungi.

Analysis of mycelial growth of *G. gargal* and *G. sordulenta* on nutrient agar medium revealed that for both species, the best culture conditions were pH 4, 18 ° C and culture medium supplemented with 0.4% MYPA of sunflower husk powder. It thus took shorter time to obtain high quality seed and

cultivation of strains in this medium was subsequently used routinely both for its maintenance and use as inoculum. Results were analyzed by a possible loss of vigour (after three years of subcultures) and showed that both strains did not lose vigour and that there was a higher rate of colonization in *Grifola sordulenta* which could be due to the fact that they adapted to the ingredients of the medium, thus indicating that the routine mycelium growing conditions followed were adequate to maintain its force for more than 12 subcultures. On the other hand, the increase in the content of sunflower husk powder (0.4 %) did not alter the rate of colonization of strain A to *G. gargal*. This indicated that there is no need in increasing the amount of this supplement in this species. It was also observed that there were no differences in the rate of colonization between strain A, B, and G9.

It has been observed that in stock strains of mycology laboratories some strains produce primordia and/or real fruitbodies after they are stored. This led us to use the method of *in vitro* culture under controlled conditions to deep on the processes underlying fungal morphogenesis, i.e the differentiation of vegetative mycelium to reproductive mycelium in these species. Observations of *G. frondosa*, *G. gargal* and *G. sordulenta* under a magnifying glass and microscope were compared with observations by other researchers. These comparisons revealed some differences in taxonomic significance in terms of growth speed, colony morphology, colour changes in the culture medium and type of degradation studied *in vitro*. The comparison of the microscopic appearance of generative hyphae, gloeopleuras, skeletal, presence of chlamydospores and crystalloid structures with observations from other researchers showed differences which will contribute to better understanding of the variability among strains of these species.

The study of the *in vitro* morphogenic differentiation of *G. gargal* and *G. sordulenta* was useful as it helped detect changes in these crops after applying different light conditions. Irradiation with white light during the vegetative growth of *G. gargal* prevented a significant delay in growth of mycelium in Petri dishes, originated from unfavourable temperatures (c.a. 21 ° C). The different light conditions produced, in fact, changes in secondary metabolism and morphogenic differentiation of cultured mycelia. Compared to findings from a study conducted in colonies grown in Petri dishes which had completed their vegetative growth in darkness and had received a thermal shock, in our study the effect of these environmental conditions was greater on *G. gargal* and similar on *G. sordulenta*. This indicates that both species of *Grifola* are sensitive to light irradiation with different morphogenic response type and intensity while white light is more effective. In the absence of light stimulus, both species of the genus were found to have the ability to show morphogenic events. In the case of *G. gargal*, strain A was observed to be more sensitive than B in the presentation of photomorphogenic responses. These results reported for different bandwidths of light irradiation are indicative of the involvement of more than one photoreceptor molecule.

Grifola gargal and *G. sordulenta* were cultured in differential media containing different phenolic compounds in order to estimate ligninolytic ability *in vitro*. For comparative purposes and in order to extrapolate results to their cultivation, this study was carried out simultaneously with two other species of poliporales which exhibit a good performance behave naturally in solid state

fermentation when using sunflower husks as main substrate. The study revealed polyphenol oxidase enzyme expression at different times and with different growth patterns. It is suggested that one of these could be the enzyme lignin peroxidase (LiP). It was further verified the activity of laccases. Mn-peroxidase (MnP) activity was presumably present because it was also detected in other strains of *G. gargal* and because addition of Mn (II) increased the rate of colonization with *G. gargal* cultivation on sunflower husk as substrate and aspect was better in *G. sordulenta*. Growth of these species in differential media containing different carbohydrate sources was also studied in order to determine the activity of the enzyme cellobiose dehydrogenase. In all cases, growth ranged from moderate to low. It was found that *G. gargal* grows best in xylulose and pectin, which could be indicative of a preference for the hemicellulosic fraction of the substrates. In contrast, *G. sordulenta* was observed to grow well on cellulose and xylulose and evidenced cellulose dehydrogenase activity. Growth rate and density of colonization on media containing carbohydrates was higher in colonies of *G. frondosa* and *Ganoderma lucidum*, being even higher than those of *G. gargal* and *G. sordulenta* which, although they grew in all media, evidenced lower ability to colonize them. Both studies in differential media showed a lower *in vitro* performance, thus preannouncing a regular to low growth performance when these results were extrapolated to crop-based substrate sunflower husk.

In some species the mycelium growing in liquid media have the advantage of reducing losses due to culture, the use of smaller spaces, and allow for an easy harvesting of the biomass and recovery of the metabolites dissolved in the medium. Cultures of *G. gargal* and *G. sordulenta* were carried out in agitated liquid medium using 250 and 500 ml Erlenmeyers flasks, and 3-liter bottles, as well as in liquid medium sources using 4-liter glass containers. Different systems were compared considering the work involved in each technique and the amount of biomass produced. *Grifola gargal* culture was carried out in 3-liter glass flasks and *G. sordulenta* was carried out in 250 ml Erlenmeyers flasks, yielding a biomass of 4 and 18 g/l after 20 days of culture, respectively. In both species, optimum temperature for this crop was c.a. 18 °C. In this work it was also determined that supplementation with different plant growth regulators and/or vitamins or aminoacids, or benzylaminopurine alone (0.1-10 mg/l) to the media of both species does not significantly increase biomass. Moreover, the use of homogenous inoculum reduced variability within treatments with respect to the use of disks of mycelium grown on agar as inoculum. The fungal material obtained from this work provided mycelial with different qualities to further test the antioxidant properties of these species.

Grain spawn is the material used to inoculate large number of substrates in mushroom cultivation. The evaluation of mycelial growth of *G. gargal* and *G. sordulenta* by linear growth bioassay of Duncan (1997) revealed that both species can be cultivated in grains of wheat, sunflower, corn and wheat combinations with millet and corn with sunflower. It was also observed that optimum growth is achieved for both species when cultivation of wheat grains is in the pH range of 5.3 to 6.4. The full colonization of grains of wheat, following the production technique in traditional 1 liter bottles, occurs more rapidly at 24 °C, compared with the growth of mycelium in semisolid media and liquid (c.a. 18 °C). In grain cultivation there were no differences in the number of bottles that completed the

colonization by days 25 and 30. For both species and for all types of grains, the largest proportion of substrates in bottles was colonized after 30 days. Considering the number of grains per gram of spawn grains, using wheat is best recommended.

Duncan linear growth test was used to assess the substrate mycelia colonization rate, bulk density, increased protein content and laccase activity, and fiber degradation produced *G. gargal* and *G. sordulenta* in 20 formulations based substrate sunflower husk. Another test was further conducted to study the effect of certain supplements on the colonization rate and apparent mycelial density in 10 formulations. Taken together, findings from our study support the conclusion that both species grow in these substrates, that sunflower seed husks needs no supplements such as bran or *Pleurotus ostreatus* spent substrate to sustain regular growth of the mycelium. For *G. gargal* colonization was found to improve with an acid treatment of the substrate or with the addition of enzyme cofactors (Mn (II) and Zn (II)), or other lignocellulosic sources such as oak, poplar, wheat straw. For *G. sordulenta* colonization was found to improve only in terms of mycelial density with an acid treatment of the substrate, or with the addition of enzyme cofactors (NH₄ (I), Mn (II) and Zn (II)).

The axenic culture of *G. gargal* and *G. sordulenta* on artificial synthetic logs using sunflower husks as substrate showed that both species can colonize the substrate, but with a longer production cycle and increased risk of contamination in relation to other mushroom species with the same technique. The thermal shock induction of 5 °C produced a significant induction of primordia and produced some fructifications. Gas exchange is crucial to the development of basidiomas, as expected based on previous research on the production of *G. frondosa*. The production sequence of both species at different stages is similar to that of *G. frondosa*: gray granular primordia that grow into fruitbodies of brain shape, then cauliflower shape and finally cluster flower.

The antioxidant properties of methanolic extracts of fruiting bodies, mycelium from liquid culture and/or wheat grains were analyzed in terms of their radical scavenger properties (DPPH radical) and reducing power. The content of phenolic compounds was compared and methanol extracts were characterized using thin layer chromatography. It was thus possible to learn more about the properties of *G. gargal* and to confirm them for the first time in the case of *G. sordulenta*. These species have antioxidant reducing power properties. Different bioforms of mycelium and also different culture systems modify forms of qualitative and quantitative antioxidant content causing variations in radical scavenger activity and reducing power. In other words, the mycelium can be induced to change their antioxidant content using plant growth regulators and variability in the content of antioxidant property is independent of that produced in other antioxidant property. Antioxidant activity was found to be due in part to the presence of phenolic compounds but it was not the only active compound. Thin layer chromatography also helped to show that the majority of antioxidant compounds were polar, in these were always revealed the presence of phenolic compounds, and in some bands, also the presense of flavonoids. Non-polar metabolites were observed in all chromatograms of extracts. In some cases they could be associated with phenolic compounds while in others could be associated to non-phenolic metabolites. In *G. sordulenta* it was found that the antioxidant activity was preferentially associated to

flavonoid compounds.

Antigenotoxic properties of fruiting bodies and mycelia from liquid cultures of *G. gargal*, as well as grains of wheat flour fermented with *G. gargal*, *G. sordulenta* and/or *G. frondosa* were also studied to test somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. The chemical agent used to cause mutations (promutagen) was DMBA (7-12-dimethylbenz (α) anthracene). Research on toxicity revealed that treatment with DMBA increased larval mortality from 9 to 45%. Still, when fungal extracts were added larval mortality rate decreased. Both mutation and recombination were assessed as the number of white spots per hundred eyes, showing an increased frequency in the treatments with DMBA, and a decrease in co-treatments with both: DMBA and fungal extracts in the following order: *G. gargal* fruiting body, three grain meals colonized and *G. gargal* liquid culture mycelium. It could be concluded that the material evaluated was not toxic and that in combination with procarcinogenic promutagenic DMBA both mortality and genotoxicity decreased. The protective response observed with fungal materials triggered detoxification mechanisms in *D. melanogaster* larvae which could be either desmutagenic or bioantimutagenic and which could be produced due to some bioactive compounds present in higher fungi with antigenotoxic activity, such as phenolics, linoleic acid, polysaccharides and polypeptides.

Summing up, findings on the absence of genotoxicity and antioxidant and antigenotoxic properties, in the fungal species studied in this Ph.D. thesis, will be greatly benefited from further research on the optimization of both species for the production of fruiting bodies through fermentation in the solid state. In the meantime, the production of mycelia and metabolites in liquid culture medium is the alternative for such optimization. A final section of this Ph.D. thesis includes information on the mineral content of different nutrients which were analyzed in samples of mycelium and fruiting bodies and colonized wheat grains. A novelty with biotechnological potential derived from this section concerns the obtention of wheat flour colonized by these fungi, which evidenced factibility of being used as functional nutrient.

Palabras claves

Grifola gargal, *Grifola sordulenta*, cultivo de hongos silvestres, medios de cultivo, actividad antioxidante, actividad antigenotóxica, actividad antitumoral, alimentos funcionales.

Capítulo I

Introducción general

1.1. Hongos comestibles y medicinales

Los hongos superiores o macromicetos han sido parte de la vida del hombre desde tiempos inmemoriales empleándose como alimento y medicina. En la era paleozoica ya había una considerable biodiversidad en el reino *Fungi*, con representantes en su mayoría acuáticos. En el período silúrico comenzaron a aparecer los hongos terrestres, y luego en el período devónico (hace 400 millones de años) y antes que aparecieran los árboles existieron los protaxites, hongos de seis metros de altura (Boyce *et al.*, 2007; Sherwood-Pike, 1991). Aproximadamente en el 5300 A.C. (*Mesolítico*) se registra la utilización de los hongos por los humanos (Zjawiony, 2004).

La utilización tradicional de los hongos se ha transmitido de generación en generación en diferentes culturas y hasta nuestra época. Cientos de años de uso tradicional suministraron las pistas sobre su potencial medicinal, y hace relativamente poco tiempo que los científicos en todo el mundo están investigando los mecanismos biológicos por los que se les atribuyen estos efectos positivos sobre la salud (Wasser, 2002).

Los denominados “hongos” o “setas” son las fructificaciones de los macromicetos correspondientes a las clases basidiomicetes (basidiocarpos) y ascomicetes (ascocarpos). En estas estructuras ocurre la meiosis y producción de esporas sexuales (haploides). En condiciones ambientales propicias, las esporas se desarrollan en hifas que crecen y se ramifican degradando la materia orgánica que usan como sustrato. Si ocurre la unión de dos hifas haploides compatibles (plasmogamia) crecen las hifas dicariontes que en determinadas condiciones formarán los carpóforos. Éstos son comestibles cuando además de ser carnosos y palatables no presentan riesgo alguno para la salud. También existen especies con carpóforos leñosos, no palatables, cuyos metabolitos se consumen en infusiones, concentrados, licores, polvos, tónicos, alcoholitos, sopas y fórmulas herbáceas (Mizuno *et al.*, 1995).

1.2. Aspectos nutraceuticos, nutricéuticos, farmacéuticos y cosmeceuticos

Muchos hongos que se cultivan como alimento también se consideran *alimentos funcionales*. Con este nombre se incluyen productos potencialmente saludables, alimentos modificados, o con algún ingrediente que proporciona beneficios más allá de los nutricionales (Sadler y Saltmarsh, 1998). Los objetivos globales del estudio científico de estos alimentos proponen: i) identificar interacciones beneficiosas entre la presencia o ausencia de un componente del alimento (macronutriente, micronutriente o no-nutriente) y una función o funciones específicas en el cuerpo; y ii) entender sus mecanismos para apoyar hipótesis a ser tratadas en protocolos pertinentes para el estudio humano.

Un alimento, por ejemplo un hongo, o fracción del mismo se considera *nutracéutico* cuando además de sus propiedades nutritivas conlleva valor medicinal o sea tiene propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida y

científicamente comprobadas. Los *nutricéuticos*, o suplementos dietarios se refieren a extractos de alimentos parcialmente purificados, que se cree proporciona beneficios para la salud; son mezclas crudas de compuestos extraídos con agua caliente o preparados como licores y alcoholitos. No deben confundirse con los *farmacéuticos* (fármacos) que casi invariablemente son una preparación que contiene un compuesto químico definido, con especificaciones, por lo cual están listados en la farmacopea (Chang, 1996). Los *cosmecéuticos* son nutricéuticos aplicados en y para el beneficio de la piel (Draelos, 2005). Por último, varios compuestos presentes en los hongos medicinales son considerados como inmunonutrientes (Philpott y Fergusson, 2004).

Ciertas enfermedades se asocian a dietas no saludables, y visto desde el lado opuesto, muchas enfermedades se tratan con dietas saludables. El consumo de determinadas hortalizas y frutas (consideradas alimentos funcionales) son recomendaciones habituales para enfermedades crónicas, cáncer, enfermedades relacionadas con el sistema circulatorio y para el envejecimiento (Chang, 1996; Mandel *et al.*, 2005). Cada día es mayor la cantidad de personas conscientes de los efectos críticos de la dieta en la salud, y de la ingestión regular de estos nutra o nutricéuticos para reforzar la respuesta inmune del cuerpo, aumentando la resistencia a las enfermedades y en algunos casos logrando la regresión de la enfermedad (Jong y Birmingham, 1990).

Actualmente, casi todos los hongos medicinales importantes se cultivan artificialmente, lo cual ha removido la limitación, en cuanto a su disponibilidad desde fuentes naturales, que originaban los períodos de escasez. Por otro lado, a partir de los cultivos controlados, se asegura la exactitud en la identificación y la fiabilidad y consistencia de los productos medicinales derivados que son estandarizados.

Cabe destacar que existen estudios químicos que han revelado que la concentración de nutrientes y de principios activos en los hongos está relacionada con el tipo de cepa utilizada en unión a otras exigencias específicas para el crecimiento fúngico, como ser: factores nutricionales (sustancias esenciales para el desarrollo: carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales), factores abióticos (humedad del compost y de la cobertura, temperatura, luminosidad, oxígeno, productos químicos en el aire, concentración de CO₂), factores bióticos (virus, bacterias, hongos, nematodos, ácaros e insectos), y factores inherentes al procesamiento (cosecha, secado/deshidratación y almacenamiento) (Chang y Miles, 2004).

1.3. Hongos políporos

Los políporos (filum: Basidiomycota, clase: Basidiomycetes, subclase: Agaricomycetidae) son un grupo de hongos altamente polifilético cuyos integrantes son reconocidos por el tamaño grande de sus basidiomas y la configuración poroide del himenóforo (Binder y Hibbett, 2002; Rajchenberg, 2006). Asimismo, son un grupo diverso en cuanto a los caracteres microscópicos, biológicos y funcionales y su rol principal como degradadores del leño de los árboles los ha transformado en elementos fundamentales de la dinámica y de la sanidad de todo tipo de bosque (Rajchenberg, 2006). Los políporos son una de las mayores fuentes de compuestos biológicamente activos, y uno tras otro, han

mostrado poseer una o varias propiedades medicinales, *i.e.* metabolitos antimicrobianos; sustancias citotóxicas, antineoplásicas e inmunomoduladoras; inhibidores de la agregación plaquetaria; hipoglucemiantes; inhibidores de la peroxidación de lípidos y varios antioxidantes; insecticidas y nematocidas por mencionar algunas de sus actividades (Zjawiony, 2004). Los políporos más cultivados son: *Grifola frondosa* (maitake), *Auricularia judea* (hongo oreja), *Flammulina velutipes* (enoki) *Cordyceps sinensis* (caterpillar fungus), *Ganoderma lucidum* (reishi) e *Hypsizygus marmoreus* (bunashimeji) (Wasser y Weis, 1999).

En la década de los 60 se realizaron las primeras investigaciones sobre los efectos antitumorales de extractos de varias especies de hongos, siendo los polisacáridos los principales componentes activos, específicamente β -D-glucanos (Ikekawa *et al.*, 1969). En 1965, en Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (conocido previamente como *Coriolus versicolor*). Un polisacárido-péptido de este hongo con el nombre de “Krestin” fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El Krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteínas (Hiroshi y Takeda, 1993). En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anticáncer en Japón, con ventas por 350 millones de dólares (Mizuno, 1999). Un producto similar se desarrolló en China con otra cepa de *Trametes versicolor*, bajo el nombre “peptide” (Rau *et al.*, 2009). En la **Tabla 1** se presentan algunos hongos políporos y los compuestos extraídos de los mismos y que se encuentran a la venta. Los polisacáridos son la fracción con mayor actividad biológica, presentes en todas estas especies.

Tabla 1. Algunos políporos y sus compuestos patentados. Fuente: Wasser y Weis, 1999.

Especies	Triterpenoides	Polisacáridos	Proteínas	Ácidos	Otros
<i>Ganoderma lucidum</i>	×	×	×	×	
<i>Ganoderma applanatum</i>	×	×			
<i>Ganoderma tsugae</i>	×	×	×	×	
<i>Schizophyllum commune</i>		×			
<i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>		×	×		Ergosterol
<i>Dendropolypurus umbellatus</i>		×			
<i>Hericium erinaceus</i>		×			Cyathane
<i>Inonotus obliquus</i>		×			Ligninas
<i>Grifola frondosa</i>		×	×		

1.4. El género *Grifola*

Shen (2001) menciona para este género 13 especies e indica que tres presentan propiedades medicinales. En revisiones posteriores, se listan 47 especies y 54 variedades (Kirk, 2010; Mycobank, 2010). Las relaciones filogenéticas de *G. sordulenta* con *G. frondosa*, *Polyporus umbellatus* y *Meripilus giganteus* (= *G. gigantea*) fueron estudiadas con herramientas moleculares por Shen (2001). Este autor propuso que *P. umbellatus* y *G. sordulenta* comparten un ancestro común con *G. frondosa* y menciona que *G. frondosa* está relacionado con *Laetiporus portentosus* y con *M. giganteus*. Las relaciones entre estas especies basadas en estudios filogenéticos realizados mediante secuenciación de

ADN permanecen aún sin resolver (Rajchenberg, 2006).

Por otra parte, en base a las características morfológicas, *G. sordulenta*, *M. giganteus* y *G. umbellata* son muy similares y también podrían estar relacionadas filogenéticamente. Shen (2001) argumenta que la clasificación basada en morfología microscópica se ve dificultada por algunos caracteres como el septado secundario engrosado en las células de la base de las fructificaciones que se confunde con la presencia de fíbulas y el sistema hifal que puede ser monomítico o dimítico. Este autor concluye que una mejor comprensión de la historia evolutiva de estas especies ayudaría al entendimiento de sus propiedades medicinales. Más recientemente Harada (2007) encuentra, mediante la secuenciación de los ITS-ADNr, que existe una similitud del 99% entre *G. gargal* y *G. sordulenta* y propuso que estas dos especies formen un clado separado de *G. frondosa*, con el cual comparten un 96% de la secuencias del ITS-ADNr.

Por sus propiedades medicinales y organolépticas *G. frondosa* (maitake) es el más apreciado del género con una producción superior a 300.000 toneladas, y Japón como el principal productor. Otras especies que se consumen en menor proporción, *G. gigantea* y *G. umbellata*, se han reportado como inhibidoras del crecimiento de tumores en ratones (Mizuno y Zuang, 1995; Ying *et al.*, 1987). Tales hallazgos llevaron a científicos de prestigio a investigar las propiedades medicinales de este género (Wasser y Weiss, 1999). Varios estudios realizados con *G. frondosa* - fruto entero fresco, seco en polvo y micelio de cultivo líquido - indican que este hongo tiene actividad medicinal como anti-viral, anti-bacteriano y anti-parasitario, regulador de desórdenes cardiovasculares y de la presión sanguínea, anti-diabético, y modulador del sistema inmunológico (Mizuno y Zhuang, 1995; Royse y Guardino, 1997). El polisacárido primario responsable de su actividad medicinal (β -1,6 glucano con una cadena lateral β -1,3) se conoce con distintos nombres: *Grifolan*, fracción MD y grifon-D (Kodama *et al.*, 2003). Si bien ha habido adelantos significativos en el conocimiento de los componentes activos en *G. frondosa*, aún se requiere investigar más sobre las propiedades medicinales de este hongo, los beneficios potenciales, el mecanismo por el que los componentes mencionados ejercen su actividad farmacológica, las enfermedades y síntomas contra los que ellos son eficaces y las dosis necesarias para el beneficio de los pacientes. Además de los polisacáridos, *G. frondosa* es fuente de otras moléculas bioactivas como es el caso de los polifenoles con actividad antioxidante (Mau *et al.*, 2002; Dubost *et al.*, 2007).

La dosificación de *G. frondosa* se ha determinado mediante ensayos realizados en animales. Hobbs (1995) estableció que la dosis oral de polisacáridos (fracción D) de *G. frondosa* que resulta efectiva como inmunopotenciador y antitumoral en ratones es de aproximadamente 0,75 mg/kg de peso. Considera que aunque es difícil comparar la actividad en ratones y humanos, asumiendo la misma actividad, significaría que una dosis comparable de la fracción D es de 47 mg para una persona de 70 Kg, y esa cantidad está presente en 12 g de fruto seco de *G. frondosa* (la cantidad de polisacárido es de alrededor de 4 mg/g de fruto seco). Las dosis comerciales contenidas en cápsulas son de 300 mg, y deben suministrarse durante 3 meses para observar los efectos en los parámetros de laboratorio (Bianchi, 2008).

No existen informes o trabajos en publicaciones científicas sobre efectos colaterales negativos del *G. frondosa* en las dosis recomendadas así como tampoco con el consumo del hongo fresco en cantidades razonables. En el sitio MedlinePlus (<http://www.enotalone.com/article/9345.html>) se puede hallar más información obtenida por agencias gubernamentales de salud (NLM, NIH entre otras) de productos derivados de *G. frondosa*.

Algunos productos a base de *G. frondosa* se han estandarizado, es decir se realiza la obtención y luego la preparación con protocolos que garanticen la reproducibilidad en su composición, es decir con poca variación en la composición de los bio-productos (y por ende en la actividad). Debido a la escasa investigación en humanos, no se conoce qué dosis son seguras o efectivas, por ello no se recomienda la toma de cualquier forma del hongo, entero, en cápsulas, tabletas o extracto líquido por menores de 18 años. Debido a que reduce la tensión arterial, las personas que toman antihipertensivos deben ser cautelosas; asimismo como *G. frondosa* reduce el nivel de azúcar en sangre, también deben ser precavidos quienes tienen diabetes o hipoglucemia y aquellos que ingieren drogas, hierbas o suplementos que afectan la glucosa sanguínea, deben monitorear su nivel de glucemia y ajustar la medicación según resulte necesario, según criterio médico. Finalmente, no se conoce sobre la seguridad de *G. frondosa* durante el embarazo y la lactancia, por lo tanto en esos estados no se recomienda su ingesta.

2. *Grifola gargal* y *G. sordulenta*

En los bosques andino-patagónicos de Argentina y Chile, se han hallado y descrito dos especies endémicas del género *Grifola*: *G. gargal* y *G. sordulenta* (Singer, 1969). Son apreciadas como alimento por las poblaciones nativas y sus propiedades nutraceuticas aún no han sido estudiadas (Rajchenberg, 2002). Dado que estos hongos se recolectan en época de invierno, donde la accesibilidad al bosque es muy limitada, es importante hallar las condiciones óptimas para el cultivo de micelio y de las fructificaciones para la producción de los compuestos con valor nutricional, nutraceutico, cosmeceutico y farmacológico hipotéticamente presentes en estos hongos. El cultivo también evitará el eventual impacto negativo en el equilibrio ecológico del bosque autóctono que provocaría la recolección intensiva de los basidiomas. El estudio de macromicetos silvestres busca establecer sus propiedades biológicas, su comestibilidad, y la ausencia de toxicidad. Así se facilita la introducción de nuevas variedades al mercado de hongos comestibles y medicinales.

2.1. *Grifola gargal*

Grifola gargal Singer, se encuentra en árboles de roble pellín, *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. En la **Figura 1** se indican los sitios donde se ha informado su recolección. Cabe mencionar que Harada (2007) obtiene para su tesis ejemplares de *G. gargal* en lugares como “Los Ángeles”, “Valdivia”, “Osorno” y “Chiloe” (Chile), pero no da referencias precisas del lugar de recolección.

El roble pellín es un árbol monoico, caducifolio de hasta 40-50 m de altura y 2 m de diámetro, se lo encuentra en bosques templados de la Argentina (desde los 36,5 a 43° Sur) y Chile, (desde los 32,50

a 41,3 ° Sur). Crece en suelos profundos y fértiles y hasta los 2.000 m de altitud; en ocasiones forma bosques puros en zonas de 700-3.000 mm de lluvias anuales. Esta especie se considera dentro de los *Nothofagus* que forman bosques tibios-templados (Heuser, 1984). Las diversas condiciones de su crecimiento han influenciado la amplia variación genética de sus bosques (Donoso *et al.*, 2004). Su madera varía de tonos blanco-amarillento en ejemplares jóvenes, tornándose rojiza en los árboles adultos.

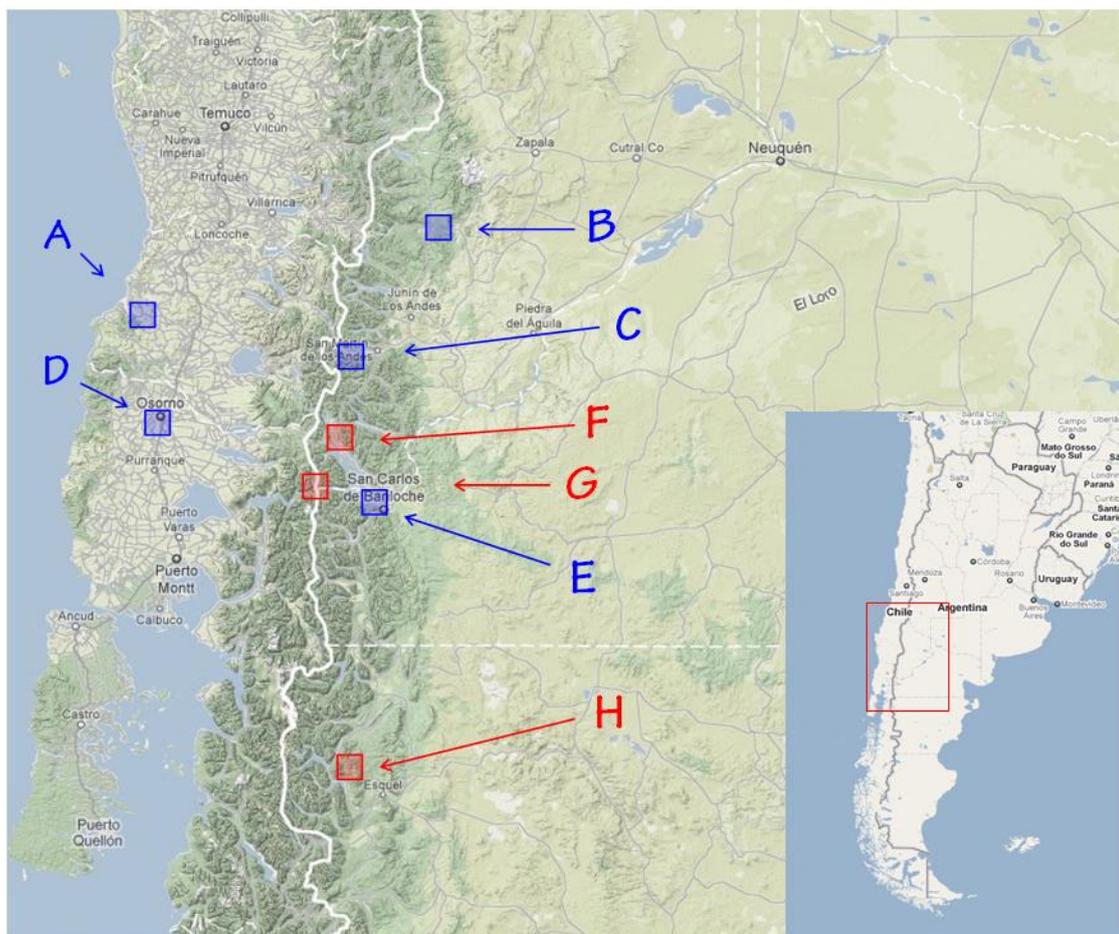
Grifola gargal causa podredumbre blanca tanto en árboles en pie como en árboles caídos, sin constituirse esto en un problema grave de sanidad. Una característica de la podredumbre es que posee un agradable olor almendrado tanto en las fructificaciones como en el tronco. En la **Figura 2** se muestran imágenes de fructificaciones y primordios de *G. gargal* tomadas en el Parque Nacional Lanín durante distintas campañas de recolección en el desarrollo de esta tesis.

En los árboles en pie se encuentran fructificaciones desde 1 m hasta los 5 m en el fuste o en alguna de las ramas. Los lugareños denominan simplemente “palo *gargalero*” al árbol en donde encuentran este hongo. En los árboles caídos genera fructificaciones anualmente, y se conoce el caso de un árbol caído de *c.a.* 0,9 m de diámetro y 8 m de largo con basidiomas anuales durante más de 20 años (**Figuras 2B-G**). Cabe destacar que recientemente se encontró una fructificación de *G. gargal* creciendo en un álamo *Populus nigra* (Pozzi *et al.*, 2009), lo cual constituye el primer antecedente de la colonización de *G. gargal* en una especie diferente a *N. obliqua*.

El ciclo biológico de *G. gargal* comienza cuando las basidiósporas se liberan desde las fructificaciones al aire. Estas células haploides son originadas en un himenóforo de poros angulares, alargados a foliosos, lamelados. En políporos la dispersión de las esporas ocurre principalmente por acción del viento y la colonización puede ocurrir en las heridas de un árbol en pie, sobre el fuste principal entre 1 m y 5 m de altura, sobre las ramificaciones (**Figura 2A**) o sobre un árbol caído (**Figuras 2C-G**). La **Figura 2B** muestra la parte del árbol que se mantuvo en pie, que a diferencia de la parte caída en el suelo, no presenta fructificaciones. Las basidiósporas germinan y durante un período crecen como micelio haploide hasta que las hifas de distintas polaridades sufren plasmogamia de la que surge un micelio dicariótico. El micelio dicariótico continúa creciendo en el duramen (tejido xilemático) del roble pellín causando una pudrición blanca (obsérvese un detalle de la podredumbre en la **Figura 2C y D**). El micelio dicariótico se reconoce al microscopio por la presencia de fíbulas, clamidosporas e hifas gloeopleuras (en el capítulo II.B se muestran detalles de estas estructuras).

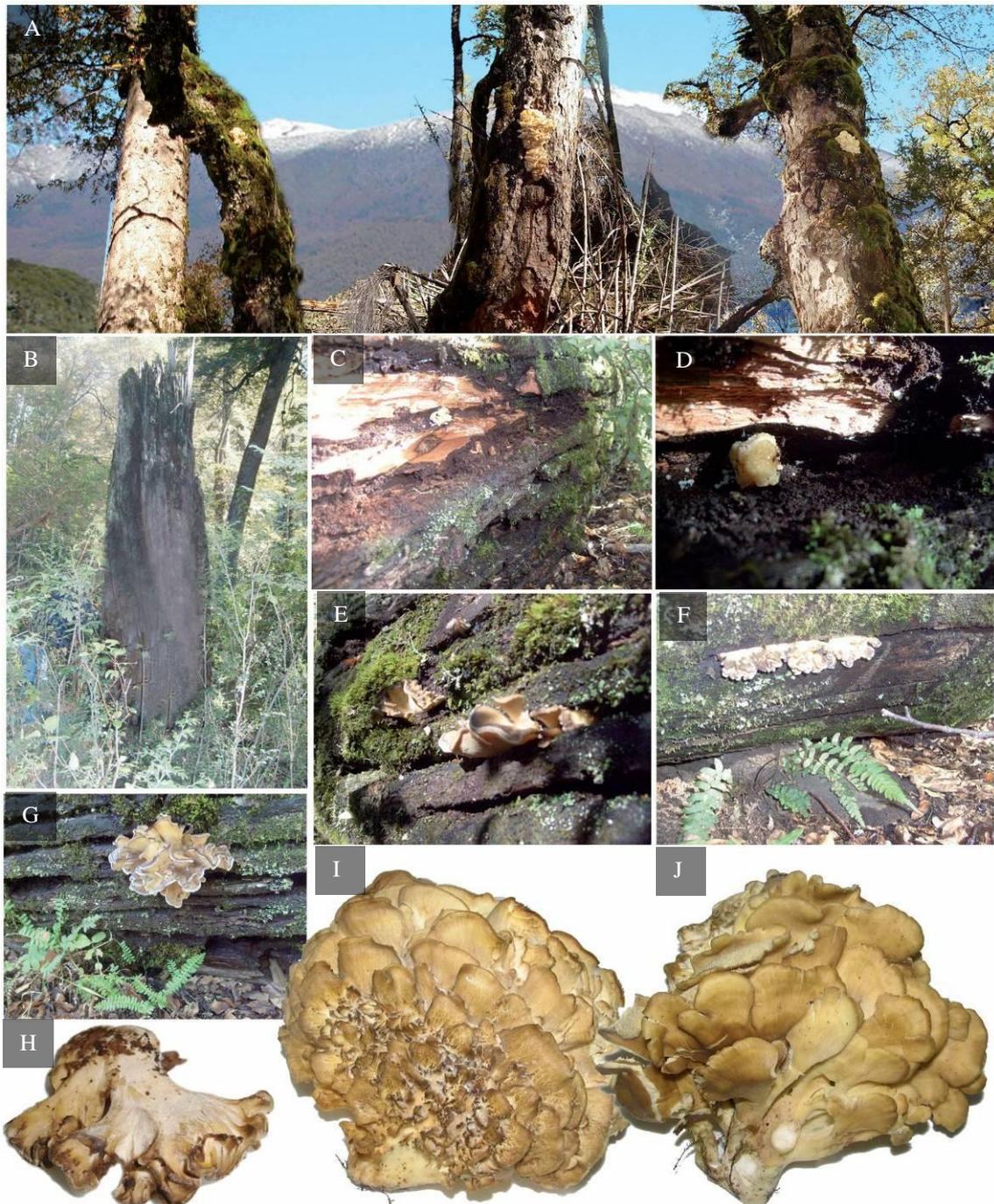
En condiciones naturales los primordios comienzan a formarse entre los meses de abril y junio y si las condiciones para la fructificación se mantienen favorables, se generan basidiomas de distintos tamaños. Éstos son semejantes a plantas de lechuga-repollo y pueden ser pequeños (como una esfera de 10 cm de diámetro) medianos (con 30 cm de diámetro) y grandes (de forma irregular de 60 cm de alto 40 de ancho y sobresaliendo 30 cm de la superficie del troco); el peso húmedo alcanza los 12 kg. Las fructificaciones son fuente de alimento de larvas de insectos de la familia *Mycetophilidae* (*Díptera*) (ver más abajo la **Figura 6**).

Figura 1. Sitios donde fueron halladas y descritas fructificaciones de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*.



Especies	Referencia en el mapa	Cita bibliográfica
<i>Grifola gargal</i>	[A] Cordillera Pelada, 15 km NE de “El Mirador”, y en la zona del “Monumento Nacional Alerce Costero”, Chile.	Singer, 1969; Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 1999
	[B] Parque Nacional Lanín, “Lago Quillén”, Argentina.	Rajchenberg, 2002
	[C] Parque Nacional Lanín, “Lago Queñi”, zona del “Río Chachín” y puesto de guardaparque “Pucará”, (Argentina).	Rajchenberg, 2002; <i>esta tesis</i>
	[D] Osorno, bosque templado, Chile.	Brujin <i>et al.</i> , 2008
	[E] Bariloche, “Península San Pedro”, Argentina	Pozzi <i>et al.</i> , 2009
<i>Grifola sordulenta</i>	[F] Parque Nacional Nahuel Huapi, “Península Quetrichué”, Argentina	Rajchenberg 2002
	[G] Parque Nacional Nahuel Huapi, “Puerto Blest”, y ciudad de Bariloche, Argentina.	Rajchenberg 2002
	[H] Parque Nacional Los Alerces, “Lago Menéndez”, Argentina.	Rajchenberg 2002

Figura 2. *Grifola gargal* fructificaciones y primordios. **A:** fructificaciones observadas en la ramificación principal (izquierda), en el fuste principal a 1 m del piso (centro) o en el fuste principal a 5 m de altura (derecha). Las imágenes **B-F** fueron tomadas de un tronco de roble pellín caído al suelo (**C-F**) y restos del árbol en pie (**B**). Las fructificaciones se hallaron sólo en la parte caída. Las imágenes **C-F**, muestran los primeros estadios de las fructificaciones (primordios) y las imágenes **I y J** corresponden a basidiomas medianos recolectados en este árbol.



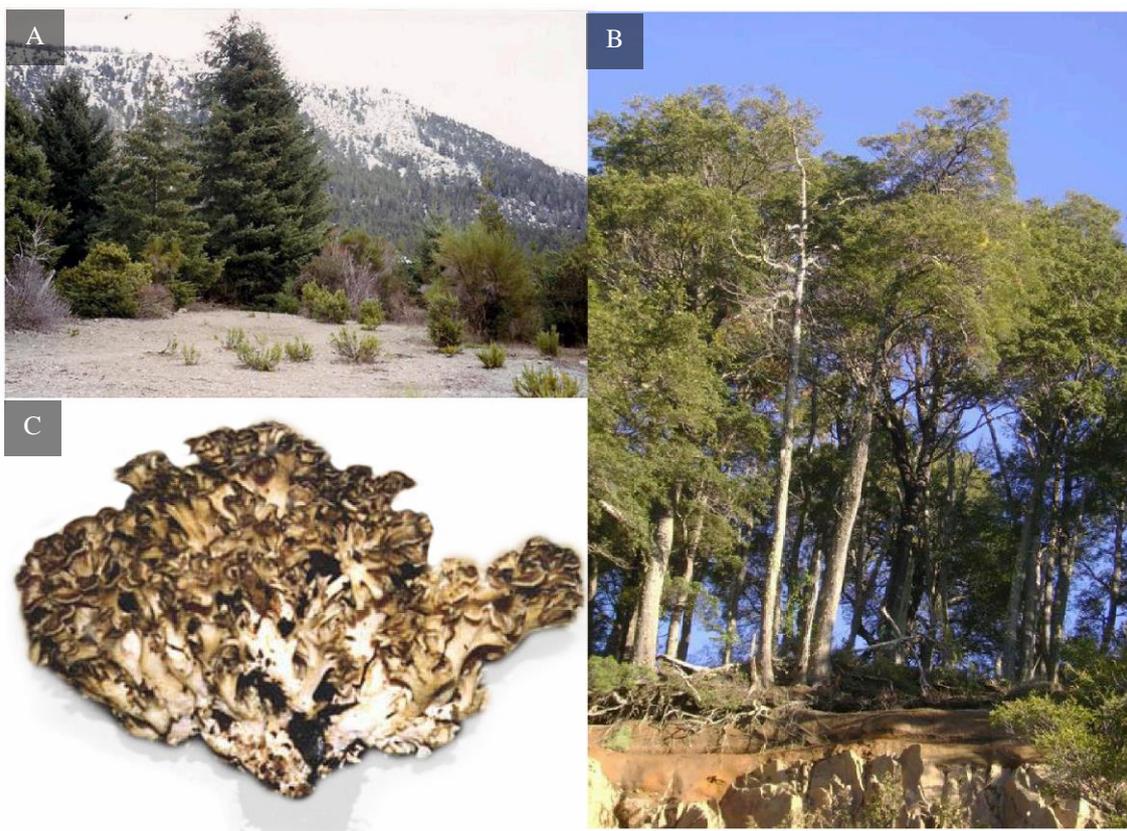
2.2. *Grifola sordulenta*

Grifola sordulenta (Mont.) Singer es una especie menos conocida que coloniza las raíces de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst (coihue) (**Figuras 3A y B**). Así como en el caso de *G. gargal*, su fitopatogenicidad no ha sido aún evaluada críticamente (Rajchenberg, 2006). En las campañas de recolección realizadas en el Parque Nacional Lanín no se hallaron fructificaciones de esta especie, por lo que los datos de su crecimiento en condiciones naturales fueron interpretados desde las fuentes bibliográficas disponibles.

Los especímenes descritos en ellas se recolectaron entre el 15 de marzo y el 8 de mayo. El coihue se encuentra hasta los 1.200 m sobre el nivel del mar en Argentina (38-43° Sur) y Chile (35-47° Sur). Es un árbol monoico, de hojas perennes, que crece hasta los 45 m de altura y puede alcanzar los 3 m de diámetro, es tolerante a bajas temperaturas y puede formar bosques puros (Heuser, 1984). *Grifola sordulenta* causa podredumbre blanca a las raíces del coihue y fructifica sobre el suelo o la base de los troncos. A pesar de la amplia distribución del coihue, las fructificaciones de *G. sordulenta* fueron solamente descritas en Argentina en los bosques de los lagos Menéndez y Nahuel Huapi.

Durante el otoño, las fructificaciones de *G. sordulenta* (**Figura 3C**) liberan basidiósporas que son dispersadas por el viento. Las basidiósporas se originan desde un himenóforo color blanco-crema dentro de los túbulos de 1-2 mm de diámetro, angulares a lamelares. Cuando estas células haploides impactan sobre el sustrato adecuado germinan originando una colonia de micelio haploide primario en la que más tarde ocurre plasmogamia con otra colonia de polaridad diferente produciéndose el micelio secundario. Este se reconoce por la presencia de fíbulas. Para perseverar en condiciones adversas la colonia de micelio puede generar estructuras de resistencia diploides: las clamidosporas. En la época de fructificación el micelio posee acumulados los nutrientes que absorbió del sustrato y con el estímulo apropiado de las condiciones ambientales se inicia la formación de primordios que luego devienen en fructificaciones. Los basidiomas hallados y descritos hasta el momento son de 35 × 15 × 30 cm.

Figura 3. *Grifola sordulenta*, árboles de coihue (A y B) y fructificación (C).



3. Campañas de recolección

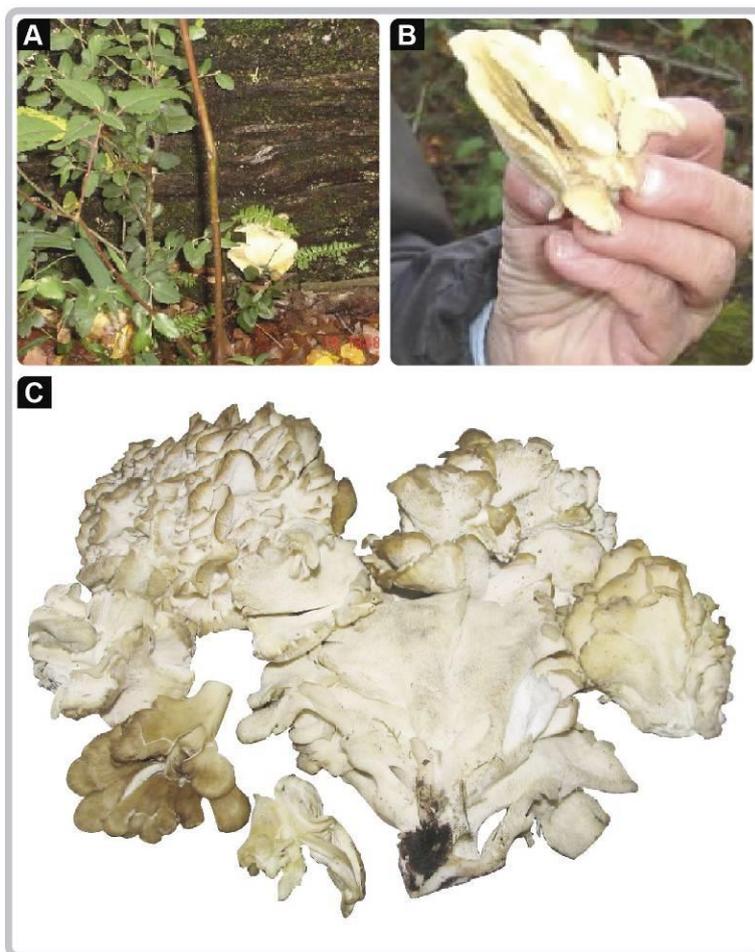
Para proceder a la recolección del material fúngico en áreas del Parque Nacional Lanín, se tramitó el permiso correspondiente ante autoridades del Parque Nacional Lanín (proyecto n° 851, seccional San Martín de los Andes). Las fructificaciones recolectadas de *G. gargal* se envolvieron cuidadosamente y se mantuvieron a baja temperatura. Posteriormente se congelaron y se transportaron hasta Bahía Blanca, donde fueron liofilizadas. Para la identificación de los especímenes se verificó: árbol hospedante, olor almendrado, descripción de la morfología del basidioma, observación de las basidiósporas y el contexto con floxina en microscopio óptico, determinándose la presencia de hifas gloeopleuras.

No se encontraron basidiomas de *G. sordulenta*. Los residentes de la zona consultados creían conocer este hongo, pero mencionaban que era muy difícil de encontrar.

3.1. Primera campaña de recolección

Siguiendo la experiencia y las indicaciones de los residentes, el 18 de Mayo de 2006 se realizó una campaña en las zonas del lago Lácar, península Yuco, sector del Río Chachín y paraje Pucará. En la península Yuco, se examinó *c.a.* de 4 ha y se halló una fructificación en mal estado, (15 ×15 ×10 cm, aproximadamente). En Pucará se encontró una fructificación nueva en un árbol caído (**Figuras 4A y B**) Conocedores del lugar mencionan que el mismo árbol presenta fructificaciones anualmente, y lo ha hecho así durante más de 20 años (**Figura 4C**).

Figura 4. Fructificaciones de *Grifola gargal* sobre *Nothofagus obliqua* halladas en un árbol caído. **A** y **B**: pequeña fructificación. **C**: cinco fructificaciones recolectadas por un residente en la semana previa a la primera campaña.



Finalmente, en la zona de bosque de *N. obliqua* aledaña a la cascada del río Chachín, 48°8'43"S - 71°39'31"O, se encontraron cuatro fructificaciones sobre árboles de esta especie distribuidas en un pequeño sector dentro de un área de 0,5 ha (**Figuras 5A-C**). Dos ejemplares estaban sobre el fuste principal y otros dos en la ramificación principal. Los árboles estaban cubiertos de musgos en la zona de la fructificación. A una distancia de *c.a.* 200 m del mismo sector se encontró una fructificación gigante ubicada en el fuste principal de un árbol a 1,5 m del suelo (**Figura 5D**). De esta fructificación se extrajo el inóculo de la cepa B (ver **Tabla 2**).

En cuanto al clima del lugar en esa época, era muy frío (-1°C a 8°C), con escarcha en las zonas abiertas y picos montañosos cubiertos parcialmente de nieve. El bosque era muy húmedo. Las primeras heladas ocurrieron en la última semana de abril. Las fructificaciones no mostraron una orientación hacia el polo norte o el polo sur, es decir la zona del tronco más seca o más húmeda de acuerdo con la incidencia normal de irradiación solar.

Durante la campaña también se observó la presencia de larvas en el contexto de *G. gargal*, que fueron recolectadas para su determinación taxonómica. Esta tarea se realizó en el Laboratorio de *Zoología de Invertebrados II* (UNS) y también con la colaboración de un especialista en la materia,

Kail Heller (Alemania). Los resultados de la identificación mostraron que las larvas pertenecían a la familia *Mycetophilidae* (*Diptera*). Los dípteros son uno de los grupos más diversos desde el punto de vista ecológico (Grimaldi y Engel, 2005) y uno de los taxa más abundantes en los bosques de *N. obliqua* (Berrios, 2002). La **Figura 6** muestra tres larvas halladas en *G. gargal*, varios miembros de esta familia de comedores de micelio han sido descritos en los bosques de *N. obliqua*, incluso en la zona de Pucará (Duret, 1989).

3.2. Segunda campaña de recolección

El 3 de Mayo de 2007 se realizó una segunda campaña, dado que se iniciaba la época de fructificación. Se recorrieron zonas en los alrededores de la cascada Chachín y no se encontraron fructificaciones. Tampoco hasta el momento se habían desarrollado las fructificaciones del árbol caído de *N. obliqua* que todos los años fructificaba. Finalmente, se encontró una fructificación en el camino Chachín-Pucará en un roble a 5 m de altura sobre una rama, en mal estado. Esta fructificación era pequeña, de 15× 10× 12 cm. Probablemente la ausencia de estos hongos se debió a la falta de acumulación de frío para la inducción de la fructificación, y que en caso del árbol caído mencionado resultó ser inducida aproximadamente un mes después.

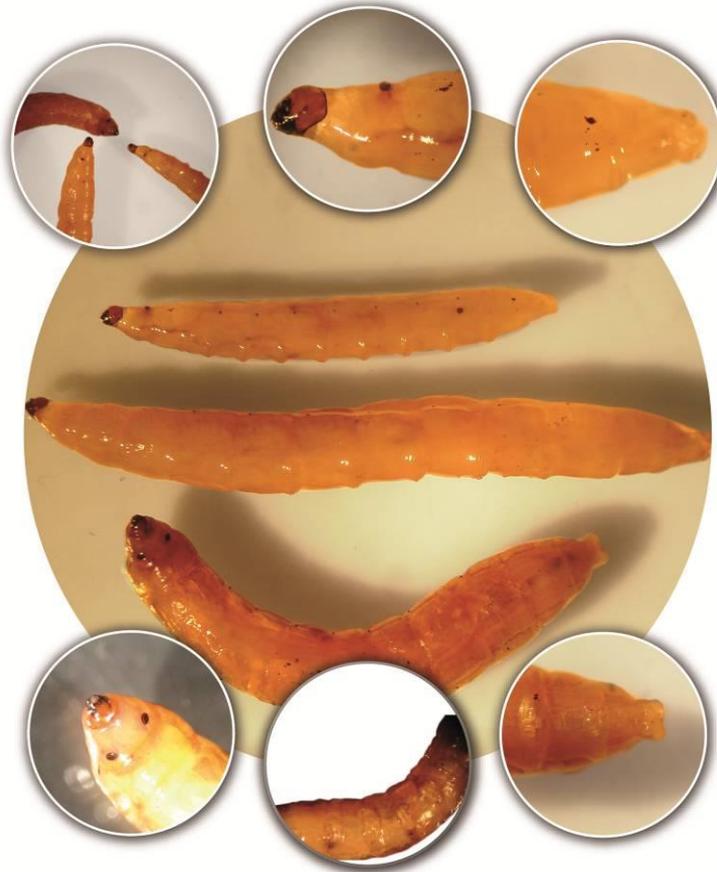
3.3. Tercera campaña de recolección

Comenzó el 10 de Mayo de 2008. Los especímenes del árbol caído fueron retirados y congelados por un residente en los días previos a la campaña. Ésta debió suspenderse dadas las malas condiciones del camino (intensas lluvias y nevadas) que tornaban peligrosa la exploración del lugar y sólo fue posible obtener los basidiomas recolectados por el mencionado residente.

Figura 5. Fructificaciones de *Grifola gargal* recolectadas en especímenes de *Nothofagus obliqua* en pie durante la 1ª campaña. **A:** basidioma en la ramificación principal; **B:** en el fuste principal (3 m de altura); **C:** sobre el fuste principal (4 m de altura); **D:** en el fuste principal a 1,5 m de altura.



Figura 6. Larvas de insectos de la familia *Mycetophilidae* (*Diptera*) halladas en el contexto de *Grifola gargal*. Larvas cilíndricas, con dos hileras paralelas de setas cortas en 9 bandas ventrales; cabeza pigmentada; un par grande de espiráculos dorsales en el protórax y 8 pares de espiráculos abdominales. En la figura del centro, de arriba hacia abajo miden: 16, 25, 21 mm respectivamente.



3.4. Cuarta campaña de recolección

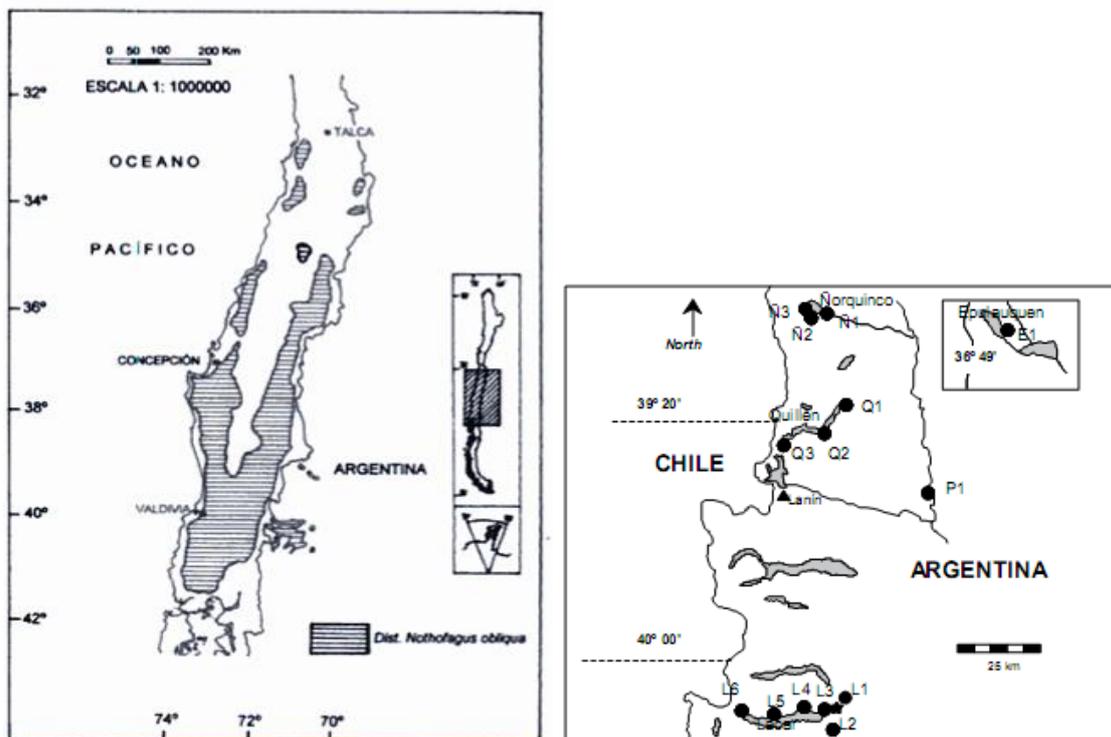
Fue realizada en la primera semana de Mayo de 2009. Hasta el momento no se habían producido nevadas pero sí heladas. Se recorrieron los bosques de *N. obliqua* y bosques mixtos de *Nothofagus* spp. (roble, raulí y coihue) y no se encontraron fructificaciones así como tampoco en la zona de la cascada Chachín. Nuevamente, en el árbol caído se encontraron primordios y fructificaciones pequeñas de *G. gargal* (**Figuras 2E-H**). De esta fructificación se hicieron varios aislamientos de los cuales cinco se lograron establecer satisfactoriamente. La cepa G9 es uno de ellos (**Tabla 2**).

3.5. Bosques de *Nothofagus obliqua*

En este punto vale enfocar la atención sobre la ubicación fitogeográfica de los bosques de *N. obliqua*, realizando una breve descripción de sus características. El roble, coyán, hualle o pellín, está distribuido entre los 33° y los 41° S, en la cordillera de la costa, depresión central y cordillera de los Andes, desde c.a.100-2000 m de altitud en el Norte y c.a. 0-500 m en el Sur en la república de Chile (**Figura 7**) (Donoso *et al.*, 2004). En Argentina se desarrolla entre los 36°50' en las lagunas de

Epulafquen y los 40°15'S en la cuenca del lago Lácar, a altitudes de 630-1.200 m (*ibíd.*). Los bosques de robles son diversos debido a su distribución amplia y en una geografía compleja que resultan en diferentes condiciones microclimáticas (Donoso *et al.*, 2004). En adición, las glaciaciones del cuaternario fragmentaron las poblaciones de *N. obliqua* y con esto se generaron procesos marcados de diversificación genética (Azpilicueta *et al.*, 2009); otro factor que interviene en la diferenciación genética es que puede formar híbridos naturales con el raulí (*N. nervosa*) (Gallo *et al.*, 1997).

Figura 7. Distribución fitogeográfica de los bosques de *Nothofagus obliqua* en Chile y Argentina. Fuentes: Donoso *et al.*, 2004 (izquierda) y Azpilicueta y Gallo, 2009 (derecha).



Como se mencionó anteriormente, las zonas donde se han encontrado especímenes de *G. gargal*, así como también su venta en mercados, corresponden a zonas costeras de Valdivia y la zona de Osorno en Chile. Si bien no está aclarada la procedencia de aquellos que se venden, se cree que pueden provenir tanto de la cordillera costera como de los valles centrales longitudinales o la cordillera de los Andes. Estas zonas se corresponden con los bosques chilenos de Cruces, Llancacura y Rupalco estudiados por Azpilicueta *et al.* (2009). En Argentina los bosques de robles son marcadamente más fragmentados (Donoso *et al.*, 2004) pudiéndose constatar la presencia de *G. gargal* en el lago Quillén, lago Queñi, río Chachín, Pucará, y Yuco, que se corresponden con los bosques Q1, L6 y L4, descritos por Azpilicueta y Gallo (2009). Entre estos bosques existe cierta cercanía genética en comparación con otros bosques donde aún no se ha determinado la presencia de *G. gargal* como Pilolil, Quila Quina, Epulafquen, Ñorquínco Pulmarí, y Ñorquínco.

La diferenciación entre poblaciones de *N. obliqua* es revelada por una gran variación de la calidad de los compuestos fenólicos (Donoso *et al.*, 2004), los cuales pueden influir en la degradación de la

madera que realizan estas especies ligninolíticas ya que los mismos poseen, en general, actividad funguicida. Posiblemente los procesos climáticos que incidieron en la variación intraespecífica y en la evolución de las poblaciones de *N. obliqua*, también pudieron causar una diferenciación paralela entre posibles poblaciones de *G. gargal*. En secciones posteriores se muestran las diferencias en las respuestas enzimáticas y el crecimiento en presencia de ácido gálico y tánico halladas en diferentes cepas de *G. gargal* que sustentan esta hipótesis.

3.6. ¿Baja capacidad de colonización, de competencia o de fructificación?

Durante las campañas realizadas, fue interesante observar que en el árbol donde se desarrollaron fructificaciones, éstas ocurrían en la parte caída y no en el tronco que quedó en pie, así como tampoco fue posible encontrar basidiomas en los robles más cercanos, y tampoco fueron hallados en años anteriores según información de residentes de la zona. Por otra parte, en la zona de Chachín se encontraron cuatro basidiomas en diferentes ejemplares de roble en un radio de 30 m, lo cual supone una posible relación entre determinados árboles y el hongo *G. gargal*, más allá de las condiciones ambientales. Es un hecho concreto que, si bien se conoce su presencia en los bosques y las épocas de fructificación, es una especie poco frecuente, al punto que los residentes del lugar han denominado a los árboles colonizados como “*palos gargaleros*”, haciendo referencia a que el árbol que ha sido colonizado produce fructificaciones año tras año, mientras que en el resto del bosque es muy difícil encontrar “nuevos *palos gargaleros*”, es decir que estacionalmente generen fructificaciones.

Contrariamente a este fenómeno selectivo, recientemente se informó que *G. gargal* colonizó y fructificó en un álamo (Pozzi *et al.*, 2009) lo cual permite suponer que la especie (o al menos la cepa en cuestión) tiene cierta capacidad de establecerse en hospedantes diferentes.

En el desarrollo de esta tesis, trabajando en condiciones de asepsia, el micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta*, creció sobre sustratos a base de trigo, girasol, maíz y cáscara de girasol, demostrando así su potencial para crecer en sustratos nuevos en ausencia de competidores. Cabe señalar que en todos los casos el crecimiento se manifestó más lento que el de otras especies ligninolíticas ensayadas en condiciones similares. También se observó que al exponerse al ambiente del cuarto de cultivo, se contaminaban de manera más rápida que las otras especies. Esto indicaría una menor capacidad competitiva ante otros microorganismos, lo cual explicaría en parte su baja incidencia, observada también en la naturaleza.

4. Madera y podredumbre

4.1. Madera de roble

En la **Figura 8** se muestran las características de la madera de *N. obliqua* (roble pellín). En la **Figura 8A** se muestra la sección sagital de la madera de *N. obliqua* donde pueden apreciarse los densos y finos anillos del crecimiento estacional, aparente por las diferentes gamas de coloración marrón rojiza. En las **Figuras 8B** y **C**, se muestran imágenes de un corte trasversal y otro longitudinal

del leño donde es claramente visible la gruesa albura, que resultó ser dura al corte, también se muestra una fina corteza que fue fácilmente separable. Asimismo pudo observarse que a medida que el tronco perdía humedad se formaron grietas radiales en el xilema y también que en la porción más íntima húmeda aparecía un color más rojizo que en las porciones exteriores (**Figura 8D**). Al obtener viruta con este material (**Figura 8E**), pudo percibirse un olor que recuerda a el ácido acético que difundía con el tiempo y se perdía a medida que las virutas se secaban.

El contenido de humedad de la viruta de este material fue del 40%. El pH de la viruta húmeda fue de 4; mientras que el la viruta después de secarse tenía pH 5. La pérdida de olor avinagrado simultáneamente con la elevación del pH estaría indicando la volatilización de compuestos orgánicos como el ácido acético y benzoico. Al conservar una muestra de madera en solución FAA (formol ácido acético-acetona) se solubilizan los taninos y otros compuestos, los que tiñen la solución del conservante de un color marrón oscuro intenso, lo cual es una indicación de la gran cantidad de compuestos fenólicos y polifenoles que impregnan el xilema y que no pertenecen al sólido esqueleto molecular de la lignina.

Figura 8. Madera de roble pellín (*Nothofagus obliqua*). **A:** sección transversal de la porción xilemática de un árbol de más de 80 años; **B:** corte transversal del tronco mostrando la porción xilemática y la albura; **C:** *idem* anterior mostrando la corteza; **D:** porción xilemática seca por el borde exterior y húmeda en su centro; **E:** viruta.



4.2. Madera de coihue

En la **Figura 9** se muestra la sección transversal (**Figura 9A**), y otra sagital (**Figura 9B**) de un tronco de coihue (*N. dombeyi*). En el corte transversal se observan los densos y finos radios de crecimiento de color crema-amarillo. Existen rajaduras paralelas al eje axial y radial. La albura de este tronco es angosta con una muy fina corteza (**Figura 9C**). Las virutas del xilema (**Figura 9D**) poseen un aroma intenso, picante semejante a cola de carpintero, barniz o vino pero sin olor avinagrado.

El contenido de humedad de la viruta fue de 30% y su pH 3,7; luego de secar la viruta se volvieron a medir los mismos valores, siendo entonces en ambos casos menores que en el roble. Este valor de pH sería indicador de la presencia de sustancias ácidas más fuertes que no desaparecen con el secado.

Figura 9. Madera de coihue (*Nothofagus dombeyi*). **A:** corte transversal del tronco mostrando la albura y xilema; **B:** corte sagital del tronco mostrando grietas en la porción xilemática; **C:** detalle de la corteza **D:** viruta.



4.3. Podredumbre del roble causada por *Grifola gargar*

La podredumbre blanca hallada en un árbol caído de *N. obliqua* producida por *G. gargar* se muestra en las **Figuras 10** y **11**. Este árbol corresponde al mencionado en la descripción de las campañas de recolección (ver en este capítulo el ítem 3.1.) que se caracteriza porque produce estacionalmente basidiomas. El aspecto superficial de la madera (**Figura 10A**) era agrumado, barroso,

húmedo, marrón oscuro, con presencia de fructificaciones de *Ascomycetes* y musgos. La podredumbre blanca de *G. gargal* se encontró en el seno de la madera (**Figuras 10B-C**) en haces longitudinales paralelos a las fibras visibles al microscopio de luz y formando pequeños agregados. Los sectores correspondientes a los radios de la madera estaban degradados, resultando así un tronco con un aspecto aserrado, lo cual puede apreciarse en la vista transversal (**Figura 10D**). Estos sectores se pudieron observar por debajo de 1 cm desde la superficie, después de retirar una porción de madera.

A partir del espacio perteneciente al radio del leño degradado se pudieron observar primordios (**Figura 10E**) con forma de muñón, del tamaño de una almendra o bien extendidos a lo largo del hueco radial en una longitud de 10 a 20 cm.

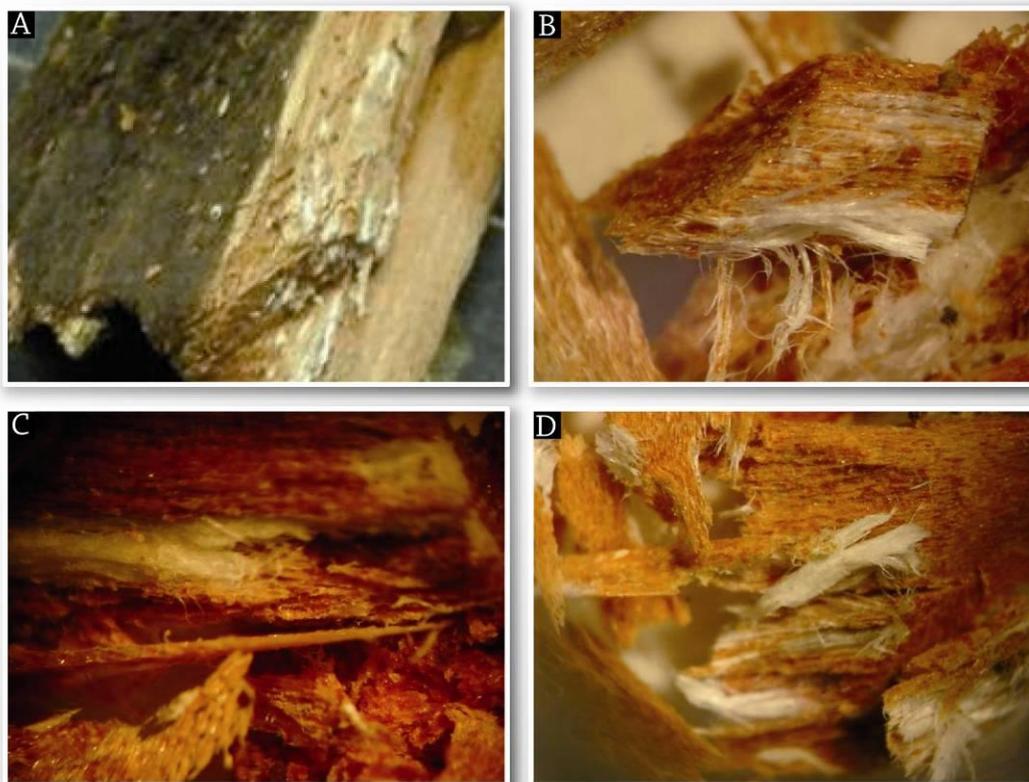
El interior de la podredumbre (**Figura 10F**) aparecía seco a la vista, y a pesar del tamaño de los basidiomas originados, no pudo apreciarse una gran degradación del leño, de hecho la madera conservaba su dureza. Al separar una porción del tronco con podredumbre emanaba el olor almendrado típico. Éste perdía su intensidad en el transcurso de 10 minutos. El micelio aislado de los primordios de este árbol se denominó cepa G9.

En un corte transversal del leño con pudrición blanca de *G. gargal* (**Figura 11A**) pudo observarse que los haces miceliales crecen en el seno de la astilla de madera, más que en la superficie, y no se encontraban donde la madera está expuesta (sección color marrón oscuro). Bajo la lupa (**Figuras 11B-D**) se aprecian las zonas degradadas, que son de aspecto grumoso y semejantes a borra de café de color marrón rojizo, con zonas más claras o más oscuras, diferente al color de la madera muy probablemente resultado de la degradación de la lignina y celulosa por las enzimas extracelulares secretadas por el micelio de *G. gargal*, aunque no se observaron en ellas tramas de hifas evidentes. Adyacente a estas zonas grumosas húmedas se encontraron fibras del micelio y leño colonizado de color blanco refringente. Probablemente el haz de fibras colonizadas actuaría como vía de transporte de nutrientes que vincula las zonas grumosas con el primordio en desarrollo, en una suerte de relación fuente destino. Estas características de cambios de coloración en las zonas grumosas respecto al resto de la madera también fueron halladas en el cultivo *in vitro* de estos hongos en los medios de ácido gálico y ácido tánico (ver en capítulo II.D el ítem 3.1.1.).

Figura 10. Podredumbre blanca en roble pellín (*Nothofagus obliqua*) causada por *Grifola gargar*. **A:** superficie de la madera, musgos, líquenes, fructificaciones de *Ascomycetes* y podredumbre con aspecto de borra de café (flecha). **B:** astilla quebrada mostrando en su seno la colonia de *G. gargar* (flecha), radios leñosos degradados (r) y primordio (p). **C:** astilla de 20 cm con micelio creciendo en haces longitudinales (flecha), pequeños agregados, y musgo. **D:** primordio (p) surgiendo entre dos astillas a una altura de 40 cm del suelo. **E:** detalle del primordio con forma de muñón semejante a una almendra. **F:** interior de una podredumbre con la madera conservando su dureza.



Figura 11. Detalles de la podredumbre blanca producida por *Grifola gargal* en un árbol de *Nothofagus obliqua*. **A:** corte transversal del leño con haces miceliales creciendo en el seno de la astilla de madera. **B y C:** pudrición color marrón rojizo con aspecto a borra de café, fibras de leño colonizado de color blanco refringente. **D:** fibras de madera y haces miceliales desagregados con una aguja.



5. Cultivo de hongos en Argentina

El cultivo en estado sólido de hongos, o fermentación en estado sólido, se define como el cultivo de hongos en materiales sólidos humedecidos en ausencia de fase líquida acuosa. Sus inicios se remontan al siglo XVII, con el sustrato compostado para el cultivo de *Agaricus bitorquis* (descomponedor secundario) y recién a partir del siglo pasado se usaron y difundieron técnicas de origen asiático para descomponedores primarios de la madera, como por ejemplo para *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes* (Chang, 1999a). Desde entonces, hubo un desarrollo en el conocimiento del cultivo tecnológico, que permitió llevar las condiciones naturales de crecimiento de los hongos en leños al cultivo en leños sintéticos y en la actualidad ya existen 200 especies de hongos comestibles cultivadas a nivel experimental y 60 a nivel comercial (Chang, 1999b; Chang y Miles, 2004).

Es así que ahora, los hongos se cultivan sobre sustratos formulados con material lignocelulósico de diversa índole y en condiciones ambientales controladas. La aplicación de estas técnicas se fue extendiendo a nuevas especies, generando un enorme potencial para la obtención no solo de alimentos, sino también de medicinas, de allí que Chang (1999a) acuñara la expresión de “revolución no-verde” al referirse fundamentalmente a la capacidad de biotransformación de los residuos agroindustriales en alimento.

En el caso de la Argentina, la producción comenzó en 1940 con el cultivo de los champiñones de París; hongos que actualmente conservan el liderazgo (94,5 %) seguido por los hongos ostra y otros (5,5%) (Curvetto *et al.*, 2004). En la última década del siglo pasado hubo un resurgimiento en la producción de hongos, apareciendo además de otras especies del complejo *Pleurotus*, los portobellos y el shiitake, probablemente como respuesta a la necesidad de nuevas posibilidades laborales y de diversificación productiva en el sector hortícola. Muy pocas universidades del país, UNS, UNSAM y de Neuquén, e instituciones superiores de investigación, CERZOS (CCT-CONICET, B. Blanca) e IIB-INTECH (CCT-CONICET, Chascomús), abordan el tema de la producción de hongos desde un enfoque científico-tecnológico, con nuevas propuestas para cubrir las necesidades de productores con escasos conocimientos. Más recientemente, se han formado asociaciones, como la *Cámara de Productores de Hongos del Sur* (Buenos Aires) y *Hongos de la Patagonia-Argentina* (Neuquén), que tienen como objetivo integrar a los productores, generar capacitación y promoción del consumo de hongos comestibles, fomentar el desarrollo tecnológico de la actividad con un mejoramiento permanente de la calidad y también facilitar la comercialización por parte de los productores asociados (Albertó *et al.*, 2010).

La búsqueda de nuevos sabores y propiedades medicinales es un incentivo para la investigación tendiente a la domesticación del cultivo de nuevas especies silvestres. Ello necesariamente implica el conocimiento de las condiciones ambientales y de las propiedades fisicoquímicas del sustrato en la naturaleza, para poder extrapolarlas al cultivo artificial de estos hongos. Este también es el caso de *G. gargal* y *G. sordulenta*, hongos que crecen en especies arbóreas del bosque andino-patagónico de nuestro país y que poseen un aroma y sabor singulares, además de propiedades medicinales (ver más adelante en esta tesis el estudio sobre sus propiedades antioxidantes y antígenotóxicas en los capítulos VI y VII) que justifican y alientan la investigación de tecnologías para su cultivo industrial. Hay que señalar que estas especies son muy difíciles de recolectar en sus hábitats naturales durante la época de fructificación, de allí la importancia de poder establecer su cultivo en condiciones controladas y eventualmente, poder disponer de ellos durante todo el año.

6. Cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*

Cada hongo requiere diferentes condiciones ambientales para su óptimo crecimiento, que deben conocerse con el propósito de producirlos eficientemente. Entonces se deben ajustar las variables nutricionales y ambientales que puedan limitar el crecimiento y fructificación del hongo, de manera que el sistema de cultivo artificial reproduzca el nicho ecológico en el cual se ha adaptado evolutivamente (Stevens, 2011).

La tecnología en el cultivo de hongos incluye diferentes fases y modalidades para las cuales los requerimientos para el crecimiento óptimo de estos organismos se estudian por separado. El cultivo en medios nutritivos semisólidos contenidos en envases como cajas de Petri permite el crecimiento rápido del micelio y se utiliza para propagar el mismo y también conocer la biología del hongo en condiciones de cultivo estéril (Albertó, 2008).

El cultivo en medios líquidos es otra forma de cultivo aséptico en medios similares a los utilizados en el cultivo semisólido pero sin el agente gelificante. Una vez optimizados, habitualmente producen mayor cantidad de micelio en menor tiempo y su recuperación del seno del medio nutritivo es más sencilla. De estos medios se pueden extraer de manera simple sustancias como enzimas, metabolitos secundarios y exopolisacáridos que el hongo secreta al medio de cultivo (Smith *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2007). También se lo puede utilizar como inóculo para la preparación de *spawn* en granos y de sustratos (Stamets, 1993).

El *spawn* está formado por granos de cereal esterilizados y colonizados por el micelio del hongo, que se halla en estado de crecimiento vegetativo óptimo. En el proceso de cultivo controlado, estas “semillas del hongo” se “siembran” en cantidades voluminosas de sustratos apropiados. Muchas veces el *spawn* se prepara agregando cantidades variables del material del sustrato donde se cultivará el hongo hasta la fructificación; el hacerlo de esta manera permite predisponer favorablemente la “maquinaria enzimática degradativa del hongo” (Stamets, 1993; Akavia *et al.*, 2009).

La fermentación en estado sólido (en inglés: SSF, *solid state fermentation*) es el crecimiento vegetativo y reproductivo de los hongos sobre sustratos humedecidos y acondicionados para la producción de fructificaciones. En estos sistemas pueden co-existir con el hongo microorganismos competidores, pero la cantidad de éstos se reduce y atenúa aplicando un tratamiento previo de descontaminación física y/o química, que le otorga ventaja al hongo cultivado para que colonice el sustrato disponible (Chang y Miles, 1989; Curvetto *et al.*, 2004). Los sustratos se formulan de manera de poseer una gran cantidad de materia orgánica, y proveer una cantidad suficiente de elementos nutritivos mayores y menores, esenciales para completar el ciclo biológico de los hongos, llegando a la producción de las fructificaciones. El material empleado como sustrato debe estar disponible regionalmente en cantidades abundantes para que el cultivo de hongos con fines comerciales sea rentable (Chang, 1996).

6.1. Cepas utilizadas

Los estudios realizados incluyeron diferentes especies y cepas (**Tabla 2**). *G. sordulenta* (Mont.) Singer y *G. gargal* Singer se obtuvieron del CIEFAP (Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, Chubut, Argentina). La cepa *G. sordulenta* CIEFAP 154, es originaria del Parque Nacional Los Alerces, Chubut, Argentina, y *G. gargal* CIEFAP 191 Lago Queñi, Parque Nacional Lanín, Neuquén, Argentina. Asimismo, se recolectaron y aislaron dos nuevas cepas desde fructificaciones de *G. gargal* obtenidas en la 1° y 4° campaña realizadas en el Parque Nacional Lanín (PNL) durante el desarrollo de esta tesis. Se dispuso solamente de una cepa de *G. sordulenta* debido a que no se encontró ningún espécimen durante las campañas. La cepa de *G. frondosa* es de Taiwán, del tipo asiático *i.e.*: que poseen ciertas diferencias con las norteamericanas (Shen, 2001), y fue gentilmente provista por *Mushworld* (Seúl, Korea) en 2005. Las cepas de *Ganoderma lucidum* provienen de la Universidad de Guelph, Canadá y de *Fungi Perfecti*, USA. Todas las especies y cepas se mantienen en el banco de germoplasma del CERZOS.

Tabla 2. Cepas utilizadas en esta tesis.

Especies	Cepas	Origen	Referencias
<i>Grifola gargal</i>	cepa A	CIEFAP n°191	Rajchenberg 2002.
	cepa B	PNL, árbol en pie. Aislada en la 1° campaña	<i>Cepa recolectada para esta tesis</i>
	G9	PNL, árbol caído (>20 años). Aislada en la 4° campaña.	" "
<i>Grifola sordulenta</i>	<i>Gs</i>	CIEFAP n°154	Rajchenberg y Greslebin, 1995.
<i>Grifola frondosa</i>	<i>Gf</i>	<i>Mushworld Organization</i> , Corea.	Origen asiático
<i>Ganoderma lucidum</i>	E47	<i>University of Guelph</i> , Ontario Canada.	Nd. *
	S	Strain 34-D: <i>Fungi Perfecti</i> Olympia, Wa, USA.	Stamets, 1993.

* Información no disponible. La cepa se mantiene en cultivo en el CERZOS desde el 2001.

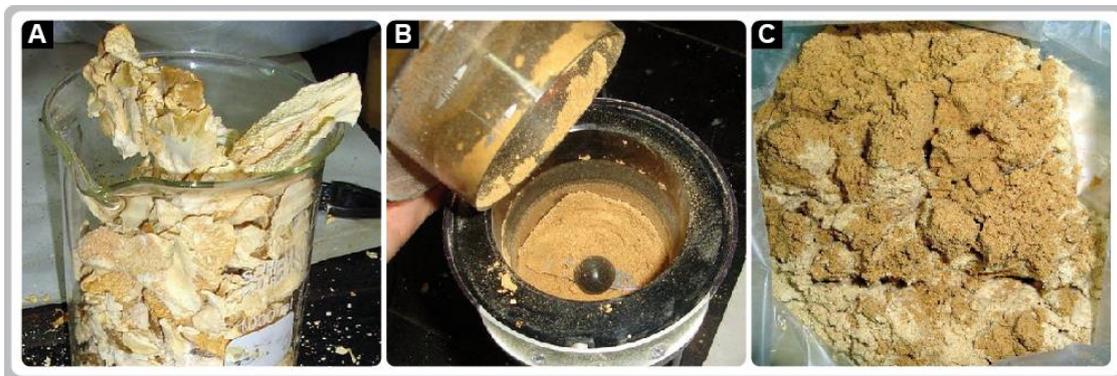
6.2. Conservación del micelio

Las colonias de stock se mantienen en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (LBHCyM) del CERZOS en medio MYPA modificado (ver capítulo II.A). El protocolo de mantenimiento consiste en el cultivo del micelio durante 20 días a 18°C y en oscuridad (ver capítulo II.A); si no se utilizan inmediatamente, las colonias se guardan en cámara fría a 5°C hasta tres meses y luego se descartan. Para la conservación del micelio por largos períodos se utiliza el método de supresión de la evaporación por inmersión en vaselina líquida estéril (Rico *et al.*, 2004).

6.3. Pool de fructificaciones de *Grifola gargal*

Las fructificaciones mejor conservadas de *G. gargal* se liofilizaron, luego se seleccionaron algunos trozos y éstos se pulverizaron (20 mesh). El polvo así obtenido (**Figura 12**) se utilizó posteriormente para estudiar las propiedades antioxidantes y antígenotóxicas (tratamiento “GgFB”) Cap. VI y VII, respectivamente). El contenido nutricional proximal y de minerales de este pool de *G. gargal* se detalla en el **Apéndice 3**.

Figura 12. Pool de fructificaciones de *Grifola gargal*. **A:** trozos provenientes de distintas fructificaciones en buen estado y liofilizadas. **B:** molinillo de café conteniendo polvo de *G. gargal* de una fructificación. **C:** pool de muestras de fructificaciones pulverizadas.



7. Objetivos de la tesis

Con el trabajo de esta tesis se buscó profundizar en el conocimiento y en la comprensión de diferentes aspectos de la biología de dos especies silvestres de hongos comestibles: *G. gargal* y *G. sordulenta*, así como en sus propiedades nutraceuticas. Los objetivos generales de los capítulos II al VI estuvieron orientados hacia el cultivo bajo condiciones controladas, brindando además información nutricional. Mientras que en los capítulos VII y VIII, se investigaron la actividad antioxidante y antígenotóxica, respectivamente, en la espera de que tales atributos funcionales reforzarían la propuesta de domesticación de ambas especies mediante el desarrollo de apropiadas técnicas de cultivo.

Capítulo II

Objetivos generales

Analizar el crecimiento micelial de *Grifola* spp. en medio de agar nutritivo. Hacer una descripción morfológica de los cultivos y realizar la comparación con referencias taxonómicas de otros autores. Estudiar el efecto de condiciones lumínicas en el crecimiento y en la diferenciación morfogénica de basidiomas y estudiar la actividad ligninolítica en diferentes medios de cultivo.

Objetivos particulares

1. Evaluar la tasa de crecimiento y la acumulación de biomasa en medio de agar en diferentes condiciones de temperaturas y pH.
2. Determinar si la velocidad de colonización en medio de agar puede incrementarse mediante el agregado de aditivos.
3. Comparar la velocidad de colonización de las cepas luego de tres años de subcultivos en el mismo medio nutritivo.
4. Describir macroscópicamente y microscópicamente las colonias cultivadas en medio de agar.
5. Cotejar las características taxonómicas con otras descritas en la bibliografía y estimar la variabilidad morfológica entre cepas.

6. Diferenciar micelio vegetativo del reproductivo usando diferentes colorantes.
7. Determinar la velocidad de crecimiento y cambios morfogénicos durante la colonización en diferentes condiciones de irradiación lumínica.
8. Observar el efecto que tiene la luz sobre el metabolismo secundario en cultivos *in vitro* maduros y sometidos a un choque térmico.
9. Evaluar el tipo de actividad enzimática y la velocidad de colonización en colonias cultivadas en medios nutritivos y en presencia de colorantes fenólicos o a base de diferentes fuentes de carbohidratos.

Capítulo III

Objetivos generales

Estudiar la producción de biomasa de *Grifola* spp. en el cultivo líquido bajo diferentes condiciones de cultivo y con distintas metodologías que incluyen el cultivo en Erlenmeyers de 250 y 500 ml, frascos de 3000 ml y fuentes de 4000 ml.

Objetivos particulares

1. Optimizar la acumulación de biomasa bajo dos condiciones de temperatura y diferentes concentraciones de caldo de semillas de girasol empleando Erlenmeyers de 250 ml.
2. Obtener biomasa empleando frascos de 3000 ml y evaluar el efecto de distintos medios nutritivos que se diferencian en su composición en cuanto a reguladores de crecimiento vegetal y vitaminas/aminoácidos.
3. Estudiar el efecto de la bencilaminopurina en el crecimiento de micelio cultivado en Erlenmeyers de 500 ml.
4. Obtener información desde el cultivo en fuentes de 4000 ml, sin agitación para producir biomasa micelial.

Capítulo IV

Objetivos generales

Seleccionar en base a la velocidad de crecimiento y la densidad aparente del micelio, granos de cereales y/u oleaginosas apropiados para la producción de blanco de hongo.

Objetivos particulares

1. Con el cultivo de micelio en granos contenido en botellas de 1 litro, discriminar entre dos temperaturas 20°C y 24°C la que favorece una mayor velocidad de crecimiento.
2. Seleccionarlos granos más adecuados para utilizar como blanco de hongo, empleando el test TCL de Duncan para determinar la velocidad de crecimiento micelial y la densidad micelial aparente evaluando dos condiciones de pH.
3. Comparar los tiempos para alcanzar la colonización completa de los distintos granos en el sistema de botellas.

Capítulo V

Objetivos generales

Estudiar la degradación de lignocelulosa en sustratos a base de cáscara de girasol. Evaluar aditivos y suplementos para mejorar ambos la velocidad y la densidad micelial de colonización. Realizar un estudio preliminar con la metodología de cultivo en troncos sintéticos.

Objetivos particulares

1. Con el bioensayo del test de crecimiento lineal (TCL) estudiar la velocidad de crecimiento y la densidad micelial aparente del cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* sobre cáscara de girasol en ausencia o presencia de suplementos, aditivos minerales y además estudiar el efecto de una hidrólisis ácida.
2. Seguido a la etapa de crecimiento vegetativo, evaluar en el sustrato colonizado algunos parámetros de indicativos del crecimiento fúngico y degradación de la matriz de lignocelulosa como ser mediante el incremento de proteínas del sustrato, la presencia de actividad de lacasas y la degradación de fibras.
3. Analizar la factibilidad de la implementación de la técnica de cultivo axénico en troncos sintéticos como una alternativa para el cultivo con fines productivos. Estudiar las características morfológicas en las etapas de generación de exudados, primordios y fructificaciones, en condiciones que se asemejarían a las del cultivo de *G. frondosa* y empleando una aproximación a las condiciones ambientales normales en el hábitat de fructificación.

Capítulo VI

Objetivos generales

Conocer la capacidad antioxidante de *Grifola* spp. y su posible correlación con fenoles u otro tipo de moléculas.

Objetivos particulares

1. Realizar extracciones metanólicas de micelios de cuerpos fructíferos, micelio de cultivo líquido y de harinas de granos de trigo biotransformadas.
2. Estudiar *in vitro* la capacidad secuestrante de radicales DPPH y el poder reductor de iones férricos.
3. Estimar el contenido relativo de antioxidantes para cada una de las actividades y evaluar la correlación de las mismas con el contenido de fenoles en los extractos.
4. Determinar con la técnica de TLC cuales podrían ser las moléculas involucradas en la actividad antioxidante.

Capítulo VII

Objetivos generales

Establecer en larvas de *Drosophila melanogaster* si diferentes muestras de *Grifola* spp. son inocuas en cuanto a toxicidad y genotoxicidad, y luego estimar si poseen antigenotoxicidad ante un agente químico de origen antropogénico.

Objetivos particulares

1. Incluir muestras de micelio en el alimento de larvas, proveniente de cuerpos fructíferos, del cultivo líquido y de harinas biotransformadas para evaluar la toxicidad.
2. Evaluar la toxicidad y genotoxicidad un rango de dosis de DMBA y seleccionar una dosis conveniente para emplear en el bioensayo SMART *eyes*.
3. Verificar que los tratamientos en combinación con la dosis elegida de DMBA no sobrepase la DL50.
4. Estudiar las mutaciones causadas por el DMBA con el SMART *eyes* y establecer en qué momento del desarrollo larval se produce el mayor daño. Resolver si las especies poseen o no actividad antigenotóxica.

Capítulo II

Cultivo en medio semisólido

Cultivo de micelio en medio nutritivo semisólido

El cultivo en medio nutritivo semisólido, también conocido como cultivo en agar, se basa en la utilización de una solución nutritiva en una red polimérica de galactósidos que le confiere propiedades de gel en cuanto a la retención de agua y la difusión de nutrientes y de gases. Es así que existen varias modalidades para el cultivo de micelio de hongos en medio nutritivo con agar como soporte; la forma técnica de realizarlo depende de los objetivos de la investigación y es así que se puede realizar en tubos de ensayos, frascos y en cajas de Petri.

La humedad relativa en estos recipientes está a nivel de saturación y para evitar la desecación los mismos se sellan con una envoltura de film de PVC extensible que constituye una barrera que no compromete el intercambio gaseoso pero coloca una limitación a la entrada de contaminantes. El empleo de cámaras de cultivo con temperatura, luz y humedad controladas permite realizar ensayos de larga duración que de otra manera podrían secarse. La preparación sencilla de estos medios permite manipular varias unidades experimentales (u.e.) simultáneamente. En el caso de las cajas de Petri se puede medir el crecimiento en función del tiempo así como también detectar cambios morfológicos, anomalías y/o contaminación.

La inoculación de los hongos en el medio de cultivo se realiza con esporas (cultivo monocariótico) o micelio vegetativo (cultivo dicariótico). La primera modalidad se utiliza para mejoramiento de las cepas y la segunda para mantener las características de una colonia mediante la clonación (Stamets, 1993). En este último caso, el inóculo puede ser tomado de otra colonia cultivada en agar o directamente del contexto de una fructificación. Con cierta periodicidad debe realizarse el cultivo de tejido desde un carpóforo, ya que luego de largos períodos de subcultivo las cepas suelen perder vigor provocando un crecimiento más lento y dificultades para la fructificación (Chang y Miles, 2004).

Experimentación

A partir de diversos estudios taxonómicos se han desarrollado claves de identificación de especies lignícolas utilizando características morfológicas y parámetros de crecimiento observados en el cultivo en cajas de Petri (Nobles 1965; Stalpers 1978; Nakasone, 1990; Rajchenberg 2006). La información provista por estos estudios es valiosa como punto de partida para poder interpretar el crecimiento y los cambios que ocurren a medida que crece y eventualmente se diferencia el cultivo.

En la definición habitual de medios para el cultivo de microorganismos, el medio que se utiliza para la multiplicación es el medio *indefinido* (contienen ingredientes de composición indefinida, como papa, extracto de malta, extractos de levaduras, extractos de carne) y *enriquecido* (posee aditivos vitales o suplementos para favorecer la producción de biomasa y/o acelerar la colonización). Por otra parte, para conocer la biología del organismo se utilizan el medio *sintético* (donde se conoce la

composición y concentración de fuentes de carbono, nitrógeno y sales), el *selectivo* (contienen metabolitos sólo tolerables por el micelio del hongo buscado) y los *diferenciales* (sirven para conocer el metabolismo del micelio y sus características fisiológicas, contienen nutrientes específicos o productos que se colorean por acción del micelio) (Moore-Landecker, 1996).

Utilizando las formulaciones de sustrato adecuadas es posible conocer la absorción de nutrientes por el micelio, la fisiología enzimática ligninolítica, así como determinar el efecto de variables ambientales sobre el metabolismo reproductivo. Adicionalmente, una vez conocido el sistema enzimático, se pueden probar sustancias estimulantes de la actividad de enzimas para mejorar la colonización.

El conjunto de variables ambientales puede resultar ya sea en la estimulación o inhibición de la fructificación. Así es que resulta importante conocer si alguna de ellas como ser: *shock* térmico, luz, enzimas, el agotamiento de los nutrientes, por citar las más importantes, es limitante para la fructificación o porque está siendo suministrada en un rango que es perjudicial, inhibiendo la formación de primordios y luego de fructificaciones.

Ensayos

A continuación se exponen los resultados del cultivo en agar nutritivo de micelio de *Grifola* spp. en diferentes condiciones (sección **A**), las observaciones morfológicas realizadas sobre diferentes colonias (sección **B**), efectos fotomorfogénicos (sección **C**) y respuesta al crecimiento en medios conteniendo compuestos fenólicos o diferentes fuentes de carbohidratos (sección **D**).

A. Análisis del crecimiento micelial de *Grifola* spp. en agar nutritivo

1. Introducción

Habitualmente, para el aislamiento y mantenimiento de las cepas de hongos ligninolíticos, se utilizan medios de cultivos indefinidos o complejos, entre ellos los más utilizados son: el medio MYPA que contiene extracto de malta, extracto de levadura, caldo de papa y agar, y el medio PDA a base de caldo de papa, dextrosa y agar. En el cultivo a gran escala de una especie es fundamental el conocimiento de sus requerimientos ambientales y nutricionales de manera de lograr que las cepas colonicen a mayor velocidad y sin disminuir la densidad, produciendo una buena cantidad de biomasa y permitiendo a su vez el acortamiento de los ciclos de producción (Sánchez y Royse, 2002).

El pH es uno de los factores más importantes para optimizar este tipo de medios, ya que influye en la solubilidad de las sales y vitaminas y en la actividad de las enzimas. Sales de Mg, Fe, Ca, Zn y los fosfatos, son insolubles a pH alcalino. El ácido p-amino benzoico y otras vitaminas existen predominantemente como ácidos libres a $\text{pH} \approx 3$ y cuando el pH se acerca a 6 el micelio debe invertir energía en el bombeo a través de canales hidrofílicos y así poder mantener las funciones celulares vitales (Moore-Landequer, 1996). A pH desfavorables la actividad enzimática afecta la digestión extracelular y la síntesis de metabolitos esenciales. Sin embargo, en general los hongos pueden crecer en amplios rangos de pH, incluso a veces se tiene más de un nivel de pH óptimo (Moore-Landequer, 1996).

La temperatura es otro factor muy importante en el crecimiento del micelio. El aumento de la temperatura eleva la velocidad de catálisis enzimática y de las reacciones químicas. La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se duplica por cada 10°C , y ante un exceso por sobre un determinado umbral de temperatura, se inactivan (Moore-Landequer, 1996). A medida que las temperaturas se aproximan al umbral mínimo o máximo se comienzan a percibir anomalías en las rutas metabólicas y anabólicas generando un micelio con crecimiento defectuoso, deforme o estéril (Chang y Miles, 2004). En las especies cultivadas de hongos, las temperaturas en las cuales el micelio se mantiene viable varía mucho entre especies y cepas siendo el rango de 3°C a 40°C ; algunas especies son viables entre límites muy estrechos de tolerancia térmica (*c.a.* 10°C) y otras pueden crecer en rangos amplios (mayores de 30°C) (Chang y Miles 1989).

Como tercer factor de interés para incluir en los ensayos de optimización del cultivo, se evaluó la influencia del polvo de cáscara de girasol y el mijo en la velocidad de crecimiento del micelio. Ésta podría ser aumentada ante la disponibilidad de algún nutriente o factor de estimulación pudiendo favorecer asimismo la inducción de enzimas ligninolíticas que acelerarían más adelante la adaptación del micelio para la colonización del sustrato (Stamets, 1993).

1.1. Hipótesis

Para ambas especies de *Grifola* spp. se postula que existe una dependencia de la tasa de crecimiento y la acumulación de biomasa con el pH y la temperatura del cultivo. El agregado de un aditivo lignocelulósico incrementaría la velocidad de crecimiento y acumulación de biomasa. El mantenimiento en el vigor de las cepas se puede evaluar mediante la comparación de la velocidad de crecimiento luego de un período prolongado de subcultivos.

1.2. Objetivos

Evaluar la tasa de crecimiento micelial como diámetro de la colonia por día y la acumulación de biomasa como mg/día, bajo i) dos condiciones de temperatura de cultivo y ii) cuatro valores de pH inicial. También determinar si se produce un efecto en la velocidad de colonización o en la acumulación de biomasa luego de agregar polvo de cáscara de girasol o granos de mijo al medio de cultivo. Comparar la velocidad de crecimiento de las cepas luego de un período de tres años de subcultivos periódicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas utilizadas

En este estudio se usaron las cepas disponibles de *G. sordulenta* y la cepa A de *G. gargal*. El origen de las cepas se describe en el capítulo I (ver **Tabla 2**).

2.2. Medio, pH y temperatura

El micelio de ambas especies de *Grifola* fue inoculado en cajas de Petri conteniendo medio MYPA (20 g/l extracto de malta, 5 g/l extracto de levadura, 2,5 g/l peptona de carne, 10 g/l glucosa, 20 g/l agar), a pH 4, 5, 6, o 7. Se incubaron a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, en oscuridad por 20 días. La tasa de crecimiento micelial se determinó por medición del diámetro de la colonización del medio en función del tiempo (n=10). La biomasa del micelio seco (n=5) se obtuvo gravimétricamente luego de separarlo del agar por calentamiento en microondas (BGH, mod. 16600, 1250 watts) durante 1 min, seguido por evaporación del agua en estufa (80°C) hasta peso constante. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial y la biomasa de micelio se determinó en medio MYPA, a pH 4, a dos temperaturas: $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Agregado de suplementos al medio con agar

Se incorporó al medio MYPA modificado 0,4% (p/v) de mijo o de cáscara de girasol en polvo (PCG), y luego se incubó a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, en oscuridad. El crecimiento de *G. sordulenta* y *G. gargal* se determinó midiendo el diámetro de la colonia de micelio (n=10), y la biomasa del mismo (n=5), el cual se determinó como se mencionó anteriormente.

2.4. Establecimiento del vigor de *Grifola sordulenta* y de diferentes cepas de *G. gargal* en cultivo

Con la finalidad de establecer si la velocidad de crecimiento tuvo variaciones luego de tres años de subcultivos en el medio MYPA modificado, se determinó la velocidad de crecimiento de *G. sordulenta* y *G. gargal* (todas las cepas disponibles, véase **Tabla 2**) en medio MYPA modificado y suplementado con 0,4% (p/v) de polvo de cáscara de girasol (PCG). En el caso de la cepa A de *G. gargal* también se evaluó una cantidad mayor del suplemento de PCG: 1% (p/v).

2.5. Análisis de los datos

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA simple y las medias fueron comparadas con el test de Tukey utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010). Cabe aclarar que ante muestras desiguales este *software* introduce la modificación de Tukey-Kramer.

3. Resultados y discusión

3.1. Temperatura y pH

Para ambas especies, la tasa de crecimiento micelial, *i.e.* el incremento del diámetro de la colonia en función del tiempo, y la producción de biomasa en el medio de agar, fueron mayores a pH 4 (**Tabla 3**). En el caso de *G. sordulenta*, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento micelial en el rango de pH de 5 a 7. Para la evaluación posterior del efecto de la temperatura o del agregado de suplementos en la tasa de crecimiento micelial se seleccionó el pH 4 para ambas cepas.

Un incremento de la temperatura de 18 a 24°C en las condiciones del cultivo de *G. sordulenta*, disminuyó muy significativamente ($p < 0,01$) tanto la tasa de crecimiento de la colonia (de 3,4 mm/día a 0,8 mm /día) como la producción de biomasa (3,8 mg/día a 1,4 mg/día). A 18°C, *G. gargal* creció a una tasa de 4,3 mm/día en diámetro de la colonia y de 5,2 mg/día en producción de biomasa, mientras que a 24°C no hubo crecimiento.

Miyauchi *et al.* (1998) informaron valores de pH similares para *G. frondosa* (pH 4 y 5). También hallaron que el crecimiento fue pobre a partir de pH 6. En el caso de *G. sordulenta* no se identificaron diferencias en los valores de pH 5 a 7 (por encima de este rango de pH existe una disminución del crecimiento). No se halló en la bibliografía consultada trabajo alguno mencionando una optimización del cultivo de *G. frondosa* con la temperatura, si bien se menciona en varios reportes que la temperatura adecuada para el crecimiento en sustratos sólidos se ubica entre 20 y 25°C (Shen, 2001; Stott y Mohammed, 2004; Montoya- Barreto *et al.*, 2008).

3.2. Agregado de suplementos

Con la adición de PCG, ambos, la tasa de crecimiento micelial y la producción de biomasa de *G. sordulenta*, aumentaron muy significativamente ($p < 0,01$) (3,3 mm/día y 5,5 mg/día, respectivamente) cuando fueron comparadas con el control (2,9 mm/día y 3,3 mg/día). La adición de mijo no aumentó ninguno de esos parámetros y sus valores fueron 2,7 mm/día y 3,6 mg/día.

En el caso de *G. gargal*, la adición de PCG aumentó significativamente ($p<0,05$) la tasa de crecimiento micelial (4,9 mm/día) y la tasa de producción de biomasa (7,3 mg/día) con respecto al control (4,3 mm/día y 5,2 mg/día, respectivamente). La adición de mijo no tuvo efecto positivo, al contrario disminuyó significativamente los valores de estos parámetros a 3,9 mm/día y 2,3 mg/día ($p<0,05$). Los valores hallados para el medio MYPA modificado fueron superiores a los reportados previamente para las mismas cepas CIEFAP 154 de *G. sordulenta* y CIEFAP 191 de *G. gargal* 5,5-8,5 cm y 3 cm de diámetro en 6 semanas, respectivamente, en medio MEA (extracto de malta 2%) (Rajchenberg y Greslebin, 1995; Rajchenberg, 2002).

Entonces, para ambas cepas, las mejores condiciones de cultivo fueron pH 4, 18°C y medio de cultivo MYPA suplementado con 0,4% de cáscara de girasol en polvo. Así, fue posible disminuir el tiempo para la obtención de un inóculo de excelente calidad de *G. sordulenta* y *G. gargal* en agar nutritivo en cajas de Petri, el primer paso para el ciclo productivo de los hongos. El cultivo de las cepas en este medio fue posteriormente utilizado en forma rutinaria para su mantenimiento y para su uso como inóculo de los medios líquidos y para la generación de *spawn* a base de granos de cereales.

Tabla 3. Influencia del pH del medio MYPA modificado sobre la tasa de crecimiento del diámetro de la colonia (mm/día) y la producción de biomasa (mg/día, peso seco) de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*.

pH	<i>Grifola gargal</i>		<i>Grifola sordulenta</i>	
	Velocidad de crecimiento micelial (mm/día)	Biomasa (mg/día)	Velocidad de crecimiento micelial (mm/día)	Biomasa (mg/día)
4	4,3 (0,36) a*	5,2 (0,26) a	3,4 (0,20) a	3,8 (0,07) a*
5	2,7 (0,28) b	4,4 (0,21) ab	2,9 (0,20) b	2,6 (0,07) ab
6	2,3 (0,30) bc	4,2 (0,20) ab	2,7 (0,17) b	1,1 (0,11) b
7	1,8 (0,32) c	3,7 (0,36) b	2,6 (0,34) b	1,1 (0,16) b

* Las diferentes letras representan diferencias altamente significativas ($p<0,01$) dentro de cada especie. Los valores medios fueron comparados con el test de Tukey. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

3.3. Estudio de vigor y evaluación de nuevas cepas

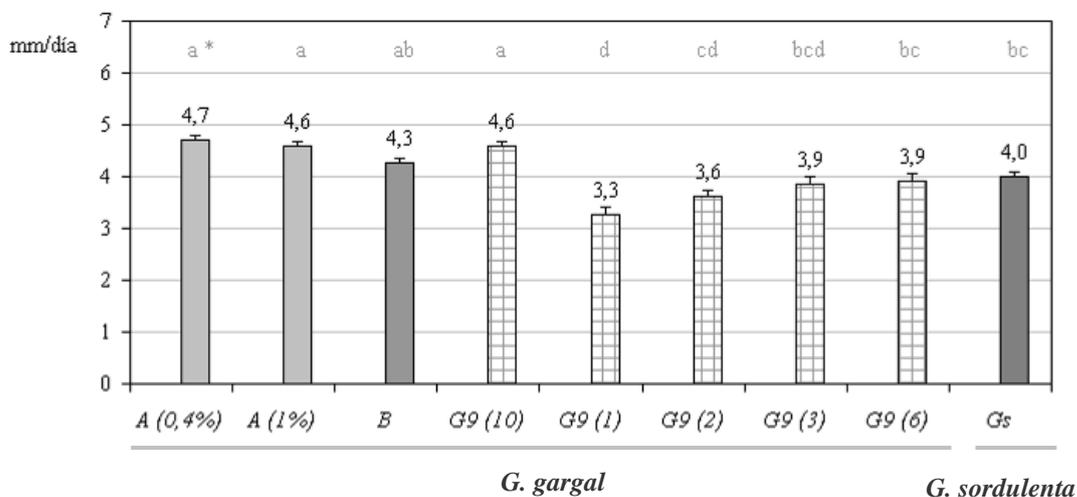
Los parámetros de crecimiento para *G. sordulenta* y la cepa A de *G. gargal* fueron nuevamente estudiados luego de tres años de subcultivos. En esta oportunidad, se incluyeron en el estudio las nuevas cepas de *G. gargal* obtenidas durante las campañas de recolección y también se evaluó en la cepa A de *G. gargal* el agregado al medio de una dosis mayor de PCG (1% p/v). Los resultados de la velocidad de crecimiento calculada al día 18 se muestran en la **Figura 13**.

Se halló que luego del amplio período de subcultivos *Grifola sordulenta* mantuvo la velocidad de colonización, e incluso la incrementó significativamente ($\alpha=0,05$). Este aumento se puede explicar por

haber desarrollado la cepa en cuestión una adaptación a los ingredientes del medio. En el caso de la cepa A de *G. gargal* no hubo variaciones significativas ($\alpha=0,05$). Se concluye que las condiciones de rutina empleadas son adecuadas para conservar el vigor de crecimiento de estas cepas, por al menos 12 subcultivos. Cuando se aumentó la cantidad de PCG no se observaron modificaciones en la velocidad de colonización de la cepa A de *G. gargal* ($\alpha=0,05$), por lo que no se justificaría el aumento de la cantidad de este suplemento en esta cepa.

La cepa B de *G. gargal* mostró menores valores de colonización que la cepa A, sin embargo estos no fueron significativos ($\alpha=0,05$). En el caso de la cepa G9 (*aislamiento 10*) se encontró una velocidad de crecimiento comparable a la de la cepa A; los demás aislamientos mostraron valores significativamente menores en *c.a.* 18-30% con respecto a la cepa A. Harada (2007) analizó la velocidad de crecimiento de 12 cepas chilenas y encontró que la mayoría de las cepas respondían con buen crecimiento (comparable al de la cepa A de este estudio), y sólo 3 lo hicieron con un 20-40% menos de velocidad que la cepa más veloz.

Figura 13. Velocidad de colonización de diferentes cepas de *Grifola* spp. en medio MYPA modificado. *Grifola gargal* (cepa A) y *Grifola sordulenta* fueron mantenidas durante 3 años en medio MYPA modificado. Las cepa A de *G. gargal* fue cultivada a dos concentraciones de PCG. También se presenta la velocidad de crecimiento de las nuevas cepas de *G. gargal* recolectadas en el Parque Nacional Lanín: B y G9 (aislamientos: 10, 1, 2, 3 y 6).



* Las diferentes letras indican diferencias altamente significativas de los valores medios determinadas con el test de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$). Las barras corresponden al error estándar (para diseños desbalanceados).

4. Conclusiones

En ambas especies fue posible disminuir el tiempo para la obtención de inóculo mediante el ajuste de las condiciones de pH y la temperatura del cultivo. El agregado de polvo de cáscara de girasol incrementó asimismo la tasa de crecimiento y la acumulación de biomasa.

Los resultados presentados fueron analizados por una posible pérdida de vigor y se halló que ambas cepas no perdieron vigor después de varios subcultivos y además hubo una mayor velocidad de colonización por *Grifola sordulenta*; ello se puede explicar por una adaptación a los ingredientes del medio. Concluyéndose que las condiciones de rutina empleadas fueron adecuadas para conservar su vigor por más de 12 subcultivos.

El aumento de la cantidad de PCG (polvo de cáscara de girasol) no modificó la velocidad de colonización de la cepa A de *G. gargal* por lo que no se justifica aumentar la cantidad de este suplemento, y no se encontraron diferencias en la velocidad de colonización entre la cepa A, B y G9.

B. Morfología de los cultivos

1. Introducción

El estudio de la morfología es el primer acercamiento para clasificar taxonómicamente cualquier organismo vivo, por ello la descripción minuciosa es siempre necesaria y el hallazgo de nuevos elementos descriptivos, morfológicos y químicos son siempre bienvenidos (Rajchenberg, 2006). En el desarrollo de esta tesis fue necesario conocer con profundidad las características morfológicas microscópicas y macroscópicas para determinar taxonómicamente los ejemplares colectados y estudiar los procesos de morfogénesis, *i.e.*: inducción de primordios y desarrollo de fructificaciones. En esta sección se expone un trabajo descriptivo de las cepas bajo estudio comparando las observaciones con las descripciones halladas en la literatura: Nobles (1948); Stalpers (1978); Rajchenberg y Greslebin (1995); Rajchenberg (2002); Chang y Chou (2003) y Rajchenberg (2006).

Adicionalmente, siguiendo la metodología de Sánchez y Moore (1999) se realizaron tinciones a las colonias de *G. gargal* y *G. sordulenta* cultivadas en caja de Petri para determinar la presencia de primordios. Estos autores, trabajando con colonias de *Pleurotus ostreatus*, establecieron que ciertas características celulares permiten conocer y entonces detectar cuándo una masa de micelio pasa del estado vegetativo al reproductivo constituyéndose en un primordio. Debido a que durante estos procesos existe gran actividad mitótica, además del mayor número de células se observa que los núcleos son más grandes y las paredes celulares más gruesas que las células vegetativas comunes. Entonces es posible identificar las células que se encuentran encaminadas a formar un primordio mediante tinciones que tengan afinidad por el ADN como lo es el reactivo de *Feulguen* o que tiñan los glucanos de la pared celular fúngica, como es el azul de toluidina. Las células encaminadas a la producción de primordios tienen mayor relación núcleo:citoplasma así como pared:citoplasma.

1.1. Hipótesis

El estudio de la biología y morfología macro y microscópica de los cultivos *in vitro* de las cepas disponibles corroboraría o incluso podría incrementar el conocimiento sobre caracteres de valor taxonómico. El resultado de la comparación entre los caracteres encontrados con estas cepas y los observados en cepas de otros autores brindará una estimación de la variabilidad morfológica de las especies. Es posible distinguir el micelio vegetativo del micelio reproductivo en colonias de *G. gargal* y *G. sordulenta* mediante la observación microscópica del micelio y la tinción de la colonia con reactivos para el ADN y las paredes celulares.

1.2. Objetivos

Describir morfológicamente el aspecto de las colonias de *Grifola* spp. en cultivo semisólido. Realizar reacciones con colorantes específicos para determinar propiedades químicas. Comparar las observaciones con las descripciones taxonómicas reportadas en la bibliografía.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas y cultivo

Los cultivos se realizaron en medio MYPA modificado. En el caso de *G. gargal* se empleó las cepa A para las observaciones generales y la cepa B para la observación de las clamidosporas. En el caso de *G. sordulenta* y *G. frondosa* se emplearon las únicas cepas disponibles en nuestro laboratorio (ver **Tabla 2**).

2.2. Estudio de las muestras

Para la observación del micelio al microscopio de luz las muestras fueron montadas con hidróxido de potasio 3%, y teñidas (o no) con floxina 1%. Para la determinación de sustancias amiloides o dextrinoides en clamidosporas y en las hifas gloeopleuras se utilizó el reactivo de Melzer caracterizándose las mismas como IKI+ o IKI- a la reacción con este colorante (Rajchenberg, 2002). Para la descripción morfológica se siguió la terminología de Rajchenberg (2002), Rajchenberg y Greslebin (1995).

Las muestras se observaron con una lupa binocular (Leica EZ 4) y microscopio óptico (Leica DM2000). Se midió el largo y ancho de las clamidosporas de *G. gargal* (cepas A y B), *G. sordulenta* y *G. frondosa* y con los valores obtenidos se calculó un índice (ancho: largo) para identificar y comparar las formas predominantes. Para la detección de primordios se empleó la metodología de Sánchez y Moore (1999): se tiñe la colonia completa en la caja de Petri con el reactivo de *Feulguen* o azul de toluidina (1% en 1% de ácido bórico).

3. Resultados y discusión

3.1. *Grifola frondosa*

Esta cepa creció satisfactoriamente en medio MYPA modificado, y la colonia presentó un aspecto superficial algodonoso a lanoso; a una velocidad de crecimiento radial promedio de 2,5 mm/día, llega a cubrir una caja de Petri en 10-14 días, cuando es cultivada en el rango de 24°C a 18°C. Esta velocidad de crecimiento micelial es similar a la de otras cepas de la especie cultivadas en medio MEA y/o ChA como la cepa norteamericana de Nobles (1948) *i.e.*: 1,8-2,4 mm/día, y otra cepa Taiwanesa descrita por Chang y Chou (2003): 1,8-3,2 mm/día y la citada por Stalpers (1978) con valores de *c.a.* 3 mm/día. En el **Apéndice 1** se muestra una Tabla donde se comparan las observaciones realizadas a estas cepas por los tres autores mencionados y también con las observaciones realizadas en esta tesis; además se incluyen imágenes representativas de los cultivos en medios diferenciales.

La colonia es de color blanco, con zonas de avance bien definidas; en el reverso de la caja de Petri se observa la decoloración del medio MYPA difiriendo con las otras cepas de *G. gargal* y *G. sordulenta*, que colorean de marrón a verde oliva al medio MEA. El olor del micelio es fuerte, similar

al de otros hongos (en general) y carente del olor a carburo que menciona Nobles (1948). El micelio se despegar fácilmente del medio de cultivo, como fue descrito por Nobles (1948). Esta cepa no esporula en 6 semanas de cultivo, ni tampoco lo hace luego de las 13 semanas, en coincidencia con la cepa de Chang y Chou (2003).

El micelio presenta hifas generativas hialinas, ramificadas, IKI-, nodosas de 2,5-5,5 μm , de paredes finas a moderadamente gruesas, de *c.a.* 1,0-1,5 μm de espesor, raramente fibuladas y mayormente septadas (**Figuras 14A-C y 15A-E**). Las hifas gloeopleuras son anchas, con contenido celular, IKI-, de 13,0-15,5 μm de diámetro y con paredes celulares de 1,0-1,5 μm , la luz del lumen celular se encuentra entre 4,0-12,5 μm (**Figuras 14B y C**). También posee hifas esqueletales, IKI-, largas y de 6,0-8,5 μm diámetro con paredes gruesas: 1,5-2,5 μm y lumen irregular de 2,0-4,0 μm (**Figura 14B**). En estos tipos celulares no se hallaron ramificaciones ni fibulas; en hifas gloeopleuras se hallaron septos.

En el micelio sumergido se observan abundantes clamidosporas, las paredes celulares son engrosadas de 1,5 μm de espesor, con fragmentos hifales vacíos adheridos, IKI- (**Figura 14A**) y que se encuentran en distintos estadios de formación (**Figuras 15C-E**), siendo la forma globosa-elipsoide la más común (**Figura 16**). Miden 10,0-12,5 μm de ancho y 10,0-15,0 μm de largo; el tamaño y la forma son similares a los descritos por los otros autores y tienen mayor volumen que las clamidosporas de *G. gargal* y *G. sordulenta* (**Figura 17**). En el micelio de la zona vieja de la colonia existen fragmentos hifales vacíos de formas nodosas e irregulares. No se encontraron cristales en el micelio aéreo ni en el agar. Cabe señalar que el medio MYPA modificado posee más variedad de fuentes nitrogenadas *i.e.*: extracto de levadura, peptona de carne; el pH más bajo (pH *c.a.* 4,5 frente a pH *c.a.* 6,5 del MEA) y polvo de cáscara de girasol como suplemento. Estas diferencias nutritivas con los medios empleados por los otros autores podrían ser parte de la causa de algunas de las diferencias observadas.

Figura 14. Micelio de *Grifola frondosa* en medio MYPA modificado (I). Montaje con hidróxido de potasio. **A:** clamidosporas con formas esféricas-globosas (*a*), elipsoidales-con pie (*b*), adheridas a fragmentos hifales (*c*). **B:** hifas gloeopleuras (*d*) y esqueletales con paredes anchas-refringentes (*e*). **C:** hifa gloeopleura con contenido citoplasmático (*f*). Las barras representan 10 μ m.

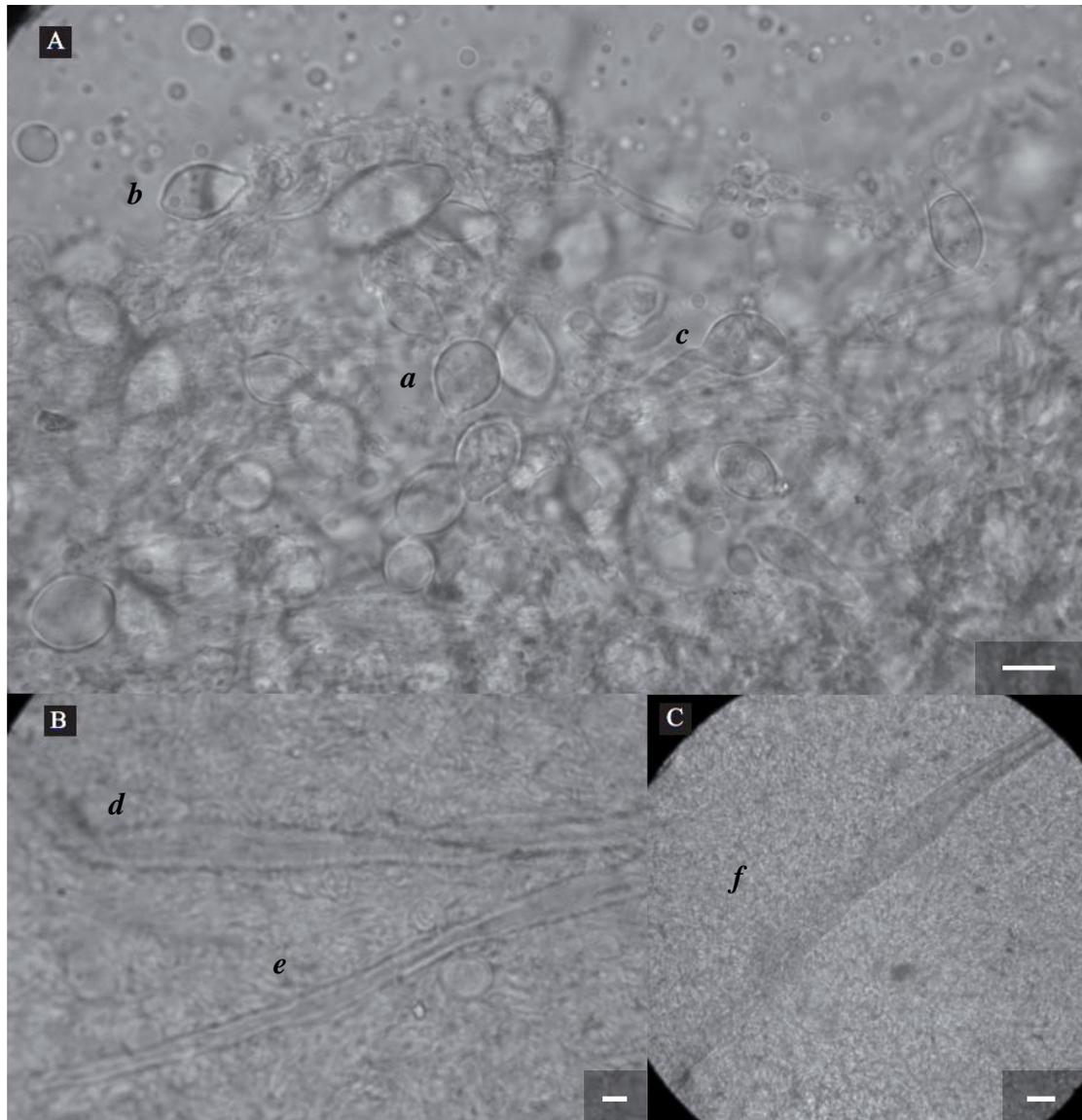


Figura 15. Micelio de *Grifola frondosa* en medio MYPa modificado (II). Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A:** hifas generativas del micelio aéreo con fíbula en medallón (*a*). **B:** tabiques (*b*). **C:** micelio aéreo, hifa gloeopleura (*c*), generativas (*d*) y clamidospora formándose (*e*). **D** y **E:** micelio ramificado en la zona de contacto con el agar, clamidosporas formándose (*f*). Las barras representan 10 μ m.

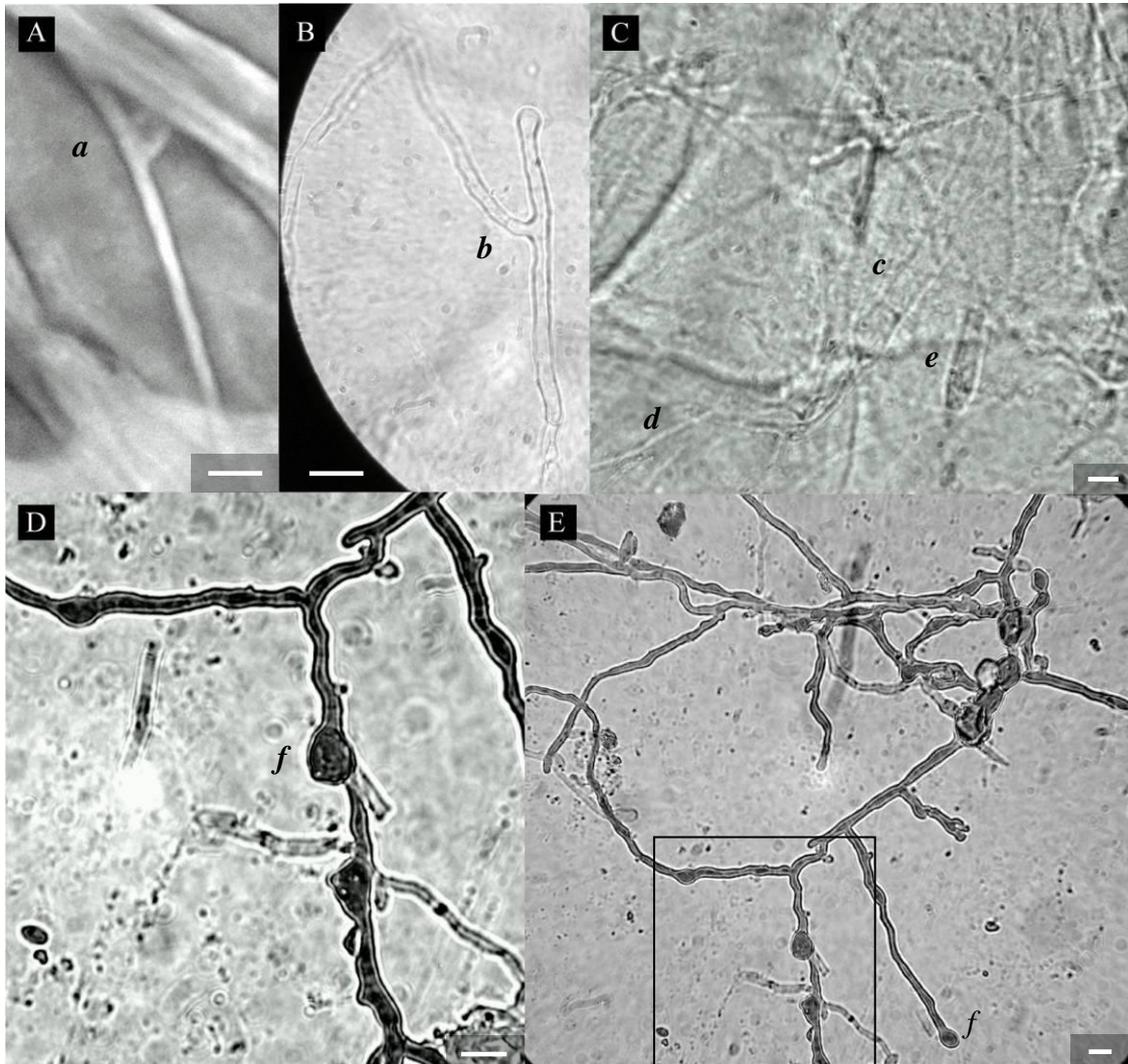
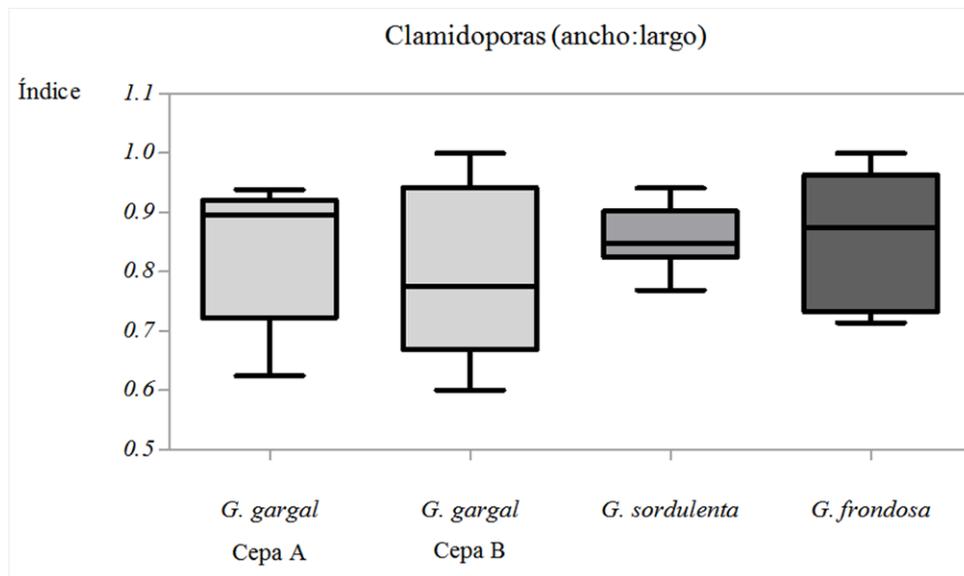


Figura 16. Clamidosporas de *Grifola* spp. en medio MYPA modificado. **A:** gráfico de *Box-Whisker* de los valores para el índice ancho: largo de clamidosporas de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa*. **B:** a medida que los valores se alejan del 1 las formas de las clamidosporas va cambiando de esféricas, globosas a elipsoidales.

A



B

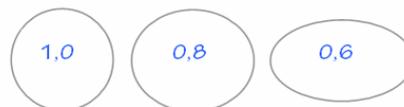
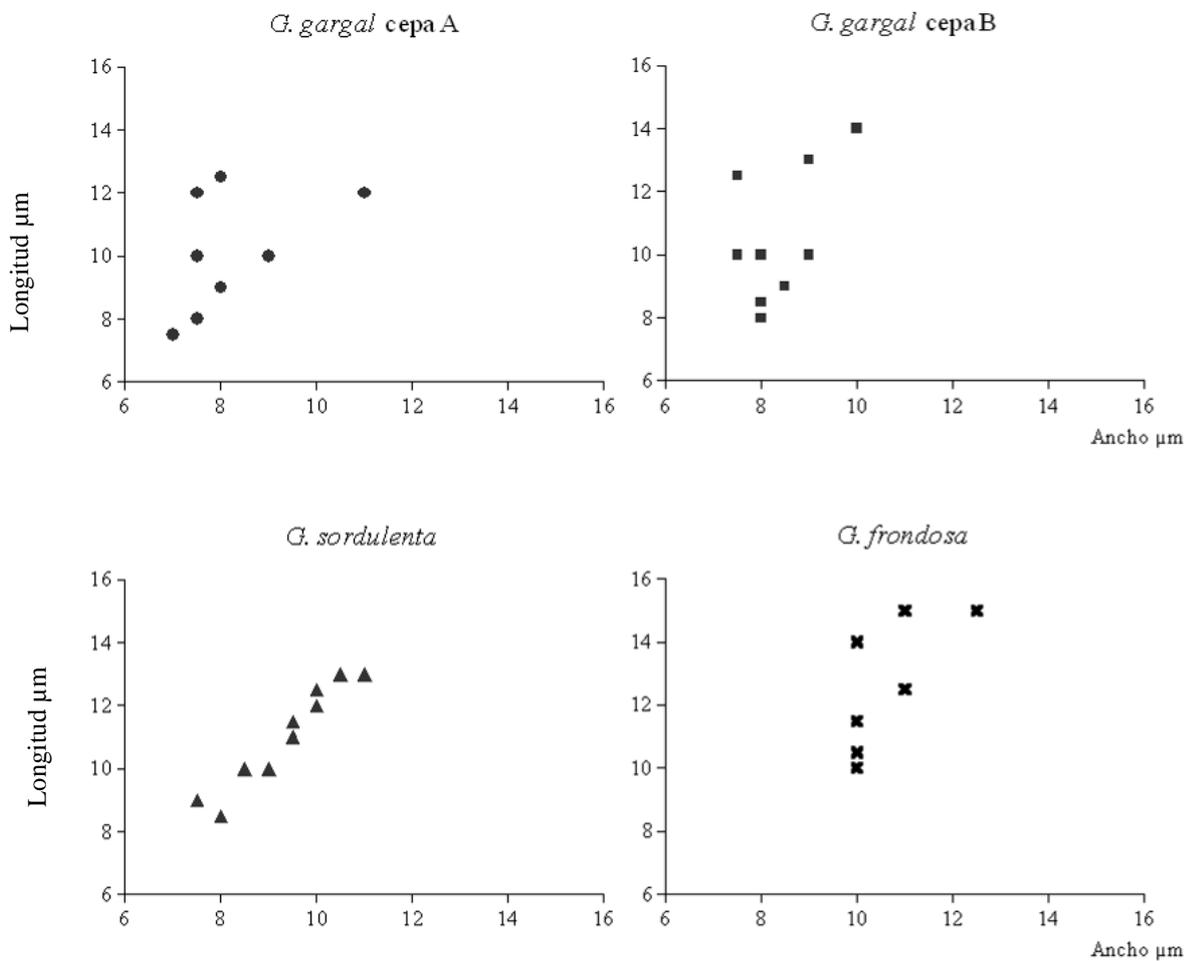


Figura 17. Valores de longitud y ancho de las clamidosporas observadas en micelio de *Grifola* spp. creciendo en medio MYPA modificado.



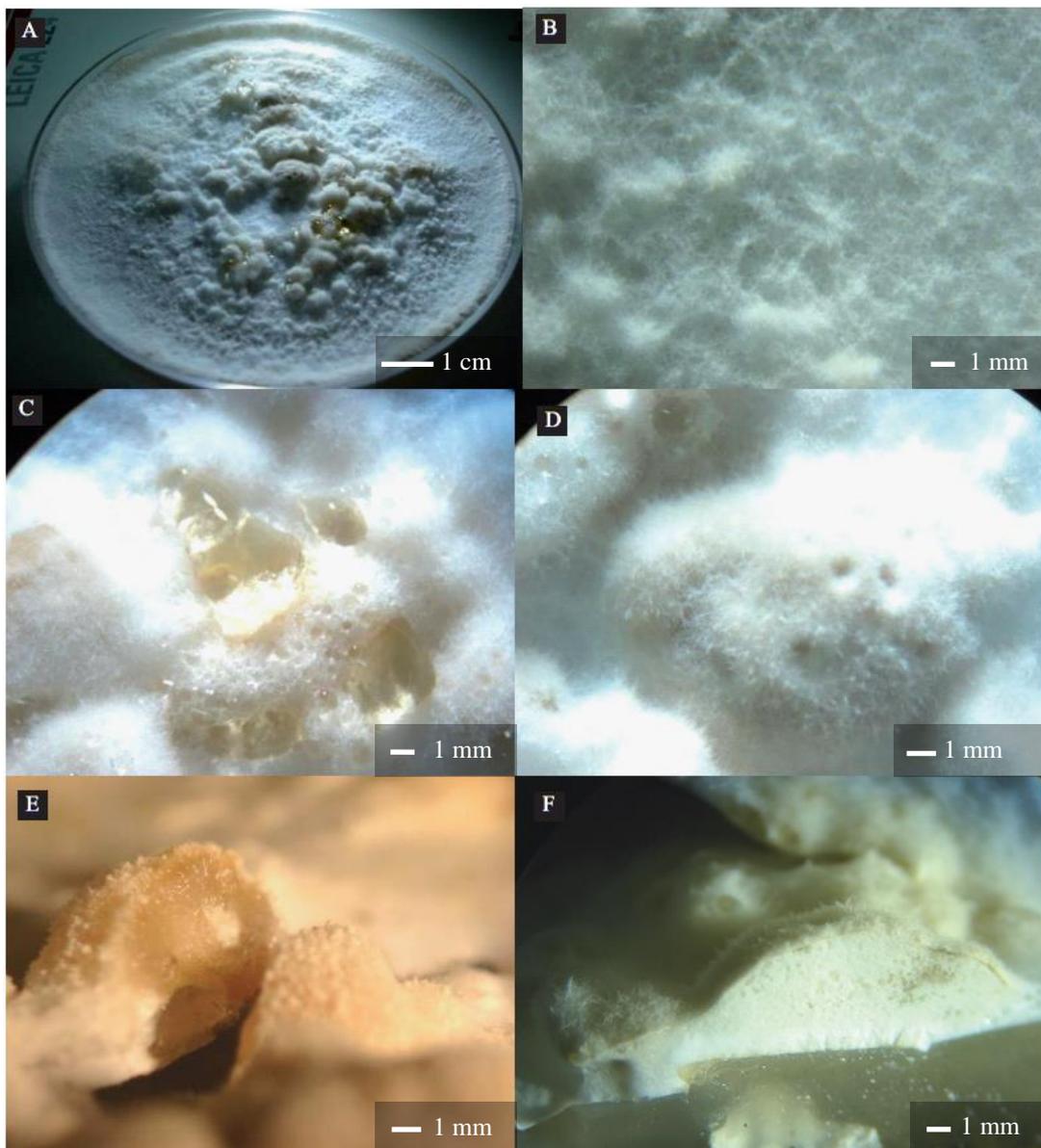
3.2. *Grifola gargal*

Los caracteres de los cultivos miceliar observados en este estudio son comparados con los descritos por Rajchenberg (2002) para *G. gargal* (cepa A) en el **Apéndice 1**. Las cepas estudiadas en esta tesis difieren con las estudiadas por Rajchenberg (2002) principalmente en que: decoloran el medio gálico y tánico, las hifas en vista macroscópica toman otros colores además del blanco, manifiestan hifas gloeopleuras y el cultivo esporula antes de las 6 semanas.

El color de la mata miceliar de las cepas A y B es blanco y de aspecto algodonoso-lanoso. El micelio se despega fácilmente del agar, siendo más evidente esta característica a un pH más bajo del medio (se produce un agar más blando). Las zonas de avance correspondientes al crecimiento de las hifas jóvenes son bien definidas a irregulares. Un aroma almendrado se desprende con mayor intensidad cuando el micelio cubre la superficie del medio en la caja de Petri. El cultivo forma esporulaciones antes de las 6 semanas (**Figuras 18, 19 y 20**), en este período las colonias manifiestan un sobrecrecimiento, con aspecto afelpado, farináceo, verrucoso y/o lacunoso; el color vira a tonos grises, marrones, y/o rojizos, que según sea su forma y tamaño se los considera rugosidades (<2 mm), agregados (>2 mm a <5 mm) o primordios (> 5 mm). Los exudados aparecen con frecuencia desde

estas formaciones desde el micelio o de sendos poros que se forman en la superficie (**Figuras 18 y 20B**). Los primordios son más frecuentemente observables en el perímetro que en el centro de la colonia. El tamaño de los mismos puede alcanzar los 20 mm de diámetro (**Figuras 18, 19F y G**); en un corte sagital se observa una corteza pigmentada, y un centro con sustancias blancas en su interior (**Figuras 18D-F**). Si están cercanos al borde de la caja de Petri orientan su crecimiento hacia afuera (**Figuras 15E-G**). También pueden observarse primordios con formas lamelares primordios con formas lamelares (**Figura 20**), estos son más raros y pueden ser simples o ramificadas (**Figuras 20C-E**).

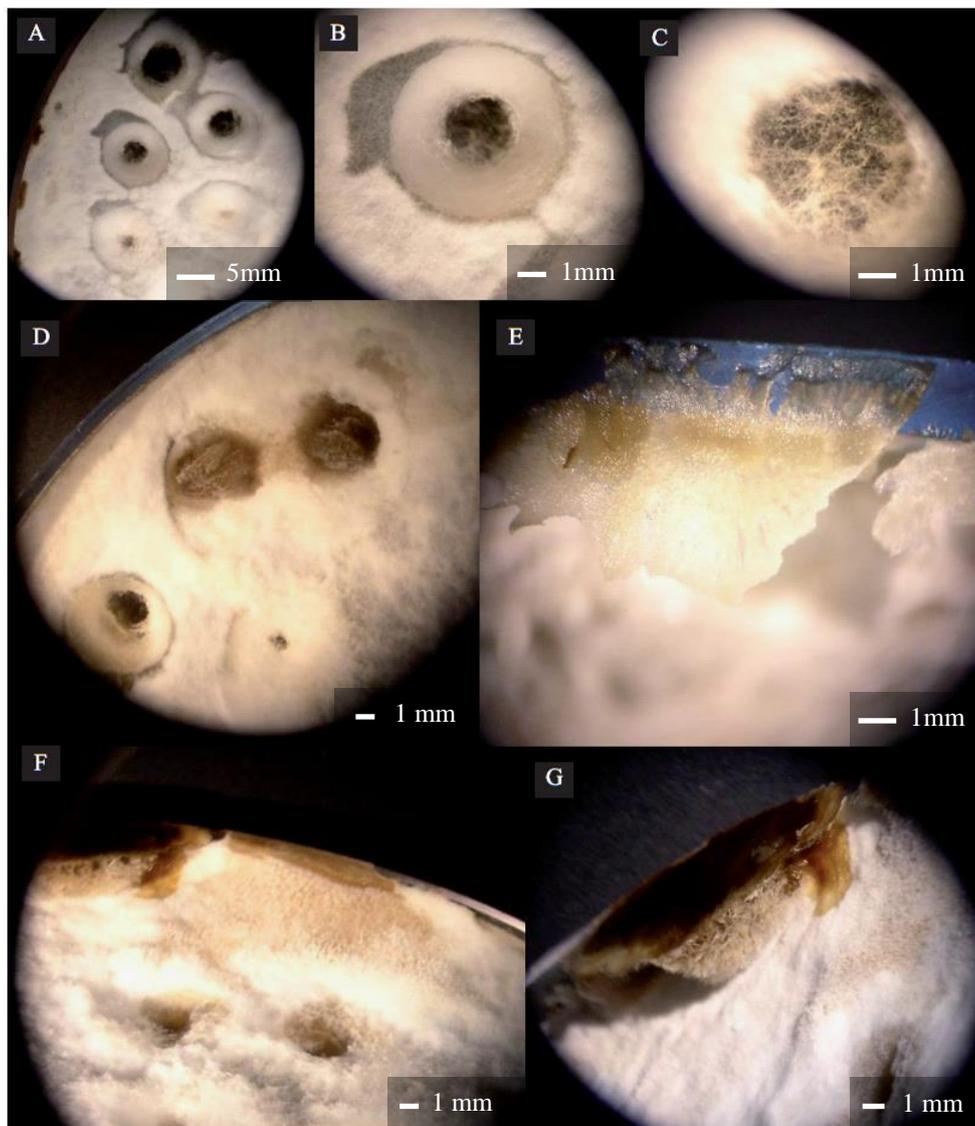
Figura 18. *Grifola gargal*, detalle de la formación de agregados, poros y micelio. **A:** colonia de *G. gargal* de 6 semanas presentando rugosidades, agregados, exudados y primordios. **B:** las rugosidades pueden crecer hasta formar agregados (**C**), poros (**D**) y también puede haber secreción de exudados (**C**). **E y F:** primordios con himenio fértil y un interior sólido y blanquecino en corte transversal.



En las **Figuras 19A-E** se observa cómo el espacio aéreo de huecos de 7 mm de diámetro realizados con sacabocados es ocupado paulatinamente por el micelio y finalmente desde allí surge, en la cuarta semana de cultivo, un primordio marrón oscuro; este proceso estaría relacionado con la cantidad de micelio acumulado como un factor que interviene en la producción de primordios.

El reverso de la caja de Petri muestra que la colonia se blanquea en medios gálicos y tánicos, indicando la presencia de enzimas que degradan los compuestos ligninosos. Además del cambio en la coloración, también se observó la decoloración de los mismos y esta acción de las enzimas oxidasas señalan a estos microorganismos como hongos de la podredumbre blanca del sustrato (imágenes ilustrativas se muestran en el **Apéndice 1**).

Figura 19. Primordios de *Grifola gargal* formados en cajas de Petri. Huecos que se rellenan de micelio en 3 semanas (**A**) formando un anillo de hifas denso (**B**) que se ocluye (**C**). De esta zona, a las 4 semanas surgen primordios (**D**). Primordios cercanos al borde de la caja de Petri creciendo hacia afuera (**E**). Los primordios más grandes alcanzan 2-4 cm (**F, G**).



La observación microscópica revela que la trama del micelio tiene hifas generativas fibuladas, con septos, IKI-. El diámetro de las hifas es fino (de 4,0-5,0 μm) y grueso (de 8,0-9,5 μm) como puede observarse en las **Figuras 21, 22, 23 y 24**. El espesor de las paredes celulares se ubica entre 1,0-1,5 μm y las fíbulas predominantes son del tipo medallón (**Figura 21D**) aunque también se ven fíbulas normales y septos simples. El tamaño de las fíbulas es igual o menor al de la hifa generativa. Hay otras hifas largas y anchas, 150 μm y 10,0-15,0 μm diámetro (**Figura 21B**), de paredes celulares hialinas engrosadas homogéneamente (1,0-2,0 μm), IKI-; y otras infladas, de 20 μm de largo con formas de piezas de rompecabezas, IKI-, hialinas con paredes engrosadas homogéneamente (1,5-2,5 μm) (**Figuras 22A y B**); casi siempre están vacías de contenido citoplasmático (**Figuras 21E, F y 22A**). Se observaron ramificaciones en ángulo recto que ocurren al nivel de la unión intercelular (**Figuras 21E y F**).

Las hifas gloeopleuras son más anchas alcanzando diámetros de 15,0-18,0 μm (**Figuras 21A y B**), y las paredes también son anchas de 1,5-2,0 μm y son IKI-. No se constató la presencia de hifas esqueléticas (o fibras). Las clamidosporas son abundantes en los cultivos más envejecidos particularmente en la zona de contacto con el agar (**Figuras 21F y 23**). El tamaño de estas esporas osciló entre: 7,5-11,0 \times 7,5-12,5 μm (*G. gargal* cepa A) y 7,5-10,0 \times 8,0-14,0 μm (*G. gargal* cepa B) (**Figura 17**). La forma de las clamidosporas en la cepa A fue predominantemente globosa, mientras que en la cepa B fueron elipsoidales (**Figura 16**). Las paredes de las clamidosporas son hialinas, engrosadas homogéneamente, con gúttulas en su interior, IKI- y a veces presentan un pie lateral o bien pueden ser terminales prendidas a un segmento hifal (**Figura 23**).

La presencia de segmentos hifales rotos tienen formas cristaloides (**Figura 23C**). Llamativamente, se encontró en una ocasión una estructura multicelular con un aspecto semejante a un conidióforo (**Figura 21C**). Nobles (1948) halló este tipo de estructuras en otros hongos políporos-xilófagos como: *Fomes annosus*, *Pholiota adiposa*, *polyporus Berkeleyi*, *P. sulphureus*, *P. rutilans*, *P. guttulatus*, y *Poria carbonica*.

Las cepas de *G. gargal* se diferenciaron de las descritas por Paredes-Leal (2006) provenientes de Valdivia (Chile) y cultivadas en medio MYPa, en que éstas últimas presentan hifas esqueléticas, hifas envolventes, y sólo algunas cepas producen clamidosporas. Debido a la distancia entre ambas poblaciones de *N. obliqua* y considerando lo expuesto anteriormente sobre la variabilidad genética, es probable que existan diferencias debidas a los procesos de fragmentación de estos bosques, también presentes en estas cepas.

Las formaciones de tipo agregados, primordios y lamelas (**Figuras 18, 19 y 20**) se caracterizaron como positivas con la tinción de los reactivos de *Feulguen* y azul de toluidina siendo más intensa esa tinción en los primordios y lamelas (**Figura 25**) (Sánchez y Moore, 1999). La relación de estas estructuras con cambios morfogénicos hacia la producción de basidiósporas se confirmó por inspección microscópica, encontrándose himenio con basidios y basidiósporas (**Figuras 20, 21C y 24**).

Figura 20. *Grifola gargal*, detalle de la formación de exudados, primordios, agregados y lamelas. **A:** exudados transparentes. **B:** primordios pigmentados y asociados a exudados amarillos. **C:** lamelas sobre el borde de la caja de Petri. **D:** lamelas vistas al microscopio (montaje con hidróxido de potasio). **D y F:** parte apical. **E:** parte basal.

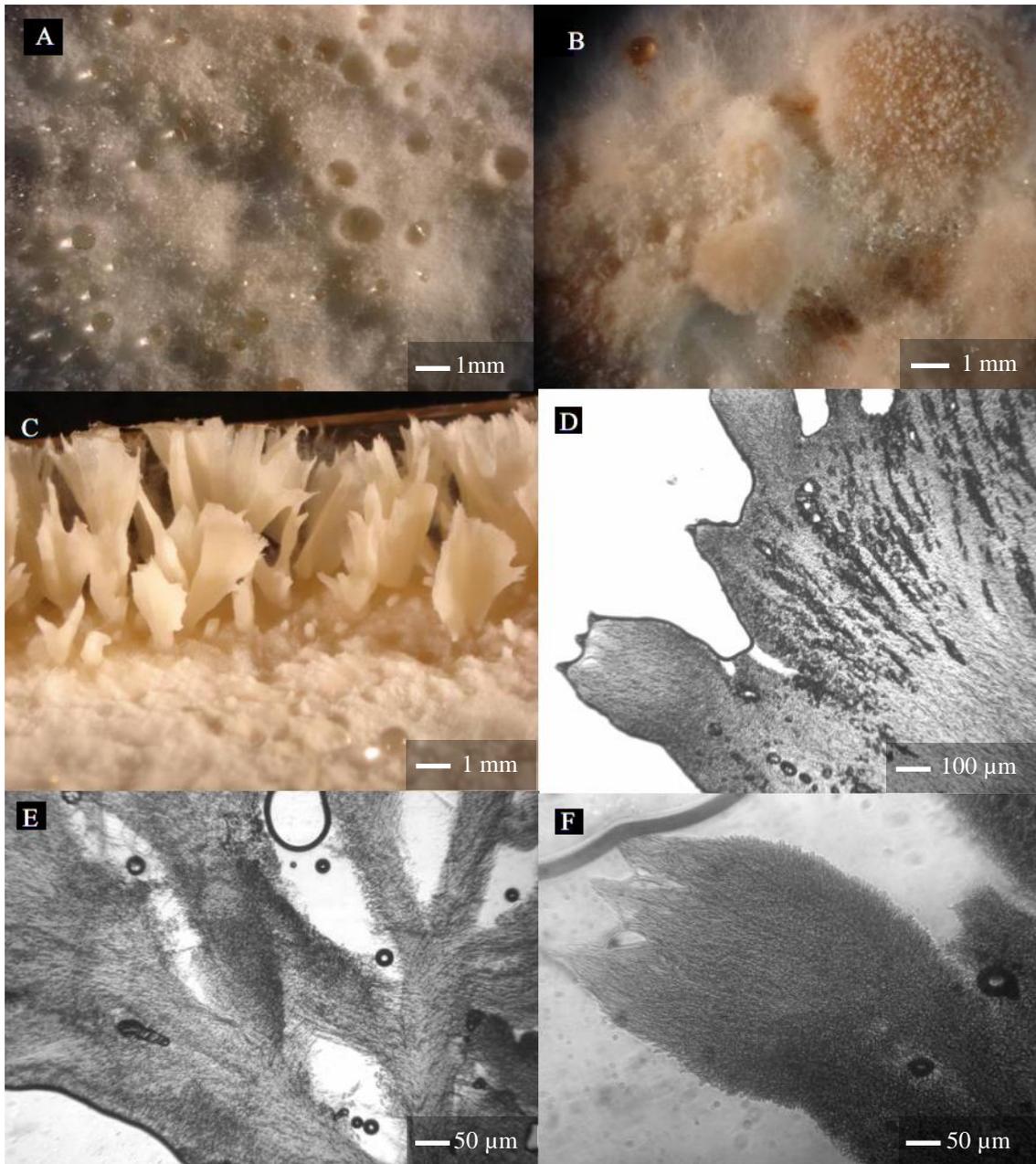


Figura 21. Micelio de *Grifola gargal* sin diferenciación superficial. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A:** trama del micelio con hifas generativas fibuladas del tipo medallón. **B:** hifas gloeopleuras (*a*) y ramificación incipiente en ángulo recto (*b*). **C:** estructura similar a un conidióforo. **D:** fíbula en medallón. **E:** hifas generativas ramificadas en una unión intercelular. **F:** clamidospora, hifas globosas de paredes engrosadas con y sin contenido celular.

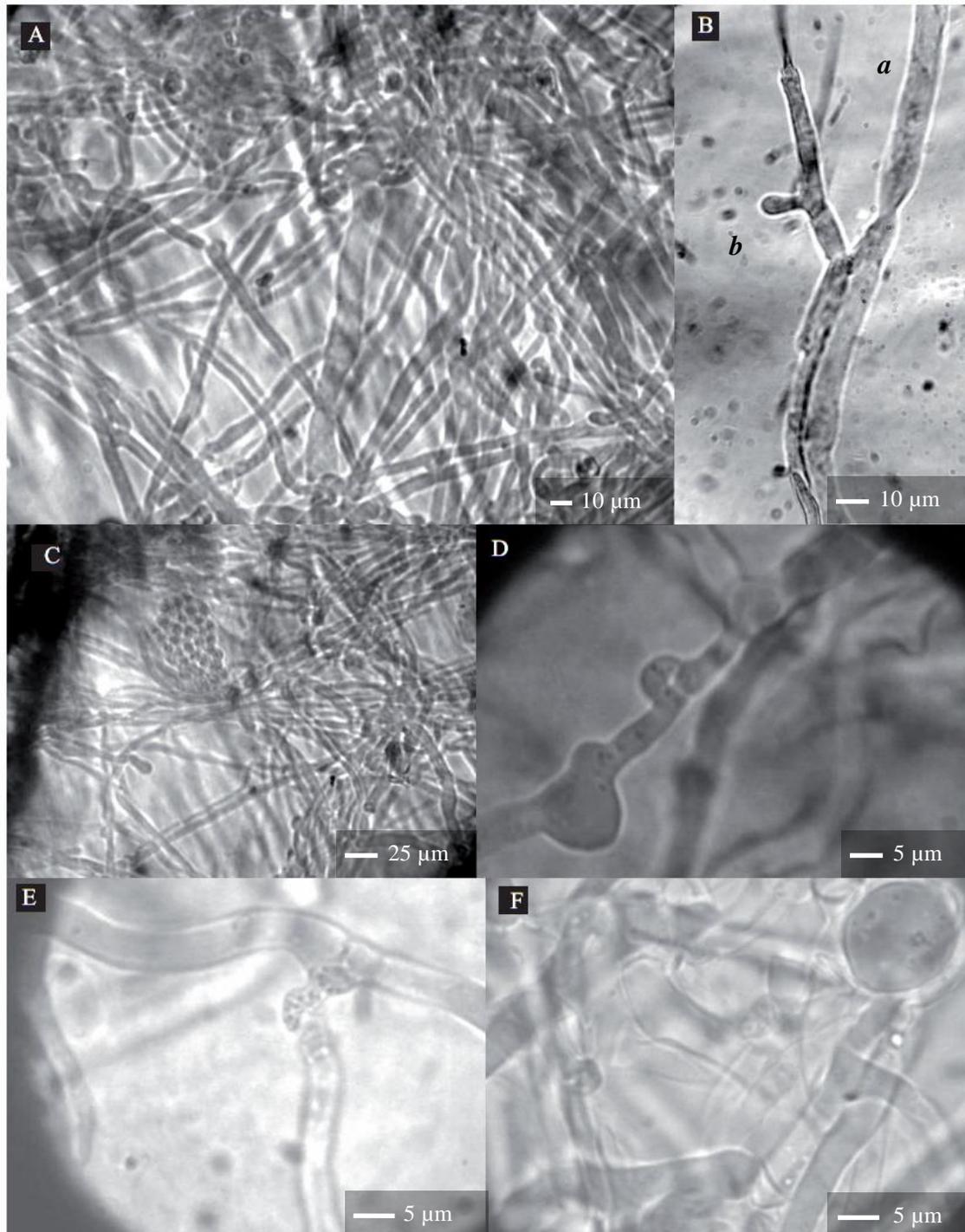


Figura 22. Micelio de *Grifola gargal* asociado a poros y exudados en cultivo sólido en agar. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A** y **B**: micelio en contacto con el agar: hifa inflada (*a*), hifa normal (*b*), clamidospora (*c*). **C**: micelio de la superficie con probasidios (*d*), basidios (*e*) y basidiósporas (*f*).

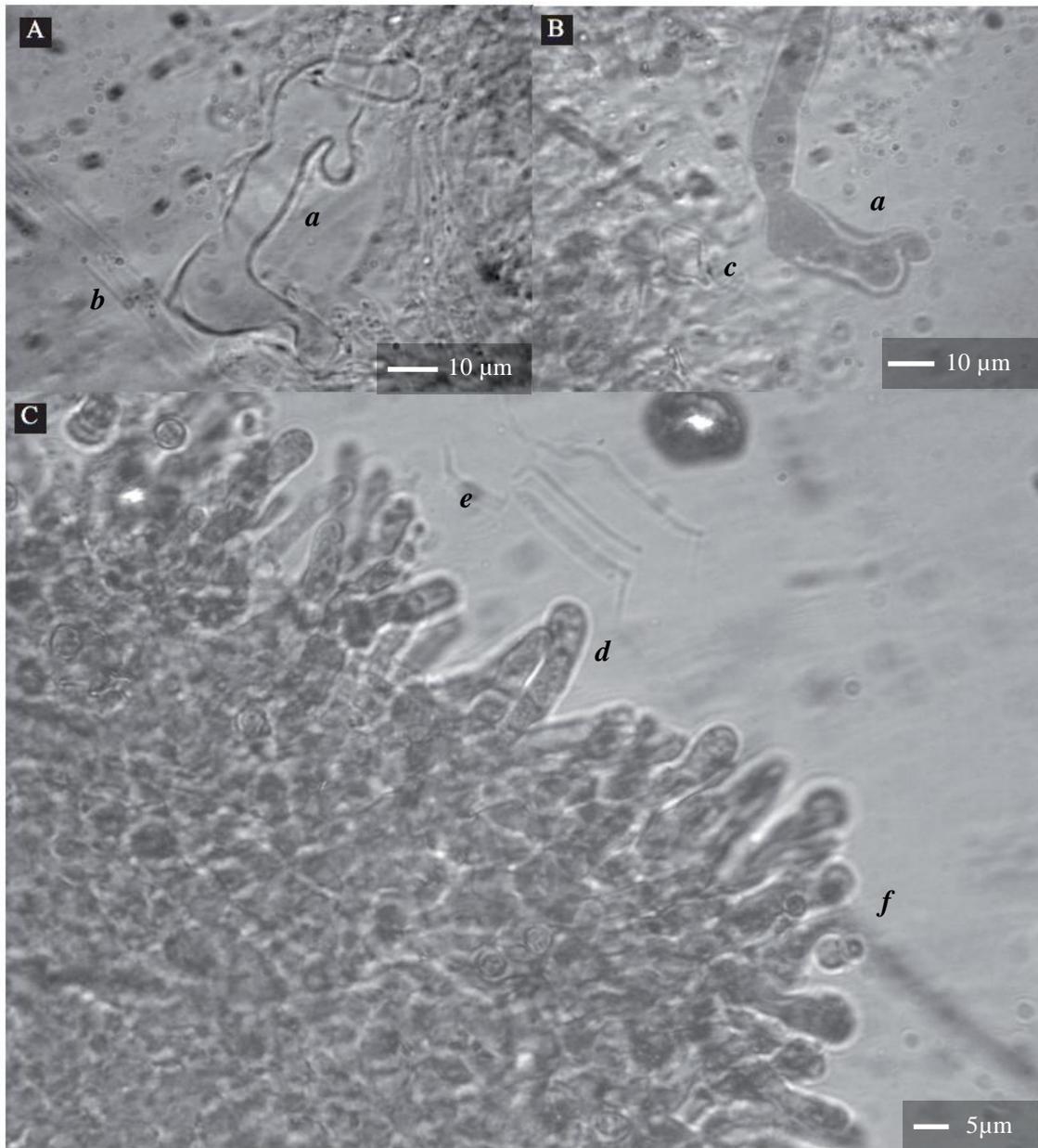


Figura 23. Micelio envejecido de *Grifola gargal*. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A:** clamidosporas, hifas rotas con formas cristaloides. **B:** hifas nodosas y clamidosporas con contenido citoplasmático. **C:** restos de agar (*a*), clamidosporas en cadena (*b*).

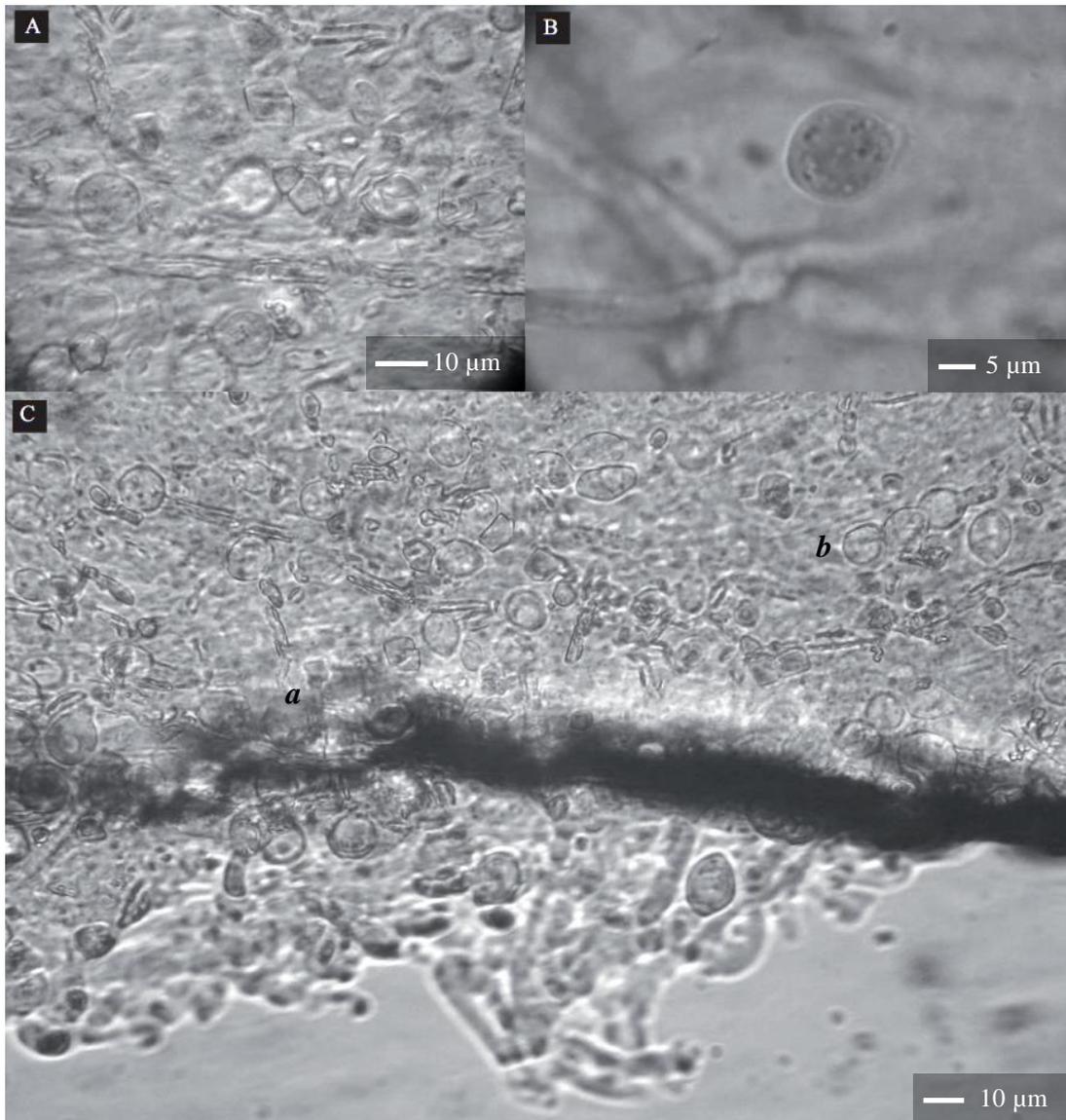


Figura 24. Himenio de *Grifola gargal* con probasidios, basidios y basidiósporas. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A, B, C, D:** lamelas y **E:** primordios. Las basidiósporas están indicadas con flechas.

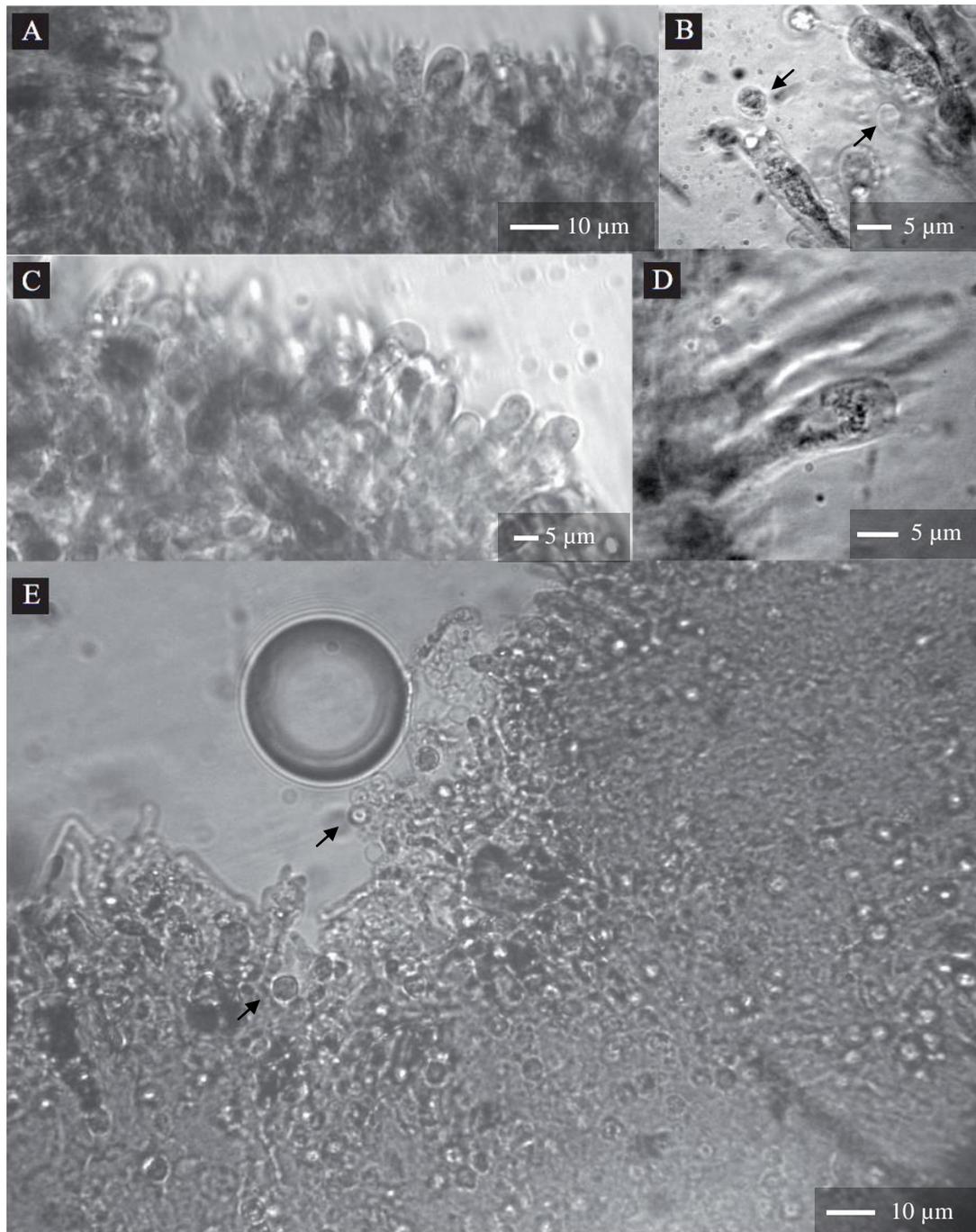
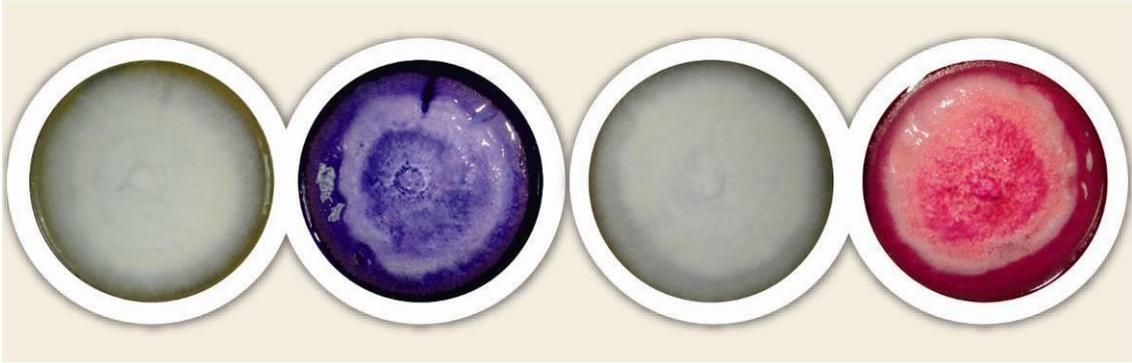
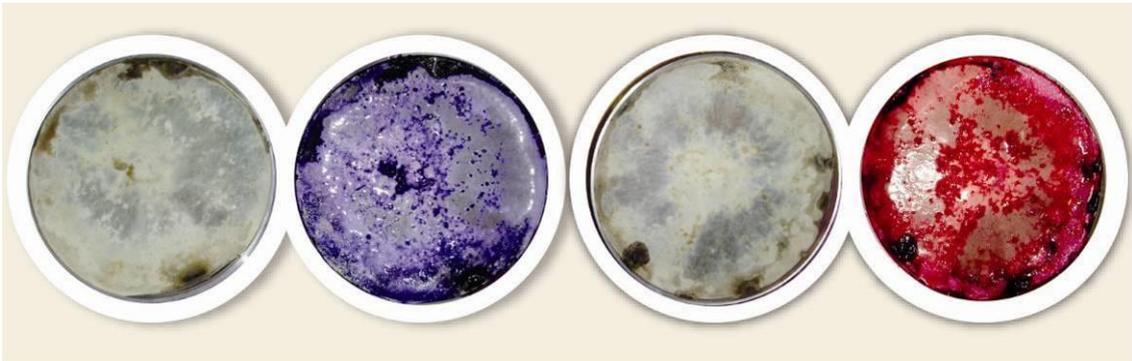


Figura 25. Tinción de *Grifola gargal* con reactivo de *Feulguen* y azul de toluidina. Los reactivos tiñen las células pequeñas, y con alta actividad mitótica. En las colonias jóvenes los reactivos tiñen el agar y de manera leve los diferentes anillos de crecimiento. A las 6 semanas, ambos reactivos tiñen selectivamente (con mayor intensidad) las zonas donde se desarrollan los primordios.

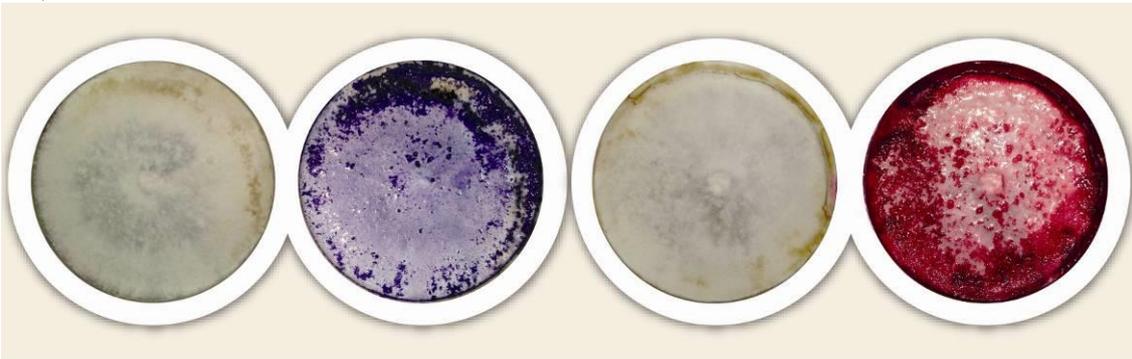
Cepa A, 3 semanas.



Cepa A, 6 semanas.



Cepa B, 6 semanas.



3.3. *Grifola sordulenta*

Los caracteres de cultivos de *G. sordulenta* observados en este estudio se comparan con los descritos por Rajchenberg y Greslebin (1995) en el **Apéndice 1**. Cabe notar que se trata de la misma cepa con diferencia de 10 años entre ambos estudios. Las principales diferencias en esta tesis son la decoloración en el medio gálico y tánico, que las hifas en vista macroscópica toman otros colores además del blanco, producen clamidosporas y que los cultivos esporulan antes de las 6 semanas.

El aspecto de la superficie de la colonia es algodonoso-lanoso y/o afelpado. En cuanto al aroma, también es almendrado como el de *G. gargal* sólo que en *G. sordulenta* es menos intenso e incluso a

veces no está presente en algunas colonias, mientras que en otros clones de la misma colonia madre si lo está. Las zonas de avance del micelio joven son irregulares, el color del micelio es blanco y en colonias sobremaduras (más de tres meses) suceden cambios de coloración denotando la presencia de metabolitos secundarios. Estas pigmentaciones anteceden la formación de agregados, primordios y/o lamelas. Estas estructuras morfogénicas son frecuentemente pigmentadas y con exudados (**Figuras 29 y 30**). La mata micelial de *G. sordulenta* forma una capa superficial “plástica” y muy resistente que dificulta su corte con sacabocados o bisturí pero que al igual que *G. gargal* se despega fácilmente del agar.

Su clasificación como hongo de la pudrición blanca de la madera fue corroborada por la decoloración del sustrato visible desde el reverso de las cajas de Petri, la generación de un halo de coloración en medio tánico (pero no en gálico) y la decoloración de ambos medios (imágenes ilustrativas se muestran en las **Figuras 2D y 3 del Apéndice 1**).

Las hifas generativas son delgadas y largas: 2,0-4,0 μm diámetro y con una longitud de *c.a.* 50 μm en la zona del micelio de avance y más de 140 μm en la zona central donde se hallan los agregados algodonosos. Las paredes de las hifas generativas son finas (*c.a.* 1 μm), IKI-, se encuentran ramificadas, poseen proyecciones y sus fíbulas tienen forma de medallón (**Figuras 26A y B, 27A, 28A-C**). Las hifas gloeopleuras son más grandes, con un diámetro de 12-20 μm , y más de 50 μm de largo. Tienen aspecto inflado y en el interior presentan gútulas (**Figuras 26C y D, y 28B**); las paredes son de espesor semejante a las hifas generativas comunes (*c.a.* 1 μm) y están separadas por septos.

Durante el estudio de los cultivos de *G. sordulenta* no se detectaron hifas esqueléticas pero sí se hallaron clamidosporas. Estas formas de resistencia eran mayormente de forma globosa a subglobosa y de 7,5-11,0 μm ancho y 8,5-13,0 μm de largo (**Figuras 17 y 28D**). También se hallaron formas intermedias entre hifas y clamidosporas (**Figuras 27B-E**). En general con paredes hialinas, delgadas, y con reacción IKI-. Siendo más abundantes en la zona envejecida del agar donde también se observaron segmentos hifales rotos de formas cristaloides.

Las estructuras esporuladoras poseen formas de agregados esféricos, lamelares o bastoncitos (**Figuras 29 y 30**), a veces llegan a formarse sendas fructificaciones que sobresalen en dirección exterior (**Figura 30**). Estas estructuras reaccionan positivamente con el reactivo de Feulgen y con azul de toluidina (**Figura 31**) (Sánchez y Moore, 1999).

Figura 26. *Grifola sordulenta*, micelio de avance. Montaje con hidróxido de potasio (A, B y C), montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina (D). A y B: hifas generativas vacías y llenas, ramificadas, con fíbulas en forma de medallón (a), clamidospora (b). C: hifa gloeopleura de 160 μm de largo y 10 μm de ancho (c). D: hifa gloeopleura de 20 μm de ancho con contenido citoplasmático, con segmentos (d). Las barras representan 10 μm .

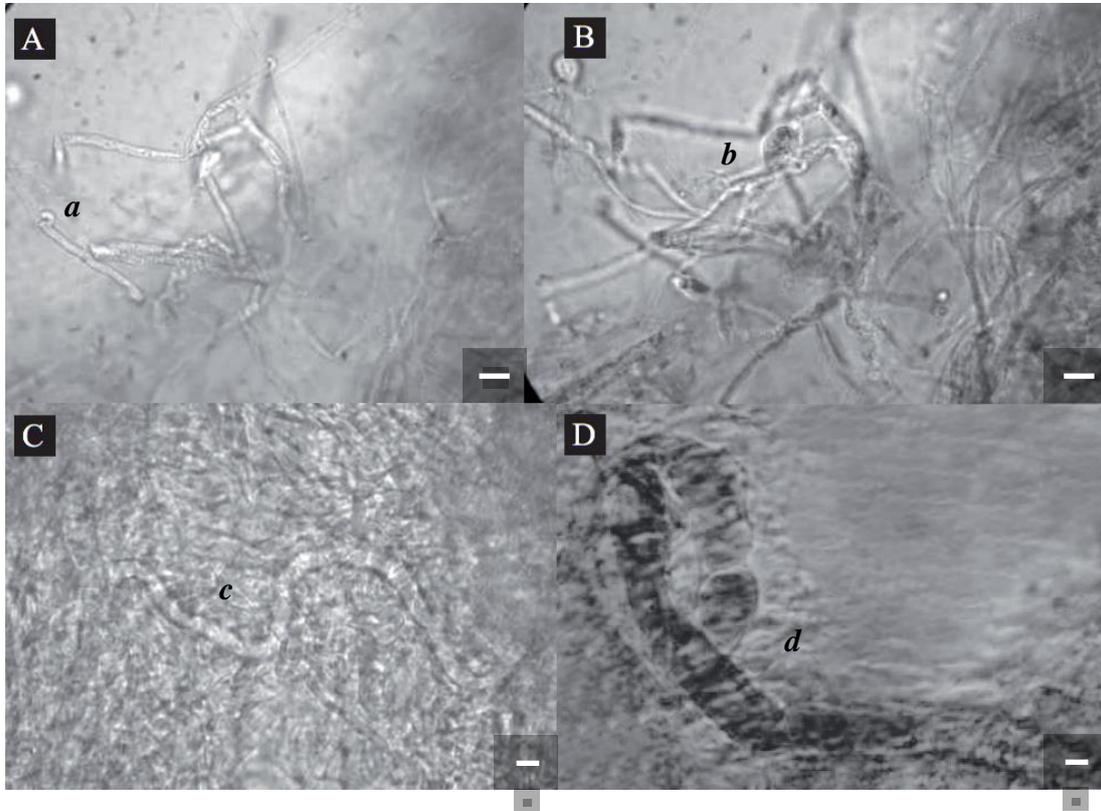


Figura 27. *Grifola sordulenta*, micelio de zonas envejecidas. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina. **A:** hifas generativas ramificadas en ángulo recto. **B y C:** clamidosporas elipsoidales con pie. **D y E:** clamidosporas en proceso de formación o de germinación. Las barras representan 10 μ m.

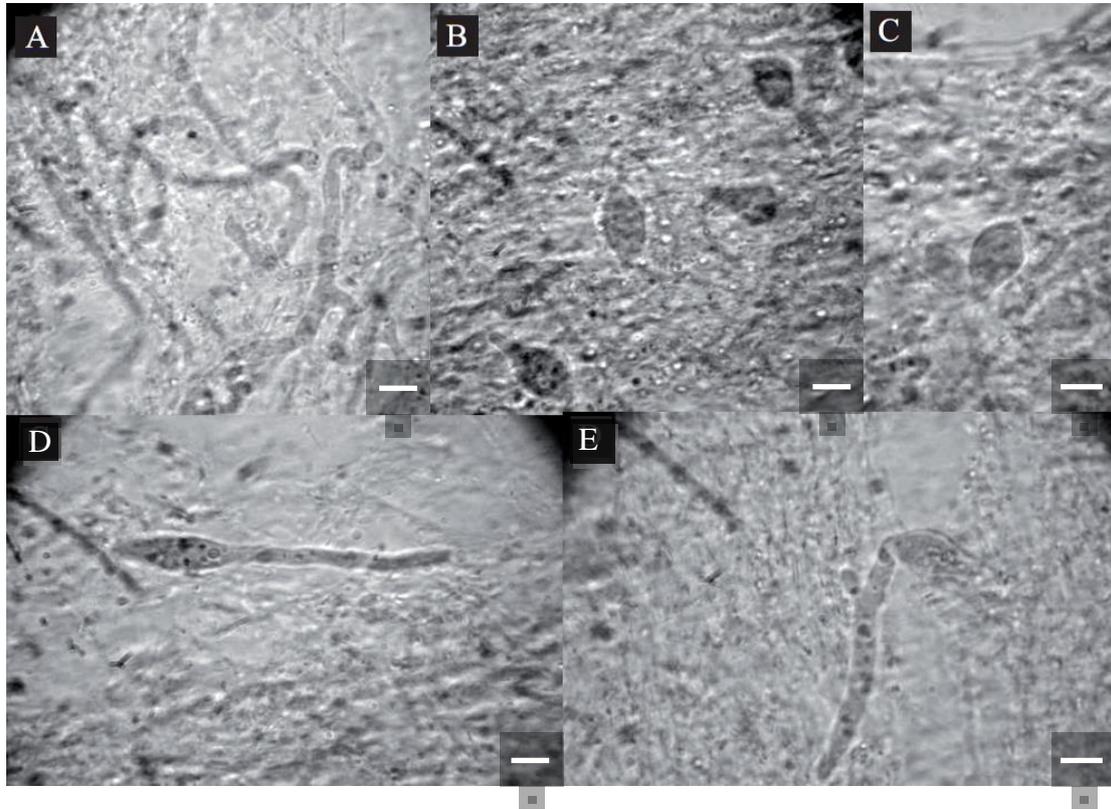


Figura 28. *Grifola sordulenta*, micelio de un agregado algodonoso. Montaje con hidróxido de potasio (A) y tinción con floxina (B, C y D). **A:** hifas generativas largas (más de 140 μm). **B:** hifas gloeopleuras cortas, segmentadas e infladas. **C:** unión intercelular desde el lado opuesto a la fíbula. **D:** clamidosporas esféricas. Las barras representan 10 μm .

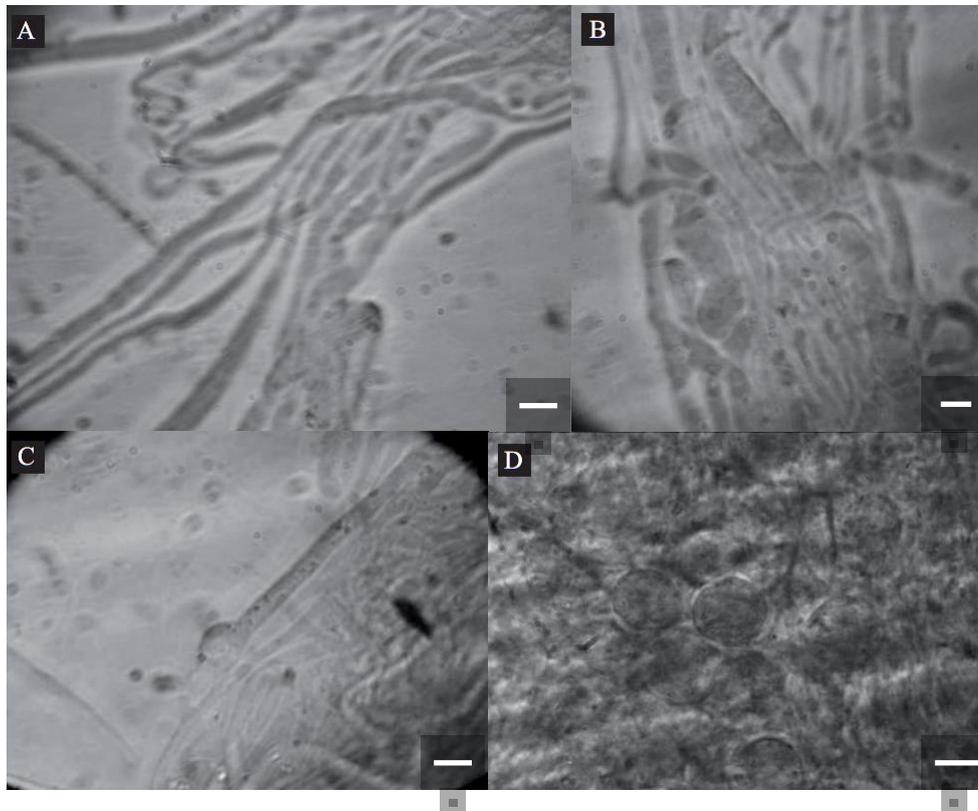


Figura 29. *Grifola sordulenta*, lamelas con forma de bastoncitos. Montaje con hidróxido de potasio y tinción con floxina (**C**, **D**, **E** y **G**), montaje con hidróxido de potasio (**F**). **A** y **B**: caja de Petri y muestra recolectada montada con hidróxido de potasio y teñida con floxina. **C** y **D**: hifas generativas cortas y largas, divididas por tabiques y fíbulas. **E**, **F** y **G**: basidiósporas con paredes hialinas y pigmentaciones en su interior. Las barras de las micrografías **C**, **D**, **E**, **F** y **G** representan 10 μ m.

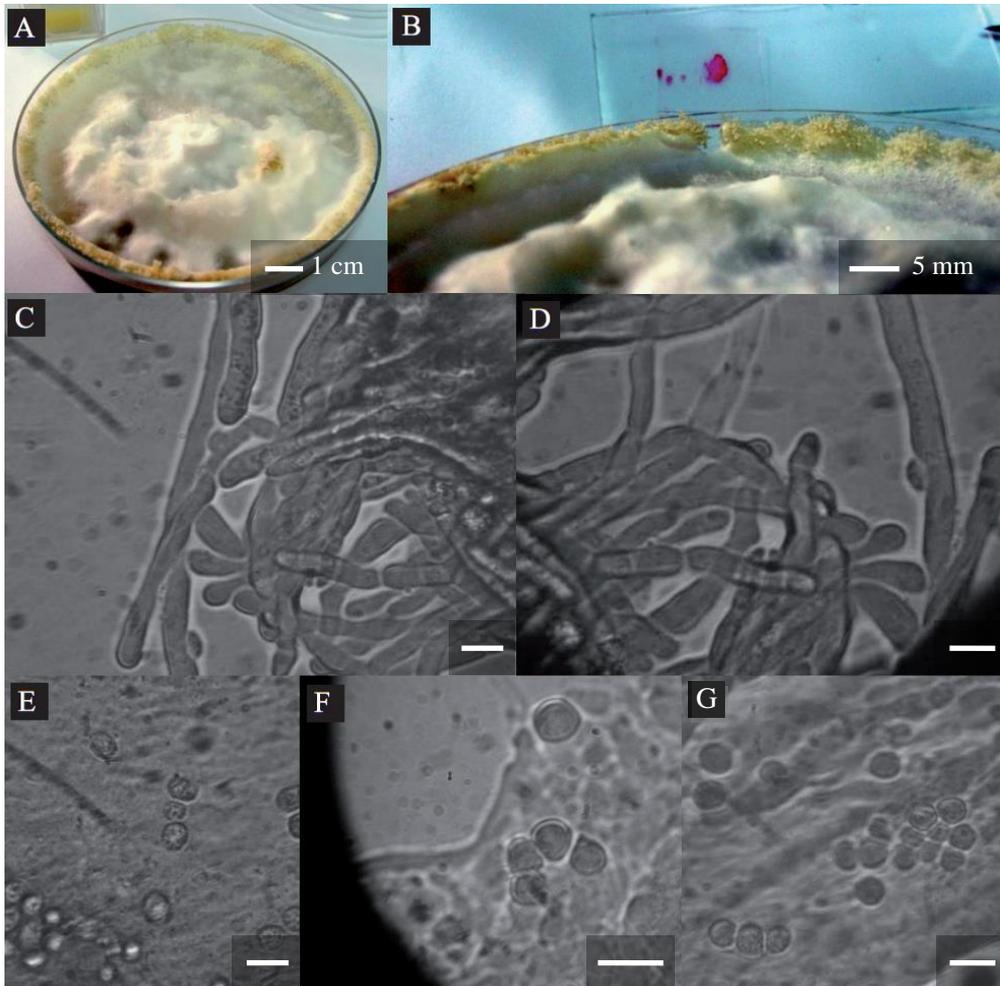


Figura 30. Lamela de *Grifola sordulenta* que creció hacia afuera de la caja de Petri. **A:** lamela pigmentada intensamente. Los preparados observados al microscopio fueron montados con hidróxido de potasio y teñidos con floxina. **B:** borde de la lamela intensamente teñida indicando un alto número de células **C:** base de la lamela. **D y E** basidiósporas refringentes. **F, G y H:** células del borde de la lamela. **I y J:** células del interior del tejido y en el centro de la lamela. **K y L:** basidios con basidiósporas.

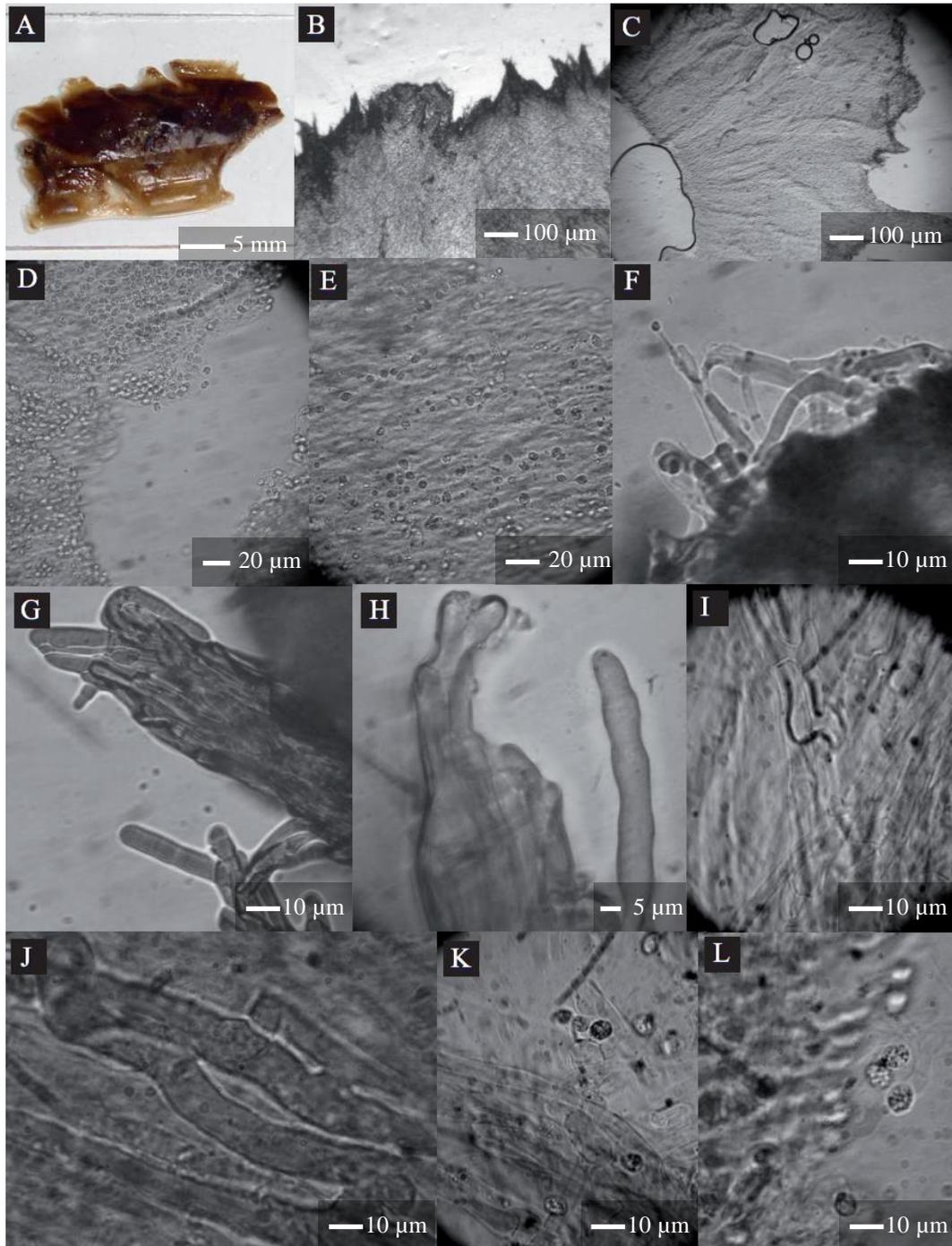
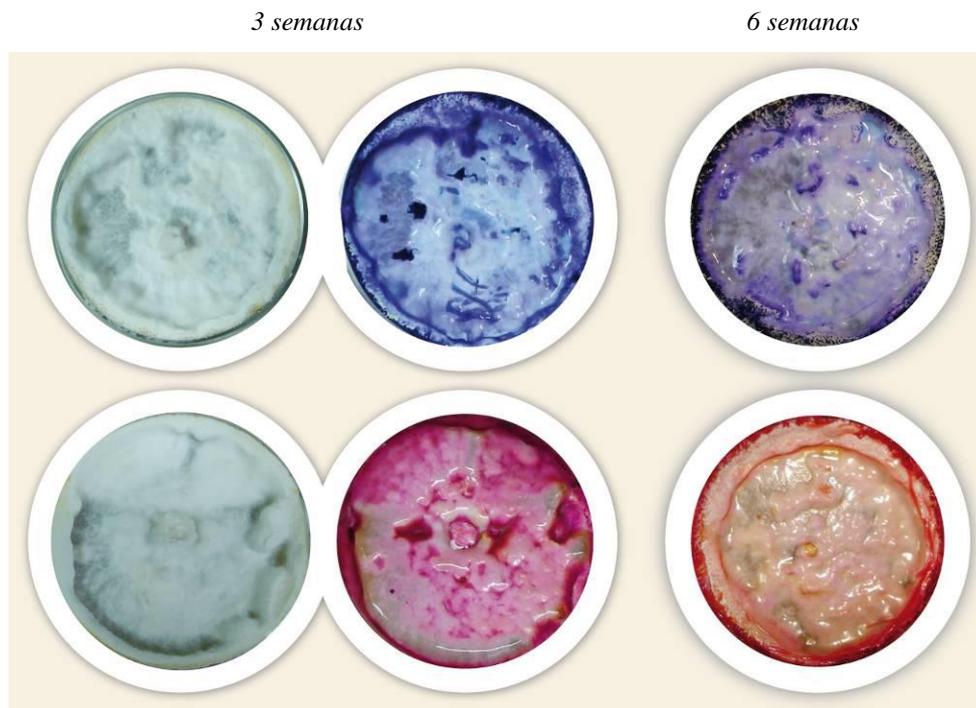


Figura 31. Tinción de *Grifola sordulenta* con reactivo de *Feulguen* y azul de toluidina. En la semana 6 hay presencia de formaciones lamelares en el borde de la colonia, que se tiñen intensamente con ambos colorantes.



4. Conclusiones

Las observaciones realizadas, así como las comparaciones con las descripciones de otros autores, contribuyeron al conocimiento de la taxonomía de estas especies y son útiles para el conocimiento general de la biología del cultivo *in vitro* de *G. frondosa*, *G. gargar* y *G. sordulenta*. La comparación entre las observaciones dentro de estas cepas con las observadas en cepas de otros autores mostró que hay variabilidad morfológica entre las cepas de cada especie. Las reacciones con colorantes de ADN y paredes celulares fueron coherentes con los cambios morfológicos y el estado de maduración del micelio, permitiendo distinguir el micelio vegetativo del micelio reproductivo.

El entrenamiento metodológico logrado fue importante para el reconocimiento morfológico de cambios en las colonias en los ensayos posteriores.

C. Fotomorfogénesis

1. Introducción

La reproducción sexual en los basidiomicetes involucra la formación de esporas haploides en basidios. Estas células especializadas nacen desde un arreglo especial de micelio fértil, el himenio, que está contenido en complejas estructuras: las fructificaciones, basidiomas, esporocarpos, o comúnmente denominados “hongos” para las personas no familiarizadas con la biología del reino *Fungi* (Moore-Landecker, 1996).

La inducción y desarrollo del crecimiento reproductivo que conduce a la formación de las fructificaciones está controlado por factores ambientales, genéticos, hormonales y nutricionales (Moore-Landecker, 1996). En general, ya sea en la etapa vegetativa o reproductiva, no hay una condición óptima única para este conjunto de factores, sin embargo muchas especies crecen y se reproducen satisfactoriamente sólo en determinadas condiciones acotadas de acuerdo a su adaptación a un determinado hábitat. Incluso, las pautas nutricionales y ambientales que inducen a la reproducción asexual pueden ser distintas de las condiciones para la reproducción sexual. Los factores suelen interactuar entre sí y el efecto particular de un factor puede ser modificado por el de otros factores; por ejemplo, el requerimiento de luz puede ser modificado por la temperatura o ciertos requerimientos vitamínicos por la disponibilidad de carbohidratos (Moore, 1998). Generalmente, la mayoría de los factores físicos y nutricionales tienen un efecto cuantitativo, aumentando o disminuyendo el número de esporas y estructuras reproductivas, dependiendo de la intensidad y/o concentración de los factores involucrados (Moore-Landecker, 1996).

La reproducción está asociada con la declinación del crecimiento somático. Los esporocarpos se forman cuando hay una maduración del micelio y los factores nutricionales disponibles en el sustrato se hacen insuficientes -limitantes- para sostener un crecimiento vegetativo. A medida que el basidioma comienza a formarse, se transportan los materiales necesarios para su crecimiento desde el micelio vegetativo en una suerte de relación fuente destino. Frecuentemente, los cultivos en cajas de Petri generan fructificaciones luego de un cierto período. Algunos de éstas son idénticas a las generadas naturalmente, otras veces presentan diferentes anomalías (Moore-Landecker, 1996).

1.1. Morfogénesis

La flexibilidad en la expresión de los programas del desarrollo permite que en condiciones de crecimiento adversas el micelio vegetativo cambie al estado reproductivo, generando la fructificación que finaliza con la producción de esporas, cerrando así su ciclo biológico. Según Moore (1998), esta tolerancia a la imprecisión de los parámetros ambientales, es un atributo importante de la morfogénesis en el reino *Fungi*. En otras palabras, las hifas son capaces de desarrollarse permitiendo que asuman un estado de diferenciación sin que hayan sido dadas todas las condiciones (Moore, 1998). La comprensión de la morfogénesis consiste en establecer hasta qué punto el medio exterior de una hifa en un estado vegetativo puede influenciarla en una manera dependiente del tiempo y del lugar

para desencadenar estos procesos (Moore, 1998). El estudio de la morfogénesis en los *Fungi* revela que una compartimentalización funcional en procesos o programas denominados “subrutinas” pueden encontrarse en todos los tejidos, células y componentes celulares. Estas subrutinas son distintas tanto genéticamente, como fisiológicamente y pueden ser ejecutadas en paralelo o en secuencia (Chiu *et al.*, 1989). Cuando lo hacen en el orden correcto el resultado es la “morfología normal” de las fructificaciones, y si algunas subrutinas no están activadas (bajo un estrés genético o fisiológico), el resto puede continuar, y esta ejecución parcial de subrutinas conlleva a “tejidos anormales” (*ibíd.*).

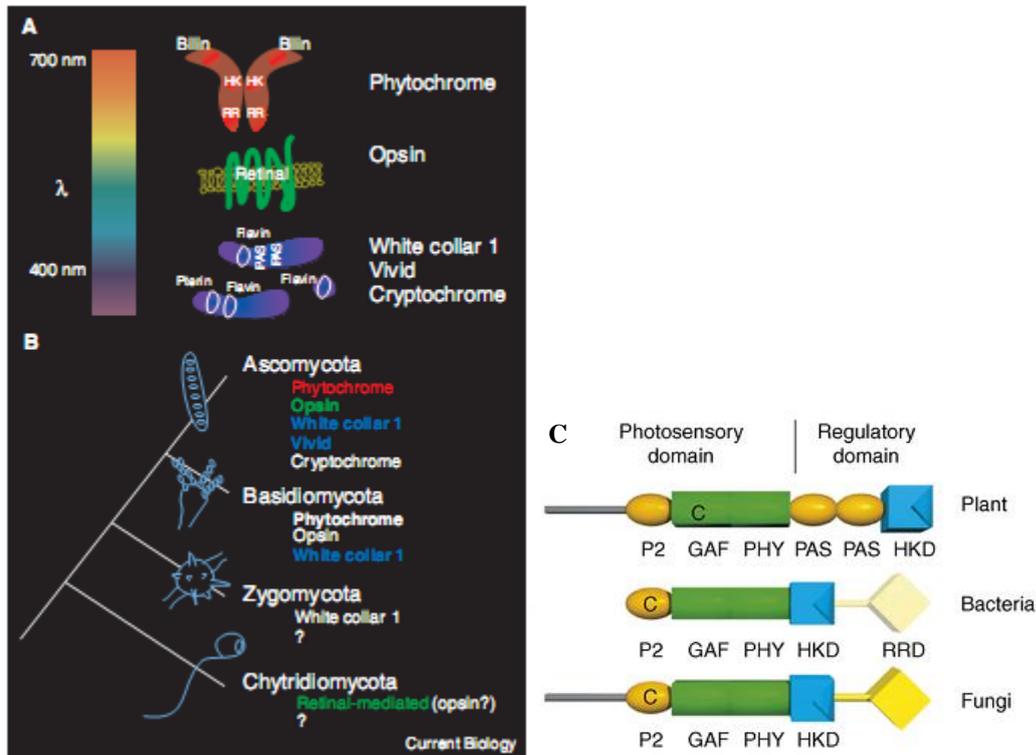
1.2. La luz como variable en la morfogénesis

La luz es utilizada por organismos no fotosintetizadores como una señal importante del ambiente (**Figura 32**). La sensibilidad a la luz ha sido conservada a través de la evolución de los reinos desde *Archaea* y *Fungi* hasta *Animalia* (Purschwitz *et al.*, 2006). En los hongos, la sensibilidad a la luz está mediada por fotorreceptores proteicos simples en su estructura, pero complejos en cuanto a la cantidad y variabilidad de respuestas en el desarrollo y metabolismo (Idnurm y Heitman, 2005).

Los fotorreceptores comienzan la cascada de señales que al internalizar esa pauta ambiental desencadenan fenómenos a nivel metabólico, fisiológico y/o reproductivo (Purschwitz *et al.*, 2006). La ausencia o presencia y los niveles de energía lumínica, intensidad y fotoperíodo, resultan tanto en la estimulación como en la inhibición de la formación de las estructuras reproductivas y de las esporas. Así, según su respuesta, los hongos se dividen en: i) aparentemente indiferentes a la luz, ii) aquéllos en que la esporulación disminuye por exposición a la luz, iii) los que requieren ciclos de luz alternados, iv) aquéllos que pueden producir esporas en completa oscuridad pero en presencia de luz lo hacen en mayor cantidad y, v) los que requieren luz para producir esporas (Moore-Landecker 1996; Ellis *et al.*, 1999).

En cuanto a la longitud de onda, los hongos responden principalmente a la luz ultravioleta, azul, verde y roja. Se ha observado que los hongos pueden responder morfogénicamente de manera diferente según la longitud de onda y es así que se dan casos donde a una longitud de onda se inhibe una respuesta mientras que a otra longitud de onda esta inhibición puede ser revertida (Tan, 1975), similarmente a la fotorreversibilidad típica del fitocromo en el reino vegetal, que es un pigmento que presenta óptimos de absorción lumínica en longitudes del rojo (660 nm) y del rojo lejano (730 nm) (Taiz y Zeiger, 1998).

Figura 32. Fotorreceptores en *Bacteria* y *Eucarya*. **A:** los fotones son absorbidos por proteínas respondiendo a diferentes longitudes de onda del espectro visible. **B:** el rojo y rojo-lejano es detectado por el fitocromo, el verde por opsinas y el azul-UV por flavoproteínas (fototropinas y criptocromos). **C:** los genes que codifican para fotorreceptores presentan homologías conservadas entre *bacteria*, *Fungi* y *Plantae*. Fuente: Purschwitz *et al.*, 2006.



1.3. Luz azul

Los receptores de la luz azul pueden dividirse en dos clases generales de flavoproteínas: los criptocromos y las fototropinas. Los criptocromos son moléculas evolucionadas de las enzimas fotoliasas capaces de desencadenar la fructificación *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*. Su efecto es tan notable que produce este fenómeno aún en presencia de nutrientes y a bajas intensidades lumínicas, condiciones que normalmente no conducen al desarrollo de la fructificación (Arjona *et al.*, 2009).

Usando la secuencia de criptocromo PHL1 de *Cercospora zea-maydis* se han encontrado otras especies que contienen este tipo de genes: *Phanerochaete chrysosporium*, *Postia placenta*, *Puccinia graminis* y *Ustilago maydis* (Bluhm y Dunkle 2008). *Lentinula edodes* posee un receptor de fototropina que es crítico en el proceso de fructificación, ya que se observó que sólo en la presencia de luz azul se pueden diferenciar las células que originan las fructificaciones (Sano *et al.*, 2009; Katayose *et al.*, 1990).

El género *Coprinus* es un modelo clásico en estudio de morfogénesis. Mediante complejos experimentos de calidad, cantidad y diferentes regímenes de luz, se hallaron evidencias de la existencia de al menos un receptor del tipo fototropina en estos basidiomicetes (Terashima *et al.*,

2005). En la morfogénesis de este género la condición lumínica es considerada como la variable ambiental más importante (Kües, 2000).

En algunas especies como *Neurospora crassa*, considerada como modelo de estudio de la recepción de luz, se han hallado respuestas a la luz azul mediadas por criptocromos (Borkovich *et al.*, 2004) así como fototropinas (Liu *et al.*, 2003; Schwerdtfeger y Linden, 2003).

Schizophyllum commune por su parte posee flavoproteínas que regulan los procesos de agregación de las hifas para la formación de primordios y la diferenciación de fructificaciones. La respuesta se encuentra entre 320 a 535 nm de longitud de onda, siendo óptima a 448 nm y es lineal con la intensidad lumínica (Raudaskoski y Mattila, 1985; Perkins y Gordon, 1969). En un cultivo micelial centrífugo *i.e.*: inoculación en el centro de la caja de Petri, las fructificaciones se producen en diferentes anillos de micelio sugiriendo que las células a diferentes edades tienen distinta habilidad para ser fotoinducidas (Perkins, 1969). Otros resultados señalan que a longitudes de onda de mayor energía, *i.e.* 280 y 340–360 nm se requiere siete veces menos energía cuántica efectiva que la necesaria a 437 y 467 nm para la diferenciación de fructificaciones (Yli-Mattila, 1985). Además de estos efectos, en *Schizophyllum commune* la luz induce también la formación de un pigmento marrón antes de la aparición de las fructificaciones. Se constató también que existen diferencias de respuestas entre distintas cepas (*ibíd.*).

Sphaerobolus stellatus es un gasteromicete que muestra diferentes respuestas a tres anchos de banda de luz las cuales están mediadas por flavoproteínas y pigmentos carotenoides (Ingold y Peach, 1970). La luz azul (400-520 nm) induce el proceso de fructificación, el rojo-rojo lejano (600-720 nm) produce cambios morfogénicos menores y en el amarillo (570 nm) ocurre una aceleración en la producción de esporas (Alasoadura y Visser, 1972).

1.4. Luz roja

La luz roja estimula otros fotorreceptores: los fitocromos (Purschwitz *et al.*, 2006). Cuyos cromóforos son tetrapirroles de cadena abierta conocidos como bilinas (Rockwell *et al.*, 2006). Los fitocromos llevan a cabo una fotoconversión reversible entre dos estados conformacionales. En bacterias y hongos son similares entre sí y comparten una estructura general con las plantas.

Varias especies de hongos responden a la luz roja. Por ejemplo, *Aspergillus nidulans* se reproduce asexualmente a 680 nm, mientras que a 740 nm u oscuridad se inhibe la reproducción asexual y la delección de genes codificadores para los fitocromos genera mayor número de esporas por lo que se presume que estos receptores están involucrados en la represión sexual (Mooney y Yager, 1990).

Los fitocromos se han identificado en varias especies como *Neurospora crassa* (Froehlich *et al.*, 2005), *Botryotinia fuckeliana*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Gibberella moniliformis*, *Gibberella zeae*, y *Ustilago maydis* (Vierstra y Karniol, 2005).

1.5. Luz verde

Los receptores proteicos capaces de absorber luz verde son las opsinas y están presentes en *Fungi*, *Archaea* y *Animalia* (Purschwitz *et al.*, 2006). Es muy poco conocida la presencia y función de estos receptores en hongos, por ejemplo en *Neurospora crassa* una opsina tiene su pico máximo de absorción a 534 nm y cuya reacción a la luz es muy lenta, por lo que se descarta una función energética como bombeadora de protones, y la delección del gen que codifica para esta opsina no produce ningún fenotipo distinguible, lo cual dificulta la interpretación de sus funciones biológicas (Bieszke *et al.*, 1999; Furutani *et al.*, 2004). En el hongo uniflagelado *Allomyces reticulatus* existe una opsina que funciona en la fototaxis, y en el ascomicete *Leptosphaeria maculans* una opsina funciona como bombeadora de protones (Idnurm y Heitman, 2005). No se halló en la literatura la presencia de estos receptores en hongos basidiomicetes.

1.6. Políporos

Ganoderma lucidum requiere luz azul para comenzar la formación de basidiomas. En oscuridad se inhiben o desarrollan fructificaciones atípicas o carentes de basidiósporas con respuestas variables entre cepas (Seo *et al.*, 1995).

Favolus arcularius es un políporo lignícola que requiere la inducción luminosa para el desarrollo de las fructificaciones, el espectro en el que se produce esta iniciación se encuentra entre 350 y 560 nm. No se conoce qué receptor lumínico participa en esta respuesta y no estarían involucrados los carotenoides y flavinas (Kitamoto *et al.*, 1968).

El número de primordios y la producción de esporas aumentan con la intensidad de luz en *Grifola frondosa* llegando a producirse esporas aún desde los primordios cuando reciben una intensidad muy fuerte (Stamets, 1993). Para lograr una morfología deseable de las fructificaciones, la inducción de primordios con luz debe iniciarse a bajas intensidades de luz (100-500 lux) y luego ir aumentando a medida que se desarrollan las fructificaciones (*ibíd.*).

1.7. Hipótesis

La irradiación de luz afectará la velocidad de crecimiento y el cambio del metabolismo primario al metabolismo secundario durante el crecimiento vegetativo del cultivo *in vitro* de *G. gargaral*. En cultivos *in vitro* maduros y sometidos a un choque térmico: la luz provee una señal que incrementa las respuestas del metabolismo secundario. Por la complejidad del proceso de iniciación de morfogénesis, es posible que existan variaciones de respuesta entre cepas y entre especies. La participación de una o más moléculas en la captación de la luz podría evidenciarse con el uso de filtros apropiados.

1.8. Objetivos

Estudiar la influencia de la luz en los procesos de crecimiento vegetativo de *G. gargal* *in vitro* exponiendo micelio en crecimiento bajo distintos anchos de longitudes de onda. Evaluar la respuesta morfológica en colonias maduras de *G. gargal* y *G. sordulenta* en respuesta a la luz de distintos anchos de longitudes de onda.

2. Materiales y métodos

Los ensayos de influencia de la luz sobre micelio vegetativo fueron realizados con *G. gargal* (cepa A); los ensayos de fotomorfogénesis se llevaron a cabo en *G. gargal* (cepa A y cepa B) y *G. sordulenta*.

Como dato de la luz ambiental del sitio de recolección de las especies en estudio, se tomaron los registros anuales del amanecer y el ocaso correspondientes al Parque Nacional Lanín (www.infoclima.com.ar) y se calculó la duración del fotoperíodo a lo largo del año (**Figura 33**).

2.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo de *Grifola gargal*

Se inoculó medio MYP A en cajas de Petri con la cepa A de *Grifola gargal* y se incubó en oscuridad por 72 h a $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de este período, las cajas de Petri como unidades experimentales (u.e.) se distribuyeron aleatoriamente en los tratamientos: *Luz Azul*, *Luz Verde* (n=8); y *Luz Roja*, *Luz Blanca* y *Oscuridad* (n=9). El tratamiento de luz consistió en irradiar a las unidades experimentales con una radiación de flujo fotónico de $4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ emitida por un tubo fluorescente de luz blanca (20 watts, Philips TLT 20W/54 RS *daylight*) ubicada a 60 cm.

Las colonias se cultivaron durante 33 días con un fotoperíodo de 12 h bajo las condiciones mencionadas de irradiación de energía lumínica, las cuales se obtuvieron utilizando hojas de celofán de color azul, verde o rojo (tratamientos denominados *Luz Azul*, *Luz verde* y *Luz roja*, respectivamente) acorde con Galston y Satter (1974), sin filtro de celofán (*Luz Blanca*) y un control en ausencia de irradiación que se realizó envolviendo las colonias en papel de aluminio (*Oscuridad*). En las **Figuras 34** y **35** se muestran imágenes representativas de las condiciones del ensayo.

El análisis de crecimiento se realizó midiendo el diámetro promedio de dos mediciones perpendiculares cada 3 días. También se compararon las velocidades de crecimiento al día 33 (mm día^{-1}). Estos dos análisis se analizaron con Anova simple ($\alpha = 0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Por otra parte, con el fin de detectar manifestaciones atribuibles al cambios morfológicos: exudados y agregados miceliales, se observó su presencia o ausencia cada 3 días, y luego se analizaron comparaciones da a pares con el test de Fisher según Lowry ($\alpha = 0,05$) (2011).

La temperatura del cuarto se controló con un equipo de aire acondicionado ajustado para un rango térmico de $21 \pm 3^\circ\text{C}$ y se registraron periódicamente las temperaturas máximas y mínimas. Los valores de temperatura se muestran en la **Figura 36**.

Figura 33. Horarios del amanecer, ocaso y duración del fotoperíodo en el Parque Nacional Lanín.

Fuente: www.infoclima.com.ar.

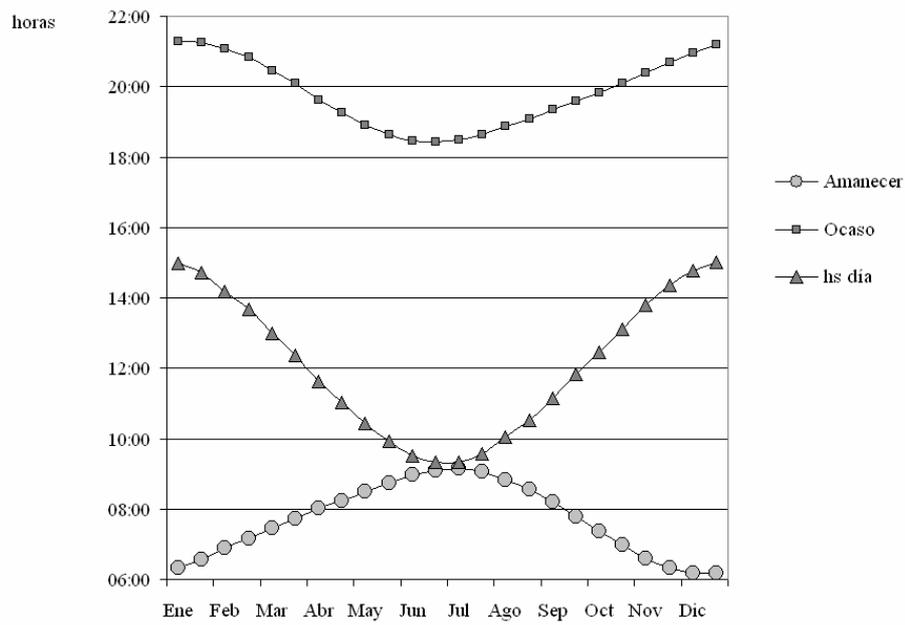


Figura 34. Cuarto de cultivo e irradiación de luz. En la figura de la izquierda se muestra la disposición de los tratamientos, y en la de la derecha la ubicación del tubo fluorescente.

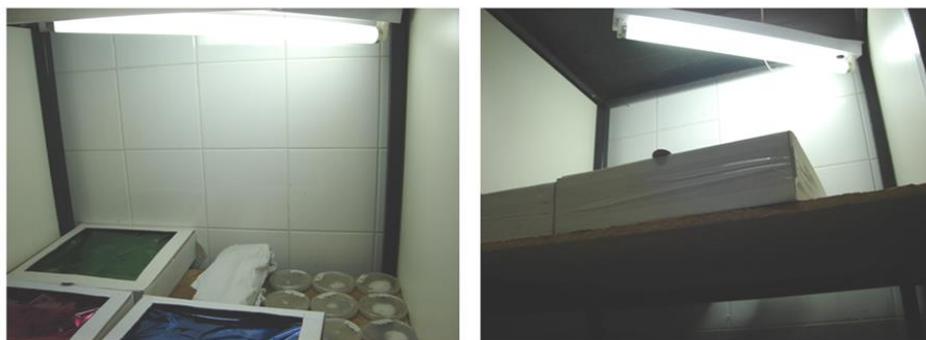
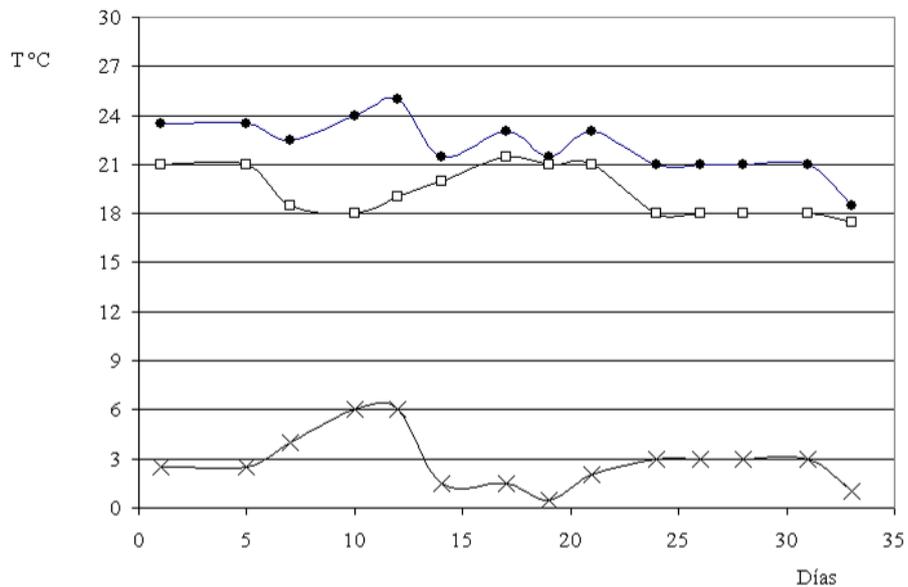


Figura 35. Placas que muestran los efectos de los tratamientos a 30 días del comienzo del ensayo. *Luz blanca* (A), *oscuridad* (B), *Luz azul* (C), *Luz verde* (D), *Luz roja* (E). Obsérvese el crecimiento y apariencia contrastante de micelio en los tratamientos con luz y en oscuridad.



Figura 36. Evolución de las temperaturas máxima (●), mínima (□), y rango térmico (×) registrados durante el período del ensayo. La temperatura máxima promedio durante el ensayo fue de 22,1°C, y la mínima de 19,1°C y los mayores valores del rango térmico diario se registraron entre los días 7 y 12.

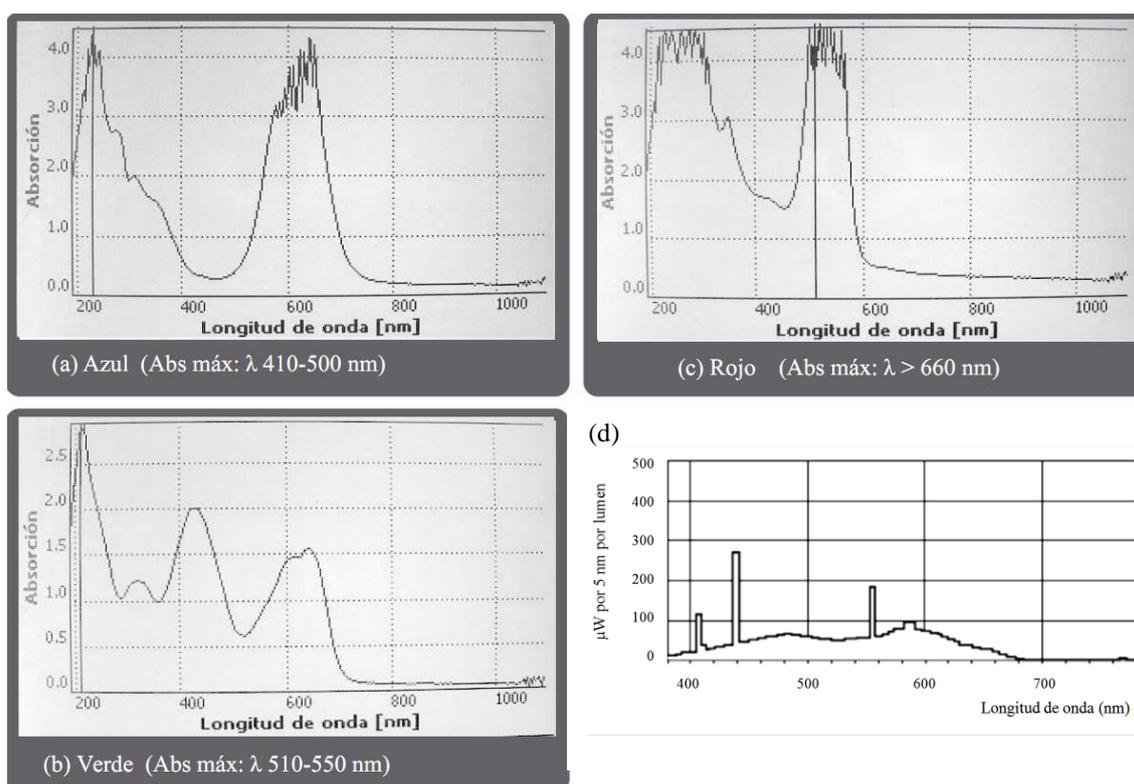


2.1.1. Tipo de irradiación lumínica

Los espectros de absorción de cada tratamiento lumínico se registraron con un espectrofotómetro *Spectroquant UV/VIS Spectrophotometer Pharo 300*© (**Figuras 37a-c** nótese que es el complementario al espectro de emisión). La energía de radiación del tubo fluorescente, según datos del fabricante en μW por 5 nm por lumen, se muestra en la **Figura 37d**.

Asimismo se determinaron las correspondientes densidades de flujo fotónico a nivel de las cajas de Petri mediante un equipo de medición de PAR (*photosynthetically active radiation*) LICOR^{MR}. Las mismas fueron de $4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (blanca), $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (azul), $3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (verde) y $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (roja).

Figura 37. Espectros de absorción de los filtros preparados con hojas de celofán. Se emplearon hojas de color azul (a), verde (b) y rojo (c), también se muestran como referencia los colores de las diferentes longitudes de onda. Espectro de emisión del tubo fluorescente en el rango de 380- 800, fuente: <http://www.ecat.lighting.philips.com> (d).



2.2. Fotomorfogénesis en *Grifola gargar* y *G. sordulenta*

Se prepararon cultivos de *G. gargar* (cepa Ay B) y *G. sordulenta* en medio MYPA modificado contenido en cajas de Petri. Los detalles de las condiciones del ensayo se presentan en la **Tabla 4**. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo CCC-20 (Lab. Electrónica, CCT-CONICET Bahía Blanca) con control de temperatura, fotoperíodo y humedad. La humedad permaneció constante a 90% durante todo el ciclo de cultivo. Éste comenzó en las condiciones mencionadas como óptimas en la literatura para el crecimiento vegetativo: oscuridad y temperatura normal (17 y 19°C); luego de la colonización

completa, el cultivo continuó en oscuridad y se disminuyó la temperatura para producir un choque térmico. Este pre tratamiento se realizó con el propósito de llevar el micelio a un estado fisiológico y nivel térmico de manera que permitiera que la inducción lumínica tuviera lugar.

Culminado el pre tratamiento, las colonias (u.e.) se distribuyeron en 6 u.e. para cada tratamiento (*Luz blanca*, *Oscuridad*, *Luz azul*, *Luz verde* y *Luz roja*) de *G. gargal* (cepas A y B). En el caso de *G. sordulenta*, los tratamientos *Luz blanca* y *Luz roja* consistieron en 6 u.e. cada uno (una u.e. del tratamiento de luz roja se contaminó y fue descartada), mientras que los demás tratamientos contaron con 7 u.e. cada uno.

Los tratamientos lumínicos se lograron empleando láminas de acrílico de Plexiglas^{MR} de 4 mm de espesor para los colores azul, verde y rojo, (ver características en 2.2.1 y en la **Figura 38**). Para el tratamiento *luz blanca* las cajas se expusieron directamente a la fuente luminosa y para el de oscuridad se evitó la incidencia lumínica protegiéndolas mediante una barrera de acero inoxidable. Además, con el propósito de imitar las condiciones existentes en los hábitats naturales en la época de fructificación de estos hongos (ver Mayo-Junio en la **Figura 33**), se aplicó un fotoperíodo de 10 h y una oscilación térmica de 12°C para el fotoperíodo y de 2°C para el nictoperíodo.

Las cajas se rotaron de posición semanalmente. El crecimiento del micelio se registró fotográficamente. A partir del día 92 las colonias se destaparon momentáneamente (ventilación) y también se fotografiaron, procedimiento que fue repetido en adelante dos veces más, una vez por semana. Se utilizó el test Chi^2 y el test de Fisher ($\alpha=0,05$) acorde a Lowry (2011), para la comparación del número de u.e. presentando cambios primarios: exudados, aroma almendrado, pigmentos, poros; y secundarios: agregados (cúmulos de micelio <5 mm), lamelas, primordios (agregados esféricos >5 mm) entre tratamientos.

Tabla 4. Fases y condiciones del experimento para el estudio de la fotomorfogénesis en *Grifola gargal* y *G. sordulenta*.

	Inicio	Crecimiento vegetativo	Inducción del metabolismo 2 ^{rio}	Irradiación	Irradiación + ventilación
Procedimiento	Inoculación	Cultivo en oscuridad	Choque frío	Inspección semanal (a)	Inspección semanal (b)
Período desde la inoculación (días)	0	1-22	22-58	58-92	92-119
Período de duración de cada fase (días)	-	22	36	34	27
Fotoperíodo	-	No	No	7 h	7 h
Control de temperatura	18°C	7 h a 19°C 17 h a 17°C	5°C	7 h a 10°C 17 h a 2°C	7 h a 10°C 17 h a 2°C
Ventilación	-	No	No	No	1 cambio semanal

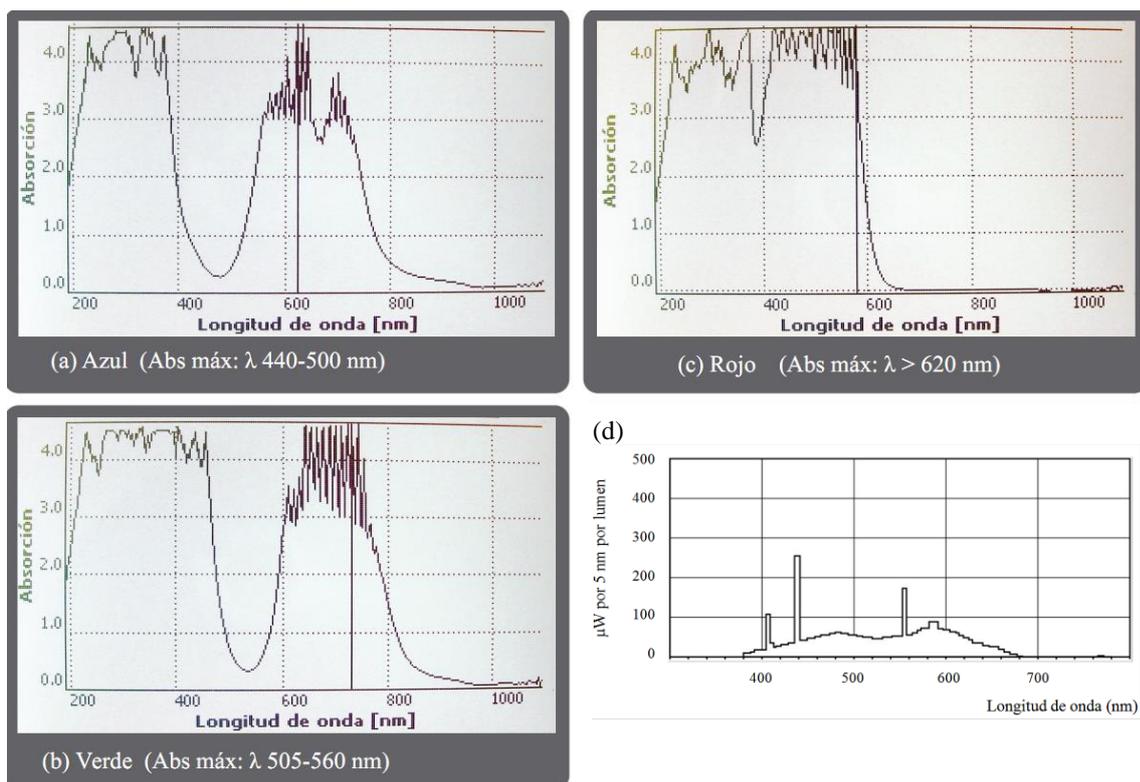
(a) Las observaciones fueron realizadas con la caja de Petri cerrada; y luego (b) con la caja de Petri abierta.

2.2.1. Tipos de irradiación lumínica

La fuente luminosa incorporada en la cámara de cultivos fue un tubo Philips TLD 36W/54. Los espectros de absorción de cada tratamiento lumínico fueron registrados con un espectrofotómetro *Spectroquant UV/VIS Spectrophotometer Pharo 300*© (Figuras 38A-C) nótese que es el complementario al espectro de emisión). La energía de radiación del tubo fluorescente (según datos del fabricante Philips^{MR}, en μW por 5 nm por lumen) se muestra en la Figura 38D.

Asimismo se determinó las correspondientes densidades de flujo fotónico a nivel de los cultivos medidas mediante un equipo de medición de PAR (*photosynthetically active radiation*) LICOR^{MR}. Las mismas fueron de $4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en blanca, $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en azul, $3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en verde y $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en roja.

Figura 38. Espectros de absorción de los filtros de acrílico medidos con espectrofotómetro. Espectros de: luz azul (a) con un ancho de banda de emisión máxima entre 440-500 nm; de luz verde (b) con un ancho de banda de emisión máxima entre 505-560 nm y de luz roja (c) con un ancho de banda de emisión máxima > 620 nm. Espectro de emisión del tubo fluorescente en el rango de 380- 800, fuente: <http://www.ecat.lighting.philips.com> (d).



3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo y la morfogénesis de *Grifola gargal*

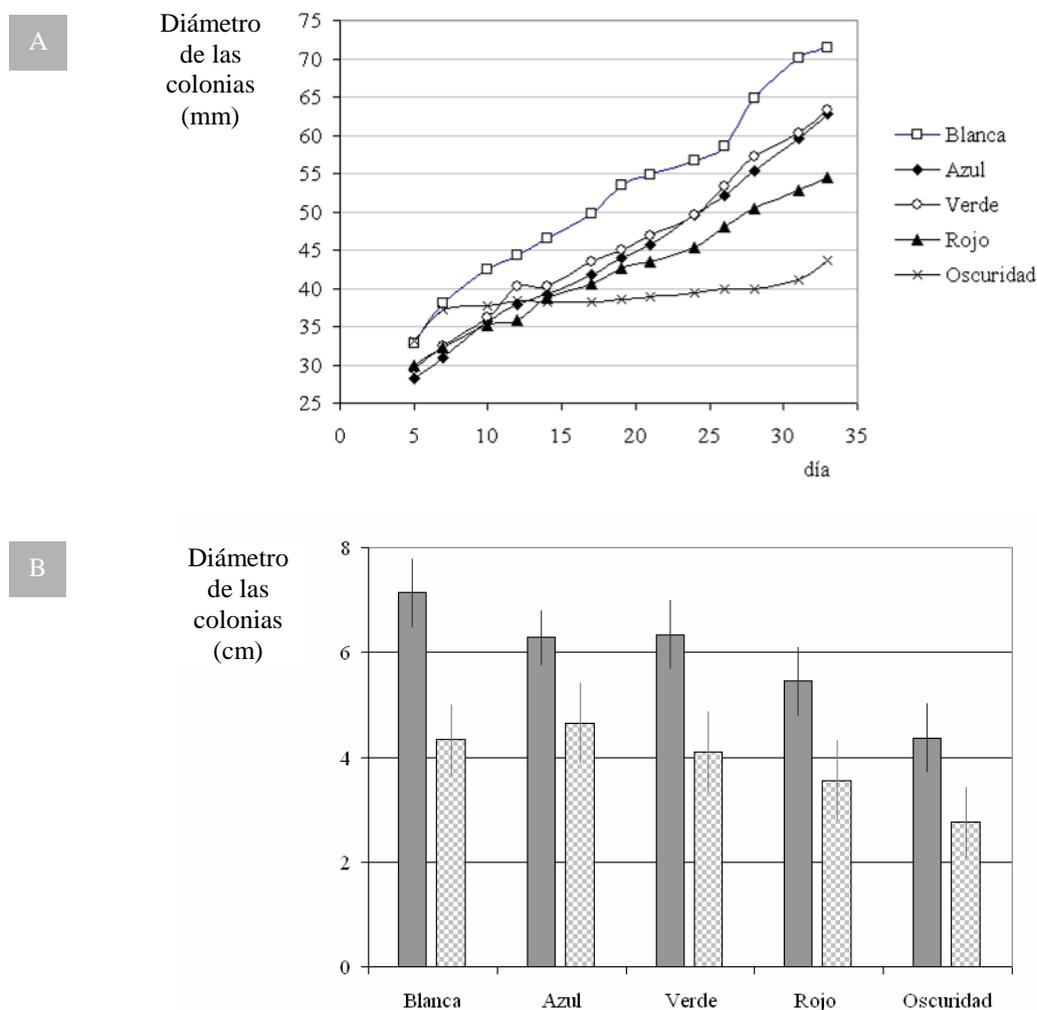
3.1.1. Efecto de la luz sobre el crecimiento vegetativo

La variación térmica que se registró durante el ensayo pudo regular en cierta extensión la velocidad y magnitud del crecimiento y de los cambios morfogénicos, como se ha observado en otros casos (Tsuué, 1969); ello en la condición de oscuridad podría explicar las diferencias observadas con este tratamiento, tanto en crecimiento como en cambios morfogénicos. Por otro lado, y como era esperable, estas respuestas resultaron ser dependientes de la luz (ausencia, presencia, ancho de banda de irradiación) en el rango térmico del ensayo.

Las curvas de crecimiento de las colonias que superaron los 30 mm al día 33 se muestran en la **Figura 39A**. Si bien sólo se hallaron diferencias significativas entre tratamientos para el día 33 ($\alpha = 0,05$), se observó que la curva de crecimiento del tratamiento de luz blanca -que reflejaba una tasa de crecimiento constante- siempre se ubicó por encima de las demás mostrando una tendencia a estimular el crecimiento, contrastando claramente con el crecimiento en oscuridad, que estuvo marcadamente demorado. En el día 33 se detectaron diferencias entre luz blanca y el de oscuridad ($\alpha < 0,05$, **Figuras 39A y B**). A la temperatura de trabajo (18-25°C), los tratamientos en luz produjeron una respuesta de crecimiento marcadamente superior al obtenido en oscuridad.

En la producción de hongos a gran escala, en la etapa de corrida del micelio (colonización del sustrato) no es habitual la incorporación de luz en las condiciones ambientales. Siguiendo los resultados anteriores, podría ser apropiado ensayar la iluminación durante esta fase en el cultivo de *G. gargal* a fin de prevenir una demora significativa de dicha fase, si la temperatura no estuviese debidamente controlada y eventualmente superara los 21°C.

Figura 39. Valores promedio de crecimiento de *Grifola gargal* en medio MYPA modificado bajo diferentes condiciones de irradiación. **A:** crecimiento miceliar de las colonias que superaron los 30 mm al día 33. **B:** crecimiento de las colonias con valores mayores a 30 mm al día 33 (barras grises) y de todas las colonias (barras cuadriculadas). Las barras de dispersión expresan los valores de \pm error estándar: $EE_{ANOVA} = (CMerror / n_i)^{1/2}$.



3.1.2. Efecto de la luz en la morfogénesis

Es conocido que, dependiendo de la especie de hongo, determinadas magnitudes de onda y/o bandas lumínicas pueden estimular o inhibir el crecimiento y/o la maduración del micelio (Seo *et al.*, 1995; Durand y Furuya 1985).

La calidad de luz administrada en los tratamientos lumínicos fue más efectiva que el cultivo en condiciones de oscuridad para la inducción de eventos vinculados a la morfogénesis, *i.e.* formación de exudados y de agregados. Vale mencionar aquí que el sistema de luz fluorescente blanca se utiliza en naves de cultivo para la estimulación del proceso de fructificación de hongos ostra (Arjona, 2009). Esta fuente de luz emite poco en las longitudes de onda UV y rojo lejano, de manera que sería esperable una menor respuesta morfogénica si la internalización de la pauta lumínica necesitase de la

participación de fotorreceptores que absorben en estos rangos de energía, por ejemplo criptocromos o fitocromos.

En la **Tabla 5** se presenta el porcentaje de u.e. con respuestas morfogénicas registradas durante el ensayo. Para una mejor apreciación de la secuencia de los fenómenos morfogénicos, las observaciones se dividieron según tres períodos: desde la inoculación al día 12, del día 13 al 25 y del día 26 al 33.

En la literatura se informa que los primeros signos de cambios morfogénicos son: exudados, aroma, pigmentaciones y cambio de la apariencia superficial p.e. poros (nombrados aquí como: *cambios primarios*). Luego a medida que avanza la diferenciación del micelio aparecen agregados, primordios y lamelas (nombrados aquí como: *cambios secundarios*) (Moore, 1998; 2005; Moore *et al.*, 2008). En este ensayo sólo se detectaron exudados (Ex.) y agregados (Ag.).

En el primer período no se detectó ningún cambio en oscuridad. En los tratamientos con luz blanca y roja se produjeron exudados de color ámbar y los agregados se formaron en todas las condiciones de luz, aunque en luz roja se detectó solo un caso (13 %) obteniendo diferencias significativas en la comparación de a pares con los demás tratamientos con el test de Fisher ($\alpha=0,05$).

En el segundo período todos los tratamientos mostraron u.e. conteniendo sectores con exudados. Los agregados se presentaron en algunas u.e. correspondientes a los tratamientos de luz azul y de luz verde, mientras que los agregados observados en la u.e. correspondiente al tratamiento de luz roja quedaron enmascarados por el crecimiento del micelio de la colonia. No hubo diferencias en la comparación de a pares entre tratamientos para exudados ni agregados ($\alpha= 0,05$). En el tercer período continuó la formación de exudados en todos los tratamientos sin presentar diferencias significativas ($\alpha= 0,05$). Los agregados fueron cubiertos por la masa de micelio que continuaba creciendo y sólo siendo conspicuos en un caso bajo luz verde y otro bajo luz roja (13 %).

Los cultivos mantenidos en oscuridad no presentaron agregados en el período del ensayo. Puede concluirse que los tratamientos lumínicos previnieron la inhibición del crecimiento observado en oscuridad y que condujeron a una estimulación del metabolismo secundario y de la morfogénesis *in vitro*.

Tabla 5. Respuestas fotomorfogénicas de *Grifola gargal* frente a la luz blanca, azul, roja o verde u oscuridad. Las observaciones fueron realizadas a los días 12, 25 y 33. Las respuestas morfogénicas observadas fueron exudados (Ex.) y agregados (Ag.).

Tratamientos	(n)	% de u.e. con respuestas					
		Día 12		Día 25		Día 33	
		Ex.	Ag.	Ex.	Ag.	Ex.	Ag.
Blanca	9	11	44	56	11	56	0
Azul	8	0	63	50	13	50	0
Verde	8	0	63	25	25	50	13
Roja	8	25	13	38	0	38	13
Oscuridad	9	0	0	22	0	44	0

3.2. Fotomorfogénesis en *Grifola gargal* y *G. sordulenta*

3.2.1. Cultivo en oscuridad y choque térmico

En la **Tabla 6** se presentan las respuestas -exudados y agregados, *i.e.* cambios primarios y secundarios- al choque térmico (disminución de 18°C a 5°C) experimentados por las colonias de *G. gargal* y *G. sordulenta* que crecieron en oscuridad por un lapso de 22 días, momento en que se completó la colonización del área superficial disponible del medio nutritivo al cual siguió el tratamiento de choque térmico al día siguiente.

Hacia el final del primer período de crecimiento vegetativo del material fúngico creciendo a 18°C, *c.a.* del 50% de las u.e. bajo estudio presentaron respuestas morfogénicas. En cuanto a los exudados, el n° de u.e. que los presentaron fue mayor en *G. gargal* que en *G. sordulenta* ($p < 0,05$) y no se hallaron diferencias en la producción de exudados entre las cepas A y B de *G. gargal*. Con relación a los agregados, no se produjeron en *G. gargal*, mientras que en *G. sordulenta* fueron numerosos.

Tabla 6. Respuestas morfogénicas de *Grifola gargal* (cepa A y cepa B, 30 u.e.) y *G. sordulenta* (33 u.e.) inducidas por diferentes condiciones de cultivo. El *crecimiento vegetativo* se realizó durante los 22 días a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, en oscuridad, mientras que el *choque* térmico consistió en el cultivo durante 36 días a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Las respuestas morfogénicas observadas registradas al final de cada período fueron exudados (Ex.) y agregados miceliales (Ag.).

Especies y cepas	(n)	% de u.e. con respuestas			
		Crecimiento vegetativo		Choque térmico	
		Ex.	Ag.	Ex.	Ag.
<i>Grifola gargal</i> cepa A	30	43	-	63	10
<i>Grifola gargal</i> cepa B	30	43	-	63	-
<i>Grifola sordulenta</i>	33	18	55	58	24

En ambas cepas de *G. gargal*, al final del período de exposición al choque térmico, no se incrementó significativamente el número de u.e. con exudados (63 %); y con relación al número de agregados, sólo se produjeron tres eventos en la cepa A (10 %); mientras que en el caso de *G. sordulenta*, se observó un incremento en los exudados de 18 a 55% de las u.e. ($\alpha = 0,05$), y los agregados que se habían registrado en el período de crecimiento a 18°C, quedaron enmascarados tras el período de frío, lo cual fue debido a un sobrecrecimiento del micelio.

Previo a la aplicación de los tratamientos lumínicos (luego de 59 días de cultivo) en 37 % de las u.e. de *G. gargal* y en el 42 % de *G. sordulenta* no había cambios morfológicos. Moore (1998) señala que en basidiomicetes, el *shock* de frío (entre otros factores como disminución de nutrientes, edad del cultivo, etc.) produce disturbios fisiológicos que modulan la transición del micelio desde el estado vegetativo a reproductivo, y si bien no se detectaron cambios visibles en todas las u.e., es probable que

todas las células fúngicas inducidas por *shock* térmico hubieran iniciado la diferenciación morfogénica.

3.2.2. Efecto de la luz en colonias maduras y tratadas con choque térmico de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*

En las **Tablas 7A** y **B** se indican los cambios morfogénicos resultantes de los tratamientos lumínicos suministrados durante la etapa del cultivo y en el **Apéndice 2** se muestran imágenes representativas de las unidades experimentales al final del ensayo.

En *Grifola gargal* se observó que todos los tratamientos de luz generaron cambios primarios, *i.e.* exudados, aroma, cambios de color en el micelio debido a pigmentos y poros, y secundarios, *i.e.* agregados, lamelas y primordios. Considerados globalmente, mostraron una frecuencia de presentación de mayor a menor en el siguiente orden de acuerdo al tipo de irradiación en el espectro de luz visible: *luz fluorescente blanca* > *azul* = *rojo* > *verde* > *oscuridad* (**Tabla 7A**).

En ambas cepas y en relación a los cambios secundarios elicitados por luz, fue la luz blanca la que produjo mayor proporción de eventos de este tipo, pero solo se diferenció estadísticamente de luz verde, que produjo una menor respuesta. En el caso de la cepa A de *G. gargal*, mostró un 40% más de eventos fotomorfogénicos que la B ($p < 0,05$), tal diferencia en la magnitud de la respuesta fotomorfogénica al ancho de banda, *i.e.* energía de irradiación, tiene también ocurrencia en diferentes cepas de otras especies fúngicas (Ellis *et al.*, 1999).

En cuanto a *Grifola sordulenta*, comparando las respuestas morfogénicas a los tratamientos ya sea de oscuridad o lumínicos, no se encontraron diferencias en el número de u.e. que presentaban cambios primarios; pero sí en las que presentaban cambios secundarios ($\alpha = 0,05$) (**Tabla 7B**). Los primordios sólo fueron observados en los tratamientos correspondientes a luz blanca y azul.

La formación de lamelas a partir de un micelio sobre maduro ocurrió en ambas especies sobre el perímetro de la colonia adyacente al borde de la caja de Petri, lo cual en este estadio se interpreta como respuesta a un microclima gaseoso favorable para su inducción, *i.e.* menor nivel de CO₂ y mayor de O₂. Este tipo de respuesta se observa también en colonias sobremaduras (usualmente con más de tres meses) conservadas en cámara fría, en oscuridad (p.e. ver **Figuras 29A** y **B**) y a la vez también sucede durante la producción de fructificaciones en invernadero cuando se exponen los primordios de *Grifola* spp. (ver capítulo V). En algunos casos se observó la presencia simultánea de lamelas con ubicación en la periferia y en el centro de la colonia. Los más notables fueron con luz roja en *G. gargal*; y luz blanca en *G. sordulenta*.

Se observó que en ambas especies pudieron desarrollarse cambios morfogénicos bajo las condiciones del cultivo en oscuridad, indicando que la luz no es un factor indispensable para la diferenciación. Cabe señalar asimismo que en las condiciones de ensayo no se presentaron fenómenos de fototoxicidad. Por el contrario, bajo la exposición prolongada a la luz blanca se incrementó la proporción en la respuesta fotomorfogénica. Aún así, hubo respuestas llamativas e inesperadas, por ejemplo en cuanto a la uniformidad de las respuestas a un mismo tratamiento; así se observaron u.e.

con colonias que mostraban una marcada respuesta al tratamiento lumínico mientras que otras no produjeron ese tipo de respuesta. Vale mencionar en este punto que en todos los casos el inóculo procedía de la misma caja de Petri.

Tabla 7. Fotomorfogénesis en *Grifola gargal*, cepas A y B (**A**) y en *G. sordulenta* (**B**) en respuesta a tratamientos lumínicos. Los cambios primarios son: exudados (Ex.), aroma almendrado (Ar.), manchas de micelio con pigmentos (Pig.) y poros (Po.); los cambios secundarios son: agregados (Agre.), lamelas periféricas (P.) o centrales (C.), y primordios (Prim.).

A. Respuestas fotomorfogénicas de <i>Grifola gargal</i>											
Trata- mientos	Cepas	(n)	% Sin res- puesta	% Cambios primarios				% Cambios secundarios			
				Ex.	Ar.	Pig.	Po.	Agre.	Lamelas P. C.	Prim.	
<i>Blanca</i>	A	6	0	100	17	100	-	100	100	-	100
	B	6	0	33	-	83	33	17	83	-	33
<i>Azul</i>	A	6	0	83	-	100	33	50	100	-	-
	B	6	0	83	-	83	67	67	83	-	33
<i>Verde</i>	A	6	0	83	33	33	100	33	100	-	-
	B	6	0	100	50	-	83	50	67	-	-
<i>Roja</i>	A	6	0	-	33	33	50	83	67	67	-
	B	6	0	50	50	-	83	33	33	33	17
<i>Oscuri- dad</i>	A	6	33	-	50	-	50	33	50	17	17
	B	6	100	-	83	-	-	-	-	-	-

B. Respuestas fotomorfogénicas de <i>Grifola sordulenta</i>											
Trata- mientos	(n)	% Sin res- puesta	% Cambios primarios				% Cambios secundarios				
			Ex.	Ar.	Pig.	Po.	Agre.	Lamelas P. C.	Prim.		
<i>Blanca</i>	6	-	100	-	17	-	67	100	50	83	
<i>Azul</i>	7	-	71	14	-	14	100	86	-	43	
<i>Verde</i>	7	-	71	29	-	86	100	100	29	-	
<i>Roja</i>	5	-	100	20	-	100	100	100	-	-	
<i>Oscuridad</i>	7	29	14	43	43	43	29	-	-	-	

Es claro que los cambios primarios y secundarios ayudan en la identificación de distintos estadios de desarrollo fúngico, *i.e.* señalan tanto el cambio del metabolismo primario al secundario como los diferentes estadios de la formación de estructuras reproductivas, como ser primordios, y que están relacionadas con este último tipo de metabolismo. Similarmente, tal cadena de fenómenos morfogénicos, con inclusión de los fotomorfogénicos, se presenta en el cultivo en condiciones controladas de *Grifola frondosa*, *i.e.* exudados y pigmentaciones seguido de formación de agregados que hacen cambiar el aspecto macroscópico del micelio hasta alcanzar progresivamente la madurez de estructuras reproductivas, llegando finalmente a la fructificación (Montoya-Barreto *et al.*, 2008; Shen, 2001).

Desde hace tiempo se conoce que los hongos reaccionan a la luz aunque sólo recientemente se han estudiado los mecanismos bioquímicos subyacentes a estas respuestas. El estudio genómico de los hongos en combinación con nuevas herramientas de la biología molecular permitirá profundizar en estos fenómenos fotobiológicos en el reino *Fungi*, cuyo conocimiento puede tener importantes derivaciones prácticas tanto en su cultivo como en la obtención de metabolitos útiles, p.e. determinados nutracéuticos, cosmeceúticos y aromatizantes.

4. Conclusiones

Ambas especies de *Grifola* fueron sensibles a la irradiación lumínica, con respuestas morfogénicas de distinto tipo e intensidad, si bien fue la luz blanca la más efectiva. En oscuridad, ambas especies fueron capaces de evolucionar metabólicamente para mostrar eventos morfogénicos. En el caso de *G. gargal*, la cepa A fue más sensible que la B en la presentación de respuestas fotomorfogénicas. Estos resultados registrados para los distintos anchos de banda de irradiación lumínica son sugerentes de la participación de más de un fotorreceptor.

D. Crecimiento en medios diferenciales

1. Introducción

Los hongos están en contacto directo con los nutrientes del nicho ecológico que habitan. Las moléculas de bajo peso molecular disponibles en la solución que rodea las hifas pueden ser absorbidas directamente mientras que las macromoléculas deben ser previamente degradadas para facilitar su biodisponibilidad. En otras palabras, se trata de una digestión extracelular mediada por enzimas que son capaces de hidrolizar sustratos poliméricos a moléculas más simples y es un proceso de varios pasos que involucra diferentes enzimas con diferentes grados de especificidad hasta lograr moléculas absorbibles y asimilables por la hifa (Moore-Landeker, 1996). De allí que la habilidad de un hongo para digerir un sustrato depende en definitiva de su complejo enzimático, de la regulación de la transcripción-traducción de las enzimas involucradas y de la actividad y/o concentración de las mismas. La organización celular en forma de micelio resulta especial para cumplir con esta función de nutrición ya que penetra en la matriz del sustrato y luego facilita el transporte de nutrientes a diferentes sectores de la colonia en una relación fuente-destino.

Los hongos políporos se encuentran entre los descomponedores saprófitos más importantes de la madera de árboles en pie, ramas caídas y tocones (Schmidt, 2006), y a pesar de los inconvenientes que pueden ocasionar, por ejemplo para la industria maderera, su rol en el reciclado de la materia orgánica es esencial, colaborando en la recirculación de nutrientes y contribuyendo al equilibrio ecológico de espacios forestales (Field *et al.*, 1992). Debido a su potencial genético, los hongos pueden adaptarse para crecer en diferentes sustratos y esto es posible a tal punto que, por ejemplo, hongos micorrícicos y descomponedores secundarios pueden sintetizar enzimas oxidasas que son típicas de hongos de la pudrición blanca y así asumen las características de un descomponedor primario (Gramss *et al.*, 1998; Mamiro y Royse, 2008).

1.1. Degradación de lignocelulosa

La lignocelulosa es uno de los principales componentes de los diversos materiales vegetales usados como sustrato para el cultivo de hongos. Esencialmente se trata de una red de microfibrillas de celulosa, en una matriz amorfa de hemicelulosa, lignina y pectina en el caso de tejidos vegetales inmaduros (Bidlack *et al.*, 1992). También se encuentran asociados otros componentes como proteínas, lípidos y minerales. La lignina es un compuesto poli aromático de las plantas superiores, con un rol estructural y defensivo, *i.e.* proporciona sostén a los tejidos leñosos y protege del ataque microbiano a la fracción total hidrocarbonada de la madera (Chang y Miles 2004).

Los basidiomicetes descomponedores primarios de la madera se dividen en dos grupos según sus atributos enzimáticos, *i.e.* en descomponedores de la pudrición blanca (*white rot fungi*) y de la pudrición castaña (*brown rot fungi*). Los primeros poseen capacidad de degradar la lignina mientras que los segundos degradan los componentes celulósicos sin una degradación significativa de lignina. Existe un tercer tipo, intermedio en su capacidad degradativa de la lignocelulosa constituido por el grupo de los hongos que produce la denominada pudrición blanda (*soft rot fungi*) (Worrall *et al.*,

1997).

La polimerización irregular de la lignina en los vegetales originó evolutivamente en los hongos el desarrollo adaptativo de enzimas ligninolíticas para poder degradarla, y son los hongos de la pudrición blanca los únicos organismos que pueden mineralizarla hasta CO₂ y H₂O. Estas enzimas son de baja especificidad y activan la lignina para superar una barrera termodinámica que desencadena una ruptura oxidativa de las cadenas laterales liberando así sus monómeros, por demetilación y escisión oxidativa de los anillos aromáticos (Martínez *et al.*, 2009). Luego, los componentes solubilizados de la lignina ingresan a la célula y son degradados por diferentes vías metabólicas hasta CO₂. Este proceso fue denominado combustión enzimática por Kirk y Farrell (1987).

A pesar que la lignina es rica como fuente carbonada, los hongos de la pudrición blanca no la utilizan como fuente de carbono, sino que la degradan para permitirse el acceso a las macromoléculas de celulosa, hemicelulosa, y otros carbohidratos que hidrolizan para disponer de azúcares simples para su absorción y subsiguiente asimilación. Este proceso degradativo de la lignina se denomina cometabolismo, y ocurre en la mayoría de los casos durante el metabolismo secundario (Leatham y Kirk, 1983).

Cabe aclarar que en el caso de los hongos se habla de metabolismo primario al hacer referencia a la etapa en la cual los nutrientes solubles son absorbidos directamente por la célula fúngica permitiendo un crecimiento vegetativo rápido y expansivo de la colonia. Durante el metabolismo primario se degradan polímeros de carbohidratos que están expuestos como celulosa, hemicelulosas y otras sustancias de reserva como el almidón de las plantas o su equivalente, el glucógeno de los mismos hongos. Luego de un período de crecimiento vegetativo (tropofase, fase de alimentación y crecimiento) y cuando el micelio detecta la insuficiencia de nutrientes, comienza el metabolismo secundario que acompaña el desarrollo reproductivo (idiofase, fase de diferenciación).

En esta fase cesa la expansión del micelio, se generan nuevas enzimas, como las ligninolíticas, y ocurre la diferenciación morfogénica que termina en las estructuras reproductivas (Dritsa y Rigas, 2006). Según la especie de hongo y las condiciones ambientales, también se sintetizan sustancias de reserva así como metabolitos secundarios con diferentes funciones biológicas (Rohlfis y Churchill, 2011). Macroscópicamente se perciben cambios de color del micelio, exudados, formación de agregados y diferenciación de estructuras reproductivas sexuales (basidiosporas en basidiomicetes) o asexuales (por ejemplo clamidosporas).

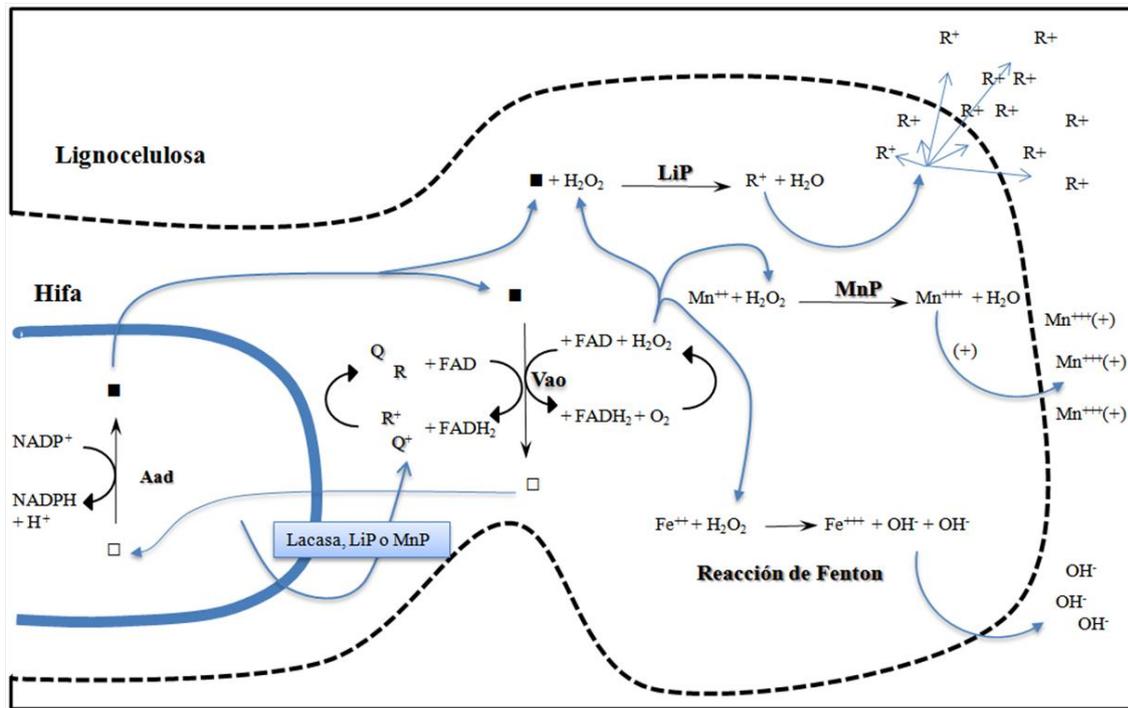
Las enzimas extracelulares que degradan la lignina son fenoloxidasas y peroxidasas. Las fenol oxidasas pueden actuar sobre uno o dos compuestos fenólicos (Mayer, 2006). Dentro de las difenol oxidasas se encuentran las lacasas, un grupo de oxidasas multicobre que catalizan la reacción de O₂ a agua y la oxidación de compuestos fenólicos a radicales libres y también la oxidación de monofenoles y difenoles y compuestos diaminoaromáticos (Dritsa y Rigas, 2006). Las peroxidasas son enzimas que se activan al oxidar el peróxido de hidrógeno a agua y O₂. La Mn peroxidasa (MnP) oxidada (Mn(III)) degrada un amplio grupo de moléculas orgánicas como ser monofenoles, difenoles, dímeros de lignina, ácidos carboxílicos, tioles y ácidos grasos insaturados, a sus respectivos radicales (*ibíd.*). La

lignina peroxidasa (LiP) oxidada reduce sustratos (por ejemplo alcohol veratrílico) que luego difunden para reaccionar con los monómeros de fenilpropano en la molécula de lignina (*ibíd.*). Aún más, hay hongos que expresan la actividad de las tres enzimas: lacasas, MnP y LiP y otros que presentan la actividad de una o dos de ellas (*ibíd.*). A veces ocurre que alguna de estas enzimas se encuentra inhibida por metabolitos generados por el mismo hongo y otras veces la enzima está codificada en el genoma pero no se detecta su actividad (Silva, *et al.*, 2008; 2010). Existen otras enzimas que al producir H₂O₂ están asociadas con la actividad generada por las peroxidases. Estas son la glioxal oxidasa y la superóxido dismutasa (Dritsa y Rigas, 2006). En la **Figura 40** se presenta el modelo de Ander y Marzullo (1997) que muestra la participación de radicales libres y distintos complejos enzimáticos en la degradación de la lignocelulosa.

Cabe mencionar que la tirosinasa es una enzima del tipo monofenol mono-oxigenasa presente en hongos de la pudrición blanca y de la pudrición castaña. Los hongos de la pudrición castaña la utilizan con una función intracelular para el metabolismo primario de aminoácidos, mientras que, los de la pudrición blanca pueden excretarla y usarla como una enzima más del complejo degradador de la madera. La actividad de esta enzima no se considera importante en comparación a las enzimas mencionadas, y por eso no se la emplea como un indicador de la ligninólisis.

La presencia de enzimas de la pudrición blanca puede detectarse haciendo crecer micelio en medios de agar nutritivo conteniendo ácido gálico, ácido tánico, o bien ciertos colorantes como el poly R478 y el azure B (Nakasone 1990; Levin *et al.*, 2004). Al oxidar y degradar los compuestos coloreados, estas enzimas causan cambios de color y durante este proceso se pueden determinar variables como la velocidad de crecimiento del micelio y el origen de las enzimas dentro de la colonia a partir de la observación de la formación del halo de color típico.

Figura 40. Interacción de las enzimas fúngicas y la veratril alcohol oxidasa con mediadores y radicales que intervienen durante la transformación de lignocelulosa. De izquierda a derecha: aril alcohol deshidrogenasa (Aad) con NADPH como grupo prostético, aril alcohol (□), aril aldehído (■), lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), radicales de lignina o quinonas (R^+ , Q^+) y sus formas reducidas (R, Q), veratril alcohol oxidasa (Vao) con FAD como grupo prostético. Adaptado de Ander y Marzullo, (1997).



1.2. Degradación de carbohidratos

La degradación o biotransformación de la lignina permite que el micelio alcance la fuente de carbohidratos y pueda secretar allí enzimas para degradarlos y luego asimilarlos. La degradación de las microfibrillas de celulosa ocurre por medio de exoenzimas como la celobiosa hidrolasa que corta la celulosa en extremos no reductores (liberando celobiosa) y endoenzimas como las endoglucanasas que actúan al azar dentro del polímero produciendo oligosacáridos. Luego, la β -glucosidasa libera glucosa a partir de celobiosa o de extremos no reductores de la celulosa (Aro *et al.*, 2005).

Los hongos de la pudrición marrón se valen del peróxido de hidrógeno y Fe(II) para oxidar las cadenas de celulosa mediante la reacción de Fenton (generación de radicales hidroxilo a partir de la reacción de peróxido de hidrógeno con hierro).

La celobiosa deshidrogenasa (CDH) es una enzima auxiliar que oxida celobiosas y celodextrinas (formando lactonas) utiliza O_2 y forma H_2O_2 . Su función es evitar la represión catabólica a la vez que oxida la celulosa por medio de la reacción de Fenton. Su presencia se puede detectar mediante el uso de diclofenolindofenol (DCPIP, 0,5 mM) como sustrato en presencia de celobiosa cuando es incorporado al medio nutritivo en agar (Cameron y Aust, 2001). Otras enzimas auxiliares que evitan la represión catabólica son la glucosa oxidasa y la lactonasa (Coughlan y Lungdahl, 1988).

En la fracción hemicelulósica de la lignocelulosa, hay una ramificación de la celulosa con cadenas de hexosas y pentosas unidos por puentes de hidrógeno a la primera y enlaces covalentes a la lignina. Esta fracción es más fácilmente hidrolizable que la fracción celulósica, dado que sus cadenas no tienen más de 200 monómeros (la celulosa está formada por 200-3000 monómeros). La composición de hemicelulosa varía entre angiospermas, y en el caso de los árboles posee abundante cantidad y variedad de xilanos (Kirk y Cullen, 1998). Para poder degradar la hemicelulosa los hongos utilizan enzimas como las endoxilanasas, β -xilosidasas, α -arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, entre otras.

Los compuestos pécticos son polisacáridos higroscópicos de la laminilla media vegetal con una cadena principal formada por ácidos galacturónicos. En la madera, estas sustancias se impregnan progresivamente de lignina durante el crecimiento secundario de la pared celular (Martínez *et al.*, 2009). Las enzimas pectinolíticas de los hongos colaboran en la separación de las paredes celulares y permiten así el ingreso de enzimas ligninolíticas y celulolíticas. Las más importantes son las pectinesterasas, pectinoliasas, entre otras.

De manera similar a lo visto para las enzimas ligninolíticas, se puede estudiar la capacidad hidrolítica de las enzimas degradadoras de carbohidratos mediante la incorporación en los medios de una fuente única de carbono. Así resulta que el conocimiento de variables como velocidad de crecimiento, densidad de la colonización, intensidad de la degradación en estos medios, es útil para la posterior formulación de sustratos, determinando entonces cuáles son los carbohidratos más favorables para el crecimiento óptimo. Resultará así una mayor biomasa micelial en el sustrato de cultivo y eventualmente se podrá limitar el crecimiento de microorganismos competidores.

1.3. Hipótesis

La actividad lignocelulolítica de las fases vegetativas de *G. gargal* y *G. sordulenta* puede estimarse mediante su cultivo en medios semisólidos en presencia de sustancias fenólicas. Asimismo, el cultivo en presencia de fuentes de carbohidratos aislados permitirá conocer la preferencia de alguno de ellos sobre otros. La comparación de las respuestas de las especies en estudios en paralelo con otras especies conocidas como degradadoras de lignocelulosa es una aproximación útil para conocer la capacidad de adaptación al crecimiento en medios nutritivos artificiales. La observación periódica del aspecto de las colonias durante cultivo vegetativo proveerá información acerca de la variabilidad entre especies y cepas.

1.4. Objetivos

Estudiar el crecimiento vegetativo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en medios diferenciales (con colorantes- reactivos y diferentes fuentes de carbohidratos) con el objetivo de conocer qué tipo de actividad enzimática poseen, así como obtener una apreciación comparativa de la naturaleza de la misma, utilizando como modelos de referencia a dos conocidos políporos ya domesticados: *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum*.

2. Materiales y métodos

2.1. Análisis de crecimiento de *Grifola* spp. en presencia de compuestos fenólicos

Se cultivaron simultáneamente y en las mismas condiciones *Grifola gargal* (cepas A, B, y G9) y *G. sordulenta*. Como término de comparación se cultivaron la cepa disponible de *G. frondosa* y las de *Ganoderma lucidum* (cepas: *Gl47* y *GlS*) en los mismos medios. El medio basal MYPA modificado (ver preparación en capítulo II.A) se empleó como medio nutritivo de base y para la determinación de fenoloxidasas se agregó ya sea ácido gálico (5 g/l) o ácido tánico (5 g/l), mientras que para detectar la presencia de enzimas ligninolíticas se usaron diferentes reactivos de color que se agregaron a los medios previo a la esterilización. La presencia de la actividad ligninolítica (Lacasa, MnP y LiP) se determinó mediante la decoloración de sulfonato de polivinilamina antrapiridona (poly R478) (0,2 g/l, Novotný *et al.*, 2004). La determinación de actividad de la enzima LiP se evaluó con la decoloración de trimetiltionina (azure B, 15,3 g/l, Arantes *et al.*, 2007).

Los medios de cultivo (*c.a.* 20 ml por caja de Petri), se inocularon en el centro con un disco de agar nutritivo (7 mm) conteniendo una porción de micelio fúngico joven en crecimiento activo; luego se mantuvieron durante 58 días en oscuridad, a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante este período se midió semanalmente el diámetro de la colonia y se determinó el diámetro de la colonia en función del tiempo (mm/día), se tomaron fotografías representativas y además se registró la intensidad de las reacciones de cambios de color y la presencia de cambios morfológicos como exudados y/o agregados.

2.2. Análisis de crecimiento de *Grifola* spp. en presencia de diferentes fuentes de carbono

Se cultivaron simultáneamente y en las mismas condiciones: *Grifola gargal* (cepa A y cepa B), *G. sordulenta*, *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum*: (cepas *Gl47* y *GlS*). El medio de cultivo basal se preparó con agar 1,7 %, 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4 g/l asparagina y el complemento de micronutrientes minerales de Murashigue y Skoog (1962) empleado en cultivo de tejidos vegetales. A este medio basal se incorporaron por separado los distintos carbohidratos como fuente de carbono (1 g/l), a saber: celulosa (carboximetilcelulosa), almidón (almidón soluble), xilulosa y pectina. La identificación de la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH) se infirió por la decoloración del colorante diclorofenolindofenol DCPIP (0,015 g/l) agregado al medio, que en este caso llevó como fuente de carbono a la sacarosa (10 g/l). Los medios fueron incubados a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 40 días, en oscuridad. Durante este período se midió semanalmente el diámetro de la colonia para determinar la velocidad de crecimiento micelial (diámetro/día), se tomaron fotografías representativas y se registró la presencia de cambios morfológicos del tipo exudados o agregados. Al final del ensayo se reveló la degradación de la celulosa aplicando un *spray* de una solución de Rojo Congo 0,3 %, seguido de un lavado con ClNa 1 N, luego se observó y se midió el halo de decoloración. Los medios con xilulosa, pectina y almidón se revelaron con el mismo método pero utilizando una solución 1% de reactivo de Lugol (I_3Na).

2.3. Análisis de los datos

Los datos registrados de crecimiento fueron estadísticamente evaluados empleando un ANOVA simple; las medias fueron comparadas con la DMS de Fisher ($\alpha=0,05$) La velocidad de crecimiento máxima fue la correspondiente al punto de inflexión de la curva de crecimiento. Para el análisis se utilizó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

3. Resultados y discusión

3.1. Cultivo en medios diferenciales conteniendo ácido gálico, tánico, azure B y poly R478

En la **Figura 41** se muestran las curvas de crecimiento en medios con colorantes para *Grifola* spp. y *Ganoderma lucidum*, en contraste con el medio basal MYPA modificado usado como control, al cabo de 58 días de cultivo. En la **Tabla 8** se muestran los resultados del análisis de la varianza para el n° de días en que la colonia alcanza los 5 cm de diámetro. La **Tabla 9A** muestra la velocidad máxima de crecimiento *i.e.* punto de inflexión de la curva de crecimiento (mm diámetro/día) y el día en que fue observada; la **Tabla 9B** muestra la velocidad de cambio de coloración producida por la biotransformación del ácido gálico o tánico, mientras que la **Tabla 9C** indica para los procesos de decoloración de cada medio el sentido en que ocurrió: ya sea centrífugo, centrípeto o bien sin un patrón claramente identificable. Finalmente, la **Tabla 10** muestra el tiempo de aparición de los primeros cambios morfogénicos en cada medio de cultivo diferencial ensayado. Imágenes representativas mostrando la apariencia de estos cultivos fúngicos se presentan en el **Apéndice 1**.

Todas las especies crecieron en todos los medios probados, exhibiendo la mayor velocidad promedio de crecimiento micelial en el medio control y la menor en el medio conteniendo ácido tánico, a excepción del caso de *G. frondosa*. En el caso de poly R478, el crecimiento micelial con ambas cepas de *G. lucidum* no se diferenció del crecimiento micelial exhibido en el medio basal, y en comparación con los demás hongos ensayados presentaron la mayor velocidad de crecimiento, alcanzando el *plateau* aproximadamente a los 12 días (**Tabla 8**).

El tiempo necesario para alcanzar 5 cm de diámetro en medio MYPA modificado no fue diferente entre las especies y cepas de *Grifola* spp. ($p>0,05$) que se ubicaron entre los 12 y 15 días (**Tabla 8**) y la velocidad máxima se registró al día 18 ubicándose entre los valores de 3,6 y 4,7 mm/día. La velocidad de crecimiento fue menor en presencia de ácido gálico para todas las especies a excepción del caso de la cepa A de *G. gargal* y la cepa 47 de *Ganoderma lucidum*. Como se mencionó precedentemente, la presencia del ácido tánico produjo un marcado retardo en el crecimiento, mostrando su efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico con más notoriedad en unas cepas que en otras, especialmente en *G. gargal* y en *G. sordulenta* (**Tabla 8**).

Tabla 8. Tiempo (días) transcurridos hasta el crecimiento de una colonia fúngica de 5 cm de diámetro en *Grifola* spp. y *Ganoderma lucidum* en medios de cultivo diferenciales conteniendo MYPA modificado (M), ácido gálico (G), ácido tánico (T), azure B (A) y poly R478 (P).

Especie y cepa		Número de días en formar una colonia de 5 cm de diámetro												EE _{Filas}			
		M			G			T			A				P		
<i>G. gargal</i>	Cepa A	B	13	a	B	20	ab	C	38	c	C	21	b	B	17	ab	2,3
	Cepa B	B	15	a	C	28	c	E	62	d	D	25	bc	B	19	a	1,8
	Cepa G9	B	14	a	BC	24	b		-		BC	18	ab	B	17	a	1,7
<i>G. sordulenta</i>		B	14	a	BC	26	c	D	49	d	C	21	b	B	16	a	1,2
<i>G. frondosa</i>		B	14	a	C	30	c	B	24	b	B	17	a	B	19	ab	1,4
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	A	5	a	A	9	b	A	12	c	A	6	a	A	6	a	0,6
	Cepa S	A	6	a	A	9	ab	A	12	b	A	7	a	A	7	a	0,9
EE _{Columnas}		1,7			2,1			1,7			1,1			1,0			

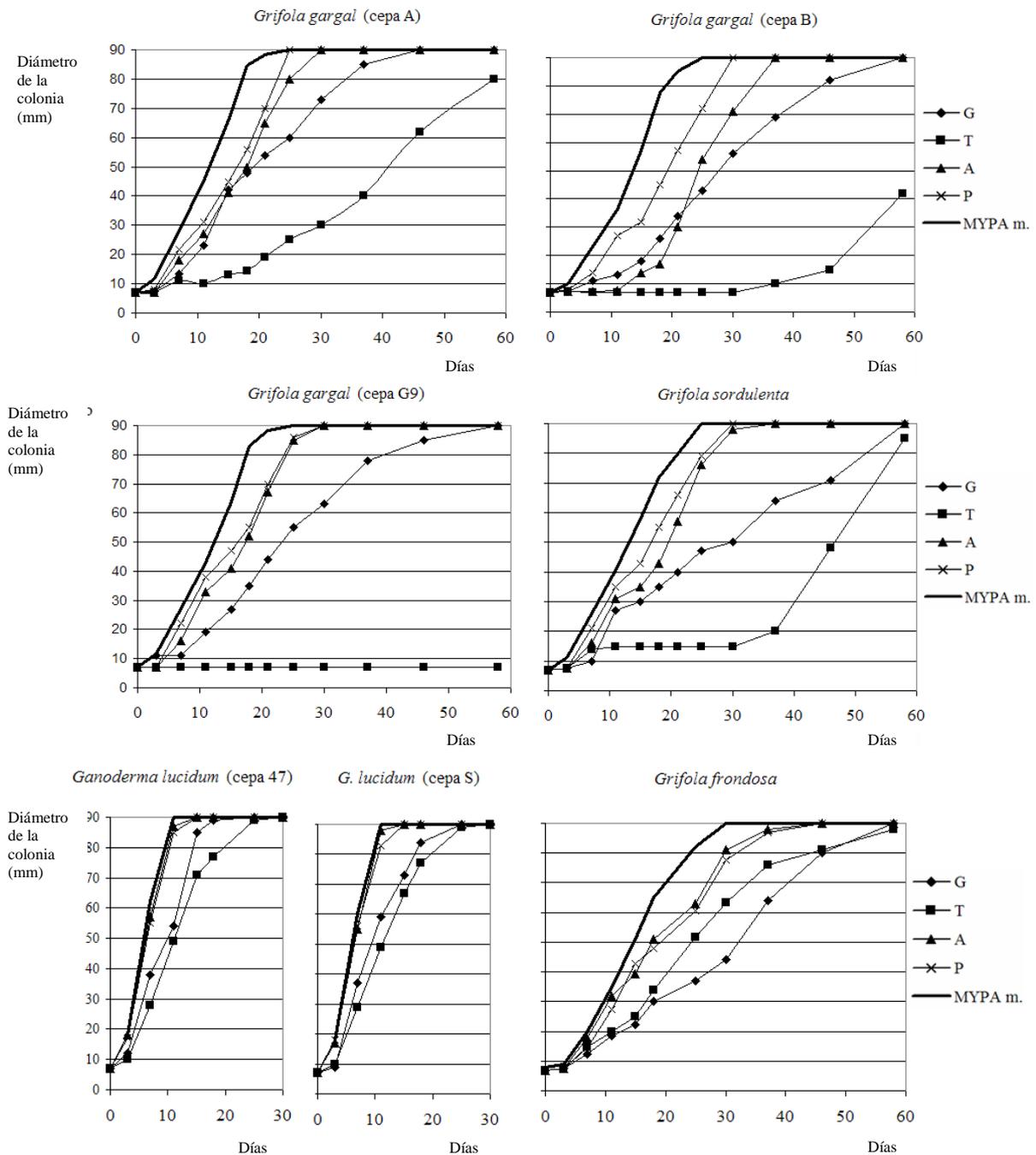
* Las letras mayúsculas en las columnas representan las DMS de Fisher entre especies para el mismo medio de cultivo. Las letras minúsculas en las filas representan DMS de Fisher entre medios para la misma cepa. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / ni)^{1/2}$.

En efecto, la cepa G9 de *G. gargal* no fue capaz de crecer en ácido tánico, mientras que la cepa B lo hizo luego de 40 días. Similarmente, hubo una fuerte inhibición de crecimiento en *G. sordulenta*, el cual empezó a detectarse a partir del día 35. El tiempo de demora observado en el crecimiento de la cepa B de *G. gargal* y *G. sordulenta* (**Figura 41**) sugiere un período umbral para la aparición de la respuesta adaptativa al medio, cuando se generarían nuevas enzimas capaces de degradar el medio recalcitrante y así permitir el acceso del micelio a la fuente de nutrientes metabolizables para apoyar el crecimiento del micelio. Esto muestra que es esperable un período de aclimatación para la adaptación con la producción *de novo* de enzimas para degradar un determinado sustrato en un cultivo de fermentación en estado sólido, lo cual incluiría el caso de un sustrato formulado sobre la base de cáscara de girasol.

La presencia de poly R478 y azure B aumentaron el número de días para que las colonias de *G. gargal* y *G. sordulenta* alcanzaran 5 cm de diámetro, en comparación con los valores hallados para el medio MYPA modificado (**Figura 41**). Las diferencias fueron significativas en medio **azure B** para las cepas A y B de *G. gargal* y para *G. sordulenta* (**Tabla 8**). Este resultado pone de manifiesto que las concentraciones de estos colorantes en el medio de cultivo, sin llegar a ser tóxicas, afectan el metabolismo fúngico.

El momento en el que se desarrolla la velocidad máxima de crecimiento revela el tiempo de adaptación del micelio a los nuevos sustratos. En la **Tabla 9A** se observa que en general el medio tánico fue el que más tiempo requirió para que se desarrolle la velocidad máxima de crecimiento miceliar, siendo necesario un período de 30-58 días de manera global para las especies fúngicas estudiadas. Las velocidades máximas fueron similares entre las especies de *Grifola*, siendo la cepa A la que mostró los mejores valores.

Figura 41. Análisis de crecimiento de micelio de *Grifola gargar* (cepas A, B y G9), *G. sordulenta*, *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum* (cepas 47 y S) cultivados en medios diferenciales contenidos en cajas de Petri (n=3). Ácido gálico: G(♦), ácido tánico: T(■), azure B: A(▲), poly R478: P(x) y MYPA modificado: MYPA m.(—).



3.1.1. Características del cultivo en medio gálico y tánico

La manifestación de fenoloxidasas se determinó por los cambios de color observados en los medios con ácido gálico y tánico. El halo de coloración que se produce se debe a la polimerización no enzimática de las o-quinonas que forman polifenoles de color negro, marrón o rojo, y se producen por acción de las fenoloxidasas sobre el ácido gálico y tánico (Edalli y Kamanavalli, 2010).

En el medio con ácido gálico se observó que las cepas de *Grifola gargal* y *Ganoderma lucidum* producían oscurecimiento desde el color ocre-ámbar hasta el marrón oscuro. Este cambio de color avanzó precediendo al crecimiento del micelio a una velocidad de 4,8- 8,9 mm/día, respectivamente y ocurrió en los primeros 7- 15 días (**Tabla 9B**). *Grifola sordulenta* y *G. frondosa* causaron un halo de coloración bien definido. Cuando el micelio alcanzó el límite de la caja de Petri (día 30-58) se desencadenaron procesos característicos del metabolismo secundario, *i.e.* decoloración del medio, aparición de exudados y de agregados miceliales diferenciados (**Tabla 10**). La decoloración del halo marrón oscuro se atribuye a una nueva actividad enzimática que degrada los polifenoles formados durante la oxidación de ácido gálico y tánico. Este proceso decolorativo ocurrió de diferentes maneras: desde el centro hacia afuera (*Grifola gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa*), desde afuera hacia el centro (*Ganoderma lucidum*, cepa S) y en toda la superficie del la caja de Petri (*G. lucidum* cepa 47) (**Tabla 9C**).

En medios con ácido tánico se observaron cambios de color de gris a marrón oscuro, revelando así la existencia de actividad de fenoloxidasas en todas las especies y cepas (**Tabla 9B**). La velocidad máxima en el conjunto de especies estudiadas se halló entre 4,0- 6,7 mm/día y se dio en las primeras dos semanas. La cepa G9 de *G. gargal* no creció en este medio, pero se produjo un halo de coloración que difundió hasta al margen de la caja de Petri en 25-30 días, posiblemente debido a las enzimas liberadas desde el inóculo inicial. *Grifola frondosa* y *Ganoderma lucidum* (cepa S) produjeron la mayor velocidad de formación de halo en medio tánico. Para esta actividad sobre el ácido tánico, *G. frondosa* resultó ser superior a *G. gargal* y ésta a su vez superior a *G. sordulenta* ($p < 0,05$, **Tabla 8**). El proceso de decoloración comenzó entre los días 30 y 37 en *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum*, y sobre el final del ensayo (día 58) en la cepa A de *G. gargal*. La decoloración ocurrió simultáneamente en toda la superficie de la colonia madura para las tres especies (**Tabla 9C**). No ocurrió decoloración en la cepa G9 que además no creció, lo cual podría indicar que la actividad decolorativa correspondería a una enzima generada *de novo* y que está ausente en el inóculo.

Estos cambios de color debidos a la degradación del sustrato por el micelio fue fotografiada en una muestra de *N. obliqua* colonizada por *G. gargal* (capítulo I, **Figura 11**), donde en ese caso se percibieron zonas donde el color era más oscuro y otras más claro. En este punto es interesante mencionar el trabajo de Paredes- Leal (2006) quien determinó en *G. gargal* las actividades de las enzimas citocromo oxidasa, esterasa, fosfatasa, peroxidasa y lacasa usando en este caso naftol como sustrato, aunque no detectó actividad de lacasa con guaiacol, ni de tirosinasa y como en nuestro caso, esta autora solo observó un crecimiento débil en medio tánico. Por otra parte la cepa cultivada de *G. frondosa* crece mejor en medio tánico que en gálico y ello no concuerda con lo observado por Nobles

(1948) en otra cepa con mejor crecimiento en medio gálico, que en tánico.

3.1.2. Decoloración de azure B y poly R478

La decoloración del medio poly-R478 revela la actividad de las enzimas ligninolíticas en general, es decir lacasas, MnP, LiP (Rodríguez- Couto *et al.*, 2000; Bending *et al.*, 2002); y el medio azure B se utiliza para determinar la actividad de la enzima LiP (Levin *et al.*, 2010). El cultivo con estos colorantes mostró su decoloración de los reactivos a diferencia del cultivo en ácidos gálico y tánico que mostró ambos, coloración y decoloración. La decoloración ocurrió en todos los casos luego del día 30 (**Tabla 9C**) y una semana después se pudo observar también cambios morfogénicos (exudados y agregados) (**Tabla 10**).

Azure B. Todas las cepas y especies pudieron crecer en presencia de este colorante. *Ganoderma lucidum* lo hizo a mayor velocidad y en 15 días colonizó completamente el medio de cultivo contenido en la caja de Petri. La velocidad de colonización entre las especies y cepas de *Grifola* fue similar 2,4-3,2 mm/día. La cepa B de *G. gargal* creció con una menor velocidad de colonización ($p < 0,05$ **Tabla 8**). Con la cepa B se halló una velocidad de crecimiento menor que en las otras cepas, y esto puede deberse a una baja actividad de la enzima LiP, razón por la cual no pudo evitar los efectos tóxicos del azure B, que sería el caso según Sasiaín (2003). Como se mencionó, la decoloración del compuesto se atribuye principalmente a la actividad de la enzima LiP, aunque también puede suceder por otros mecanismos como ser la reacción de Fenton (Aguiar y Feraz, 2006) y la actividad de otras peroxidadas (Ferreira-Leitão *et al.*, 2003).

Como la enzima LiP actúa más específicamente sobre azure B, su efecto de decoloración se diferenciaría por ser rápido y marcado. Siguiendo este criterio se concluye que todas las especies ensayadas presentaron actividad asociada a LiP; si bien lo hicieron con diferentes respuestas de decoloración. En *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* la decoloración ocurrió desde el centro hacia afuera, *i.e.* de manera centrífuga mientras que en el caso de las dos cepas de *Ganoderma lucidum* ocurrió de afuera hacia el centro, o sea de manera centrípeta. Las cepas de *G. gargal* mostraron mayor cantidad de agregados, y las de *Ganoderma* mayor cantidad de exudados (**Tabla 10**).

Poly R 478. La decoloración de poly R478 se usa para evaluar la capacidad de biorremediación por hongos, dado que su estructura está relacionada con la de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Alcalde *et al.*, 2002). En el medio con poly R478 todas las especies y cepas crecieron rápidamente, y se obtuvieron diferencias significativas en comparación con los demás medios con colorantes (**Tabla 8**). Una posible explicación es que la concentración de este reactivo era 25 a 75 veces menor respecto a los otros tres.

Las curvas de crecimiento en función del tiempo obtenidas con este colorante resultaron ser paralelas a las obtenidas con azure B (**Figura 42**). Es esperable que por la misma acción de LiP detectada en medios con azure B, se decolorasen también los medios conteniendo poly R478. Además de la intervención de la LiP en la degradación de este compuesto, intervendrían también las enzimas lacasas.

Tabla 9. Máxima velocidad de crecimiento y de biotransformación de los colorantes en el medio de cultivo colonizado por *Grifola gargal* (cepas A, B y G9), *G. sordulenta*, *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum* (cepas 47 y S) cultivadas en cajas de Petri conteniendo medio basal MYPA modificado y medios Gálico (G) Tánico (T) azure B (A) y poly R478 (P). **A:** máxima velocidad de crecimiento (mm/día) y edad del cultivo en el cual se produce (días). **B:** máxima velocidad de biotransformación (formación de un halo de coloración, mm/día) de los medios gálicos y tánico, y edad del cultivo en el que se produce (días). **C:** edad del cultivo al inicio de la decoloración del medio, la dirección de este proceso fue: centrífuga (CF), centrípeta (CP) o sin patrón apreciable (SP).

A Especie y cepa		Máxima velocidad de crecimiento micelial (mm/día) y edad del cultivo (días)									
		M		G		T		A		P	
<i>G. gargal</i>	Cepa A	4,7	18	2,8	15	1,4	58	3,2	25	3,6	25
	Cepa B	4,3	18	1,9	30	0,7	58	2,4	37	3,0	30
	Cepa G9	4,6	18	2,2	25	-	-	3,4	25	3,5	11
<i>G. sordulenta</i>		4,1	18	2,5	11	1,5	58	3,0	25	3,2	25
<i>G. frondosa</i>		3,6	18	1,8	7	2,1	30	2,9	11	2,8	15
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	8,9	7	5,6	15	4,7	48	7,9	25	7,8	25
	Cepa S	8,6	7	4,8	15	4,4	58	8,0	25	7,6	25

B Especie y cepa		Máxima velocidad de biotransformación de G o T (halo de color, mm/día) y edad del cultivo (días)			
		G		T	
<i>G. gargal</i>	Cepa A	5,3	11	5,5	7
	Cepa B	4,8	11	4,5	7
	Cepa G9	5,6	15	4,0	7
<i>G. sordulenta</i>		-	-	-	-
<i>G. frondosa</i>		Nd		6,7	7
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	8,9	7	5,9	7
	Cepa S	7,4	7	6,6	7

C Especie y cepa		Edad del cultivo al iniciar la decoloración (días) y dirección del halo de decoloración							
		G		T		A		P	
<i>G. gargal</i>	Cepa A	46	CF	58	SP	30	CF	37	CF
	Cepa B	30	CF	-	-	37	CF	37	SP
	Cepa G9	-	-	-	-	37	CF	37	CF
<i>G. sordulenta</i>		37	CF	-	-	37	CF	30	SP
<i>G. frondosa</i>		46	CF	37	SP	37	CF	37	SP
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	37	SP	37	SP	37	CP	37	CP
	Cepa S	30	CP	30	SP	37	CP	30	SP

El proceso de coloración comenzó entre los días 30 y 37 días, y ocurrió de manera variable, encontrándose representados los tres modelos en cuanto al sentido de la decoloración, incluso dentro de las cepas de la misma especie (Tabla 9C). De la comparación de los resultados de la decoloración de poly 478 y azure B que se muestran en la Tabla 10 surge que el momento de la decoloración coincide en cuatro cepas y en las otras tres ocurre una semana antes o después; mientras que el sentido de la decoloración coincidió en tres casos y en los demás fue diferente. La coincidencia de ambos

parámetros ocurrió en dos casos. Estos resultados no permiten descartar que la acción enzimática detectada en el medio con poly R478 sea también debida a otras enzimas además de la enzima LiP. En *G. gargal* y *G. sordulenta* se determinó la actividad enzimática de lacasas en el transcurso de otro ensayo; esta enzima, conjuntamente con LiP, podría ser también causante de la decoloración observada en medio poly R478. Chang y Chou (2003) informaron que *G. frondosa* posee actividades de lacasas y peroxidasas, las que serían responsables de los cambios de color en medio con poly R478.

Tabla 10. Tiempo (días) transcurridos hasta el inicio en la presentación de exudados y/o agregados en *Grifola* spp. y *Ganoderma lucidum* en medios de cultivo diferenciales conteniendo MYP A modificado (M), ácido gálico (G), ácido tánico (T), azure B (A), poly R478 (P). Las observaciones se realizaron hasta el día 60.

Especie y cepa		Aparición de exudados (días)					Aparición de agregados (días)				
		M	G	T	A	P	M	G	T	A	P
<i>G. gargal</i>	Cepa A	-	-	-	-	60	60	-	-	60	-
	Cepa B	-	60	-	46	46	58	37	-	51	37
	G9	-	60	-	-	-	-	-	-	60	-
<i>G. sordulenta</i>		-	58	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. frondosa</i>		60	25	58	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	Cepa 47	-	-	-	58	-	-	37	-	-	-
	Cepa S	58	-	58	46	-	60	-	-	58	-

3.2. Cultivo en medios con diferentes fuentes de carbohidratos

La actividad ligninolítica ocurre a la par del proceso de hidrólisis de carbohidratos, donde el micelio degrada compuestos tales como celulosa, hemicelulosa, xilulosa y ácidos pécticos, para obtener moléculas simples asimilables a través de la membrana plasmática. Los hongos de la pudrición blanca pueden ser selectivos (primero degradan lignina y hemicelulosa, luego la celulosa) o simultáneos (todos los componentes se degradan al mismo tiempo) (Zabel y Morrel, 1992).

Los resultados del crecimiento en medios de agar inoculados con los hongos bajo estudio, *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa* y *G. lucidum*, conteniendo distintas fuentes de carbohidratos, se presentan en la **Figura 42** y en la **Tabla 11**. Todas las especies pudieron crecer en todas las fuentes de carbono aunque el desarrollo de las colonias fue débil en comparación con el obtenido en el medio MYP A modificado. El revelado de los carbohidratos con Rojo Congo (celulosa, xilano), o Lugol (almidón, pectina) mostró en todos los casos un halo de decoloración muy tenue e irregular (**Tabla 11**). En estos casos el crecimiento débil puede atribuirse tanto a una insuficiencia de nutrientes como a una carencia de compuestos como los existentes en el extracto de malta usado habitualmente, que pueden colaborar en la inducción de enzimas hidrolíticas de carbohidratos (Müller *et al.*, 1988).

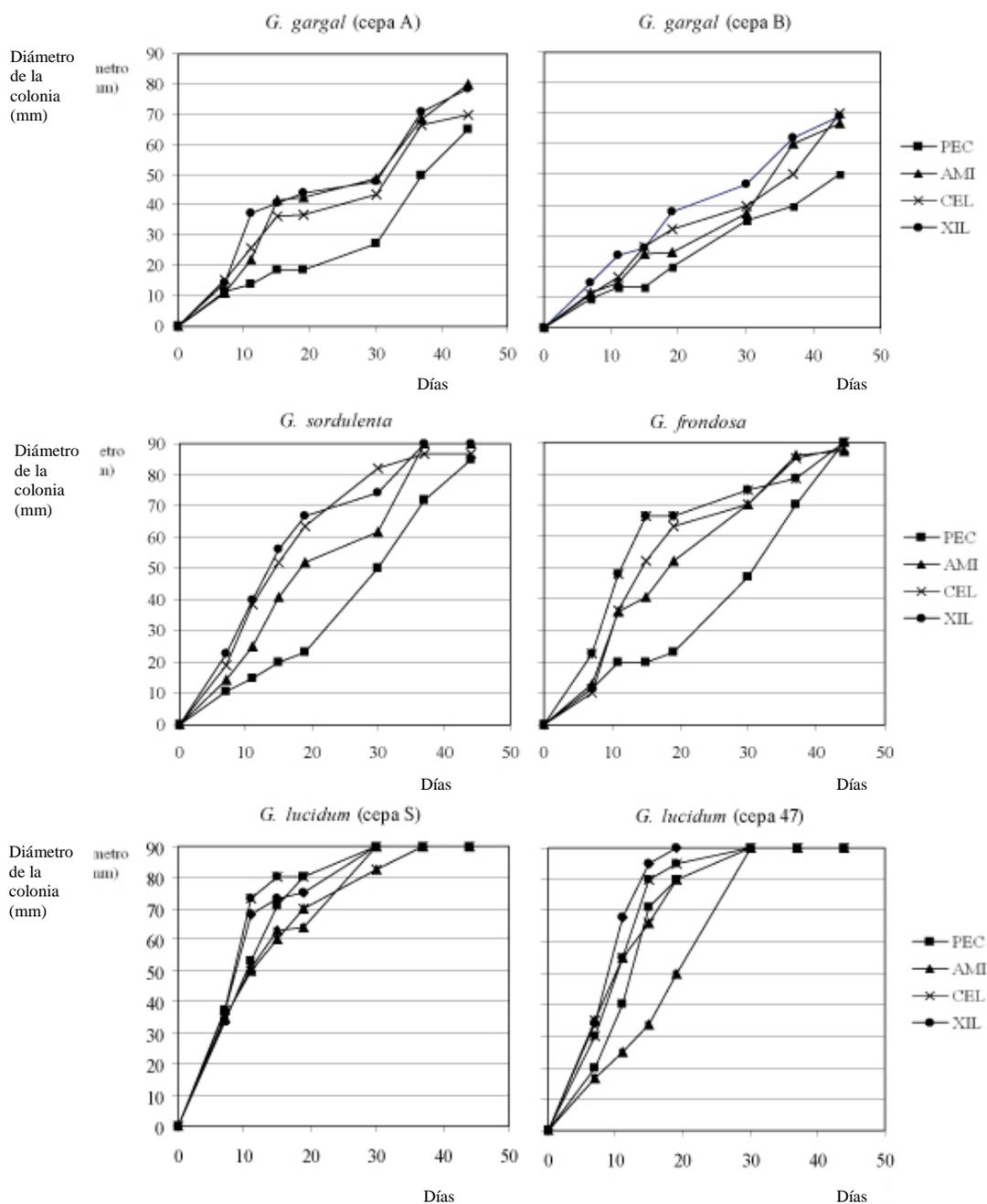
Tabla 11. Tiempo (días) transcurridos para el crecimiento de una colonia fúngica de 5 cm de diámetro. Los valores son el promedio de tres repeticiones. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / ni)^{1/2}$. Las letras mayúsculas en las columnas representan las DMS de Fisher entre cepas y especies para el mismo medio de cultivo. Las letras minúsculas en las filas representan DMS de Fisher entre medios para la misma cepa.

Especie y cepa		Número de días en formar una colonia de 5 cm de diámetro										EE _{Filas}					
		Celulosa			Xilulosa			Pectina			Almidón			DCPIP			
<i>G. gargal</i>	Cepa A	C	35	b	E	37	ab	F	55	d	D	31	a	D	39	c	0,6
	Cepa B	D	43	c	D	27	a	C	29	a	E	36	b	E	53	d	1,5
<i>G. sordulenta</i>		B	20	a	C	20	a	D	31	c	C	25	b	C	33	c	0,8
<i>G. frondosa</i>		B	22	a	C	22	a	E	37	b	B	22	a	D	38	b	0,5
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	A	11	b	B	8	a	A	22	d	A	11	b	B	18	c	0,4
	Cepa S	A	11	a	A	12	a	B	14	a	A	13	a	A	12	a	0,7
EE _{Columnas}		1,4			0,6			0,8			0,8			0,9			

Curvas de crecimiento similares se obtuvieron con la cepa A de *G. gargal* en los medios con xilulosa, almidón y celulosa (**Figura 42**). Los carbohidratos que promovieron una colonización más veloz fueron almidón y xilulosa, mientras que el medio con pectina fue el que causó el mayor retraso de crecimiento ($p < 0,05$, **Tabla 11**). A pesar de que el medio conteniendo pectina fue el que mostró menor velocidad de crecimiento, la percepción visual de crecimiento estuvo en un nivel medio en ambas cepas de *G. gargal*, y en este sentido fue mejor que los demás medios (**Tabla 12**). La cepa B mostró curvas de crecimiento similares entre todos carbohidratos (**Figura 42**), registrándose la mayor velocidad en los medios con xilulosa y pectina ($p < 0,05$) (**Tabla 11**). El cultivo en medio con DCPIP dio negativo para la presencia de celulasa deshidrogenasa (CDH) en ambas cepas, y en la cepa B fue el medio que se colonizó más lentamente. De esta manera el crecimiento de ambas cepas de *G. gargal* en los medios ensayados indica una actividad que denota la presencia de celulasa, amilasa, y actividad xilanolítica y pectinolítica. Anteriormente, Paredes- Leal (2006) detectó en esta especie la actividad de las enzimas amilasa, celulasa, ureasa, y ausencia de actividad de lipasa y proteasa.

El medio con xilulosa fue el que proporcionó el desarrollo de mayor velocidad de crecimiento en todas las especies ($p < 0,05$, **Tabla 12**). Este medio fue el único con el cual el micelio pudo obtener nutrientes para generar cambios morfogénicos (exudados y agregados) y completar su ciclo biológico con el inicio de la formación de estructuras reproductivas. La xilulosa (y también la pectina) es parte importante de la fracción hemicelulósica de la madera, por lo que el cultivo de *G. gargal* sería favorecido en aquellos sustratos que contienen mayor proporción de esta fracción nutritiva. La velocidad de crecimiento medida en el sustrato que contenía celulosa estuvo en segundo lugar respecto a la obtenida en el sustrato conteniendo xilulosa y fue luego seguida por las correspondientes a los sustratos con almidón y con pectina, en ese orden. (**Tabla 11**).

Figura 42. Análisis de crecimiento de micelio de *Grifola gargal* (cepas A y B), *Grifola sordulenta*, *Grifola frondosa* y *Ganoderma lucidum* (cepas 47 y S) cultivados en medios diferenciales conteniendo: pectina (PEC), almidón soluble (AMI), carboximetilcelulosa (CEL), xilulosa (XIL).



Grifola sordulenta mostró el mayor tamaño, la mayor velocidad y vigor en los medios con celulosa y xilulosa (Tablas 11 y 12). El crecimiento del micelio en presencia de ambos carbohidratos fue más rápido que en el caso de *G. frondosa* y *G. gargal*, aunque sólo se diferenció significativamente de *G. gargal* (Tabla 11). Y en los medios con DCPIP y con pectina, el crecimiento de *G. sordulenta*, resultó ser de los más lentos. En el medio con DCPIP en el día 30 se observó la formación de un halo naranja, producto de la degradación de ese sustrato por parte de la enzima CDH. En este medio también se observó la presencia de exudados asociados al cambio de color en medio

CDH, lo cual sugiere que ambos fenómenos están relacionados con la inducción de enzimas del metabolismo secundario, que ocurre luego de la disminución de nutrientes fácilmente disponibles.

En *G. frondosa* los medios con celulosa, xilulosa y almidón produjeron el crecimiento más veloz del micelio (**Tabla 11**), al igual que con *G. sordulenta* la velocidad de crecimiento en medio con pectina siguió al resto de las fuentes de carbohidratos ($p < 0,05$). En cuanto al aspecto visual, los cultivos en los medios con pectina y almidón fueron los de mayor vigor (**Tabla 12**). La degradación del DCPIP generó, alrededor del día 30, un halo de color ocre y, junto con *G. sordulenta*, fueron las dos únicas especies en las cuales se confirmó la presencia de CDH. Esto sucedería también por disminución y/o insuficiencia de nutrientes asimilables de fácil disposición que traería aparejado la estimulación de la producción de enzimas del metabolismo secundario.

En el caso de las cepas de *Ganoderma lucidum*, pudo observarse que crecieron a una mayor velocidad que todas las de *Grifola* spp. ($p < 0,05$). De manera similar a *G. sordulenta* esta especie tuvo un crecimiento más vigoroso en medios con celulosa o xilulosa. No se constató la presencia de la enzima celobiosa deshidrogenasa, ya que no se detectó actividad asociada al cambio de color del marcador DCPIP.

Tabla 12. Resultados de las reacciones de revelado con colorantes realizada a los 44 días de crecimiento, tiempo en el que la colonia alcanza 5 cm de diámetro. Para observar la degradación de los carbohidratos se reveló su presencia con Rojo Congo 3% para detectar celulosa y xilulosa, y Lugol 1% para detectar almidón y pectina. La presencia de la actividad biotransformadora se infirió a través de la presencia de decoloración. La densidad aparente del crecimiento se clasificó de menor (+) a mayor (+++) intensidad.

Especie y cepa		Presencia (P) o ausencia (A) de la degradación de los carbohidratos y densidad aparente de crecimiento (+/++/+++)									
		Celulosa		Xilulosa		Pectina		Almidón		DCPIP	
<i>G. gargal</i>	Cepa A	P	+	P	+	P	++	P	+	A	++
	Cepa B	P	+	P	+	P	++	P	+	A	++
<i>G. sordulenta</i>		P	+++	P	+++	P	++	P	++	P	++
<i>G. frondosa</i>		P	+	P	+	P	+++	P	+++	P	+++
<i>G. lucidum</i>	Cepa 47	P	+++	P	+++	P	+	P	+	A	+++
	Cepa S	P	+++	P	+++	P	+	P	++	A	+++

4. Conclusiones

El análisis del crecimiento de cultivos de *G. gargal* y *G. sordulenta* utilizando medios conteniendo colorantes y diferentes fuentes de carbono fue útil para inferir su perfil enzimático relacionado con sus capacidades para degradar materiales lignocelulósicos.

Los modelos de *G. frondosa* y *Ganoderma lucidum* tomados como términos de comparación de dos políporos domesticados factibles de cultivar en forma rápida en un sistema de fermentación en estado sólido, por ejemplo sobre un sustrato a base de cáscara de semilla de girasol, permite extrapolar

esta aptitud biotransformadora para el crecimiento vegetativo y reproductivo de ambos *G. gargal* y *G. sordulenta*, ya que estos últimos poseen un complemento enzimático similar y tendrían la capacidad de degradar sustratos similares.

En efecto, las cepas y especies evaluadas poseen actividad asociada a la enzima LiP y esta enzima en conjunto con otras como las lacasas explicarían los cambios de color en los medios gálico, tánico y poly R478. Se hallaron similitudes entre *G. sordulenta* y *G. frondosa*: ambas no causan halo de coloración en medio gálico (aunque sí decoloran el medio), y se encontró una diferencia que consiste en que *G. sordulenta* no produce decoloración en medio tánico. *Grifola gargal* coincide con *G. frondosa* en que ambas decoloran el medio tánico. Por otra parte, si bien *Ganoderma lucidum* rápidamente colonizó los medios con colorantes marcadores, la decoloración de los mismos se inició al mismo tiempo que las especies de *Grifola* spp.

El crecimiento del micelio de *Grifola* spp. en presencia de diferentes carbohidratos fuente, mostró una moderada a baja densidad micelial de crecimiento. Así, aunque *G. gargal* crece mejor en xilulosa, también creció en medio conteniendo pectina, lo cual indica una preferencia por sustratos con un mayor contenido de hemicelulosa en sus fibras. *Grifola sordulenta* crece bien en celulosa y xilulosa y pudo demostrarse la presencia de la enzima celulosa deshidrogenasa. *Grifola frondosa* crece satisfactoriamente en pectina, celulosa, y fue la única especie que exhibió un muy buen crecimiento en almidón, siendo entre las especies evaluadas la que posee mejor capacidad de utilización de carbohidratos. *Ganoderma lucidum* fue similar a *G. sordulenta* en su habilidad para utilizar los marcadores de los carbohidratos y mostró preferencia por celulosa y xilulosa, aunque pudo crecer rápidamente en los medios correspondientes a todos los tratamientos probados.

Capítulo III

Cultivo en medios líquidos

Cultivo de micelio en medios líquidos

En algunas especies, el cultivo de micelio en medios líquidos ofrece ciertas ventajas, como ser reducción de las pérdidas por contaminación, utilización de espacios más reducidos y fácil recolección de la biomasa y de metabolitos disueltos en el medio (Mizuno *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la mayoría de las investigaciones se han focalizado en la fermentación en estado sólido y en la obtención de sustancias bioactivas a partir de las fructificaciones. Para la obtención de biomasa micelial, o metabolitos por cultivo líquido, es necesario comprender las fases del crecimiento, el metabolismo primario y el secundario de los hongos. Durante el metabolismo primario, cuando cursa la tropofase, la curva de crecimiento (biomasa *vs.* tiempo) adopta forma sigmoidea: con una fase exponencial y luego lineal *i.e.*: el micelio se multiplica nutriéndose de sustancias solubles del medio.

Luego, los cambios en las condiciones ambientales como ser la disminución de nutrientes, las oscilaciones térmicas, de pH, las propiedades reológicas (que regulan el movimiento de los fluidos) o la presión parcial de gases (fundamentalmente de oxígeno y de dióxido de carbono), inducen el paso del metabolismo primario al secundario o idiofase. Aquí la curva de crecimiento termina su forma de S y al final se manifiesta como una meseta (Tang *et al.*, 2007). En esta fase de crecimiento aparecen las moléculas bioactivas más buscadas, los metabolitos secundarios. En unión al genotipo de la cepa en cultivo, la composición del medio y las condiciones ambientales determinarán cualitativa y cuantitativamente la producción de metabolitos secundarios. Por eso la estandarización de las condiciones de cultivo es importante para asegurar la reproducibilidad del cultivo y así de los compuestos útiles que se deseen obtener.

Condiciones de cultivo y morfología del micelio

En el cultivo en agitación orbital horizontal se utilizan normalmente Erlenmeyers dispuestos en una bandeja con agitación orbital (*shaker*) a una velocidad de agitación que puede variarse (hasta 200 rpm). La agitación es necesaria para la aireación, para la disminución de la capa no agitada en la interfase micelio/medio nutritivo de manera de mejorar la difusión de metabolitos (nutritivos y tóxicos) y para la transferencia de masa y calor. Sin embargo, y dependiendo del sistema de agitación, puede también generar una fuerza de rozamiento que puede producir un estrés mecánico que influye en la constitución estructura y composición- de la pared celular y en el metabolismo secundario (Tang *et al.*, 2007).

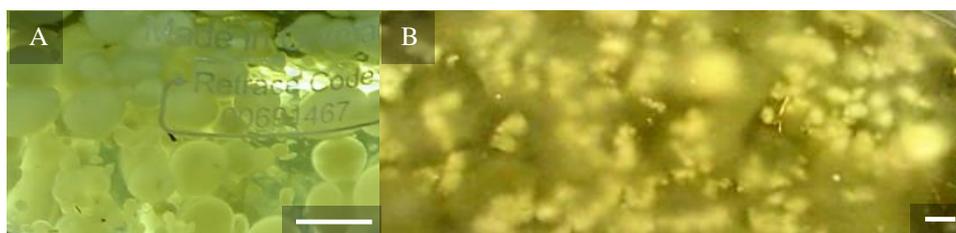
Durante esta tesis, se consideró que una agitación suave era alrededor de 30 rpm, mientras que se consideró de mediana a fuerte la agitación realizada a 90 rpm. La proporción de volumen de medio: aire dentro del envase es un factor que influye para obtener una aireación apropiada. Como criterio se siguió la recomendación de Yang y Jong (1987) de emplear una relación de volumen del medio:

volumen total de al menos 1:5; además se emplearon tapones permeables a gases confeccionados con algodón.

El cultivo estacionario impone condiciones reológicas considerablemente diferentes a las existentes en el cultivo en agitación, de allí las diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la producción de biomoléculas. Este tipo de cultivos puede realizarse en envases comunes sin agitación o en biorreactores (Tang *et al.*, 2007). La difusión de los gases puede ser pasiva (sin agitación ni aireación, pero asegurando una gran superficie de intercambio de gases) o activa mediante agitación mecánica o burbujeo de gases, este último como se realiza en biorreactores de 5- 15 litros para el cultivo de micelio y otros microorganismos que usan para agitar el sistema *air lift*, preferentemente a una agitación mecánica, ya que permite disminuir el estrés mecánico producido por la agitación con paletas (Tang *et al.*, 2007).

Una característica general de los cultivos líquidos bajo agitación moderada, es la producción de un micelio de tipo laxo-plumoso, y a medida que aumenta la agitación del medio el micelio se torna más denso y esferoidal (Hsieh *et al.*, 2006). A modo de ejemplo, en la **Figura 43** se muestran *pellets* compactos de *G. gargal* (**A**) y *pellets* de *G. sordulenta* plumosos- pubescentes (**B**). Lee *et al.* (2004) encontraron en *G. frondosa* que con una baja aireación se obtienen *pellets* compactos y que al aumentar la aireación se obtenían plumosos- pubescentes. Los autores hallaron que esta condición tipo plumosa o pubescente es la óptima para producir biomasa y metabolitos como ser polisacáridos y ácido araquidónico. Se encontraron resultados similares en otras especies, apareciendo las formas plumosas pubescentes para sustancias volátiles (Gallois *et al.*, 1990). Este no fue el caso para la obtención de otros compuestos, p.e. en *Paecilomyces japonica* y *Cordyceps militaris* los *pellets* compactos son los más deseables (Sinha *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002).

Figura 43. Morfología de micelio en medios líquidos. **A:** *pellets* de *G. gargal* con forma de esferas. **B:** *pellets* de *G. sordulenta* plumosos-pubescentes. Las barras representan 1 cm.



Es importante considerar que un adecuado balance nutritivo del medio evita la aparición prematura de factores limitantes para el crecimiento, puesto que una carencia específica de algún nutriente se convierte en una señal biológica que inducirá el proceso de idiofase (Papagianni, 2004).

Varios autores optimizaron el crecimiento de *G. frondosa* en medios líquidos utilizando como fuentes de carbono glucosa, maltosa y sacarosa y como fuentes nitrogenadas complejas extracto de malta, de levadura, de maíz y peptona de carne (Cui *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2008). La calidad de las fuentes nitrogenadas es de especial importancia ya que fuentes como las mencionadas

anteriormente pueden influenciar la cantidad y calidad de los metabolitos secundarios (Jong y Birmingham, 1993; Mao y Zhong, 2006; Lin y Chen, 2007). Es interesante mencionar aquí un ejemplo de interacción entre dos factores como un gas (oxígeno) y un suplemento nutritivo (aceite de oliva) en los cultivos líquidos de *G. frondosa*, con la observación de que un 1% de aceite de oliva puede mitigar los efectos adversos causados por el oxígeno en exceso, (Hsieh *et al.*, 2006).

Otra variable que incide en la morfología del micelio es el pH, que es producto del metabolismo del micelio en crecimiento debido a la absorción, asimilación de nutrientes y la consecuente excreción de metabolitos. Estos procesos pueden causar cambios en el pH que afectan el crecimiento y la morfología (Chang y Miles, 2004). Lee *et al.* (1999) observaron en *Ganoderma lucidum*, que si durante el crecimiento se mantiene el pH estabilizado (pH 6,0) el micelio forma *pellets* y tiene gran contenido de polisacáridos; de otra manera, permitiendo que el metabolismo produzca una deriva del pH, el micelio se torna filamentoso y produce menor cantidad de polisacáridos (Lee *et al.*, 2004).

Finalmente, la temperatura es otro factor importante a tener en cuenta durante la optimización del cultivo de hongos en medios líquidos. Es ampliamente conocido que el metabolismo aumenta con la temperatura, y cuando ésta se ubica por fuera del rango de actividad normal del organismo, adaptado a un determinado nicho ecológico, puede producir una señal de estrés por ejemplo un choque térmico a alta temperatura o directamente dañar el micelio y producir efectos letales.

Ensayos

A continuación se exponen los resultados del cultivo de micelio de *Grifola* spp. i) En diferentes condiciones de pH y temperatura empleando Erlenmeyers de 250 ml en cultivo agitado (sección **A**). ii) En frascos de 3000 ml en condiciones de agitación suave, esto en presencia de medio basal o suplementados (sección **B**). iii) En Erlenmeyers de 500 ml en cultivo agitado en presencia de diferentes concentraciones de una citoquinina: bencil amino purina (BAP) (sección **C**). iv) En fuentes de vidrio con la modalidad de cultivo estacionario (sección **D**).

A. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. gargal* en medio líquido en Erlenmeyers de 250 ml

1. Introducción

La optimización del cultivo de *G. sordulenta* y *G. gargal* en medio líquido se basa en la selección de un conjunto de variables de cultivo, tanto del sustrato como del ambiente, en unión a un sistema de producción que permita maximizar los rendimientos de la biomasa en crecimiento activo. Esta biomasa puede destinarse a la producción de inóculo o a otros usos, incluyendo aquellos con fines comerciales.

En la búsqueda de las condiciones de crecimiento óptimo de estas especies de *Grifola*, se estudió el efecto del agregado de caldo de semillas de girasol (CSG) al medio líquido nutritivo basal, a dos temperaturas. Este suplemento contiene una cantidad importante de ácidos grasos poli-insaturados, (presentes en las semillas de girasol, por su composición ver Cancalon, 1971) y se esperaba observar un efecto beneficioso como el hallado en *G. frondosa* en presencia de suplementos similares (Hsieh *et al.*, 2006), así como también se observó trabajando con un sustrato conteniendo caldo de semillas de girasol y otras especies (Rabinovich *et al.*, 2007; González-Matute *et al.*, 2011). Por otra parte, este caldo también provee un material lignocelulósico particular que podría actuar como inductor en la producción de enzimas ligninolíticas; la presentación temprana de un sustrato al micelio permitiría un tiempo de adaptación al mismo lo cual llevaría a una colonización más rápida de sustratos relacionados: *i.e.*: granos de girasol como ingrediente para la obtención de *spawn* de semillas en diferentes mezclas, o bien en fermentación sólida de sustratos conteniendo cáscara de girasol.

1.1. Hipótesis

Para ambas especies se postula que existe una dependencia de la acumulación de biomasa con la temperatura del cultivo. Por otro lado, el agregado de un aditivo lignocelulósico estimularía el crecimiento y por esto una rápida producción de biomasa.

1.2. Objetivos

Evaluar la velocidad de acumulación de biomasa (miligramos por día), bajo i) dos condiciones de temperatura de cultivo y ii) diferentes concentraciones de caldo de semillas de girasol.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas e inóculo

Para inocular las unidades experimentales se emplearon discos de micelio de (6 mm de diámetro) crecido en medio agar nutritivo de *G. gargal* (cepa A) o *G. sordulenta*.

2.2. Medio de cultivo

Se utilizó un medio basal MYP conteniendo por cada litro: 20 g de extracto de malta, 2 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de carne, 0,5 g de SO₄Mg.7H₂O, 0,2 g de SO₄Mn.5H₂O, 30 g de

glucosa, al cual se agregó 65 g de semillas enteras de girasol, a pH 4,0 (pH óptimo en medio semisólido, Cap II.B).

Se prepararon caldos de semilla de girasol utilizando proporciones crecientes de semilla por cada 100 ml de agua destilada de manera de obtener diferentes mezclas (1,63%; 3,25%; 6,5%; 13%; 26% y 39%, p/v). Estas mezclas se autoclavaron a 120°C durante 40 minutos y luego se filtraron. Con estos filtrados se preparó luego el medio basal. Asimismo se evaluaron dos temperaturas de incubación: 20 ±1°C o 24 ±1°C.

2.3. Cultivo líquido

Cada unidad experimental (n=6) consistió en 50 ml de medio de cultivo agregados en Erlenmeyers de 250 ml. Estos materiales son de fácil manejo aunque poseen la desventaja de poder disponer de poco volumen de cultivo. Cada Erlenmeyer fue inoculado con 6 discos. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 20 ±1°C o 24 ±1°C con agitación orbital horizontal a 90 rpm, durante 20 días. En estas condiciones se obtienen *pellets* compactos. Para determinar la biomasa, se recuperó el micelio desde el medio líquido por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos y el micelio obtenido se secó a 80°C hasta peso constante.

2.4. Análisis de los datos

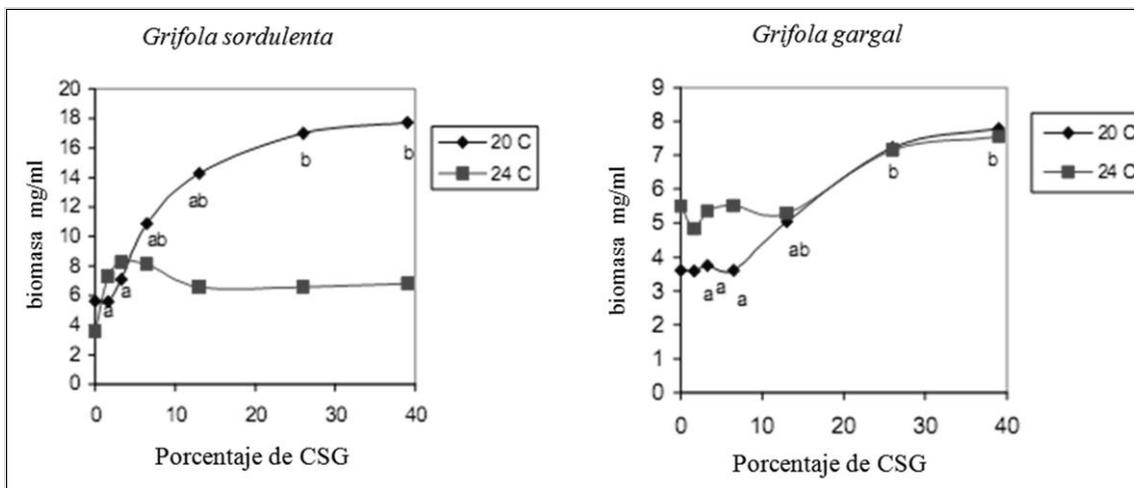
Los resultados fueron analizados con el test de Anova simple, y los valores medios se compararon con el test de Tukey ($\alpha=0,05$), utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

3. Resultados y discusión

Cuando se cultivó *G. sordulenta* durante 20 días a 20°C en medio MYP modificado con la adición de CSG, el contenido micelial alcanzó una meseta (17 mg/ml) con 26% de CSG; logrando con 39% de CSG triplicar el crecimiento obtenido en medio control (6 mg/l) (**Figura 44**). La incubación a 24°C mantuvo constantes los valores de producción de biomasa (7 mg/l), sin cambios significativos con el agregado de CSG, mostrando claramente una menor biomasa de micelio de la que se obtuvo a 20°C.

Bajo idénticas condiciones, para *G. gargal* se observó un incremento en el contenido de biomasa micelial de 3,5 mg/ml en el control a 7 mg/ml para 26% y 39% de CSG a 20°C ($p<0,05$). En cambio a 24°C la biomasa de micelio aumentó solo el 50% en relación con el control a esas mismas concentraciones de CSG, sin registrarse diferencias significativas en la producción de biomasa micelial entre las diferentes concentraciones de CSG. Tampoco se encontraron diferencias significativas de la biomasa entre temperaturas (20°C y 24°C) en ninguna concentración de CSG.

Figura 44. Producción de biomasa de micelio *Grifola sordulenta* y *G. gargal* cultivado en medio líquido MYP modificado. Los medios de cultivo contenían diferentes concentraciones (1,63%, 3,25%, 6,50%, 13%, 26% y 39%) de caldo de semillas de girasol (CSG). La incubación se realizó a 20°C y a 24°C durante 20 días. Los valores de contenidos de micelio con las mismas letras indican que no son significativamente diferentes $p > 0,05$.



Las mejores condiciones para la obtención de biomasa en estas especies fueron usando el medio MYP modificado con la adición de 6,5% (p/v) semillas de girasol enteras y 26 % de CSG, a pH 4 y 20°C. La biomasa/día generada por *G. gargal* y *G. sordulenta* al comienzo de la fase estacionaria (20 días de cultivo) fue 0,35 y 0,8 g/l, respectivamente; así el rendimiento obtenido en *G. sordulenta* resultó ser más del doble que el hallado en *G. gargal*.

El rendimiento de estas especies en la producción de micelio fue *c.a.* 70-35 % más bajos que el de otras especies también evaluadas en nuestro laboratorio en otras investigaciones y bajo condiciones similares. Por ejemplo, *G. frondosa* produce 1,25 g/l por día calculado a los 16 días de cultivo (Figlas *et al.*, 2010); *Agaricus blazei*: 1,4 g/l por día calculado a los 5 días de cultivo, y/o *Ganoderma lucidum*: 1,5 g/l por día calculado a los 6 días de cultivo (Rabinovich *et al.*, 2007; González-Matute *et al.*, 2011); cabe mencionar que en estas especies también se logró incrementar los valores de biomasa mediante el agregado de caldo de semillas de girasol.

Si bien el crecimiento micelial en medios de cultivo líquidos de *G. gargal* y *G. sordulenta* resultó ser considerablemente más lento que el de otras especies domesticadas cultivadas bajo las mismas condiciones, resultó aún satisfactorio y puede ser utilizado para su propagación. Los resultados anteriores obtenidos en el cultivo semisólido en agar al igual que con el cultivo en medio líquido caracterizan a estas especies como de lento de crecimiento en medios artificiales.

4. Conclusiones

En ambas especies se comprobó que existe una dependencia de la tasa de crecimiento micelial y la acumulación de biomasa con la temperatura del cultivo. El agregado de caldo de semillas de girasol incrementó la acumulación de biomasa de micelio en ambas especies estudiadas.

B. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. gargal* en medios líquidos complejos en frascos de 3 litros

1. Introducción

Los metabolitos secundarios más buscados de los hongos son los polifenoles, polisacáridos, enzimas ligninolíticas, terpenoides, flavonoides, alcoholes, acetileno, ácidos orgánicos y compuestos volátiles (Zjawiony 2004). En la elaboración de alimentos se emplea el micelio proveniente del cultivo líquido de hongos comestibles y medicinales (o tónicos) en sopas, tisanas, y como suplementos en harina de cereales (Chang y Miles, 2004). Los medios de cultivo elaborados con ingredientes específicos como aminoácidos, vitaminas y/o reguladores vegetales, pueden incrementar el crecimiento de la biomasa fúngica (Lin y Chen, 2007; Jonathan y Fasidi, 2001a; 2001b; 2003); y en relación al metabolismo secundario se conoce que estos mismos ingredientes estimulan la síntesis de enzimas ligninolíticas (Levin *et al*, 2010; Drista y Rigas, 2006) y la producción de metabolitos de interés medicinal (Mizuno, 1999).

En el caso de *G. gargal*, Harada (2007) encontró que el componente responsable del aroma particular del hongo es el benzaldehído, y aunque no se han realizado investigaciones similares con *G. sordulenta* es posible que también sean las mismas moléculas las responsable del aroma en esta especie. Se puede estimular la producción de este compuesto en medios líquidos utilizando ingredientes como glucosa, peptona y extracto de levadura, fenilalanina, asparagina, y ácido benzoico (*ibíd.*).

1.1. Hipótesis

El cultivo de micelio en frascos permitirá obtener micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta* con rendimientos aceptables de biomasa. El agregado de suplementos nutritivos orgánicos estimularía por una parte el crecimiento vegetativo y por otra parte el metabolismo secundario.

1.2. Objetivos

Evaluar el cultivo de ambas especies en frascos con grandes volúmenes de medio nutritivo conteniendo reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas y aminoácidos, a 20°C, oscuridad y agitación baja. El micelio obtenido se analizarán sus propiedades antioxidantes (“GgLC-frascos I II III y IV” y “GsLC-frascos I II III IV” capítulo VI) y antígenotóxicas en el caso de los medios basales (“GgLC- frascos I” y “GsLC-frascos I”, capítulo VII). El contenido nutricional proximal y de minerales del micelio cultivado en el medio basal se presenta en el **Apéndice 3**.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas e inóculo

Para inocular los medios líquidos se emplearon sectores de micelio crecido en medio agar nutritivo en forma de cuña (¼ de la caja de Petri) de *G. gargal* (cepa A) o *G. sordulenta*. Se utilizaron frascos de vidrio de 3.000 ml conteniendo 500 ml de medio de cultivo, con una relación inicial volumen de medio: volumen total = 1:6, con 10 repeticiones por tratamiento. La incubación fue realizada en oscuridad, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y baja velocidad de agitación (30 rpm) en un agitador orbital horizontal. Luego de 30 días el micelio se separó por filtración con un filtro de nylon ($\phi 30 \mu\text{m}$), se liofilizó y se molió con la ayuda de un mortero. El material resultante se mantuvo en un desecador hasta su uso para la determinación de la actividad antioxidante.

2.2. Medios de cultivo

En la **Tabla 13** se muestra la composición de los medios nutritivos empleados en los tratamientos. Un medio basal (C), fue suplementado con vitaminas- aminoácidos (VA), con reguladores (R) o con ambos vitaminas-aminoácidos y reguladores (VA+R). Los medios de crecimiento se ajustaron a pH 4,3 y posteriormente se esterilizaron en los frascos.

Tabla 13. Composición de los medios de cultivo usados para *Grifola gargal* y *G. sordulenta*. Medio basal (C), medio basal suplementado con vitaminas y aminoácidos (VA), medio basal suplementado con reguladores de crecimiento vegetal (R) y medio basal suplementado con vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento vegetal (VA+R).

Tratamientos	Tipo de nutriente	Detalle y cantidad
C (control)	Carbohidrato principal	18 g/l sacarosa
	Fuentes nitrogenadas	6 g/l extracto de levadura; 3 g/l peptona
	Sales macronutrientes	1,65 g/l NO_3NH_4 ; 1,9 g/l NO_3K ; 0,44 g/l $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,37 g/l $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3 g/l $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$
	Sales micronutrientes	6,2 mg/l BO_3H_3 ; 16,9 mg/l $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$; 8,6 mg/l $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,83 mg/l KI; 0,25 $\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
VA	Vitaminas	100 mg/l inositol; 0,5 mg/l ácido nicotínico; 0,1 mg/l tiamina; 0,5 mg/l piridoxina; 0,5 mg/l ácido ascórbico; 0,5 mg/l ácido fólico; 0,5 mg/l riboflavina
	Aminoácidos	150 mg/l triptofano; 150 mg/l alanina; 150 mg/l fenil alanina
R	Reguladores	0,1 mg/l ácido indol acético; 0,1 mg/l bencilaminopurina; 0,1 mg/l ácido giberélico
VA+R	Vitaminas aminoácidos	medio VA
	Reguladores	medio R

2.3. Determinaciones

Luego de 30 días de cultivo, al momento de recolección de la biomasa de micelio, se determinaron los valores de pH, conductividad y contenido de glucosa en los medios de crecimiento. Para este último caso se utilizó un *kit* de laboratorios Wiener® que usa un método enzimático.

2.4. Análisis de los datos

Los valores de biomasa se analizaron con Anova simple y las medias fueron diferenciadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$). El error estándar de cada media para la biomasa se calculó con la fórmula $EE_{MEDIAS} = (STi^2/nTi)^{1/2}$. También se realizaron análisis de correlación entre pH o conductividad con el peso seco del micelio ($\alpha=0,05$). Los cálculos se realizaron empleando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

3. Resultados y discusión

Mediante este método de cultivo fue posible obtener biomasa de micelio de manera sencilla y con una rápida recuperación. En la **Figura 45** se muestran imágenes fotográficas del micelio obtenido; pueden observarse las formas nubosas debida a la baja agitación de los cultivos. Cabe destacarse que el medio siempre se observó traslúcido y que en el caso de *G. sordulenta* presentó una tonalidad de color más oscura que con *G. gargal*. Ambas especies produjeron un aroma almendrado que se mantuvo en el medio luego de la extracción del micelio, sugiriendo allí la presencia remanente de estos metabolitos volátiles.

Los suplementos (vitaminas y aminoácidos y/o reguladores de crecimiento vegetal) no produjeron incrementos significativos en el peso fresco ni en el peso seco para ninguna especie ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de biomasa (peso fresco o peso seco) entre *Grifola gargal* y *G. sordulenta* ($p<0,05$). Los mayores valores de producción de biomasa (peso seco) en función del volumen del medio estuvieron entre 4 y 6 g/l, respectivamente (**Figura 46**). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas pudo observarse que i) *G. sordulenta* superó a *G. gargal* en los valores promedio de contenido de biomasa en todos los tratamientos, y que ii) el valor promedio de biomasa correspondiente al tratamiento R superó a los correspondientes valores de biomasa de los demás tratamientos.

Si bien este ensayo se mantuvo por 10 días más que el presentado en la sección anterior, no fue posible alcanzar el mismo rendimiento de biomasa. Posiblemente podría haberse obtenido una mayor biomasa en presencia de CSG, pero en este caso no se agregó a fin de evitar una combinación compleja de metabolitos secundarios, ya que la CSG contiene vitamina E y otras moléculas antioxidantes que luego causarían interferencias al ensayar las propiedades antioxidantes de este material (ver más abajo que prácticamente se usó toda la fuente carbonada). Si se asume que la presencia del aroma almendrado es indicativa de la producción de metabolitos secundarios; el inicio para la extracción de estos metabolitos secundarios podría ser a partir del día 15, cuando comienza a percibirse el aroma almendrado en las condiciones del ensayo.

Figura 45. Micelio de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* cultivado en medios nutritivos líquidos durante 30 días, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, oscuridad y 30 rpm. **A:** frasco con 500 ml de medio de cultivo; **B:** micelio recolectado; **C, D, E, F:** masas miceliales con formas esferoidales-nubosas. Las **Figuras A, B, C, F** pertenecen a *G. gargal*; y **D, E** pertenecen a *G. sordulenta*.



Se ha visto que la disminución en el contenido del carbono es una señal desencadenante del metabolismo secundario (Lin y Chen, 2007). Al tiempo de la cosecha se determinó que el contenido de glucosa presente en el medio (resultante de la hidrólisis de la sacarosa del medio) disminuyó de 15 g/l a un promedio de 0,5-2,0 g/l, implicando que se utilizó el 86-95 % de la misma. No hubo diferencias significativas en el contenido remanente de este metabolito entre tratamientos ni entre las especies bajo estudio ($p>0,05$). Es así que durante el tiempo de cultivo, una gran proporción del contenido de carbono se usó en la respiración celular. En la **Figura 47** se muestra una representación de *Box-Whisker* para el contenido de glucosa en cada unidad experimental de cada especie (todos los tratamientos).

Figura 46. Valores promedio de la biomasa de micelio (g) por unidad experimental de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*. Los tratamientos fueron: medio de cultivo basal (C), C + vitaminas y aminoácidos (VA), C + fitoreguladores (R), C + vitaminas, aminoácido y reguladores (VA+R). Los desvíos corresponden al error estándar de cada media.

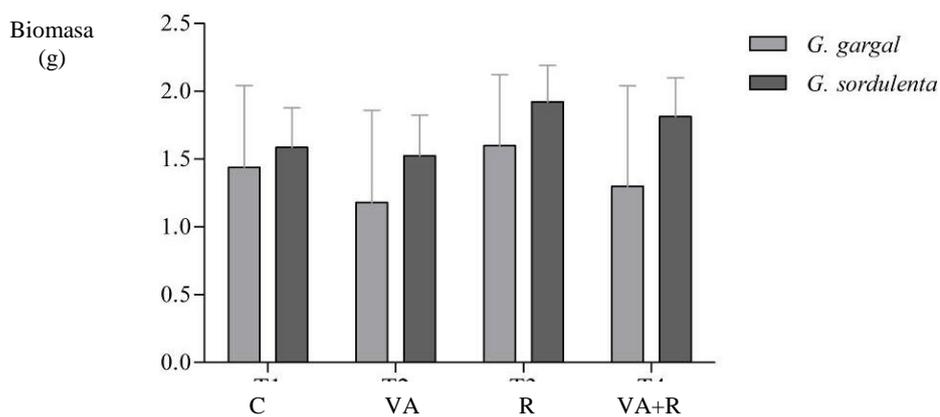
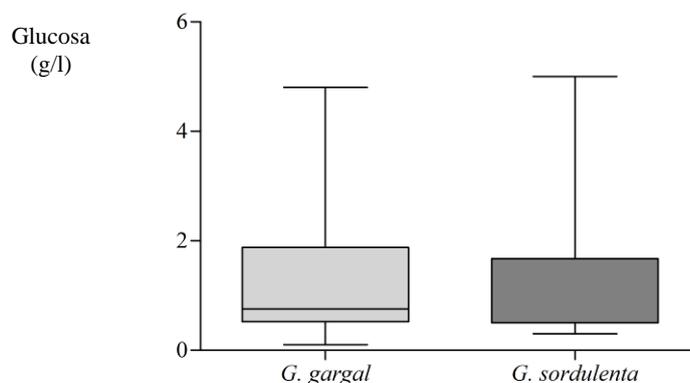


Figura 47. Representación *Box-Whisker* que muestra el contenido de glucosa (g/l) remanente en el medio luego de 30 días de cultivo. Se muestran los valores máximos, mínimos, mediana y las cajas grises que representan el 50% de los datos. El valor inicial de sacarosa en el medio fue de 18 g/l.



El remanente de glucosa al día 30 es muy poco y no deja margen para extender el período del cultivo, en estas condiciones la lisis celular puede producir metabolitos secundarios indeseables (Papagianni, 2004). En ambas especies el peso fresco y el peso seco fueron correlativos (**Figura 48**, los datos corresponden a todos los tratamientos de las dos especies) y el contenido de agua del micelio fresco resultó ser del 96 %. No se halló correlación ($p>0,05$) entre el pH y el peso seco, aunque sí hubo un incremento en la acidez de *G. sordulenta* pH 4,6, mientras que *G. gargal* se mantuvo a un pH más alto (**Figura 49**, $p<0,05$). En cuanto a la absorción de sales del medio por el micelio de *G. gargal* o *G. sordulenta* en crecimiento, en el nivel salino de los tratamientos ensayados, resultó ser no significativa. La **Figura 50**. Muestra la ausencia de correlación entre conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y biomasa (peso seco) de todas las unidades experimentales.

Figura 48. Correlación del peso fresco vs. peso seco (gramos) del micelio de *Grifola gargal* y de *G. sordulenta* cultivados en frascos. El contenido de agua en el micelio fresco es constante (c.a. 96 %) hasta los 2 g de micelio seco por unidad experimental.

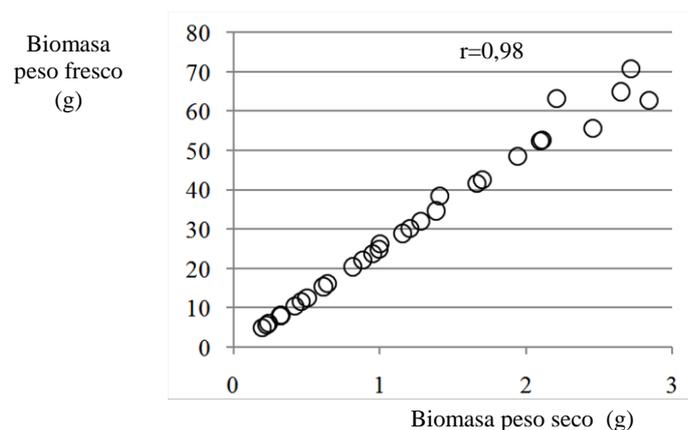


Figura 49. Correlación entre pH (medido al final del cultivo) y biomasa del micelio fúngico (peso seco en gramos) a los 30 días de cultivo líquido de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en medios estacionarios.

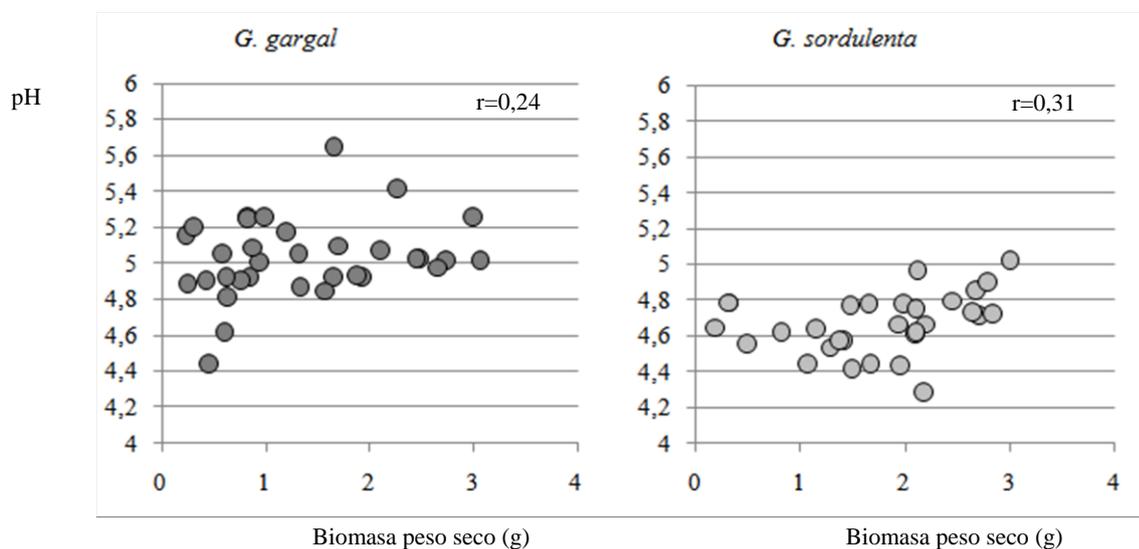
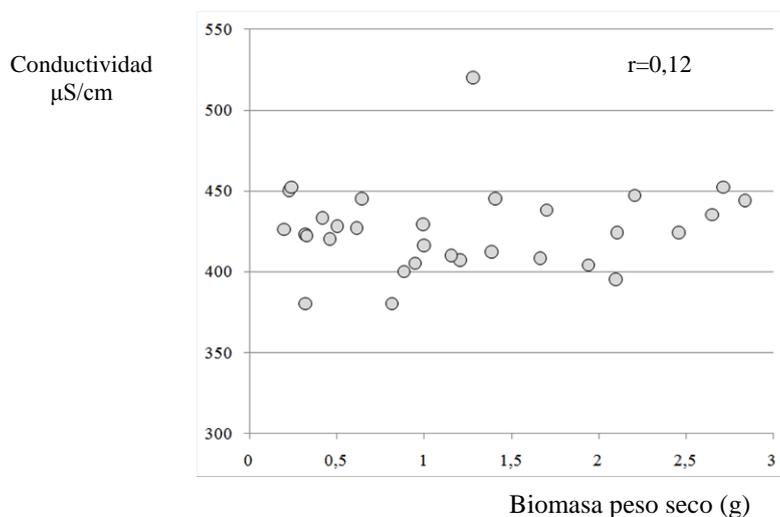


Figura 50. Correlación entre conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y biomasa del micelio fúngico (peso seco en gramos) de todas las unidades experimentales a los 30 días de cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en medio líquido bajo agitación suave.



4. Conclusiones

El cultivo de micelio en frascos permitió obtener con estas unidades experimentales micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta* de manera más fácil, pero con rendimientos de biomasa menores a los hallados con Erlenmeyers de 250 ml. El agregado de suplementos nutritivos orgánicos no mostró mejoras importantes en cuanto a la cantidad de biomasa. Esta metodología produjo una mayor biomasa micelial en *G. sordulenta* en comparación a la obtenida con *G. gargal* y permite la posibilidad de separar muy fácilmente el micelio desde el caldo de cultivo.

C. Cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en medio líquido en Erlenmeyers de 500 ml. Efecto de la bencilaminopurina

1. Introducción

Los estudios fisiológicos revelan que los reguladores de crecimiento vegetal también poseen actividad en el reino *Fungi*. En efecto, se halló que intervienen en la elongación celular y la diferenciación (Yanagishima, 1963; Tomita *et al.*, 1984), en el aumento de biomasa y del contenido proteico en *Pleurotus sajor-caju*, en *Agaricus campestris* y en *Volvariella esculenta* (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Guha y Banerjee, 1974; Jonathan *et al.*, 2004, respectivamente). En *Lentinus subdunus* cultivado en troncos se observó que aumentan la productividad (Kadiri y Arzai, 2004) y además se encontró que estimulan la germinación de esporas en *G. frondosa* (Isikhuemhen y Vaughans-Ward, 2005).

Entre todos los reguladores vegetales conocidos, las citocininas han recibido una atención especial por su intervención en la relación simbiótica planta-micelio de los hongos micorrícicos. De hecho, este grupo de hongos sintetizan citocininas como parte de estas interacciones (Kraigher *et al.*, 1991; Dutra *et al.*, 1996), incluso se conoce que ciertos aminoácidos incrementan su producción durante el cultivo líquido (Kampert y Strzelczyk, 1990).

Como en los vegetales, las citocininas regulan el intercambio de iones a través de las membranas celulares del micelio, la división y elongación celular, movilización de nutrientes y participan en el retraso de la senescencia (Dua y Jandaik, 1979). Asimismo, regulan el metabolismo secundario como se ha demostrado en *Agaricus bisporus* en relación con la producción de aroma y maduración del basidiocarpo (Pohleven 1990; Champavier *et al.*, 2000; Braaksma *et al.*, 2001).

1.1. Hipótesis

El crecimiento de *G. gargal* y de *G. sordulenta* puede ser estimulado por una citocinina, la bencilaminopurina.

1.2. Objetivos

El propósito del estudio fue evaluar la influencia de la bencilaminopurina (BAP: 0,1-10 mg/l) en el crecimiento del micelio cultivado en medio nutritivo líquido en agitación. Como un objetivo adicional se estudiaron dos metodologías de homogenado de micelio para elaborar el inóculo. En el capítulo IV se presenta la evaluación del micelio resultante en su actividad antioxidante (“GgLC-BAP 0 0,1 1 5 y 10” y “GsLC-BAP 0 0,1 1 5 y 10”).

2. Materiales y métodos

En este ensayo se realizaron modificaciones para obtener una menor variabilidad: como recipientes de cultivo se emplearon Erlenmeyers de 500 ml (conteniendo 125 ml de medio de cultivo dando una relación inicial volumen de medio: volumen total de 1:4) y como inóculo se utilizó un homogeneizado en medio líquido del micelio cultivado en cajas de Petri en medio MYPA modificado.

Para la obtención del inóculo líquido se empleó una licuadora doméstica de mano, en condiciones de asepsia, siguiendo en general el protocolo de Stamets (1993) que en este caso resultó ser útil, aunque como este autor menciona, no todas las especies son tolerantes a este tipo de manejo. Es así que en el ensayo preliminar, que se describe en la siguiente sección, se pudo observar con esta metodología que *G. gargal* mostraba valores más homogéneos de biomasa entre las réplicas, aunque en promedio resultaron ser menores que en el caso de los obtenidos usando ya sea la inoculación con discos de agar o bien cuñas de micelio, sugiriendo que este procedimiento disminuyó los puntos de crecimiento por ruptura celular. Se asumió que también sería este el caso para *G. sordulenta*.

2.1. Preparación del inóculo líquido

En un ensayo preliminar se cultivó a *G. gargal* (cepa A) en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 125 ml de medio de cultivo sembrado con inóculo líquido de micelio. Para la elaboración de este inóculo y para el cultivo posterior se utilizó la fórmula del medio nutritivo líquido: 30 g sacarosa, 6 g extracto de levadura, 2 g peptona, 500 mg $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg $\text{PO}_4\text{H K}_2$, 140 mg $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot\text{H}_2\text{O}$, por litro de medio, a pH 4. Los medios de cultivo fueron esterilizados durante 30 minutos a 121°C.

Se probaron dos tratamientos de esterilización del conjunto de vaso y licuadora utilizando ClONa. Esto fue necesario dado que este conjunto no resiste una esterilización por calor. El tratamiento **A** fue más intensivo que el **B**, como se describe a continuación:

Tratamiento A: ClONa 80 g/l al 10% durante 30 minutos (3 minutos con la licuadora en funcionamiento y 4 minutos sin funcionar), seguido de etanol 70% 5 minutos y 4 enjuagues con agua estéril.

Tratamiento B: ClONa 80 g/l al 10% durante 15 minutos (3 minutos con la licuadora en funcionamiento y 4 minutos sin funcionar) seguido de 4 enjuagues con agua estéril.

Para la preparación del inóculo se licuaron 8 cuñas de micelio (una caja de Petri) en 125 ml de medio por 10 s, 2 veces. Para el cultivo se inocularon 10 ml de inóculo en 125 ml de medio contenido en Erlenmeyers de 500 ml (n=10). La incubación se realizó a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 90 rpm, en oscuridad y durante 20 días. Al final del ensayo el micelio recuperado se centrifugó a 200 g, se liofilizó, y se registró su peso seco. El efecto de la esterilización sobre la producción de biomasa fue analizado con el test *t* de Student ($\alpha=0,05$).

2.2. Cultivo sumergido de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*. Efecto de BAP.

Se empleó el tratamiento **A** para la esterilización del sistema usado en el ensayo preliminar para la obtención de los correspondientes inóculos líquidos. Se cultivaron *G. gargal* (cepa A) y *G. sordulenta*

(n=10) en el medio de cultivo mencionado en la sección anterior, conteniendo diferentes dosis de BAP (0- 0,1- 1- 5 y 10 mg/l). La BAP se solubilizó en el medio de cultivo previo a la esterilización. Luego de 20 días de cultivo se recolectó el micelio por centrifugación a 200 g, se liofilizó y se molió con la ayuda de un mortero para luego conservarlo en desecador hasta su uso para la determinación de las propiedades antioxidantes (ver capítulo VI).

2.3. Análisis de los datos

Los valores de biomasa obtenidos en el ensayo del ítem 2.1. se analizaron con el test *t* de *Student* ($\alpha=0,05$) y los valores de biomasa del ítem 2.2. se analizaron con Anova simple. En este último caso las medias fueron diferenciadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$) y se calculó el error estándar de cada media con la fórmula $EE_{MEDIAS} = (ST_i^2/n_i)^{1/2}$. Los cálculos se realizaron empleando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

3. Resultados y discusión

3.1. Preparación de inóculo líquido

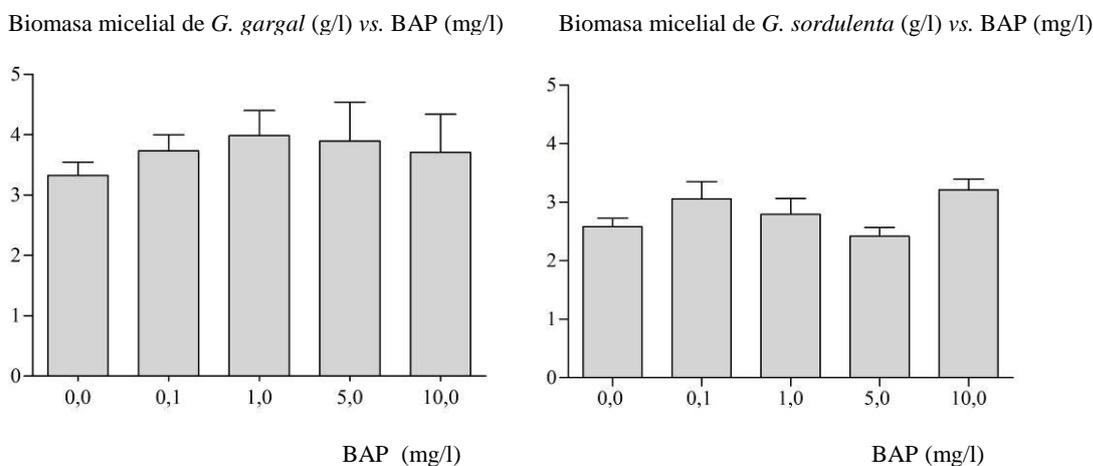
A los 20 días de cultivo se obtuvieron los valores promedios de biomasa de micelio (g/l) de *G. gargal*. El micelio recolectado y liofilizado pesó 4,4 g/l para el tratamiento **A** y 3,5 g/l para el tratamiento **B** sin obtenerse entre ellos diferencias significativas (*t de Student*: $p>0,05$). Se observó que las esferas de micelio (= *pellets*) eran pequeñas respecto a las formadas cuando la inoculación se realizó con discos de micelio cultivado en agar. Este método permitió reducir la variabilidad en comparación con la inoculación mediante discos o cuñas de micelio, empleadas previamente. En este caso (tratamiento **A**) el coeficiente de variación ($C_v = \text{desvío estándar} / \text{media} \times 100\%$) fue de *c.a.* 15%, mientras que en el cultivo en Erlenmeyers de 250 ml (para *G. gargal*) fue de 20 % y en el cultivo en frascos superaba el 50%.

Debido al empleo de esta técnica, donde existe mayor manipulación y se emplea una esterilización química, es posible que se incrementen los eventos de contaminación. Sin embargo, en esta experiencia sólo se contaminó una u.e. con el método de esterilización **B**. Ambas metodologías fueron satisfactorias y para utilizar en adelante se optó por el tratamiento **A**, donde la esterilización química resultó ser adecuada al propósito perseguido.

3.2. Efecto de BAP sobre el crecimiento de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en cultivo sumergido

En ambas especies no se detectaron incrementos significativos de la biomasa micelial por sobre el control ($p<0,05$). Hubo una tendencia de incremento en la biomasa en el caso de *G. gargal* con dosis de BAP de 1 y 5 mg/l que representó *c.a.* 18% superior al control (**Figura 51**). En *G. sordulenta* también se detectaron tendencias similares (*c.a.* 18%) con 0,1 y 10 mg/l de BAP (**Figura 51**).

Figura 51. Producción de biomasa micelial de *Grifola gargar* o *G. sordulenta* en medio líquido sumergido después de 20 días de cultivo en diferentes concentraciones de BAP (0-10 mg/l). Las barras representan los valores promedio de la biomasa de micelio (peso seco, g /l). El desvío corresponde al error estándar de la media.



En ausencia de BAP, el crecimiento del micelio de *G. gargar* fue mayor al correspondiente a *G. sordulenta*: 3,3 y 2,58 g/l, respectivamente ($p < 0,05$). Durante el estudio previo de la optimización del cultivo en medios líquidos y en las condiciones empleadas, *G. sordulenta* había producido una mayor biomasa; la diferencia entre el primer estudio y el actual son: el medio de cultivo con caldo de semillas de girasol vs. sin caldo, el empleo de Erlenmeyers de 250 ml vs. 500 ml, una mayor relación de volumen de medio: volumen total (1:5 y 1:4, respectivamente) y la inoculación con micelio en discos de agar vs. micelio homogeneizado. Dado que el manejo previo del inóculo es un factor importante en lo que se refiere a la viabilidad del micelio, se infiere que *G. gargar* es más tolerante que *G. sordulenta* al tratamiento usado para multiplicar los “puntos de propagación”. En la **Figura 52** se muestran imágenes con las secuencias de la experimentación. Es interesante mencionar que en todos los tratamientos con BAP, así como en el control, fue típica la aparición de un olor almendrado en ambas especies. Además, durante el cultivo líquido de *G. sordulenta* se observó que el color del medio se tornaba más oscuro con la edad del cultivo, como ya se había observado durante el cultivo en frascos.

4. Conclusiones

En las condiciones ensayadas, el crecimiento de *G. gargar* y de *G. sordulenta* no fue estimulado de por la presencia de bencilaminopurina (BAP). El homogenado del micelio redujo la variabilidad entre los valores de biomasa de las u.e., pero también este tratamiento invasivo pudo ser una causa de la menor tasa de crecimiento.

Figura 52. Secuencia de la preparación del inóculo líquido para el cultivo líquido de dos especies de *Grifola* spp. en cultivo sumergido, en Erlenmeyers de 500 ml, y el resultado del cultivo correspondiente. **A:** materiales, **B:** introducción del medio estéril (125 ml) y el micelio proveniente de una caja de Petri en el vaso de la licuadora, **C:** licuadora en funcionamiento para obtener el inóculo líquido, **D:** inoculación del medio de cultivo líquido contenido en las unidades experimentales, **E:** micelio de *G. gargal* al día 20 del cultivo (5 mg/l BAP); **F:** micelio de *G. sordulenta* a los 20 días de cultivo (0,1 mg/l BAP).



D. Cultivo de *Grifola sordulenta* y *G. frondosa* en condiciones de cultivo líquido estacionario

1. Introducción

El cultivo estacionario conduce a la formación de un micelio laxo-pubescente, que como se mencionó anteriormente, puede tener diferentes propiedades respecto al micelio con forma esférica que se produce en los cultivos con agitación. Una manera de realizar los cultivos estacionarios es empleando como contenedor una fuente de vidrio u otro material autoclavable y asegurando una buena relación superficie/volumen para permitir un adecuado intercambio de gases (Chang y Miles, 2004). Además de obtener micelio (y/o metabolitos desde el medio) se ha encontrado que este tipo de sistemas también es apto para la producción hidropónica de fructificaciones de shiitake (*ibíd.*).

Dado que el intercambio gaseoso bajo esta metodología se produce por difusión simple, en otras palabras no se requiere disponer de un *shaker*, se pueden emplear mayor número de u.e. En contrapartida y por causa de una velocidad de difusión más lenta de los nutrientes, este sistema requiere más tiempo para colonizar el medio líquido.

1.1. Hipótesis

Es posible cultivar micelio de *G. sordulenta* y *G. frondosa* mediante la metodología sin agitación y obtener micelio de calidad aceptable

1.2. Objetivos

Obtener parámetros del cultivo de micelio en estado estacionario, luego recolectarlo y emplearlo como material biológico para evaluar la actividad antioxidante del mismo (“*Gs*LC- fuentes” y “*Gf*LC- fuentes”, capítulo VI). El contenido nutricional proximal y mineral del micelio de cultivo líquido de *G. frondosa* cultivado con esta metodología se trata en el **Apéndice 3**.

2. Materiales y métodos

2.1. Especies e inóculo

Se evaluó la factibilidad de esta metodología para la producción de micelio de *G. sordulenta*, y *G. frondosa*. Se realizó su cultivo en Erlenmeyers de 250 ml según la metodología desarrollada en la sección **A**. de este capítulo para su uso como inóculo.

2.2. Fermentación sumergida en condiciones de cultivo estacionario

El medio empleado fue el propuesto por Lee *et al.* (2003) para *G. frondosa*: 30 g glucosa, 6 g extracto de levadura, 2 g peptona de carne, 0,5 g $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,14 g $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 g PO_4HK_2 , por litro, a pH 4. Después de agregar el medio (500 ml) a las fuentes de vidrio de 4 litros de capacidad (10 u.e. por especie), se envolvió el conjunto en bolsas de polipropileno resistentes a alta temperatura y

se procedió a su autoclavado a 121°C durante 30 minutos. El inóculo, correspondiente a cada una de las dos especies de *Grifola* bajo estudio, se agregó en una proporción del 10% v/v del medio de cultivo contenido en las fuentes. El cultivo se realizó durante 48 días, en oscuridad y a 20°C.

2.3. Análisis de los datos

A los 48 días de cultivo, el micelio de las dos especies había cubierto la superficie del medio de cultivo. Se dio por finalizado el ensayo y el material se filtró con una malla de nylon ($\phi 30 \mu\text{m}$) y se liofilizó. Posteriormente se conservó en desecador hasta la determinación de sus propiedades antioxidantes (ver capítulo VI). El rendimiento de biomasa se analizó con el test t de Student ($\alpha=0,05$).

3. Resultados y discusión

En la **Figura 53** se muestran las secuencias de la técnica utilizada. De las 10 fuentes usadas por tratamiento quedaron 4 en *G. sordulenta* y 7 en *G. frondosa*. El resto del material se perdió por contaminación, lo cual es relativamente esperable cuando se debe manipular asépticamente estos sistemas y donde la experiencia del operador es muy importante.

Al día 11 de cultivo se tomó una alícuota (1 ml) de los diferentes medios de las fuentes y se realizó un subcultivo en medio MYPA modificado, con el propósito de cuantificar el crecimiento micelial de estas especies en las condiciones especificadas. Luego de 15 días de este cultivo se encontró que *G. frondosa* produjo *c.a.* de 17 colonias mientras que *G. sordulenta* produjo 8 colonias.

Al día 48 del cultivo líquido estacionario, algunas unidades experimentales (fuentes) tenían una gran proporción de masa micelial creciendo por encima del nivel del cultivo líquido (**Figura 54**). Las otras unidades experimentales eran como las de la **Figura 53C**, mostraban un buen crecimiento pero no sobresalían del medio líquido. Se consideró que este tiempo de cultivo había sido suficiente y para evitar la entrada del micelio a la fase de lisis celular por sobrecrecimiento, se recolectó y liofilizó el material.

Los rendimientos expresados como biomasa de micelio seco obtenido por u.e. de 500 ml, en los cultivos estacionarios de *G. sordulenta* y *G. frondosa*, se muestran en la **Figura 55**. *Grifola sordulenta* obtuvo en promedio 2,8 g/l, y *G. frondosa* 2,4 g/l, sin diferencias significativas entre ambos (test t de Student $p>0,05$). Si bien *G. frondosa* había iniciado el crecimiento con mayor rapidez, como se determinó para el día 11, ambas especies se encontraron en la meseta de crecimiento para el día 48, resultando rendimientos de biomasa similares sobre la base de peso seco.

Fue llamativo encontrar que en este sistema *G. sordulenta* desarrolló también la pigmentación verde oscura análoga a la comentada en el cultivo en frascos y en Erlenmeyers (en cultivo con BAP). Además *G. sordulenta* mostró manifestaciones del metabolismo secundario en la superficie *i.e.* exudados, pigmentación y formación de agregados, mientras que *G. frondosa* no las desarrolló. Este inicio de cambios morfogénicos señala la posibilidad de realizar cultivos hidropónicos de manera similar a lo informado por Chang y Miles (2004) para el caso del shiitake. Así se muestra que este tipo

de cultivo no solo es útil para el estudio de variables que intervienen en la fructificación sino que eventualmente puede representar una alternativa productiva.

Finalmente, en la **Tabla 14** se comparan los rendimientos de micelio obtenidos en los diferentes sistemas *i.e.*: Erlenmeyers de 250 y de 500 ml, frascos y fuentes. Además de las diferencias que se observan en los rendimientos, es importante recalcar que las formas de cultivo pueden condicionar las propiedades químicas del micelio y los productos vertidos por éste al medio.

La metodología de Erlenmeyers de 250 ml resultó como la mejor en cuanto al rendimiento para las tres especies. Mientras que en *G. gargal* y *G. sordulenta* con el cultivo en frascos, se obtuvieron mejores rendimientos que con Erlenmeyers de 500 ml. Por otra parte cuando *G. sordulenta* se cultivó en fuentes, se obtuvo la mitad del contenido de micelio que en frascos de 3 litros y además en el doble de tiempo. El rendimiento de biomasa micelial de *G. frondosa* producida en fuentes fue menor al logrado en otra cepa con el uso de un biofermentador (Lee *et al.*, 2004).

Figura 53. Cultivo de micelio en medios líquidos estacionarios. **A:** fuentes de vidrio con medio de cultivo envueltas con polipropileno resistente al autoclavado y esterilizadas en autoclave durante 30 minutos a 121°C. **B:** luego de su cultivo en oscuridad se retiran de la bolsa protectora. **C:** Antes de efectuar la recolección del micelio se observa para determinar la ausencia de contaminación y se anotan los caracteres que presenta el cultivo. **D:** el cultivo se filtra con una malla de nylon ($\phi 30 \mu\text{m}$) y finalmente se liofiliza.

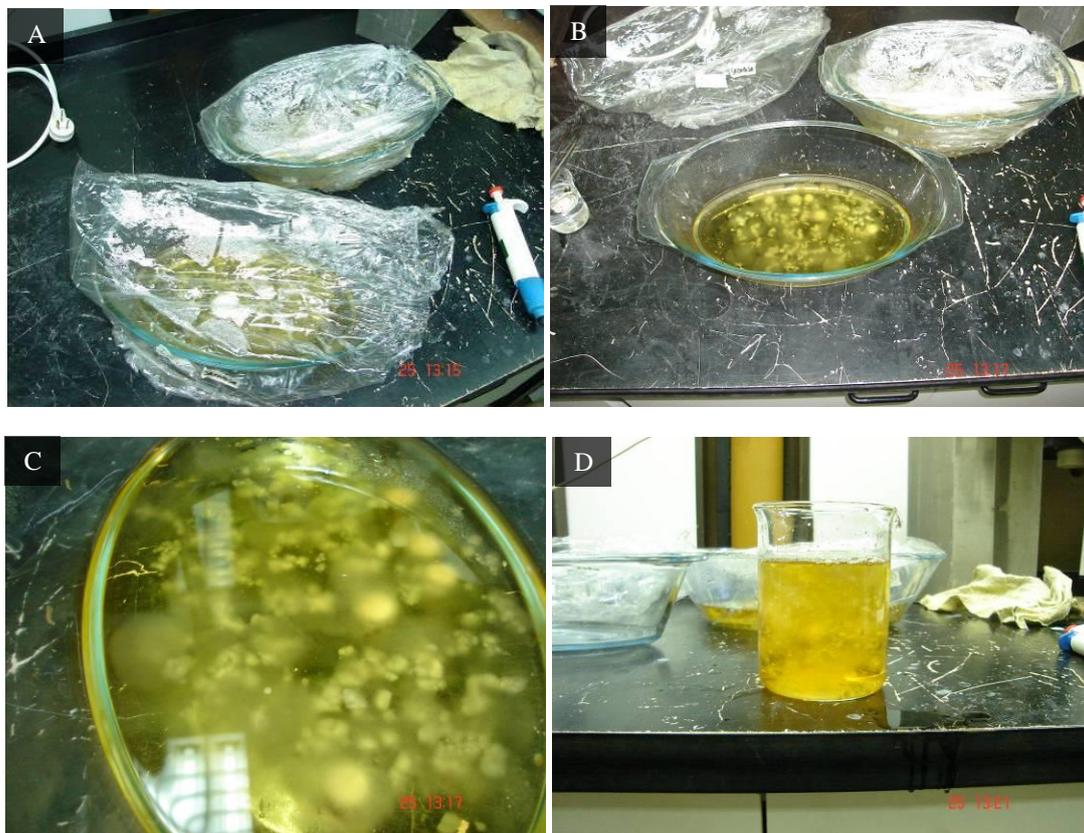


Figura 54. Cultivos estacionarios de *Grifola sordulenta* y de *G. frondosa* a los 48 días de cultivo. Las fuentes contenían 500 ml de medio. El micelio de *G. sordulenta* presentó agregados pigmentados y exudados en las zonas de micelio que sobresalían de la superficie. En el caso de *G. frondosa* se observó sobrecrecimiento abundante de micelio blanco sin formar agregados ni exudados.

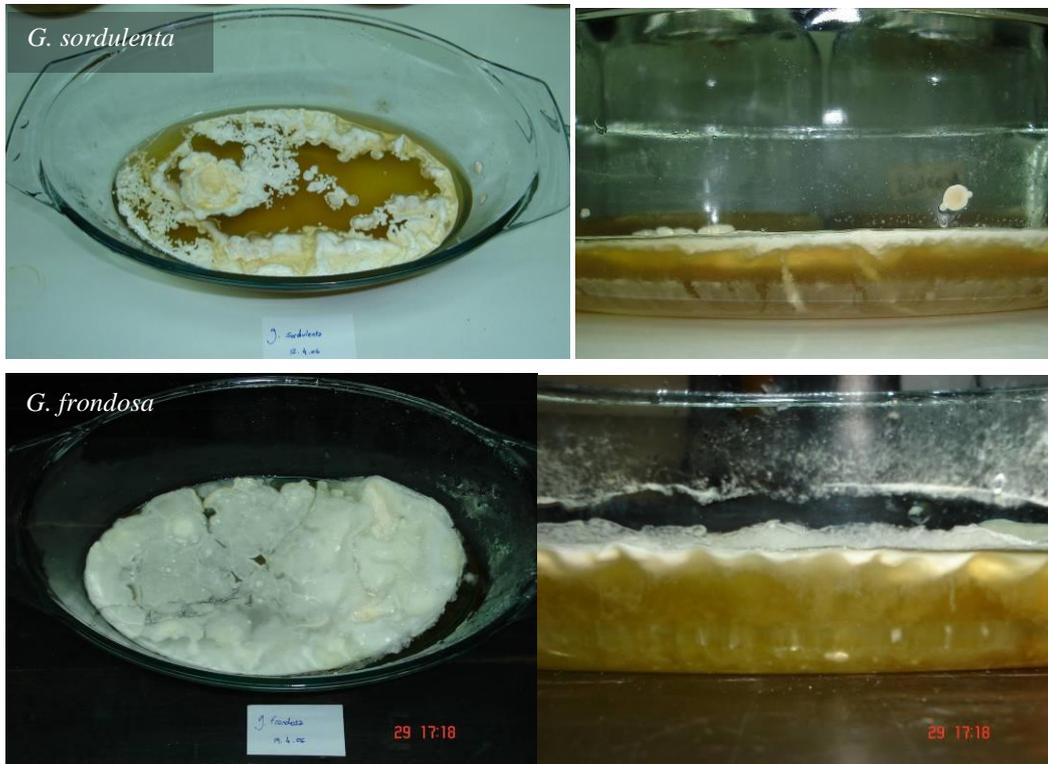


Figura 55. Representación *Box-Whisker* que muestra los rendimientos de biomasa (peso seco del micelio por u.e.) de *Grifola sordulenta* y *G. frondosa* obtenido en cultivo en medio líquido estacionario. Las fuentes contenían 500 ml de medio de cultivo. El micelio se durate 48 días a 20°C y en oscuridad.

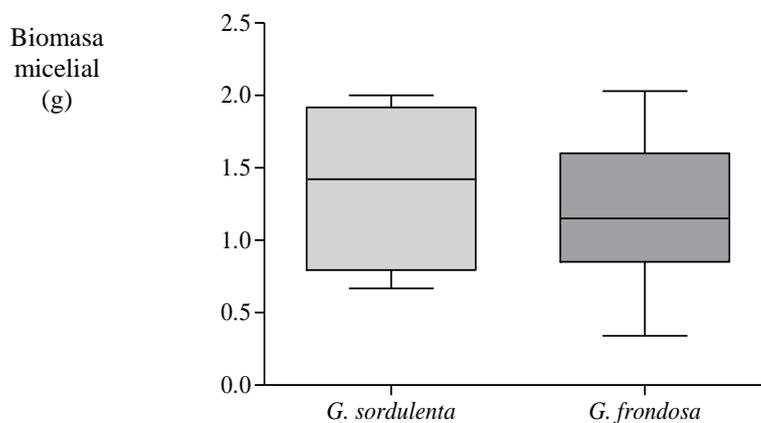


Tabla 14. Comparación del rendimiento de biomasa micelial (peso seco) entre las especies de *Grifola* estudiadas en relación al tipo de recipiente y volumen de medio. Las especies fueron cultivadas en medio líquido con agitación (Erlenmeyers a 90 rpm y frascos a 30 rpm) y medio estacionario (fuentes). Se incluyen datos de la misma cepa de *G. frondosa* cultivada en Erlenmeyer de 250 ml y de otra cepa de *G. frondosa* cultivada en un biofermentador de 5 litros.

Especie	Sistema de cultivo	Volumen de medio (ml)	Rendimiento (g/l)	Días de cultivo	Referencia
<i>G. gargal</i>	Erlenmeyers 250 ml	50	8,0	20	Postemsky <i>et al.</i> , 2006
	Erlenmeyers 500 ml	125	3,3	20	<i>Esta tesis</i>
	Frascos 3 l	500	4,0	30	<i>Esta tesis</i>
<i>G. sordulenta</i>	Erlenmeyers 250 ml	50	18,0	20	Postemsky <i>et al.</i> , 2006
	Erlenmeyers 500 ml	125	2,6	20	<i>Esta tesis</i>
	Frascos 3 l	500	6,0	30	<i>Esta tesis</i>
	Fuentes 4 l	500	2,4	48	<i>Esta tesis</i>
<i>G. frondosa</i>	Erlenmeyers 250 ml	50	27,3	23	Figlas <i>et al.</i> , 2010
	Fuentes 4 l	500	2,8	48	<i>Esta tesis</i>
	Biorreactor 5 l	5000	16,8	~14	Lee <i>et al.</i> , 2004

4. Conclusiones

La temperatura de cultivo afectó el crecimiento de *G. gargal* y *G. sordulenta*, siendo más favorable el cultivo *c.a.* 18°C. La acumulación de biomasa aumentó con el agregado de caldo de semillas de girasol como aditivo.

El cultivo de micelio en frascos con agitación leve mostró ventajas para la obtención de micelio de manera más sencilla, sin embargo los rendimientos de biomasa fueron menores en comparación con el cultivo en Erlenmeyers de 250 ml. La biomasa de micelio cultivada en frascos no aumentó cuando se introdujeron en el medio vitaminas y aminoácidos y/o reguladores del crecimiento vegetal como suplementos nutritivos orgánicos.

La evaluación del cultivo agitado de micelio en Erlenmeyers más grandes, de 500 ml, mostró un menor rendimiento de biomasa al de Erlenmeyers de 250 ml, que se adjudicó al proceso de homogenado del inóculo, *i.e.*: micelio en cajas de Petri. No obstante este procedimiento fue útil para disminuir la variabilidad estadística en la cantidad de biomasa por unidad experimental dentro de cada tratamiento. En el mismo ensayo, empleando Erlenmeyers de 500 ml, también se verificó que la dosis de bencilaminopurina empleada no causó un estímulo en la acumulación de biomasa micelial.

Finalmente, el cultivo estacionario fue el que produjo menor biomasa no obstante hay que considerar que es una alternativa factible cuando no se cuenta con un equipo de agitación orbital.

Capítulo IV

Cultivo en sustratos conteniendo granos de cereales y oleaginosas para la producción de blanco de hongo

1. Introducción

En general, los granos de cereales u oleaginosas pueden usarse para sostener el crecimiento vegetativo de los hongos basidiomicetos de la pudrición blanca (Jiskani *et al.*, 2007). El blanco de hongo, conocido también como semilla de hongo o por la palabra inglesa *spawn*, es el micelio del hongo que crece de manera vegetativa y vigorosa en un *carrier* que le suministra los nutrientes necesarios para ello y además permite, *a posteriori*, su dispersión uniforme en el sustrato en el cultivo industrial. En efecto, se trata de granos de cereales, granos de oleaginosas, mezclas de aserrines de madera con virutas, cultivos en medios líquidos, o incluso se pueden usar como *spawn* porciones del sustrato colonizado; los anteriores se utilizan para “sembrar” (inocular) el sustrato donde se realizará la producción de hongos, sustrato que usualmente se prepara con el agregado de aditivos como yeso y caliza, y en algunos casos con otros suplementos que pueden mejorar el crecimiento y desarrollo de los hongos (Chang y Miles, 2004). En general el blanco de hongo se produce sobre esos elementos *carriers* mediante el cultivo de la especie de hongo de interés en condiciones asépticas a partir de cultivos puros. Una vez que se inocula el material *carrier*, el micelio debe colonizarlo de manera rápida para reducir el riesgo de contaminación (*ibíd.*).

El *spawn* en granos de cereales es el más utilizado en el cultivo de hongos en sustratos estériles o pasteurizados. Puede prepararse en bolsas o botellas, siendo estas últimas más seguras para su manejo y esterilización (Stamets, 1993).

El crecimiento del micelio en los granos puede estar limitado por una reducción en la concentración de nutrientes y de oxígeno, por el acúmulo de productos finales tóxicos, por la producción de metabolitos secundarios y por los cambios en algunos factores como el pH (Regina, 2001). Estas limitaciones se controlan parcialmente mezclando los granos dentro de las botellas en forma enérgica y en una frecuencia que no perturbe el crecimiento (Chang y Miles, 2004).

Cada partícula individual, ya sea el grano de cereal u otro material, colonizado por micelio es un pequeño inicio de la colonización del próximo sustrato. A menor tamaño habrá más puntos de colonización por peso de *spawn*; sin embargo es más probable que se formen agregados difíciles de separar y que son una característica de algunas especies. Las partículas mayores tienen menor relación superficie: volumen, y en consecuencia deben ser incorporadas en mayor proporción en el sustrato (Akavia *et al.*, 2009).

Las diferencias en la calidad nutritiva de los materiales usados como *carrier* influyen en la velocidad de crecimiento del micelio, por lo que es necesario determinar cuáles son más aptos para una determinada especie y sustrato. Así por ejemplo, la utilización de granos de girasol solos o en mezcla con granos de cereal en esta etapa de cultivo sería un factor que predispondría la colonia de micelio a degradar más específicamente un sustrato a base de cáscara de girasol.

En la composición del sustrato para *spawn* a base de granos se agregan sales de calcio en un 1-2% p/p sobre la base de peso húmedo. Este aditivo actúa como buffer para mantener el pH cercano a la neutralidad, evitar la formación de agregados y además como suplemento de macronutrientes. La piedra caliza (CO_3Ca) es la más empleada, combinándose con yeso (SO_4Ca), cal apagada ($\text{OCa} + \text{H}_2\text{O}$), y en algunos casos también con nitrato de potasio (Chang y Miles, 2004).

La inoculación de los granos estériles se realiza en condiciones de asepsia con micelio fúngico crecido en agar o medios líquidos. Como una manera práctica de propagar fácil y rápidamente el *spawn* se puede realizar el subcultivo grano-grano partiendo de la primera generación, *i.e.* *spawn* maestro mediante la inoculación de una botella a 10 botellas, y así durante tres subcultivos. De esta manera una botella originaría 1000 botellas de *spawn*, pero no se recomiendan más de tres subcultivos debido a que durante los mismos pueden ocurrir variaciones con respecto al tipo original, con la consecuente pérdida de las características productivas deseables de la cepa (Stamets y Chilton, 1983). El *spawn* se suele almacenar por corto tiempo a baja temperatura, 4°C, a fin de disminuir la velocidad del crecimiento vegetativo hasta su empleo (Stamets, 1993). Si llegado el caso se observa que la colonia comienza a manifestar caracteres de crecimiento secundario, el *spawn* no debería utilizarse, ya que su velocidad de colonización del sustrato es considerablemente menor que la de un *spawn* en buenas condiciones. Este retraso se debe a que el micelio debe retomar el metabolismo primario para comenzar la colonización del sustrato (Stamets, 1993).

En esta sección se muestran los resultados de la evaluación de diferentes formulaciones a base de granos de cereales y oleaginosas para la elaboración de *spawn* para el cultivo de hongos en general y de especies de *Grifola* en particular. El bioensayo Test de Crecimiento Lineal (TCL) (Duncan, 1997), es en general un buen indicador de la velocidad de colonización de un sustrato por una determinada cepa fúngica. Resulta de utilidad para la comparación ya sea de diferentes formulaciones de sustrato o bien de la habilidad de diferentes cepas para colonizar un sustrato dado (Duncan, 1997).

1.1. Hipótesis

La velocidad de crecimiento y la densidad aparente del micelio cultivado en granos es dependiente de la temperatura y del tipo de grano empleado.

1.2. Objetivos

Comparar la velocidad de crecimiento del micelio de *Grifola* spp. en botellas de granos de trigo expuestos a diferentes temperaturas. Estudiar con el test TCL de Duncan la velocidad de crecimiento y observar la densidad aparente del micelio cultivado en distintos granos. Comparar la velocidad de colonización de los diferentes granos en botellas.

A posteriori se analizarán las propiedades antioxidantes y antígenotóxicas de los granos de trigo biotransformados de *G. gargaral*, *G. sordulenta*, *G. frondosa* y el control de granos de trigo preparados de igual modo pero sin inocular (*GgWG*, *GsWG*, *GfWG* y *WF*, capítulo VI y VII). El contenido nutricional proximal y mineral de estas muestras se trata en el **Apéndice 3**.

2. Materiales y métodos

2.1. Procedimiento general para la producción de *spawn*

El cultivo de *spawn* comprende operaciones simples como imbibición de granos en una solución de sales de calcio, esterilización, inoculación con el micelio de la cepa fúngica de elección y cultivo en condiciones controladas. El cultivo en botellas es una técnica que ha dado buenos resultados y posee ventajas especialmente en el momento de la esterilización. La metodología para el cultivo de *spawn* en botellas, empleada en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (LBHCyM) del CERZOS (Curvetto *et al.*, 2004), consiste en colocar 250 g de granos de trigo (*Triticum aestivum* o *T. durum*) entero en botellas de vidrio de 1 litro, a las cuales luego se adiciona una solución conteniendo 3,53 g de CO_3Ca (0,8 % p/p) y 6,56 g de SO_4Ca (1,5 % p/p), en 190 ml de agua; se mezclan y se dejan en reposo por 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente las botellas se tapan con tapón de algodón y se autoclavan durante 90 minutos a 121°C. El contenido de granos en peso fresco por botella resulta ser 470 g con una humedad final entre 42-44% y un pH ~6. Para la primer generación o *spawn* maestro, los granos en cada botella se inoculan con 4 cuñas de micelio (¼ de caja de Petri) cultivado en medio MYPA modificado, usando una técnica aséptica en un gabinete de flujo laminar horizontal de aire estéril. Luego, para obtener dos generaciones más de *spawn*, se emplea una proporción de inoculación del 10% usando el *spawn* maestro en activo crecimiento (Stamets y Chilton, 1983).

2.2. Efecto de la temperatura en la colonización de *spawn*

El efecto de la temperatura (20°C y 24°C) en el crecimiento del *spawn* de *G. gargal* y *G. sordulenta*, se evaluó utilizando 10 botellas (u.e.) por especie y condición térmica. Las botellas en cultivo fueron inspeccionadas a los días 20, 25 y 30 del cultivo, y se registraron las unidades experimentales que presentaban una completa colonización.

2.3. Test de crecimiento lineal (TCL) para la evaluación del crecimiento de micelio en diferentes granos

Este bioensayo utiliza 10 g de sustratos previamente esterilizados y colocados en un tubo de vidrio de (16 mm diámetro y 20 cm de largo) a los cuales se les inocula, por uno de sus extremos, un disco de micelio joven crecido en agar nutritivo. Las formulaciones (**Tabla 15**) se prepararon con trigo, trigo suplementado con mijo, girasol, maíz y la combinación maíz: girasol, en una mezcla acuosa de CO_3Ca y SO_4Ca , resultando un pH promedio de 6,5 o bien con otra mezcla acuosa conteniendo yeso pero sin carbonato de calcio y llevado a pH 5 con ácido sulfúrico, previo al autoclavado.

En esta experiencia, el cultivo se realizó durante 30 días, en oscuridad continua, a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y con humedad ambiental cercana a 90%. Los tubos se colocaron en una cámara de crecimiento (CCC-20) y periódicamente se rotaron de posición.

Al final del cultivo se registró la longitud de la colonia de micelio y se calculó la velocidad de colonización en mg de peso seco del sustrato por día (mg PSS/día). Se usó esta forma de expresión ya

que permite la comparación de sustratos con diferente grado de empaquetamiento y/o densidad. Según la intensidad del crecimiento del micelio *i.e.* su densidad aparente, cada u.e. fue evaluada en categorías (0/+++).

2.4. Velocidad de colonización en botellas

Una vez realizado el TCL se hizo un cultivo en botellas con las mismas formulaciones de sustratos. Los sustratos se prepararon como se explica en el punto **2.1** para los granos de trigo y el cultivo se hizo en oscuridad, a 24°C. Los ingredientes de los sustratos y cantidades de los materiales (por botella) se indican en la **Tabla 16**, en este caso también se realizaron cultivos en ambos grupos de pHs: ~6,5 y ~5,3. El ensayo fue realizado con 8 botellas para cada fórmula y cada especie en estudio. A los días 20, 25 y 30 del cultivo se inspeccionó el contenido de las botellas y se registraron las que manifestaban una completa colonización. Finalmente, se extrajo el *spawn*, se desagregó y se contó el número de agregados de granos colonizados por gramo de materia fresca. Este procedimiento se aplica de acuerdo a la velocidad de colonización de la cepa, por ejemplo en cultivos veloces como *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* y *Grifola frondosa* los granos de trigo deben ser sacudidos cada 3-4 días.

2.5. Análisis de los datos

La comparación del número de botellas completamente colonizadas de los ensayos **2.2** y **2.4** se realizó empleando el test exacto de Fisher según Lowry (2011); se consideraron significativos los valores menores a: $\alpha=0,1$. El análisis de la masa de sustrato colonizada por día (**2.3**) se hizo con el ANOVA simple y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$) utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Tabla 15. Composición de las fórmulas de sustrato para obtención de *spawn* y valores de los parámetros usados para evaluar el crecimiento de micelio de *Grifola garga* y *G.sordulenta* mediante el TCL. Se muestran los valores de pH para cada fórmula.

pH ~6,5				
Componentes de la fórmula	Proporción en el sustrato (%)	pH ⁽¹⁾	HR ⁽¹⁾	Densidad g/ml
Agua	42,2			
SO ₄ Ca	1,5			
CO ₃ Ca	0,8			
T1 trigo	55,5	6,8	43,2	0,60
T2 trigo:mijo (8:2)	“	6,6	44,7	0,65
T3 maíz	“	6,2	43,4	0,40
T4 girasol	“	6,3	38,8	0,55
T5 maíz:girasol (1:1)	“	6,2	40,3	0,45
pH ~5,3				
Componentes de la fórmula	Proporción en el sustrato (%)	pH ⁽¹⁾	HR ⁽¹⁾	Densidad g/ml
Agua	42,8			
SO ₄ Ca	1,5			
SO ₄ H ₂ 98%	0,02			
T6 trigo	56,3	5,5	42,2	0,60
T7 trigo:mijo (8:2)	“	5,6	43,0	0,65
T8 maíz	“	5,2	41,0	0,40
T9 girasol	“	5,1	37,1	0,55
T10 maíz:girasol (1:1)	“	5,2	40,7	0,45

(1) El pH y la HR fueron medidos luego del autoclavado.

Tabla 16. Composición de las fórmulas de sustrato para la obtención de *spawn* preparado en botellas de 1 litro.

pH ~6,5			pH ~5,3		
Componentes de la fórmula	Peso por botella (g)	Proporción en sustrato (%)	Componentes de la fórmula	Peso por botella (g)	Proporción en sustrato (%)
Agua	190	42,2	Agua	190	42,8
SO ₄ Ca	6,56	1,5	SO ₄ Ca	6,56	1,5
CO ₃ Ca	3,53	0,8	SO ₄ H ₂ 98%	0,09	0,02
Trigo	250	55,5	Trigo	250	56,3
Trigo:mijo (8:2)	“	“	Trigo:mijo (8:2)	“	“
Maíz	“	“	Maíz	“	“
Girasol	“	“	Girasol	“	“
Maíz:girasol (1:1)	“	“	Maíz:girasol (1:1)	“	“

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento

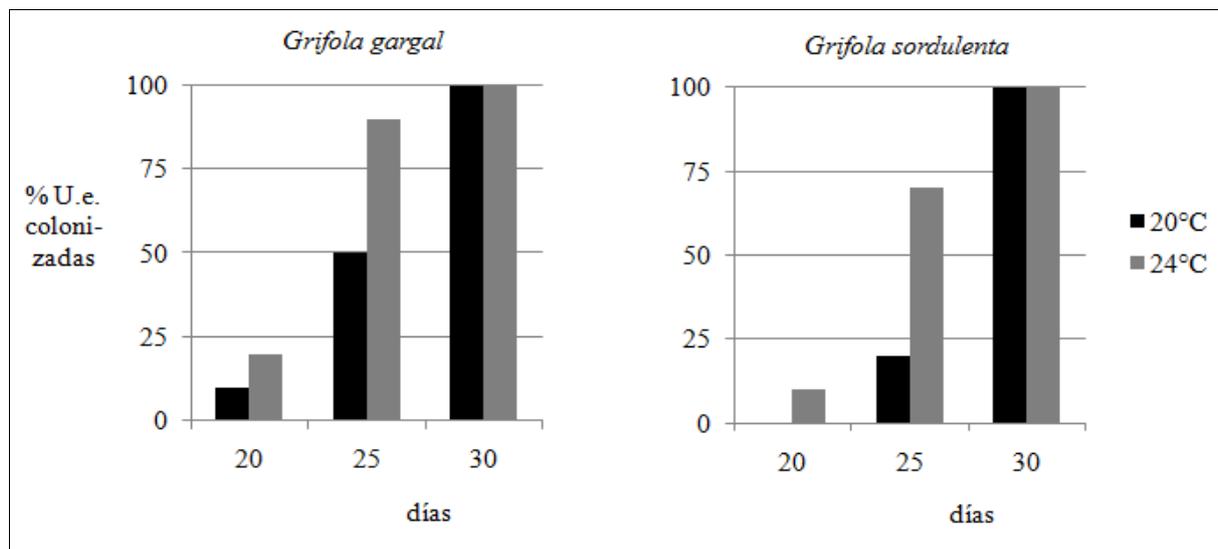
Los resultados del cultivo a 20 y 24°C de *G. gargal* y *G. sordulenta* en granos de trigo se muestran en la **Figura 56**. En el día 30 de cultivo, ambas especies cultivadas a 20°C mostraron una completa colonización de los granos en la mayoría de las u.e., mientras que a 24°C se observó una reducción de cinco días en el número de u.e. que completaban la colonización de los granos ($p < 0,07$). En ensayos preliminares con este sustrato se halló que las temperaturas superiores a 28°C inhiben el crecimiento en ambas especies (resultados no mostrados).

En este punto es interesante mencionar que es conocido que la temperatura, además de la velocidad de las reacciones químicas, regula la producción de enzimas ligninolíticas en los hongos (Dritsa y Rigas, 2006). Dicho de otra manera, la interacción con los nutrientes presentes en el medio a diferentes temperaturas, es determinante para la producción de ciertas enzimas cuyo resultado será una particular velocidad de crecimiento del micelio.

En esta tesis se observó que en los medios nutritivos en agar, *G. gargal* y *G. sordulenta* crecían adecuadamente a 18°C, mientras que a 24°C, *G. gargal* no crece y *G. sordulenta* disminuye significativamente su crecimiento (ver en capítulo II.A el ítem 3.1.). En cultivo en agar, otras cepas de *G. gargal* (provenientes de Chile) no manifiestan diferencias de velocidad de crecimiento entre 20 y 25°C (Harada, 2007). Por otra parte, cuando se cultivan en medios líquidos, ambas especies obtienen los mejores valores de crecimiento a 20°C (ver en capítulo III.B el ítem 3.).

En resumen, la temperatura óptima de crecimiento para ambas especies estuvo en el rango de 18-20°C cuando la provisión de nutrientes fue en sus formas simples y solubilizadas (medio de agar y líquido). En cambio, cuando el micelio debió degradar moléculas complejas como almidón y otros carbohidratos, como es el caso del cultivo en granos de cereales, la velocidad de crecimiento fue mejor a 24°C. Valores similares de temperatura de crecimiento fueron determinados para *G. frondosa* (25°C) en condiciones similares de cultivo (Montoya- Barreto *et al.*, 2008).

Figura 56. Porcentaje unidades experimentales (granos de trigo en botellas) que resultaron completamente colonizadas a distintos tiempos (20, 25 y 30 días) a partir de la inoculación con *spawn* de *Grifola gargar* y *G. sordulenta*. Los cultivos se hicieron a 20°C y 24°C.



3.2. Ensayo de velocidad de crecimiento lineal del micelio

Los resultados del TCL se presentan en la **Tabla 17** y en la **Figura 57** se muestran fotografías de u.e. representativas de los diferentes tratamientos. Los tratamientos cuyos pHs se ubicaban en el rango de pH 6,2-6,8 fueron agrupados como “pH ~6,5”, y aquellos en el rango de pH 5,1-5,6 como “pH ~5,3”.

En el caso de *G. gargar* se hallaron diferencias significativas entre los diferentes sustratos en la velocidad de colonización (mg PSS/día) ($p < 0,05$). Las formulaciones de sustrato donde el crecimiento fue más veloz (135-160 mg PSS/día) y con mayor densidad aparente (+++) fueron: trigo (en ambos pHs), trigo: mijo (pH ~6,5), maíz: girasol (ambos pHs), maíz (pH ~5,3).

Grifola sordulenta por su parte, también tuvo diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de sustrato ($p < 0,05$) y, en general, mostró menores velocidades de colonización en comparación con *G. gargar*. En esta especie el sustrato conteniendo trigo (a pH ~5,3) produjo el mayor valor promedio en la velocidad de colonización (104 mg PSS/día) y además el micelio de las u.e. correspondientes presentó también una elevada densidad aparente.

De manera global, la fórmula de sustrato a base de trigo (a pH ~5,3) produjo la mayor velocidad de colonización de micelio en ambas especies, con una alta densidad aparente y eventualmente sería una fórmula de elección para su cultivo en masa. Los granos de trigo se emplean habitualmente como base en la preparación de blanco de hongo (Akavia *et al.*, 2009). En el LBHCyM-CERZOS han sido cultivadas con esta misma metodología otras especies como *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus* spp., *Agaricus blazei*, *Hericium erinaceus* (González- Matute *et al.*, 2002; Curvetto *et al.*, 2004; González- Matute *et al.*, 2010; Figlas *et al.*, 2007), en las cuales se coloniza completamente una botella a los 10, 15, 20 y 20 días, respectivamente. En el caso de *Grifola frondosa*, la colonización completa de una botella de *spawn* a base de granos de trigo tarda 25-30 días y a base de maíz y girasol tarda 25 días

(resultados no publicados).

El mijo también se emplea como base en la preparación de *spawn* para hongos (Akavia *et al.*, 2009) y/o como suplemento debido a su alto contenido de proteínas (17% sobre base seca) y una ventaja adicional es la alta relación superficie volumen que mejora la dispersión del micelio en el sustrato a colonizar (Stamets, 1993). Shen (2001) señala que en el cultivo de *G. frondosa*, la combinación de mijo con centeno y salvado de trigo en el sustrato mejora la colonización del mismo.

En este ensayo la inclusión de mijo en el sustrato a base de trigo (20 y 80% respectivamente), no mejoró la velocidad de colonización en relación al sustrato conteniendo únicamente trigo en ninguna de las especies y bajo ninguna de las condiciones de pH. Aún más, con *G. gargal* cultivado en la misma fórmula de sustrato, a pH ~5,3, se observó una disminución en la densidad aparente de crecimiento micelial (++ vs. +++ en trigo a pH ~5,3).

En ambas especies los valores promedios de velocidad de colonización en sustrato para *spawn* a base de maíz fueron comparables a los correspondientes para el caso del trigo. Este grano fue colonizado con alta densidad aparente sólo por *G. gargal* y a pH ~5,3. Montoya-Barreto *et al.* (2008) encontraron que el empleo de granos de maíz fue el más exitoso entre los diferentes granos que probaron para la obtención de *spawn* para el cultivo de *G. frondosa*. Probablemente este resultado se debió a la forma de preparar el *spawn*, en este caso, sin agitación periódica después de la inoculación inicial (comunicación personal).

Tabla 17. TCL con *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta*. Velocidad de colonización en sustratos a base de granos de trigo, trigo suplementado con 20% de mijo, girasol, maíz, y maíz: girasol 1:1, a diferentes pH. Los valores de velocidad de colonización (mg de sustrato seco/día) calculados al día 30 se analizaron con Anova simple y las medias se diferenciaron con el test de Tukey ($\alpha=0,05$). También se calificó de manera subjetiva el crecimiento micelial aparente de 0 a +++.

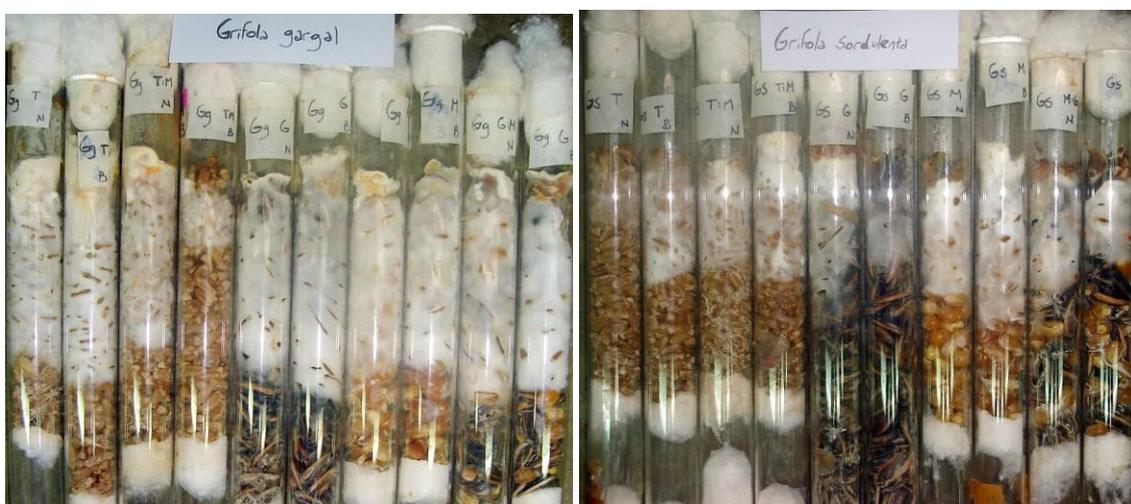
Sustratos por especie fúngica	pH ~6,5		pH ~5,3	
	Velocidad de colonización (mg PSS/día)	Crecimiento micelial aparente	Velocidad de colonización (mg PSS/día)	Crecimiento micelial aparente
<i>Grifola gargal</i>				
Trigo	159,6 a	+++	161,0 a	+++
Trigo:mijo (8:2)	140,8 ab	+++	117,3 bcd	++
Girasol	99,3 d	+++	111,1 cd	+++
Maíz	124,9 bcd	++	139,3 ab	+++
Maíz:girasol (1:1)	140,6 ab	+++	135,3 abc	+++
<i>Grifola sordulenta</i>				
Trigo	105,3 A	++	104,0 A	+++
Trigo:mijo (8:2)	106,7 A	++	94,8 AB	+++
Girasol	80,6 B	+++	78,5 B	++
Maíz	88,9 AB	++	105,7 A	++
Maíz:girasol (1:1)	77,7 B	++	75,3 B	+++

En el TCL, la semilla de girasol no produjo una alta velocidad de colonización por el micelio de ninguna de las dos especies. Sin embargo el girasol pudo ser colonizado con una alta densidad aparente a ambos pHs por micelio de *G. gargal* y a pH ~6,5 por *G. sordulenta*. Asimismo, se pudo observar una alta densidad de crecimiento micelial en el TCL para *G. gargal* a ambos pHs y para *G. sordulenta* a pH ~5,3 con una proporción 1:1 de estos granos en el sustrato. (Tabla 17 y Figura 57).

Stamets (1993) destaca que en la determinación de la velocidad final del ciclo de cultivo, además de la cepa, condiciones de cultivo y proporción de inoculación, también es importante la combinación de *spawn*/calidad del sustrato. Es así que el uso de un *spawn* a base de girasol, o bien girasol/ maíz, como fue mostrado aquí con aceptable velocidad de colonización de sustrato, podría favorecer el cultivo en un sustrato a base de cáscara de girasol.

Estos sustratos conteniendo granos de girasol y/o maíz, se caracterizaron por su bajo valor de densidad específica (el volumen de estos granos por unidad de masa en relación al del trigo es un 75% mayor).

Figura 57. Imágenes del TCL de *Grifola gargal* y de *G. sordulenta*, a los 30 días de cultivo. Las placas fotográficas muestran unidades experimentales representativas de la colonización de los diferentes sustratos contenidos en los tubos de prueba. Las letras en los rótulos de los tubos de vidrio: “T”, “TM”, “G”, “M” y “GM”, representan los granos de trigo, trigo: mijo, girasol, maíz y maíz: girasol, respectivamente. Las letras “N” y “B” representan los tratamientos con pH ~6,5 y ~5,3 respectivamente (ver materiales y métodos).



3.3. Obtención del *spawn* en botellas

Se cultivaron *G. gargal* y *G. sordulenta* empleando la técnica habitual de preparación de *spawn* empleando botellas de vidrio de 1 litro. Se evaluó el tiempo de colonización (días) de los diferentes sustratos formulados anteriormente para el TCL. En todos los sustratos (n=8 por tratamiento) ensayados para ambas especies la colonización se completó al día 30, a excepción de *G. gargal* en los sustratos conteniendo trigo, trigo: mijo a (bajo ambos pH), que estuvieron completamente colonizados

al día 25, sin que esto represente diferencias significativas con los demás tratamientos en las comparaciones de a pares realizadas con el test de Fisher ($\alpha=0,10$). En todos los casos se observó una densidad de crecimiento micelial aparente similar; compárese **Figuras 58A-C** para *G. gargal* y **Figuras 58E y F** para *G. sordulenta*.

El pH no influyó en el tiempo de colonización del sustrato. Para encontrar efectos de este tipo habría que evaluar un rango más amplio de pH.

En todos los sustratos se detectó la presencia del aroma almendrado, entre los días 25 y 30, período cuando se detecta el mismo aún sin quitar el tapón de algodón; ello a su vez puede reflejar la calidad del *spawn*, ya que no es perceptible este aroma en un sustrato contaminado o sin una colonización exitosa.

En la **Tabla 18** se muestran los valores promedio del número de granos colonizados por gramo fresco de *spawn*. La presencia de mijo con granos de trigo (en una relación 2:8) elevó en un 33% los granos colonizados respecto a las halladas en *spawn* de granos de trigo. Y por otra parte en el caso de los granos de maíz y de girasol hubo tres veces menos granos colonizados respecto al *spawn* de trigo. Sólo el *spawn* de trigo sería más ventajoso en términos de una producción en cultivo industrial, ya que permitiría acortar el ciclo de producción al incrementar la velocidad de colonización del sustrato sembrado.

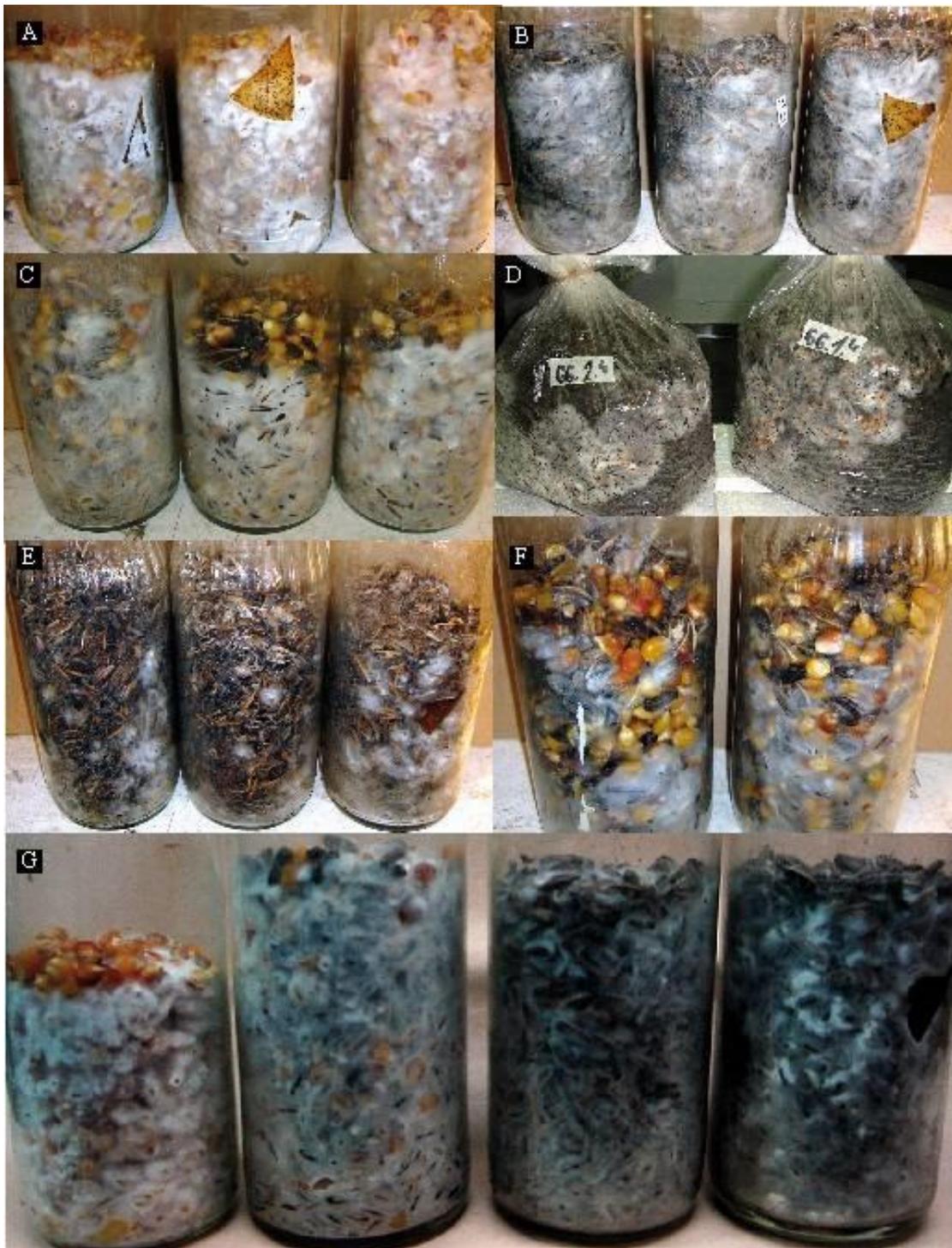
Tabla 18. Valores promedio de los granos colonizados por gramo fresco de *spawn* de *Grifola gargal* o de *G. sordulenta*. Los diferentes granos para *spawn* se cultivaron en botellas a 24°C, en oscuridad y durante 30 días. Luego de la incubación, el *spawn* se removió de las botellas y se desagregó manualmente.

Componente inicial del <i>spawn</i>	Granos/ g de <i>spawn</i>
Trigo	18
Trigo:mijo (8:2)	27
Maíz	5
Girasol	8
Maíz:girasol (1:1)	7

4. Conclusiones

Las mejores condiciones del cultivo de micelio de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en granos para la obtención de *spawn* es a 24°C, y en oscuridad con agitación de los granos cada 6-9 días. Considerando la velocidad de colonización, densidad aparente y número de unidades de colonización por gramo se recomienda emplear granos de trigo solos.

Figura 58. Las placas fotográficas muestran los sustratos colonizados que se obtuvieron en la preparación del *spawn* de *Grifola* spp. *G. gargar*: (A), *spawn* a base de granos de maíz (a pH ~5,3 y ~6,5); (B) *spawn* a base de semillas de girasol (a pH ~5,3 y ~6,5), (C) *spawn* a base de granos de maíz:girasol (1:1) (a pH ~5,3 y ~6,5); (D) dos semanas post-inoculación de sustrato con *spawn* de trigo de *G. gargar*; *G. sordulenta*: (E) *spawn* a base de semillas de girasol (a pH ~5,3 y ~6,5); y (F) *spawn* a base de granos de maíz-trigo (a pH ~5,3 y ~6,5). En (G, de izquierda a derecha) se muestra como comparación el *spawn* de *G. frondosa* cultivado en maíz (pH ~6,5), maíz-girasol (1:1) (pH ~6,5) y girasol (a pH ~5,3 y ~6,5) después de tres semanas desde la inoculación.



Capítulo V

Cultivo en medio sólido sobre sustrato a base de cáscara de girasol

Fermentación de micelio en estado sólido

El estudio de las condiciones del hábitat donde estos hongos fructifican constituyó una aproximación útil para el ajuste de las condiciones artificiales para el estudio de su cultivo controlado en el laboratorio (ver capítulo I). En especial se tuvo en consideración lo observado en la colonia de *G. gargal* establecida en un roble pellín (*N. obliqua*) caído (ver en el capítulo I el ítem 3.) donde estacionalmente y por más de 20 años se venían generando fructificaciones. Esta colonia resulta muy llamativa dado que a pesar de tantos años, no se han encontrado fructificaciones en los árboles inmediatos a esta colonia, según informaron los conocedores del lugar y de este hongo. Por lo tanto es razonable argumentar sobre el hecho de que ciertos factores endógenos y aún exógenos del sitio podrían dificultar la dispersión de estas especies en su hábitat natural, lo cual también podría colocar una limitación en la domesticación de estas especies fúngicas en sustratos sintéticos.

Para eliminar experimentalmente parte de estas causas desconocidas por la cual no es frecuente el hallazgo de estas especies en la naturaleza, se eligió al cultivo axénico y en condiciones de asepsia controlada como modelo de cultivo, ya que de esta manera se evitaría la competencia por el sustrato con otros microorganismos, como sucede en los cultivos pasteurizados.

Se denomina cultivo axénico, también conocido como “cultivo puro”, al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Éstos se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo poseen la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con seguridad.

Cáscara de girasol como sustrato

Dentro de la variedad de desechos agroindustriales que se pueden emplear como sustrato para el cultivo de hongos se trabajó con cáscara de girasol. En la industria oleaginosa de Argentina, la extracción de aceite de girasol (*Helianthus annuus*) se realiza sobre las semillas sin cáscara, lo que produce gran cantidad de cáscara de girasol, que es un desecho lignocelulósico que se quema o entierra (Curvetto *et al.*, 2004). La cáscara de semillas de girasol constituyen cerca del 18-20 % del total de la semilla procesada (Helgeson *et al.*, 1978). Sobre la base de peso seco, la cáscara de girasol contiene alrededor de 5% de lípidos, de los cuales un 3 % es cera compuesta por ácidos grasos de cadena larga y alcoholes; además contiene un 4 % de proteínas; 50% de carbohidratos totales, y un alto contenido de cenizas que puede llegar hasta el 49% (Cancalon, 1971; Torrea, 1998). Asimismo, contiene azúcares reducidos que son el segundo mayor constituyente de la cáscara y equivalen aproximadamente al 26% del peso total (Cancalon, 1971). En el material almacenado a granel analizado en el LBHCyM-CERZOS, la cáscara de girasol contiene alrededor de 11% de humedad, 45% de de carbono y entre 0,70 y 0,95% de nitrógeno.

Las cáscaras, tal como emergen de la industria aceitera poseen una forma de cuña y un tamaño de partícula promedio de 12 mm, que permite evitar un indeseable empaquetamiento cuando se la usa como sustrato para el cultivo de hongos. En efecto, debido a las características anteriores, este material abundante y de bajo costo ha sido utilizado en la elaboración de fórmulas de sustrato satisfactorias para el cultivo de los hongos de la pudrición blanca, como hongos del complejo *Pleurotus*, *Ganoderma lucidum*, *Hericiium erinaceus* (Curvetto *et al* 2002a; González- Matute *et al.*, 2002; Figlas *et al.*, 2007); así como también para hongos de la pudrición marrón como *Lentinus edodes* (Curvetto *et al.*, 2005). Incluso también se logró el cultivo de descomponedores secundarios como *Agaricus blazei* y *A. bisporus* usando la cáscara de girasol como parte del sustrato, ya sea compostado o bien sin compostar (González- Matute *et al.*, 2010).

Suplementos y aditivos

Es ampliamente conocido que en los sustratos basados en una fuente de lignocelulosa (cáscara de girasol, virutas de madera, etc.) es frecuentemente necesario incorporar suplementos y/o aditivos.

Los suplementos suministrarían nutrientes que están presentes en cantidades insuficientes y por lo tanto limitantes del crecimiento fúngico; ellos también pueden aumentar la velocidad de colonización actuando como cofactores enzimáticos que estimulan la producción de enzimas o su actividad (ver también en este capítulo la sección C).

El salvado de trigo es uno de los suplementos más comúnmente empleado en el cultivo de varias especies de hongos y en especial en el cultivo de *G. frondosa*, en unión a otros suplementos como el mijo y el centeno (Shen, 2001). De Souza-Silva *et al.* (2008) hallaron que el agregado de salvado a medio de cultivo líquido aumentaba la producción de enzimas lacasas, MnP y LiP cuando era incorporado al sustrato de *Ganoderma lucidum*. Incluso en este estudio se demuestra que induce un adelanto en la producción de enzimas que se expresaron en la tropofase cuando en general las enzimas ligninolíticas se expresan en la idiofase.

Entre los componentes más importantes del salvado de trigo se encuentran: hemicelulosas (30%), celulosa (10–15%), almidón (10–20%), proteínas (15–22%), lignina (4–8%) y otros componentes menores como cutina y lípidos (Locci *et al.*, 2008). Otros análisis revelan que contienen 17% de proteína, 5% de materia grasa, 10% de fibra y 6% de minerales entre otros componentes (Stamets, 1993). Es destacable su alto contenido de nitrógeno (especialmente de proteínas y aminoácidos) y el de hemicelulosas, ya que esta última fracción nutritiva es de importancia en el cultivo de algunas especies como *Pleurotus ostreatus* y *P. tuber-regium* (Kuforiji y Fasidi, 2009; Tsang *et al.*, 1987; Streeter *et al.* 1982).

Se conoce que el sustrato remanente del cultivo de hongos puede a su vez ser empleado como sustrato o suplemento de sustrato en el cultivo de otras especies fúngicas. Aunque se lo llama “sustrato gastado” porque contiene menor cantidad de carbohidratos, por otra parte posee nutrientes provenientes de restos del micelio, en especial polisacáridos, proteínas, otros metabolitos vegetales y fúngicos y factores de crecimiento (Li *et al.*, 2001). Por ello, los sustratos gastados también encuentran

aplicación en una amplia variedad de usos (Ribas *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2009); por ejemplo como enmienda orgánica en suelos hortícolas (Jordan *et al.* 2008) y también mezclado con tierra en la elaboración de sustrato para macetas de viveros (Rinker, 2002), entre otras aplicaciones.

Ensayos

A continuación se exponen los resultados del cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en test de crecimiento lineal para probar: sustratos a base de cáscara de girasol suplementados o no con salvado (sección **A**); sustratos formulados en base a este ensayo y suplementados con estimuladores enzimáticos; suplementos nutritivos o con un tratamiento de hidrólisis ácida del medio (sección **B**); finalmente se estudia el cultivo axénico en troncos sintéticos elaborados a base de cáscara de girasol (sección **C**).

A. Estudio de variables culturales para el crecimiento de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*, parte I

1. Introducción

En el entorno del hábitat de crecimiento de un organismo existe una multiplicidad de factores ambientales que hacen a que en condiciones naturales sólo se exprese una fracción de su potencial genómico. La domesticación de especies de hongos silvestres necesita reducir tales limitaciones a fin de realizar su cultivo de manera costo-eficiente.

Como se mencionara anteriormente en el capítulo IV, mediante la prueba de test de crecimiento lineal (TCL) de Duncan (1997) es posible estudiar de manera sistemática diferentes variables del cultivo como ser cepas, sustratos, y condiciones ambientales, para seleccionar las condiciones que permitan el mejor crecimiento en el estudio subsiguiente del cultivo en troncos sintéticos.

Con este bioensayo se calcula la velocidad de colonización y además también se posibilita la observación de otras características como ser la densidad de colonización del sustrato y la formación de agregados de micelio dentro del mismo. Por otra parte, cuando finaliza el período de crecimiento, el sustrato colonizado se puede analizar para la determinación de su contenido de fibras, proteínas y/o actividad de enzimas. Eventualmente el contraste entre el contenido en el sustrato original y el determinado luego de la colonización proveen información sobre el mecanismo de la biotransformación. El incremento en el contenido de proteínas es un indicador del contenido de micelio y el incremento en la actividad de enzimas, como las lacasas, es indicador de la actividad degradativa (Baldrian, 2005).

El objetivo de la experiencia que aquí se muestra fue probar mediante el TCL el efecto de diferentes fórmulas de sustratos sobre la velocidad de colonización micelial de *G. gargal* y *G. sordulenta*. Los sustratos fueron elaborados a base de cáscara de girasol (CG), sustrato biotransformado de cáscara de girasol remanente del cultivo de *P. ostreatus* durante 40-50 días de cultivo y luego de dos oleadas de fructificación (SG), solos o en combinación; la mitad de estos sustratos contenía salvado de trigo (ST).

Asimismo, se buscó estudiar estos sustratos sobre la base del tamaño de partícula, su densidad, humedad relativa, pH, contenido de proteínas y actividad de lacasas, a fin realizar correlaciones y obtener información que pudiera ser relevante a la caracterización físicoquímica de los sustratos. Finalmente se estudió la biodegradación del material lignocelulósico presente en los mismos.

1.1. Hipótesis

La degradación de la lignocelulosa de cáscara de girasol por *Grifola gargal* y *G. sordulenta* podría evaluarse mediante la velocidad de colonización, la densidad aparente, el contenido de proteínas, la actividad de lacasas y el análisis de fibras del sustrato.

1.2. Objetivos

Estudiar la velocidad de crecimiento y la densidad micelial aparente del cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en diferentes formulaciones evaluadas con el TCL. Determinar luego de la fase de crecimiento vegetativo el incremento de proteínas del sustrato, la presencia de actividad de lacasas y la degradación de los diferentes componentes del sustrato.

2. Materiales y métodos

2.1. Test de crecimiento lineal

Este bioensayo utiliza una pequeña biomasa de sustrato estéril (10 g, ver formulaciones en ítem 2.2. de esta sección) dispuesta en un tubo de vidrio (16 mm diámetro y 20 cm de largo) la cual, después de ser compactada dentro del tubo a una densidad adecuada, es inoculada por uno de sus extremos con un disco de micelio crecido sobre agar nutritivo. El micelio en crecimiento es visible a través de las paredes de vidrio y puede medirse la distancia del frente de crecimiento micelial, así como apreciar la densidad aparente de la colonización.

Los tubos tapados por sus extremos con algodón se esterilizaron a 121°C por 2 horas. Una vez enfriados se inoculó el sustrato en cada unidad experimental, accediendo por uno de los extremos, con un disco (16 mm) de agar con micelio en crecimiento activo. Se utilizó micelio de *G. gargal* (cepa A) y *G. sordulenta*, cultivado en medio nutritivo MYPA modificado, en cajas de Petri, a pH 4 (por la elaboración de los medios ver capítulo II.A). La incubación se hizo a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y oscuridad, en una cámara de cultivo CCC-20 (Lab. Electrónica, CCT-BB, CONICET) y con una humedad de 90%. Los tubos se dispusieron horizontalmente y se rotaron periódicamente.

A los 45 días de cultivo se midió la distancia recorrida por el micelio desde el extremo del inóculo hasta el extremo del micelio en crecimiento (promediando 4 mediciones diferentes alrededor del tubo). Con este dato y con la densidad del sustrato se calculó la biomasa de sustrato colonizado por día (mg PSS/día).

2.2. Formulaciones de sustrato

Se prepararon 20 formulaciones de sustratos a base de cáscara de girasol (CG), sustrato gastado de *P. ostreatus* (SG) y algunas de sus combinaciones, con o sin salvado de trigo (20%) (ST) como suplemento (**Tabla 19**). Los materiales de los sustratos a base de CG y SG se incorporaron enteros (12 mm \times 5 mm en promedio) o molidos (2 mm \times 1 mm en promedio), para esto último se usó un molinillo Butt modelo am-48 - 60177, Ionomex, Argentina. Después de determinar el contenido de humedad de los componentes del sustrato (10-12%), se procedió a preparar las distintas formulaciones de sustrato con agua (60%), SO_4Ca (2%) y CO_3Ca (0,5%). Se llenaron 10 tubos de vidrio por formulación (unidades experimentales) conteniendo cada uno 10 gramos de sustrato. La compactación del sustrato en los tubos se realizó ejerciendo una presión similar en ambos extremos. Esta operación terminó cuando el sustrato se empaquetaba adecuadamente y sin desagregarse. Luego, se obtuvo la

densidad del sustrato. Después de la esterilización se determinó la humedad relativa y se midió el pH del sustrato contenido en dos tubos correspondientes a cada tratamiento y se promediaron sus valores.

2.3. Contenido proteico y actividad de lacasas de los sustratos colonizados

La extracción de proteínas para la determinación del contenido proteico y de la actividad de lacasas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brum (2005), con algunas modificaciones. Cinco u.e. fueron elegidas al azar y de cada unidad experimental se tomaron 3 g de sustrato de la zona colonizada. Las muestras fueron extraídas con la ayuda de un mortero, empleando 10 ml de buffer fosfato diácido de potasio 0,05 M (pH 6,8) con 0,1% de Triton-X, durante 2 minutos. Seguidamente, los extractos se filtraron (Watman n°1) y se guardaron a 4°C hasta su uso, al día siguiente.

2.3.1. Determinación del contenido de proteínas

Las proteínas se determinaron utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976). A 50 mg de Coomassie Brilliant Blue G[®] (Sigma #B0770) se le agregó 25 ml etanol 96°, 50 ml ácido fosfórico 80%, y agua en c.s.p. 500 ml. Sobre alícuotas (200 µl) del extracto proteico se agregó 2 ml de reactivo de Bradford y rápidamente se mezcló en vórtex; luego de 5 minutos se registró la absorbancia a 595 nm usando un espectrofotómetro *1600 Plus Metrolab*[®]. Se construyó una curva de calibrado utilizando como estándar a la albúmina sérica de bovino (2,5 -10 µg/ml).

Se determinó el contenido de proteína al sustrato correspondiente a 5 u.e. por tratamiento (la medición de cada unidad se repitió 3 veces y los valores fueron promediados). Los valores se expresaron en microgramos de proteína por gramo de sustrato seco (µg /g PSS). El contenido inicial (basal) se midió en sustratos sin colonizar después de su esterilización en autoclave.

2.3.2. Determinación de la actividad de lacasa

Alícuotas de 500 µl del extracto proteico se mezclaron con 500 µl de una solución tampón de acetato de sodio 0,1M (pH 5) y 25 µl de una solución metanólica saturada de siringaldazina 8,8 mM (Sigma #S7896) (Brum, 2005). Seguidamente se agitó vigorosamente y a los 60 segundos se registró la absorbancia a 525 nm (coeficiente de extinción molar de la siringaldazina a 525 nm: 65000 M⁻¹ cm⁻¹). La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1 mmol de sustrato en un minuto. Los valores finales se expresaron como unidades enzimáticas sobre la base de peso seco de sustrato (U/g PSS). Se analizó el sustrato correspondiente a 5 u.e. por tratamiento, y cada valor fue el resultado de promediar 3 determinaciones distintas realizadas sobre el sustrato de la misma u.e. La actividad inicial (basal) fue medida en sustratos sin colonizar posterior al autoclavado.

2.4. Estudio de la degradación de los componentes del sustrato

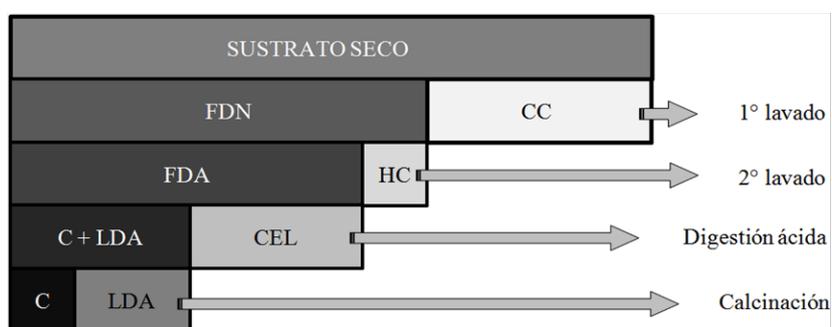
Los componentes del sustrato digeridos fueron evaluados con la técnica de análisis de contenido de fibras según Van Soest *et al.* (1991) usando un equipo ANKOM 220 Fiber Analyzer. Con los datos obtenidos se calcularon los valores correspondientes -previos y posteriores a la corrida de micelio- al

contenido celular y a los contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina, materia orgánica y cenizas. En la **Figura 59** se muestra un esquema ilustrativo que representa los componentes que fueron determinados con este análisis, su orden de determinación y los pasos operativos llevados a cabo.

Se realizó una determinación de cada parámetro en una muestra obtenida con alícuotas de sustrato correspondiente al sector colonizado, de 3 u.e. tomadas al azar. A los fines comparativos, se consideró suficiente la determinación de una muestra única por tratamiento.

El material de las muestras fue secado en estufa a 50°C, 48 h, homogenizado y molido (1 mm) en molinillo Butt. Luego, cada muestra (0,5 g) se colocó en sobres de *nylon* estandarizados (tipo F57) para el analizador de fibras.

Figura 59. Diagrama del análisis de fibra. FDN: fibra detergente neutro, CC: contenido celular, FDA: fibra detergente ácido, HC: hemicelulosa, C: cenizas, LDA: lignina detergente ácido, CEL: celulosa.



2.4.1. Método para determinación de materia seca

Se determinó la pérdida de humedad después de secar la muestra en estufa hasta peso constante. Brevemente, los crisoles se secaron en estufa a 100°C por 15 min, se enfriaron en desecador, se pesaron y se registraron los pesos. Luego se agregó 1 g de cada muestra y se registraron los pesos nuevamente. Se secaron en estufa a 105°C durante 48 h, se enfriaron en desecador, se pesaron y se registraron los pesos. La ecuación para la determinación de la materia seca fue:

$$MS (\%) = [(\text{peso crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso crisol}) / (\text{peso muestra húmeda})] \times 100.$$

2.4.2. Determinación de fibra detergente neutro

Este análisis permite determinar el contenido de pared celular de los vegetales. Para ello, las bolsas filtro se pesaron y se registró el peso (W1). Luego, se pesó la muestra seca, molida dentro de la bolsa filtro (W2). A su vez, se pesó una bolsa blanco que se incluyó en la digestión para determinar la corrección debido a la bolsa (C1). Se sellaron las bolsas a 0,5 cm del borde abierto (ATW Manufacturing CO. INC. Model ATWH 200-220V) y el contenido de las muestras dentro de las bolsas se mezcló por agitación. Posteriormente, se colocó hasta un máximo de 24 bolsas en el tanque del aparato de digestión. Se agregaron 2 litros de solución detergente neutro (30,0 g de lauril sulfato de sodio; 18,6 g de fosfato dibásico de sodio anhidro; y 10,0 ml de trietilenglicol, en 1 litro de agua destilada, pH entre 6,9 y 7,1) dentro del contenedor del ANKOM Fiber Analyzer y se agregaron 4 ml de α -amilasa (α -amilasa bacteriana termoestable: actividad = 17.400 *Liquefon Units/ml*).

Después de verificar que el sostenedor de bolsas operara con agitación de manera adecuada, se encendió el equipo con el temporizador en 75 minutos y se cerró la tapa. Una vez apagado, se abrió la válvula de drenaje y antes de abrir la tapa del tanque se permitió que saliera la solución caliente. Luego, se abrió la tapa, se agregaron 2 litros de agua caliente (90-100°C), se volvió a cerrar la tapa y a encender la agitación para permitir el enjuague por 10 minutos. Se retiró el agua y se repitió la operación dos veces. Finalizado el enjuague, se removió el sostenedor de bolsas, se retiraron las mismas, y se enjuagaron en acetona. Se permitió que se secaran a temperatura ambiente y posteriormente se llevaron a estufa a 95°C durante 24 h, se enfriaron a temperatura ambiente y se pesaron (W3).

La ecuación usada para la obtención del porcentaje de fibra detergente neutra (FDN), sobre la base de peso seco, fue:

$$\text{FDN (\%)} = \{[W3 - (W1 \times C1)] / (W2 \times MS)\} \times 100.$$

Donde: W1 = peso bolsa; W2 = peso muestra; W3 = peso después del proceso de extracción; C1 = corrección con la bolsa blanco (peso final de secado en horno/peso original de bolsa blanco); MS = materia seca.

2.4.3. Determinación del contenido celular

Los nutrientes más rápidamente utilizables están encerrados por la pared celular (FDN) y se pueden agrupar colectivamente con la denominación de contenido celular (CC), el cual incluye proteínas, carbohidratos solubles, minerales solubles y lípidos. Un alto CC es un índice de alto valor nutritivo. El CC se determina como: $\text{CC (\%)} = 100 - \% \text{ FDN}$.

2.4.4. Método para determinar fibra detergente ácido

Este es un método rápido para determinar la lignocelulosa. La diferencia entre FDN y fibra detergente ácido (FDA) es una estimación de la hemicelulosa, si bien esta diferencia incluye algo de proteína unida a la pared celular. Para determinar el contenido de FDA se empleó el mismo equipo y preparación de muestras que para FDN reemplazando la fórmula del detergente neutro por 2 litros de la fórmula del detergente ácido (20 g bromuro de cetil trimetil amonio en 1 litro de SO_4H_2 1 N previamente titulado) y siguiendo los mismos procedimientos sin el agregado de alfa amilasa. El peso (W3) fue introducido en la ecuación usada para la obtención del porcentaje de FDA (sobre la base de peso seco):

$$\text{FDA (\%)} = \{[W3 - (W1 \times C1)] / (W2 \times MS)\} \times 100.$$

Donde: W1 = peso bolsa; W2 = peso muestra; W3 = peso después del proceso de extracción; C1 = corrección con la bolsa blanco (peso final de secado en horno/peso original de bolsa blanco); MS = materia seca.

2.4.5. Determinación de lignina detergente ácido y del contenido de cenizas

Después de realizar las determinaciones de FDA, se colocaron las bolsas-muestras secas y a

temperatura ambiente en un recipiente de 3 litros y se agregaron 250 ml de SO_4H_2 72 % hasta cubrir las bolsas. Estas se agitaron al comienzo y cada 30 minutos subiendo y bajando el recipiente de 2 litros unas 30 veces. Después de 3 horas, se retiraron las muestras del SO_4H_2 y se enjuagaron en agua caliente (90-100°C) para remover el ácido. El enjuague se repitió hasta que el pH resultó neutro. Las bolsas se secaron en estufa a 105°C por 4 h, se removieron y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, para luego registrar el peso (W3). Posteriormente, se procedió a determinar el contenido de cenizas. Las bolsas enteras se incineraron en crisoles, previamente pesados, a 525°C por 3 h; luego se permitió que se enfriaran y se calculó la pérdida de peso (W4). Se calculó la corrección para cenizas con la bolsa blanco (C1) usando la pérdida de peso después de la ignición de una bolsa blanco secuencialmente corrida a través de los pasos para FDA y lignina.

La ecuación usada para la obtención del porcentaje de lignina detergente ácido (LDA), sobre la base de peso seco y corregido por el contenido de cenizas, fue:

$$\text{LDA (\%)} = \{[\text{W3} - (\text{W1} \times \text{C1}) - (\text{W4} - \text{C2})] / (\text{W2} \times \text{MS})\} \times 100.$$

Siendo W1 = peso bolsa; W2 = peso muestra; W3 = peso después del proceso de extracción; W4 = peso de materia orgánica (pérdida de peso en la ignición de la bolsa y el residuo de fibra); C1 = corrección de la bolsa blanco (peso final de secado en horno/peso original de bolsa blanco); C2 = cenizas corregidas bolsa blanco (pérdida de peso en la ignición de la bolsa blanco); MS = materia seca.

2.4.6. Método para determinación de materia orgánica

Para su cálculo en base a materia seca, se emplearon los valores de materia seca y cenizas según la fórmula: $\text{MO (\%)} = \% \text{MS} - \% \text{cenizas}$.

2.5. Análisis de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010). La comprobación de supuestos de normalidad y la homocedasticidad de los datos se evaluó con el test Shapiro Wilks modificado y el test de Levene, respectivamente.

La velocidad de colonización se analizó con un Anova simple y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$), en estos casos fue necesario realizar la transformación con la aplicación del logaritmo natural de los valores de peso seco (mg) de sustrato colonizados por día.

El contenido proteico y la actividad de lacasas en los sustratos sin colonizar y la variación respectiva luego de la colonización por micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta*, se analizaron con el test no paramétrico de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

Se realizaron análisis de regresión lineal simple y de correlación ($\alpha=0,05$) con las variables humedad relativa, pH, contenido de proteínas, actividad de lacasas, velocidad de colonización y densidad del sustrato según se presenta en la sección siguiente.

3. Resultados y discusión

3.1. Propiedades del sustrato previo a la colonización

Los valores promedio iniciales de la densidad del sustrato, el pH, la humedad relativa del sustrato fresco, la concentración de proteínas y la actividad de lacasas se muestran en la **Tabla 19**. La proporción relativa de los componentes del sustrato, *i.e.*: FDN, FDA, MO, cenizas, contenido celular, hemicelulosas y lignina, se muestran en la **Tabla 20**.

3.1.1. Densidad del sustrato

La densidad del sustrato sugiere el grado de empaquetamiento de los materiales que lo constituyen, y es un factor muy importante para el crecimiento de micelio en troncos sintéticos. En la cáscara de girasol a granel la densidad está en el rango de 0,20 a 0,23 g/ml (*c.a.* 11 % humedad); como componente del sustrato para el cultivo de otros hongos empleó en una densidad de ca. 0,50 g/ml (Curvetto *et al.*, 2005). En los sustratos aquí formulados con materiales sin moler (enteros) se obtuvieron valores de densidad de 0,45 g/ml mientras que en aquellos conformados con material molido (se considera al salvado también) se obtuvieron valores 22-37% más altos: entre 0,55 y 0,62 g/ml.

3.1.2. Humedad relativa y pH

Durante la imbibición del sustrato se ajustó la humedad a un nivel de 65%, y luego del autoclavado la misma varió en un rango del 10% (63 a 70 % HR). En cuanto al pH, mediante el agregado de sales de calcio se obtuvo un pH levemente ácido, con valores medidos entre 5,7 y 6,2.

Si bien estos rangos de humedad y pH fueron pequeños, aún podrían afectar la colonización del sustrato por ejemplo mediante la regulación de la actividad de enzimas ligninolíticas y la solubilización de nutrientes (Sharma y Arora, 2010; Wood, 1980; Kok *et al.*, 1992).

Para estudiar si existían relaciones entre la solubilización de proteínas y la actividad de lacasas en función de estos estrechos rangos de humedad y pH se realizaron análisis de regresión, que solo resultó ser significativo entre pH y solubilización de proteínas, aunque con un coeficiente de regresión muy bajo ($p > 0,05$, $R^2 = 0,20$). Por lo tanto se asumió que la humedad relativa y el pH en los rangos obtenidos luego de la imbibición y el autoclavado no serían factores que *per se* introdujeran variaciones en la solubilidad de proteínas y/o en la actividad de lacasas.

3.1.3. Contenido de proteínas y actividad de lacasas en los sustratos iniciales

Los sustratos con mayor contenido de proteínas solubles se ubicaron en el rango de 7,6-5,2 µg/g PSS; aquellos con contenidos medios obtuvieron valores de 3,6-2,2 µg/g PSS y los de menor contenido 1,8-0,8 µg/g PSS (**Tabla 19**). Los valores más altos en el contenido de proteínas solubles se hallaron en aquellos sustratos de SG suplementados con ST (T10 T11 T18), seguido por los sustratos formulados solamente con SG (T2, T4 y T14) que obtuvieron valores correspondientes a los dos primeros grupos, mientras que aquellos compuestos por CG suplementado con ST se colocaron sólo entre los de contenido medio (T9 T12 y T17) y los de CG sola en los de menor contenido (T1, T3 y

T13).

Cabe mencionar que como no es una extracción exhaustiva, los contenidos proteicos totales son mayores al contenido determinado. En otras palabras, las proteínas determinadas en el presente estudio representan a la fracción solubilizada en el buffer de extracción.

Por su parte, las lacasas son enzimas polifenoloxidasas usualmente asociadas a la degradación de la lignina por los hongos, sin embargo están presentes en otros reinos como en las plantas (Leatham y Stahmann, 1981). En las semillas de girasol, un tipo de estas enzimas polifenoloxidasas está relacionada con algunos procesos como la pigmentación de las cubiertas seminales (De Leonadis *et al.*, 2005).

El estudio de la actividad de lacasas en los sustratos iniciales autoclavados mostró valores que se ubicaron en el rango de 0,07- 0,35 U/g PSS de actividad enzimática. Cabe mencionar que luego de 45 días de colonización por *G. gargal* y *G. sordulenta* (ver más adelante **Tablas 21** y **26**) la actividad enzimática máxima alcanzó valores de 1,18-1,46 U/g PSS, respectivamente.

Los sustratos con mayor actividad de lacasas se ubicaron entre los valores de 0,35-0,22 U/g PSS, y el resto se consideró de baja actividad (<0,20-0,07 U /g PSS). Gran parte de los tratamientos con mayor actividad correspondieron a sustratos conteniendo >65% SG (en orden decreciente: T2 T20 T14 T16 T18 T10) aunque también se encontraron valores altos en formulaciones con 100% CG (en orden decreciente: T13 T3), concluyendo al respecto que no se pueden establecer relaciones entre esta actividad con la mayor proporción de un componente del sustrato en particular. Estos valores de condición basal de oxidación de la siringaldazina fueron tenidos en cuenta para luego restárselos a los de oxidación de siringaldazina en los sustratos posteriores a la colonización por *G. gargal* y *G. sordulenta*. Una de las causas de la presencia de esta condición basal de oxidación en el sustrato puede responder a factores biológicos como la presencia de lacasas termoestables; por ejemplo, se ha informado que algunas lacasas pueden mantener su máxima actividad durante 2 horas a 75°C (Guo *et al.*, 2011). Sin embargo, no se han descrito enzimas de este tipo que sean tolerantes a una temperatura de autoclavado. Otra posible causa de la condición basal de oxidación de siringaldazina puede ser la presencia de factores químicos con un alto potencial rédox del sustrato (Nogala *et al.*, 2007; Hapiot *et al.* 1993).

Tabla 19. Composición de los diferentes sustratos empleados en el TCL antes de la colonización por *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta*. También se presentan los valores de densidad, pH, humedad relativa (HR) y el contenido de proteínas y actividad de lacasas sobre la base de peso seco del sustrato. La cáscara de girasol (CG) y el sustrato previamente colonizado por *Pleurotus ostreatus* (SG) se agregaron enteros (e.) o molidos (m.), el salvado de trigo (ST) se agregó en un 20% de la formulación.

Fórmulas de sustrato	CG		SG		ST	Densidad (g/ml)	pH ^a	HR% ^a	Proteínas µg/g PSS ^b	Lacasas U/g PSS ^b
	e.	m.	e.	m.						
T1	100					0,45	5,8	63	0,8 ±0,4 fg	0,17 ±0,08 cdef
T2			100			0,45	5,7	66	6,7 ±0,5 ab	0,35 ±0,12 a
T3		100				0,50	5,8	66	1,6 ±0,4 defg	0,23 ±0,09 abcde
T4				100		0,50	6,0	64	2,2 ±0,4 cdef	0,20 ±0,08 bcdef
T5	50		50			0,45	5,7	66	3,3 ±0,5 abcd	0,28 ±0,09 abc
T6	50			50		0,45	5,9	65	3,6 ±0,4 abcd	0,23 ±0,08 abcde
T7		50	50			0,50	5,8	64	2,7 ±0,5 bcde	0,22 ±0,11 abcde
T8		50		50		0,55	6,0	65	1,8 ±0,4 defg	0,11 ±0,07 ef
T9	80				20	0,50	5,9	66	2,6 ±0,4 bcde	0,07 ±0,06 f
T10			80		20	0,50	5,7	64	7,6 ±0,7 a	0,23 ±0,08 abcde
T11				80	20	0,62	6,0	66	5,2 ±0,9 abc	0,14 ±0,06 ef
T12		80			20	0,62	6,0	70	3,1 ±0,4 abcd	0,16 ±0,06 def
T13	25	75				0,55	5,9	67	1,4 ±0,4 efg	0,28 ±0,07 abc
T14			25	75		0,50	6,0	64	2,8 ±0,8 abcde	0,33 ±0,09 ab
T15		75		25		0,62	6,2	70	0,8 ±0,5 g	0,22 ±0,06 abcde
T16		25		75		0,55	5,9	64	3,3 ±0,5 abcd	0,28 ±0,08 abc
T17	15	65			20	0,53	6,0	65	3,1 ±0,9 abcd	0,12 ±0,06 ef
T18			15	65	20	0,53	5,8	66	5,7 ±1,0 abc	0,27 ±0,06 abcd
T19		65		15	20	0,59	5,9	66	0,8 ±0,4 fg	0,24 ±0,08 abcde
T20		15		65	20	0,55	5,9	65	1,5 ±0,5 defg	0,34 ±0,10 ab

^a Promedio de dos muestras.

^b Valor medio ± error estándar, correspondientes a 5 u.e. por tratamiento, el error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDIA} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})^{1/2}$. Las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas para cada columna con el test de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

3.1.4. Análisis de fibra previo a la colonización

Los contenidos de fibras detergente neutro y ácido (FDN, FDA), lignina (LDA) y cenizas se obtuvieron mediante los análisis correspondientes (ver 2.4), luego considerando estos valores se calculó el contenido de materia orgánica (MO), hemicelulosa y celulosa. Los resultados del contenido de estas variables en los sustratos previo a la colonización se muestran en la **Tabla 20**.

El contenido de materia orgánica de todos los sustratos se ubicó entre 87 y 94%. Los sustratos de a las formulaciones a base de SG poseían un contenido algo menor de MO (87-89%), y si bien ya habían producido dos oleadas de cultivo (40-50 días de cultivo), aún serían aptos para el crecimiento de una nueva colonia. El uso de sustratos gastados para el cultivo de hongos está bien documentado e incluye una gran variedad de especies y sustratos; por ejemplo a partir de sustrato gastado de *P. ostreatus* se cultivaron otras especies del mismo género y también *Stropharia* spp. (Rinker, 2002).

En todos los sustratos estudiados, la materia orgánica antes de la colonización consistía en su mayor parte en contenido celular (32-42%) y la fracción de celulosa (25-36%), seguido por la fracción de lignina 12-18%, y finalmente la de hemicelulosa 4-12%.

Como se mencionó en la introducción de esta sección, algunos hongos lignocelulolíticos como *P. ostreatus* degradan la fracción hemicelulósica con preferencia a las demás (Kuforiji y Fasidi, 2009; Tsang *et al.*, 1987; Streeter *et al.* 1982). Este fue el caso de la cepa de *Pleurotus ostreatus* con la que se obtuvieron los sustratos SG, el cual mostró un contenido 30% menor de hemicelulosas que el obtenido en el análisis de la CG (compárese T1 vs. T2 y T3 vs. T4). Esta carencia de nutrientes asociados a la fracción de hemicelulosa (como xilulosa, entre otras) podría resultar en una limitación para el cultivo de una nueva colonia si la especie fúngica emplea esta fracción como principal fuente de carbohidratos.

El salvado de trigo por su parte contiene un 30% de hemicelulosa. Además y como era esperable, el análisis de fibra de los sustratos suplementados con salvado de trigo reveló que las fórmulas que contenían 20% ST y 80% de CG (entera o molida, T9 T12 y T17) poseían contenidos de hemicelulosa mayores que las formulaciones sin el suplemento. Los valores más altos se obtuvieron en el T9 y T12 con 12% de hemicelulosas. Sin embargo, también se obtuvieron contenidos de hemicelulosa cercanos (del 8%) en formulaciones sin salvado de trigo: T1 T13.

Se decidió considerar que las fracciones del material lignocelulósico de los sustratos obtenidos antes y después de la biotransformación cambiaban de manera importante desde el punto de vista biológico cuando se obtenía una variación del 10% en las fracciones analizadas.

El contenido de la fracción de celulosas no varió entre los sustratos de las diferentes formulaciones, por ejemplo, la fórmula T3 que contenía CG molida tenía un contenido similar al del sustrato conteniendo SG molido (30 vs. 32%, respectivamente). Sin embargo, es probable que debido a la ligninólisis y al consumo de hemicelulosas por la colonización previa de *P. ostreatus*, en el sustrato SG existiera una mayor exposición de la celulosa que en la CG, lo cual favorecería el cultivo de micelio de otras especies poseedoras de una mayor capacidad de utilización de la celulosa como nutriente principal como, por ejemplo, sería el caso de *Volvariella volvacea* (Chang y Miles, 2004).

Los componentes del contenido celular (CC) son los metabolitos intracelulares y polisacáridos de la pared celular, en ambos casos se trata de compuestos solubles en agua y por esto fácilmente disponibles. Esta fracción se ubicó entre el 32 y 41% de la materia seca de las diferentes fórmulas de sustrato. Si bien era esperable que en el sustrato SG la colonización previa por *P. ostreatus* aumentara el CC, no se hallaron correlaciones, que pudieran mostrar una mayor liberación de productos del CC que la existente en los sustratos a base de CG (compárese T3 vs. T4). De todas maneras debido a la biotransformación de la cáscara de girasol por *P. ostreatus* tanto la estructura de los materiales como la composición cualitativa en su contenido celular no sería la misma.

Tabla 20. Contenido de fibras (FDN, FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en diferentes fórmulas (T1-T20), anteriores a la colonización por micelio de *Grifola gargar* y *Grifola sordulenta*, expresado en % sobre la base de peso seco. La suma de los valores de CC, hemicelulosa, celulosa, LDA y cenizas es el 100% de la composición de cada fórmula de sustrato.

Fórmulas de sustrato	FDN	FDA	MO	CC	Hemi-celulosa	Celulosa	LDA	Cenizas
T1	67	59	92	33	8	36	15	8
T2	59	54	88	41	5	28	14	12
T3	59	52	91	41	7	31	12	9
T4	63	58	88	37	5	32	14	12
T5	59	53	91	41	6	31	13	9
T6	67	61	90	33	6	34	17	10
T7	66	61	90	34	5	34	17	10
T8	68	62	90	32	6	34	18	10
T9	67	55	93	33	12	32	16	7
T10	60	53	89	40	7	25	17	11
T11	58	54	89	42	4	26	17	11
T12	68	56	93	32	12	34	15	7
T13	68	60	94	32	8	36	18	6
T14	66	60	87	34	6	31	16	13
T15	68	62	90	32	6	34	18	10
T16	68	61	90	32	7	34	17	10
T17	66	57	90	34	9	31	16	10
T18	64	58	88	36	6	29	17	12
T19	68	58	89	32	10	32	15	11
T20	63	55	88	37	8	29	16	12

3.2. Crecimiento de *Grifola gargar*

3.2.1. Fórmulas de sustratos

El TCL es de alguna manera representativo de la etapa de “corrida del micelio” en los troncos sintéticos (Duncan, 1997). En este bioensayo se utilizan 10 g de sustrato mientras que en el cultivo en los “troncos sintéticos” a escalas productivas se emplean usualmente bolsas de 2 a 5 kg de sustrato, es decir 200-500 veces mayor, y aún en otros casos bolsas superiores a los 2 metros de longitud (Stamets 1993). El objetivo de una rápida colonización en esta etapa de corrida del micelio es doble, por un lado evitar el crecimiento de microorganismos competidores y, por otro lado lograr un ciclo productivo más corto, con las deseables consecuencias favorables en la relación costo beneficio. Asimismo, el logro de una mayor biomasa fúngica al final de la colonización de un determinado sustrato cuando el micelio está maduro para iniciar el proceso de fructificación, repercutirá en una mayor magnitud en la producción de carpóforos (Oei, 1996).

En el caso de la presente tesis el micelio de *G. gargar* creció en todos los sustratos de todas las fórmulas evaluadas en el TCL. En la **Tabla 21** se muestran los resultados de la velocidad de

colonización micelial en los diferentes sustratos (fórmulas T1-T20). Algunas imágenes ilustrativas de los tratamientos se muestran en la **Figura 60**.

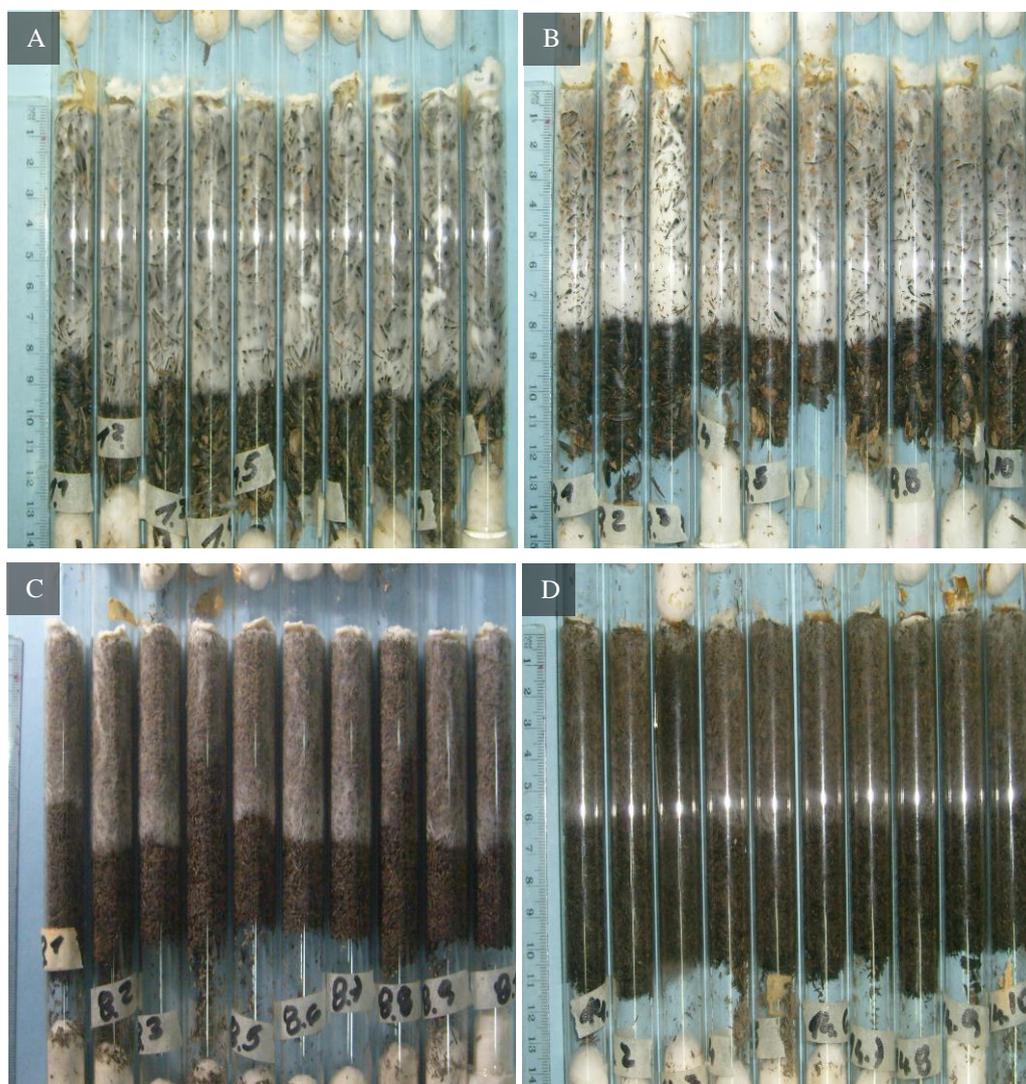
Tabla 21. Velocidad de colonización del micelio de *Grifola garga* en diferentes sustratos determinada mediante el ensayo de test lineal. Las fórmulas (T1-T20) se prepararon con cáscara de girasol, sustrato gastado remanente del cultivo de *Pleurotus ostreatus*, molidos o enteros, y sus combinaciones, en ausencia o presencia de salvado de trigo (20%). Asimismo, se presenta la densidad aparente del crecimiento micelial (laxo, denso, muy denso indicado por +, ++ y +++, respectivamente), el incremento en el contenido proteico ($\mu\text{g PSS/día}$) y el incremento de la actividad de lacasas (U/gramo PSS) luego de 45 días.

Fórmulas de sustrato	Velocidad de colonización mg PSS/día ^a	Crecimiento micelial aparente	Proteínas $\mu\text{g/g PSS}$ ^b	Lacasas U/g PSS ^b
T1	111 ± 1,0 a	+++	56 ± 2,1 a	0,51 ± 0,14 abcd
T2	83 ± 1,0 d	+++	14 ± 1,4 cdefg	0,26 ± 0,13 efg
T3	106 ± 1,0 ab	+++	29 ± 1,9 abcde	0,71 ± 0,18 ab
T4	53 ± 1,0 h	+	10 ± 1,6 efg	0,46 ± 0,12 bcdefg
T5	93 ± 1,0 c	+++	38 ± 2,1 abc	0,57 ± 0,15 abc
T6	90 ± 1,0 c	+++	32 ± 1,5 abcd	0,21 ± 0,11 g
T7	102 ± 1,0 b	+++	15 ± 1,2 cdefg	0,49 ± 0,14 bcde
T8	86 ± 1,0 cd	++	13 ± 1,4 defg	0,36 ± 0,12 defg
T9	103 ± 1,0 ab	+++	16 ± 2,0 bcdefg	0,46 ± 0,15 bcdefg
T10	86 ± 1,0 cd	++	8 ± 1,2 fg	0,40 ± 0,16 cdefg
T11	51 ± 1,0 h	++	21 ± 1,6 abcdef	0,63 ± 0,18 abc
T12	90 ± 1,0 c	+++	36 ± 1,7 abc	1,02 ± 0,18 a
T13	91 ± 1,0 c	+++	47 ± 2,1 ab	0,61 ± 0,18 abc
T14	63 ± 1,0 fg	+	12 ± 1,6 defg	0,23 ± 0,12 g
T15	70 ± 1,0 e	++	6 ± 1,8 g	1,08 ± 0,18 a
T16	68 ± 1,0 ef	++	18 ± 1,6 bcdefg	0,50 ± 0,13 abcd
T17	81 ± 1,0 d	+++	33 ± 1,7 abc	1,18 ± 0,18 a
T18	54 ± 1,0 h	++	23 ± 1,7 abcdef	0,52 ± 0,10 abcd
T19	68 ± 1,0 ef	+++	9 ± 1,1 efg	0,47 ± 0,17 bcde
T20	60 ± 1,0 g	++	24 ± 2,1 bcdefg	0,23 ± 0,13 fg

^a Valores medios de velocidad de colonización ± error estándar, correspondientes a 10 u.e. por tratamiento, el error estándar se calculó con: $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$. Los datos fueron transformados con la variable logaritmo natural y las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

^b Valor medio ± error estándar, correspondientes a 5 u.e. por tratamiento, el error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDIA} = (S_{Ti}^2 / n_{Ti})^{1/2}$. Las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas para cada columna con el test de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

Figura 60. Placas fotográficas representativas de la colonización con micelio de *Grifola gargal* de sustratos en el TCL. Las placas A y B corresponden a las fórmulas T1y T9 a cuyos micelios se le asignó una densidad aparente de ++++. Obsérvese que en estos 2 tratamientos se puede apreciar la presencia de micelio condensado (MC) de forma esferoidal a irregular, a veces formando una masa continua. La placa C corresponde a la fórmula T8 del sustrato colonizado con menor densidad (++) y la placa D corresponde a la fórmula T14 del sustrato colonizado con mucho menor densidad (+).



Para poder realizar el análisis de Anova simple, los valores de velocidad de crecimiento fueron transformados con la variable logaritmo natural. En función de los resultados hallados con este análisis y los determinados para la densidad micelial aparente e incremento de proteínas al final del ensayo (**Tabla 21**), se clasificaron los tratamientos (fórmula del sustrato + condiciones experimentales) en *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*. Esto se realizó con el fin de facilitar la presentación e interpretación de los resultados. El gráfico de barras de la **Figura 61** muestra las agrupaciones de tratamientos y la velocidad de colonización en cada uno de los sustratos de las diferentes fórmulas a los 45 días.

Los tratamientos de *muy alto crecimiento* produjeron una velocidad de colonización de 102-111 mg PSS/día, un valor de densidad de micelio aparente de ++++, y un incremento de proteínas de 15-56

µg/g PSS. Las formulaciones de estos tratamientos consistieron en CG (T1), CG molida (T3), CG suplementada con salvado de trigo (T9), CG molida: SG (1:1) (T7). En el caso de T1 y T9 se hallaron condensaciones miceliales densas que aparecían como una masa sólida de formas esferoidales a irregulares en la parte central del tubo (**Figuras 60A y B**).

La composición de las fórmulas de sustratos para los tratamientos con *alto crecimiento* (**Figura 61**) fue variada y consistió en: CG molida y entera (T13); CG y SG entera o molidos (T5 T6 T8); CG y SG con 20% ST (T10 y T12), un ejemplo ilustrativo se muestra en la **Figura 60C**. La velocidad de colonización en éstos se ubicó entre 86-93 mg PSS/día y tuvieron valores de densidad aparente de +++ y ++, y un incremento de proteínas de 8-47 µg/g PSS.

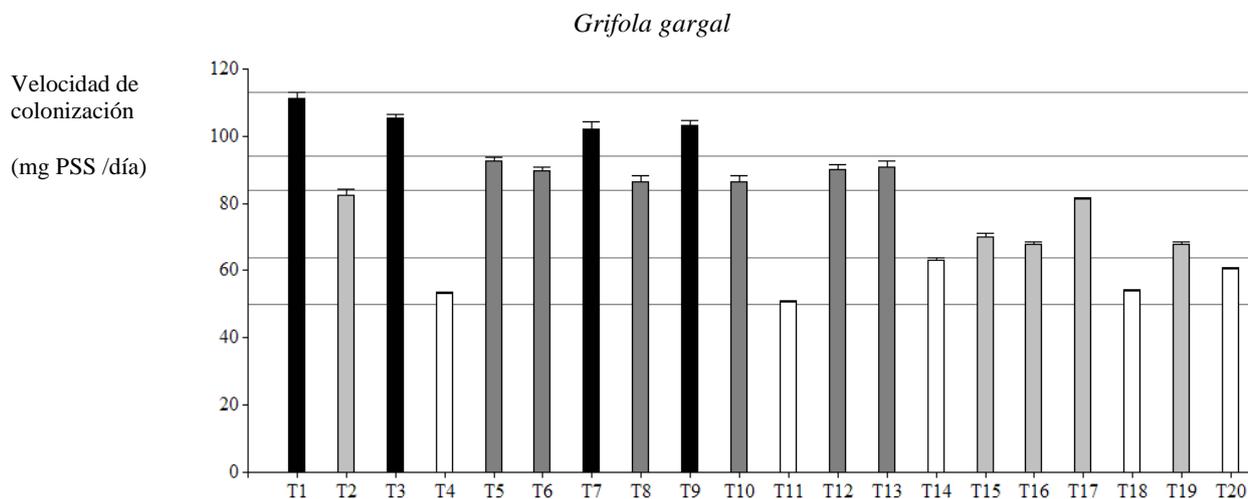
El resto de los tratamientos (*medio y bajo crecimiento*) mostraron velocidades de colonización de 50-70 mg PSS/día, la mayoría presentó un valor de densidad aparente de ++ o + y el incremento de proteínas fue de 6-33 µg/g PSS. En este último caso, las formulaciones tenían un alto contenido de material molido, incluso con salvado cuyo tamaño de partícula es similar al del material molido, un ejemplo ilustrativo se muestra en la **Figura 60D**.

Otros basidiomicetos como *Ganoderma lucidum* y *H. erinaceus* fueron cultivados y evaluados con el TCL en formulaciones de sustrato con CG (González- Matute *et al.* 2002; Figlas *et al.*, 2007, respectivamente). Las densidades aparentes del micelio fueron similares entre *Ganoderma lucidum*, *H. erinaceus* y las formulaciones calificadas como de *muy alto crecimiento* en *G. gargal*. Las velocidades de colonización de aquel sustrato con *Ganoderma lucidum* y *H. erinaceus* fueron de 25 y 12 veces más veloces que *G. gargal*, respectivamente. Esto parece indicar que en estas condiciones de cultivo (sustrato + ambiente) colocadas para el crecimiento de *G. gargal* habría una menor habilidad del hongo para aprovechar las fuentes de nutrición disponibles, probablemente debido a una menor actividad lignocelulolítica. En el estudio previo del crecimiento de *G. gargal* en medios diferenciales, se pudo observar también que *G. gargal* posee menor habilidad de crecimiento que *Ganoderma lucidum* en medios de agar conteniendo compuestos fenólicos (ver resultados en capítulo II.D).

Entre las formulaciones que contenían SG se observó que aquellas que tenían >65% de SG (T2 T4 T14 y T18) manifestaron valores menores en la velocidad de colonización, en relación a las que contienen ≤50% de SG (T5 T6 T7 T8) (ver **Tabla 21** y **Figura 61**). Éstas últimas se colocaron entre las formulaciones con *alto* y *muy alto crecimiento*, de manera que el SG podría ser empleado como un componente de las fórmulas en proporciones menores al 50%.

Si bien el SG posee nutrientes valiosos, es esperable que también posea deficiencias nutritivas producidas por el crecimiento de *P. ostreatus*, un ejemplo de éstas sería el menor contenido de hemicelulosa (datos iniciales de los tratamientos T2 y T4). El menor contenido en hemicelulosa podría inhibir el crecimiento de *G. gargal* ya que se observó que esta fracción nutritiva fue la más empleada en tratamientos pertenecientes a *muy alto* y *alto crecimiento* (ver más adelante ítem 3.2.6.).

Figura 61. Velocidad de colonización de sustratos de diferentes fórmulas, medida en miligramos de sustrato seco colonizado por *Grifola gargal* por día. La diferenciación en aptitudes de las fórmulas para apoyar el crecimiento micelial fue hecha en base a la apreciación de la densidad micelial aparente en unión a la velocidad de colonización. Barras negras: *muy alto crecimiento*; barras gris oscuro: *alto crecimiento*; barras gris claro: *medio crecimiento* y barras blancas: *bajo crecimiento*. Las barras representan el valor medio de la velocidad de colonización y su valor de error estándar (calculado con la fórmula $EE_{MEDI\bar{A}} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})^{1/2}$).



Una fuente importante de hemicelulosas se incorporó en aquellas formulaciones suplementadas con 20% ST ya que este suplemento es rico en esa fracción de carbohidratos y estaría incrementando *c.a.* de un 6% el contenido final del mismo. Para el caso de sustratos a base de SG, el salvado de trigo sería importante para suplir la mencionada deficiencia. Sin embargo, al comparar los tratamientos formulados con SG solamente (T2 y T4) vs. las mismas formulaciones conteniendo 20% de ST (T10 y T11), no se observó un incremento en los valores de velocidad de colonización ni de la densidad micelial aparente. Esto sugiere que en el sustrato SG podrían estar presentes otros factores limitantes bióticos (metabolitos producidos por *P. ostreatus*) o abióticos, como podría ser una salinidad relativamente elevada ya que el SG usado en estos ensayos no fue lavado.

Por otra parte la incorporación de 20% de salvado de trigo en fórmulas con un contenido $\geq 50\%$ de CG no produjo mejoras en comparación a aquellas fórmulas que contenían $\geq 50\%$ de CG y sin suplementación con salvado. De hecho en este último grupo se encontraron tratamientos con *muy alto crecimiento* (T1, T3 y T7). No obstante, también en el primer grupo hubo una formulación con *muy alto crecimiento* (T9) en la cual el ST muy probablemente podría aportar otros efectos beneficiosos en la composición de los metabolitos nutracéuticos de las fructificaciones maduras de *G. gargal*. Al respecto, la influencia del efecto funcional del sustrato en las propiedades funcionales de los hongos no ha sido aún extensivamente investigada, si bien algunos resultados han sido descriptos para *Ganoderma lucidum* (Peksen *et al.*, 2011). Un ejemplo cercano a este concepto es el enriquecimiento de micelios y frutos de hongos con oligoelementos minerales esenciales (González- Matute *et al.*, 2011).

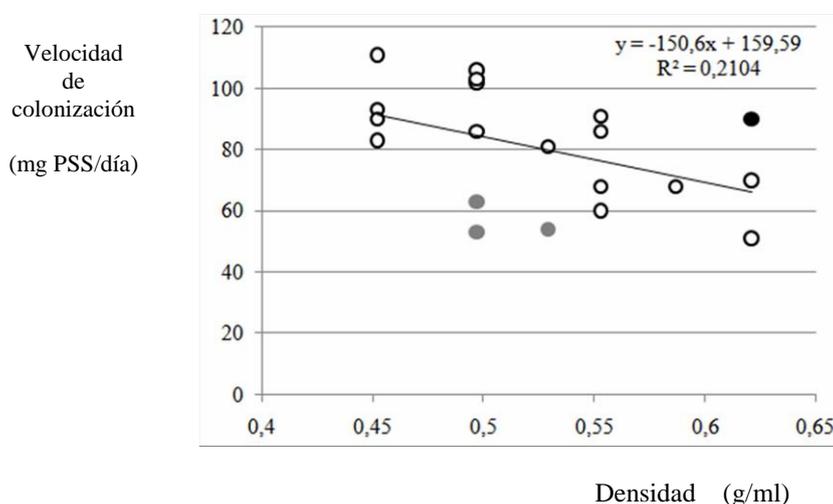
3.2.2. Influencia de la densidad del sustrato en el crecimiento

La densidad de los sustratos (promedio \pm desvío estándar) de *muy alto* y *alto crecimiento* fue menor: $0,49 \pm 0,03$ y $0,52 \pm 0,07$, a la de los de *medio* y *bajo crecimiento*, que fue de $0,55 \pm 0,07$ y $0,53 \pm 0,06$. El análisis de regresión de la densidad de los sustratos *versus* la velocidad de colonización por tratamiento resultó significativo, si bien la relación entre ambas variables fue baja ($p < 0,05$; $R^2 = 0,21$) (**Figura 62**).

Vale recordar aquí que el sustrato correspondiente a T1 contenía solamente CG entera con una densidad de 0,50 g/ml. Algunos tratamientos con “densidad adecuada” produjeron bajas velocidades de colonización y bajas densidades miceliales aparentes (T4 T14 y T18: de 0,45 a 0,50 g/ml, ver detalle en **Figura 62**), lo cual se debe a su alta proporción de SG (contenían entre 80-100% de SG molido o entero). Una excepción de un tratamiento con *alto crecimiento* a pesar de su elevada densidad (0,62 g/ml) fue la del T12, atribuyéndose este resultado a su buena calidad nutritiva (CG molida 80% y salvado de trigo 20%, ver detalle en **Figura 62**).

Surge así que una compactación adecuada para el cultivo de *G. gargar* es de 0,45-0,50 g/ml; para ello una proporción de CG (entera) mayor del 50% facilita el logro de esta densidad a la vez que asegura una buena disponibilidad de nutrientes. Por otra parte, los sustratos molidos y el salvado poseen mayor superficie de exposición y en consecuencia mayor fuente de nutrientes por unidad de volumen, sin embargo su incorporación no debe ser excesiva. Entonces, para no perder el efecto de sus beneficios nutricionales, se sugiere incorporarlos en proporciones que no incrementen la densidad total muy por encima de los 0,50 g/ml.

Figura 62. Análisis de regresión de la velocidad de colonización de *Grifola gargar* vs. densidad de los sustratos de diferentes formulaciones (representadas por círculos). Los círculos rellenos de color gris (●) se emplearon para indicar las formulaciones de sustrato con baja densidad (T4 T14 T18, $\geq 80\%$ SG) en las que se produjeron baja velocidad de colonización del micelio. El círculo relleno de color negro (●) indica a la fórmula T12 (80% CG molida y 20% ST) en la que el micelio mostró una alta velocidad de colonización a pesar de poseer alta densidad.



3.2.3. Humedad relativa y pH

En la fermentación en estado sólido los sustratos se humedecen hasta hidratar completamente las paredes celulares, habitualmente hasta un contenido hídrico entre el 60 y 70%, evitando un exceso por encima de ese límite, ya que el agua inundaría los espacios intersticiales (Oei, 1996).

No se hallaron relaciones significativas entre la velocidad de crecimiento y el rango de humedad relativa inicial ($p > 0,05$) sugiriendo que en el rango estudiado de HR las condiciones fueron homogéneas. Cabe mencionar que los valores de HR estuvieron cercanos a los hallados en la madera de *N. obliqua* colonizada por *G. gargal* (60%).

Por otra parte la regresión de los valores de colonización de sustrato vs. el pH luego del autoclavado detectó diferencias significativas con una relación muy baja entre ambas variables para el rango estudiado ($p < 0,05$ $R^2 = 0,22$). Ya se conocía que en otras condiciones de pH el crecimiento de *G. gargal* es más veloz a pH menores a 5 (ver capítulo II.A) y también que el pH medido en las virutas húmedas de roble pellín incluso es menor a 4. Sin embargo este rango no se pudo obtener en la práctica con los sustratos que resultaron de las fórmulas presentadas, los cuales estuvieron entre valores de pH 5,8- 6,2; dentro de este rango estrecho no se producirían diferencias significativas en parámetros biológicos de interés como ser la actividad enzimática total o la solubilidad de nutrientes.

3.2.4. Incremento en el contenido de proteínas y en la actividad de lacasas

El análisis del incremento de proteínas solubles en unión a la velocidad de colonización y la densidad aparente del micelio en crecimiento micelial proporciona una indicación de la biotransformación de los compuestos nitrogenados que acompaña el crecimiento de la biomasa fúngica.

En los casos en que un sustrato no tuviera un nivel nutritivo suficiente se da la posibilidad que el micelio se expanda “creciendo” rápidamente pero sólo intentando satisfacer la demanda nutricional. En tal caso la valoración de la colonización por su densidad micelial resultaría ser baja (=laxa) y con el análisis del incremento en el contenido de proteína soluble, como marcadora de biomasa, se confirmaría ese bajo crecimiento. Y, más aún, podría encontrarse el caso de que el micelio utilice las proteínas para obtener energía en mayor proporción que las proteínas que incorpora a su biomasa, entonces se observaría una disminución en el contenido proteico (Fonseca *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2002).

En la **Tabla 21** se muestra el contenido de proteínas de los sustratos de cada tratamiento después de 45 días de colonización. Allí se observa que todos los tratamientos incrementaron el contenido de proteínas solubles en el sustrato colonizado detectándose diferencias significativas entre ellos y siendo el T1 el tratamiento en que se detectó el mayor incremento del contenido de proteínas. En la **Tabla 22** se muestran los incrementos de proteína en el sustrato para los tratamientos agrupados según el tipo de crecimiento observado. El incremento fue mayor en los sustratos correspondientes a los tratamientos con “*muy alto y alto crecimiento*” (29 $\mu\text{g/g}$ PSS para ambos casos), mientras que los sustratos de “*medio y bajo crecimiento*” presentaron menores incrementos (16 y 18 $\mu\text{g/g}$ PSS, respectivamente).

Se destaca que entre los tratamientos de *muy alto* crecimiento el T1 (CG entera) fue el que mostró mayor incremento en el contenido de proteínas (56 µg /g PSS).

En la **Tabla 22** se muestra la actividad de lacasas medidas en el sustrato de cada tratamiento después de 45 días de colonización. El promedio de los incrementos de la actividad de lacasas en los sustratos colonizados correspondientes a los tratamientos agrupados de acuerdo a su respuesta de crecimiento se muestra en la **Tabla 23**.

Los valores incrementales de la actividad de lacasas más altos al día 45 de la colonización fueron los de “*medio crecimiento*” (0,70 U/g PSS), lo cual indicaría que estos tratamientos contaban con el micelio en una fase activa de la degradación (**Tabla 23**). Y, en el caso de los tratamientos de *muy alto* y *alto crecimiento* ya habrían terminado con esta fase dado que mostraron valores menores (0,54 y 0,53 U/g PSS).

Se realizaron tres análisis de correlación: i) actividad de lacasas vs. velocidad de colonización, ii) actividad de lacasas vs. incremento del contenido de proteína, iii) actividad de lacasas vs. degradación de la lignina (ver degradación de lignina en la **Tabla 25**), que en todos los casos resultaron no significativos ($p > 0,05$). Vale mencionar aquí que el micelio de *G. gargal* y de *G. sordulenta* realiza la biodegradación ligninolítica con otras enzimas que acompañan a la actividad de las lacasas: LiP y/o MnP (ver en capítulo II.E) y que no fueron cuantificadas en este estudio.

El incremento en la actividad de lacasas producido por *G. gargal* en los tratamientos con mayor actividad de esta enzima fue similar al medido en *A. blazei* en sustratos basados en cáscara de girasol y con el empleo del mismo método de cultivo y determinación enzimática de lacasas: 0,9 U/g PSS, a los 53 días de colonización (González- Matute, 2009). Cabe destacar que *A. blazei* no es un hongo de la pudrición blanca como lo son estas especies de *Grifola* spp., sino un descomponedor secundario que facultativamente emplea las lacasas para degradar sustratos lignocelulósicos según los nutrientes que encuentre en el sustrato (González- Matute *et al.*, 2010).

Tabla 22. Variación del contenido de proteínas en el sustrato después de la colonización por micelio de *Grifola gargal* (valores promedios en **Tabla 21**). Los tratamientos están agrupados según el tipo de crecimiento en *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDIA} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})^{1/2}$.

Tipo de crecimiento	Δ Proteínas $\mu\text{g/g PSS} \pm EE_{MEDIA}$
<i>Muy alto</i>	29 \pm 10
<i>Alto</i>	29 \pm 6
<i>Medio</i>	16 \pm 5
<i>Bajo</i>	18 \pm 3

Tabla 23. Variación de la actividad de lacasas en el sustrato después de la colonización por micelio de *Grifola gargal* (valores promedios en **Tabla 21**). Los tratamientos están agrupados según el tipo de crecimiento en *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDIA} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})^{1/2}$.

Tipo de crecimiento	Δ Lacasas $\text{U/g PSS} \pm EE_{MEDIA}$
<i>Muy alto</i>	0,54 \pm 0,06
<i>Alto</i>	0,53 \pm 0,11
<i>Medio</i>	0,70 \pm 0,18
<i>Bajo</i>	0,41 \pm 0,08

3.2.5. Contenido de fibra en sustratos posterior a la colonización por *Grifola gargal*

En la **Tabla 24** se presentan los resultados del contenido de FDN, FDA, LDA, MO y mineral (cenizas) de los sustratos luego de 45 días de cultivo de *G. gargal*. En la **Tabla 25** se muestran las variaciones (porcentaje final-porcentaje inicial \times 100%) superiores al 10 % en los contenidos celular, de fibras y cenizas correspondientes a los diferentes grupos de crecimiento micelial de *G. gargal* (*muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*).

La degradación de la materia orgánica fue evaluada a través del incremento en el porcentaje del contenido de cenizas. Las variaciones mayores del 10% en el contenido de cenizas se encontraron principalmente en los sustratos correspondientes a los tratamientos con *muy alto crecimiento* cuyos valores incrementaron entre 18 y 36% y también en tres casos (de seis) en los sustratos con *alto crecimiento* fúngico con incrementos del 13 a 18% (**Tabla 25**).

Cabe mencionar aquí que luego de dos oleadas de *P. ostreatus* cultivado sobre CG, se produce la misma degradación de la materia orgánica a la hallada en este estudio, lo cual indicaría que *P. ostreatus* es una especie capaz de biotransformar efectivamente la materia orgánica en fructificaciones, y si *G. gargal* tuviera la misma capacidad de biotransformación podría eventualmente desarrollar fructificaciones de tamaño aceptable.

Entre las diferentes fracciones de los nutrientes presentes en los sustratos, la más degradada en los grupos de *muy alto*, *alto* y *medio* crecimiento fue la de hemicelulosa (-13 a -250%). Sólo en el tratamiento T7 (*muy alto crecimiento*) se observó una disminución más importante en la fracción de

celulosa, mientras que en T9 T12 y T13 la degradación ocurrió tanto en hemicelulosa como en celulosa. El contenido celular fue la fracción nutritiva principal sólo en el T3 (muy *alto crecimiento*). Con el análisis del contenido en fibras del sustrato, antes y después de su colonización por el micelio, pudieron estimarse los componentes de la lignocelulosa que son degradados en mayor magnitud y por ende conocer qué fuente utiliza metabólicamente el hongo para apoyar su crecimiento y desarrollo. En efecto, en este estudio con *G. gargal* se encontró que el micelio empleó distintas fracciones de los sustratos de las diferentes formulaciones, lo cual se interpreta como una propiedad favorable de *G. gargal* para utilizar los recursos nutritivos disponibles. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Nasreen *et al.* (2008) que trabajando con *P. ostreatus* hallaron una dependencia entre la fracción nutritiva consumida según el sustrato donde se cultivó el micelio.

En esta misma tesis, un antecedente sobre esta capacidad de utilizar diferentes fuentes nutritivas es el descrito en el capítulo II.E donde se demostró que las colonias de *G. gargal* tienen cierta capacidad de adaptación para crecer en diferentes fuentes de carbohidratos como ser xilulosa, almidón, pectina y celulosa.

La disminución de la fracción de lignina de los sustratos de los grupos de *muy alto* y *alto crecimiento* fúngico fue: i) paralela a la disminución de la fracción de hemicelulosa en T1 y T10, ii) paralela a la fracción de celulosa en T7, y iii) paralela a ambas fracciones: hemicelulosa y celulosa, en T9 y T12. En los otros cuatro tratamientos restantes la fracción de lignina fue constante o aumentó, en este último caso, los aumentos se deben a decrementos en el resto de los componentes.

En varios tratamientos se encontraron correlaciones positivas entre actividad de lacasas y degradación de lignina *i.e.*: alta actividad con degradación superior al 10% y en el sentido opuesto, con baja actividad de lacasas y degradación de lignina menor al 10%. Pero otros grupos mostraron correlaciones negativas: presentando alta actividad de lacasas sin disminución en el porcentaje de lignina y baja actividad de lacasas pero alta degradación de lignina. Estos resultados en direcciones opuestas apoyan la observación realizada anteriormente de que la presencia de actividad de la enzima se encuentra cuando el micelio está en activa de degradación; posteriormente la actividad se pierde pero quedan los componentes degradados. Si bien la actividad de lacasas está relacionada con la ligninólisis, no podría descartarse tampoco la participación de otras enzimas del complejo ligninolítico.

También se consideró relevante que la actividad de lacasas se perdiera, es decir que la vida útil de la enzima en el sustrato fuese corta reduciendo la utilidad del sustrato gastado de *G. gargal* con otros fines biotecnológicos como sería para la extracción de enzimas lacasas (Rinker, 2002).

Finalmente se destaca que el tratamiento de mejor respuesta global fue el T1 donde se redujo principalmente la fracción de hemicelulosa, hubo una degradación intermedia de lignina y aumentó moderadamente el contenido celular.

Consideradas en conjunto, la velocidad de colonización de los sustratos, el incremento del contenido de proteínas, la actividad de lacasas y la degradación de la fracción de lignina proveyeron una información útil para la identificación del estado metabólico y consecuentemente fisiológico del

micelio a los 45 días de crecimiento, en otras palabras, una pista útil para delimitar el mínimo de tiempo de cultivo en las condiciones empleadas para llegar a la madurez del micelio y por ello una situación adecuada para la inducción del proceso de fructificación.

Tabla 24. Contenido de fibras (FDN y FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en sustratos de diferentes fórmulas de (T1-T20, 500 mg de sustrato seco de c/u), expresados en % sobre la base de peso seco, luego de 45 días de colonización por micelio de *Grifola gargar*. La suma de los valores de CC, hemicelulosa, celulosa, LDA y cenizas es el 100% de la composición de cada fórmula de sustrato.

Fórmulas de sustrato	FDN	FDA	Materia orgánica	Contenido celular	Hemi-celulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas
T1	62	56	90	38	6	33	13	10
T2	62	60	88	38	2	33	15	12
T3	63	57	89	37	5	34	13	11
T4	64	60	88	36	5	32	16	12
T5	59	56	89	41	3	30	15	11
T6	66	60	90	34	6	33	18	10
T7	66	58	84	34	8	41	11	16
T8	65	59	90	35	6	33	16	10
T9	58	52	89	42	6	29	12	11
T10	47	45	89	53	2	24	10	11
T11	59	52	89	41	7	29	13	11
T12	60	50	92	40	10	30	12	8
T13	67	60	93	33	7	28	25	7
T14	67	61	88	33	6	31	18	12
T15	66	60	90	34	7	35	15	10
T16	64	59	90	36	5	32	16	10
T17	64	56	89	36	8	33	12	11
T18	63	56	88	37	7	27	17	12
T19	65	57	89	35	8	31	14	11
T20	60	53	89	40	7	30	13	11

Tabla 25. Variación entre el porcentaje final e inicial del contenido celular, fibras y cenizas luego de 45 días de colonización de sustratos (T1-T20) por micelio de *Grifola gargar*. Los datos se asignaron por grupos de tratamientos con respuestas diferentes de crecimiento: *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*. Se muestran sólo las variaciones mayores al $\pm 10\%$.

Tratamientos agrupados por crecimiento	Δ Contenido celular	Δ Hemi-celulosa	Δ Celulosa	Δ Lignina	Δ Cenizas
<i>muy alto</i>					
T1	+13	-33		-15	+20
T3		-40			+18
T7		+38	-10	-55	+38
T9	+21	-100	-10	-33	+36
<i>alto</i>					
T5		-100		+13	+18
T6					
T8				-13	
T10	+25	-250		-70	
T12	+20	-20	-13	-25	+13
T13		-14	-29	+28	+14
<i>medio</i>					
T2		-150	+15		
T15		+14		-20	
T16	+11	-40			
T17		-13		-33	
T19		-25			
<i>bajo</i>					
T4				+13	
T11		+43	+10	-31	
T14				+11	
T18		+14			
T20		-14		-23	

3.3. Crecimiento de *Grifola sordulenta*

3.3.1. Fórmulas de sustratos

El test de crecimiento lineal mostró que *G. sordulenta* pudo colonizar satisfactoriamente los sustratos de la mayoría de las fórmulas (14 tratamientos) mientras que en el resto (6 tratamientos) sólo alcanzó a extenderse un centímetro en el período de estudio (**Tabla 26**). En la **Figura 63** se muestran imágenes representativas de sustratos colonizados por *G. sordulenta*.

Para poder realizar el Anova simple, los valores de velocidad de crecimiento fueron transformados con la variable logaritmo natural. En el caso de esta especie el análisis se hizo sin tomar en cuenta los tratamientos considerados como “0” en cuanto a su densidad micelial aparente (ver **Tabla 26**). Asimismo, y como se hizo con *G. gargar* con el propósito de facilitar la presentación e interpretación de las respuestas de crecimiento de los diferentes tratamientos, se agruparon los mismos en: *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo crecimiento*.

Tabla 26. Velocidad de colonización de micelio de *Grifola sordulenta* en sustratos de fórmulas diferentes (T1-T20) preparadas con cáscara de girasol, sustrato gastado remanente del cultivo de *Pleurotus ostreatus*, molidos o enteros y sus combinaciones, en ausencia o presencia de salvado de trigo (20%), determinada mediante el test de crecimiento lineal. Asimismo se presenta la densidad aparente del crecimiento micelial (laxo, denso, muy denso indicado por +, ++ y +++, respectivamente), el incremento en el contenido proteico (mg PSS/día) y el incremento de la actividad de lacasas (U/gramo PSS). La duración del ensayo fue de 45 días.

Fórmulas de sustrato	Velocidad de colonización mg PSS/día ^a	Crecimiento micelial aparente	Proteínas µg /g PSS ^b	Lacasas U/g PSS ^b
T1	98 ± 1,2 a	+++	40 ± 3 bc	0,14 ± 0,07 hi
T2	28 ± 1,2 efg	+	5 ± 3 d	0,38 ± 0,09 cdefg
T3	87 ± 1,2 ab	++	16 ± 3 cd	0,68 ± 0,17 abc
T4	1 -	0	3 ± 3 d	0,41 ± 0,08 bcdef
T5	97 ± 1,2 a	+++	43 ± 3 bc	0,38 ± 0,17 cdefgh
T6	83 ± 1,2 abc	+++	21 ± 3 bcd	0,45 ± 0,10 abcdef
T7	86 ± 1,2 ab	++	41 ± 3 bc	0,34 ± 0,11 efgh
T8	2 -	0	2 ± 4 d	0,45 ± 0,09 abcdef
T9	107 ± 1,2 a	+++	96 ± 4 a	0,36 ± 0,11 defgh
T10	43 ± 1,2 cdef	+	7 ± 3 d	0,52 ± 0,14 abcde
T11	5 -	0	6 ± 3 d	0,57 ± 0,12 abcde
T12	69 ± 1,2 bcd	+++	27 ± 3 bcd	0,28 ± 0,12 fghi
T13	68 ± 1,2 bcd	++	4 ± 3 cd	0,09 ± 0,08 i
T14	4 -	0	2 ± 3 cd	0,27 ± 0,10 fghi
T15	45 ± 1,2 cde	+	4 ± 3 cd	0,19 ± 0,11 ghi
T16	1 -	0	3 ± 3 cd	0,21 ± 0,12 ghi
T17	81 ± 1,2 abc	+++	25 ± 4 bcd	0,92 ± 0,14 ab
T18	8 -	0	2 ± 4 cd	1,46 ± 0,21 a
T19	61 ± 1,2 bcd	++	10 ± 3 cd	0,24 ± 0,13 fghi
T20	31 ± 1,2 def	+	3 ± 3 cd	0,63 ± 0,23 abcd

^a Valores medios de velocidad de colonización ± error estándar, correspondientes a 10 u.e. por tratamiento, el error estándar se calculó con: $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$. Los datos fueron transformados con la variable logaritmo natural y las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

^b Valor medio ± error estándar, correspondientes a 5 u.e. por tratamiento, el error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDIA} = (S_{Ti}^2 / n_{Ti})^{1/2}$. Las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas para cada columna con el test de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

El gráfico de barras de la **Figura 64** muestra las agrupaciones de tratamientos y la velocidad de colonización en cada uno de los sustratos de las diferentes fórmulas a los 45 días. La comparación de las velocidades de colonización correspondientes a *G. gargal* y *G. sordulenta*, claramente muestra que *G. sordulenta* colonizó los sustratos a una menor velocidad en todos los tratamientos a excepción del correspondiente al tratamiento T9, que en ambas especies tuvo velocidades de crecimiento similares (**Figuras 61 y 64**).

En el caso de *G. sordulenta* los tratamientos considerados de *muy alto crecimiento* (velocidad de colonización de 97-107 mg PSS/día, densidad aparente +++, incremento de proteínas de 40-96 µg /g

PSS) fueron: T9 (CG entera con 20% ST), T1 (CG entera) y T5 (50% CG entera, 50% SG entero). Éstos se caracterizaron por poseer condensaciones de micelio que fueron de mayor tamaño que las encontradas en *G. gargal* (ver como ejemplo el T1 y T9 en las **Figura 63A y B**). En el caso de T9 las condensaciones de micelio podían ocurrir desde el inóculo de manera continuada hasta el frente del crecimiento micelial.

Los tratamientos de *alto crecimiento* (T3, T6, T7, T17) produjeron velocidades de colonización entre 83-87 mg PSS/día, la densidad aparente se ubicó entre +++ y ++, y el incremento de proteínas fue de 16-41 µg /g PSS. Todos mostraron intensas condensaciones de micelio aunque de menor tamaño que las observadas en los casos de *muy alto crecimiento* (ver como ejemplo el T3 en la **Figura 63C**).

Los tratamientos con respuestas de *medio crecimiento*: T12, T13 y T19, fueron los que produjeron velocidades de colonización más bajas (61-69 mg PSS/día) de los cuales sólo el T13 produjo condensaciones de micelio.

Finalmente, el grupo de tratamientos con respuestas de *bajo crecimiento* fue dividido entre los que mostraron crecimiento micelial, calificados como + (T2, T10, T15, T20) y los que no produjeron crecimiento micelial o si lo hicieron, fue sólo en algunas u.e. y en poca extensión, calificados como "0" (T4, T8, T11, T14, T16, T18). En este último grupo, los tratamientos comprendían fórmulas de sustratos conteniendo 50-100% de SG y más del 50% del material molido (ver como ejemplo el T20 en la **Figura 63D**).

Como ocurrió con *G. gargal*, la incorporación en la fórmula de sustrato de $SG \geq 65\%$ redujo los valores de velocidad de colonización (ver valores de T2 T4 T10 T11 T14 T16 T18 y T20), y también sucedió lo propio con sustratos compuestos únicamente por material molido y con $CG \geq 50\%$ y $\leq 50\%$ SG (T8 y T15). Por otra parte los sustratos con 50% CG y 50% SG pudieron sostener de *muy alto* a *alto crecimiento* solo cuando la mitad del material estaba presente en su forma entera (compárese T5, T6, y T7 vs. T8). En otras palabras, el SG puede usarse como componente del sustrato en proporciones menores al 50%, y en este caso los componentes lignocelulósicos enteros a incluir deberían incorporarse en una proporción del 50%.

En los tratamientos que mostraron al menos *crecimiento medio* se observó que la suplementación con 20% de salvado de trigo favoreció en dos casos el aumento en la velocidad de colonización (sin diferencias significativas): T1 vs. T9 y T13 vs. T17, mientras que en otro caso ocurrió lo contrario: T3 vs. T12.

Es importante destacar que aunque ambos tratamientos: T1 y T9, resultaron ser los que producían mejor velocidad de colonización de sustrato, el sustrato correspondiente a T9, que contenía el suplemento de salvado de trigo, mostró el doble del incremento en el contenido de proteínas solubles.

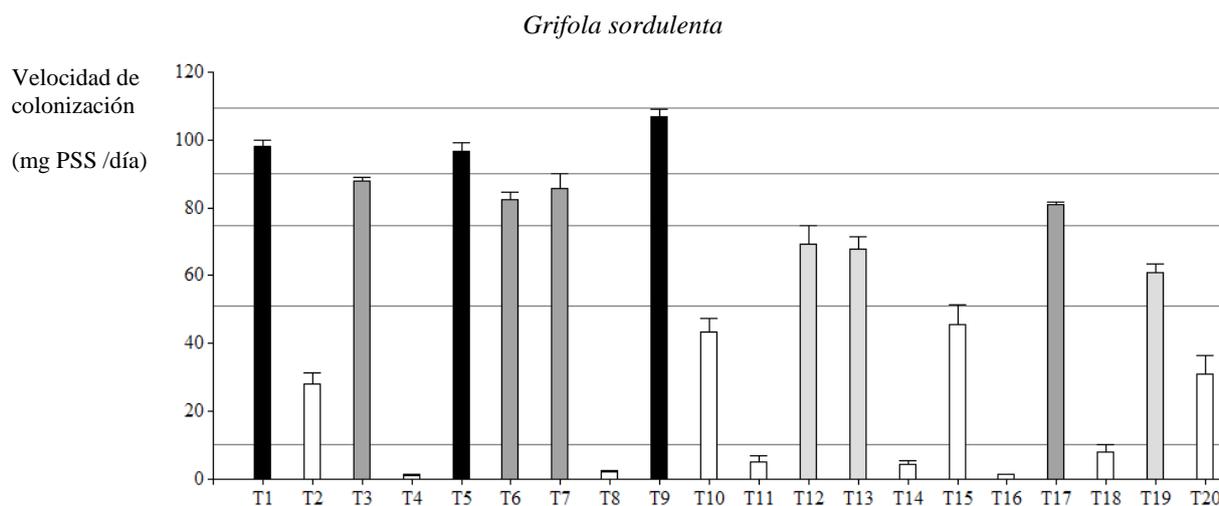
En el cultivo de *G. frondosa* la suplementación con salvado de trigo (20%) a una mezcla de virutas de roble americano y roble blanco (c.a. 80%) produjo una reducción significativa del tiempo de cultivo en todas las etapas del ciclo de producción, i.e. corrida del micelio, desarrollo de primordios y fructificación (Shen, 2001), pudiendo esperarse algo similar en el cultivo de *G. sordulenta* con la

suplementación de ST.

Figura 63. Placas fotográficas representativas de la colonización de micelio de *Grifola sordulenta* de sustratos en el TCL. Las placas A y B corresponden a las fórmulas T1 y T9 a cuyos micelios se le asignó una densidad aparente de +++ . Obsérvese que en estos 2 tratamientos se puede apreciar la presencia de zonas con micelio más denso. La placa C corresponde a la fórmula T3 del sustrato colonizado con menor densidad (++) y la placa D corresponde a la fórmula T20 del sustrato colonizado con mucho menor densidad (+).



Figura 64. Velocidad de colonización de diferentes fórmulas de sustrato, medida en miligramos de sustrato seco colonizado por *Grifola sordulenta* por día. La diferenciación en aptitudes de las fórmulas para apoyar el crecimiento micelial fue hecha en base a la apreciación de la densidad micelial aparente en unión a la velocidad de colonización. Barras negras: *muy alto crecimiento*; barras gris oscuro: *alto crecimiento*; barras gris claro: *medio crecimiento* y barras blancas: *bajo crecimiento*. Las barras representan el valor medio de la velocidad de colonización y su valor de error estándar (calculado con la fórmula $EE_{MEDI A} = (S_{Ti}^2 / n_{Ti})^{1/2}$).



3.3.2. Influencia de la densidad del sustrato en el crecimiento

La densidad de los sustratos (promedio \pm desvío estándar) de *muy alto* y *alto crecimiento* fue de $0,47 \pm 0,03$ y $0,50 \pm 0,07$, mientras que los de *medio* y *bajo crecimiento* fue de $0,59 \pm 0,07$ y $0,54 \pm 0,06$.

Tomando los sustratos con valor nutritivo aceptable se observó un evento con un claro efecto inhibitorio debido a la densidad del sustrato entre los tratamientos T9 vs. T12.

3.3.3. Humedad relativa y pH

Se realizó un análisis de regresión entre velocidad de colonización de los sustratos correspondientes a los grupos de tratamientos con respuestas de *medio*, *alto* y *muy alto crecimiento* vs. la humedad relativa correspondiente a cada uno de ellos. El resultando de este análisis fue significativo pero obtuvo un R^2 muy bajo (0,2), con lo cual se considera que el rango de HR obtenido luego del autoclavado no introdujo una variación importante en la velocidad de colonización.

La regresión entre velocidad de colonización y el pH para la misma selección de tratamientos resultó significativa, y aunque esta vez se obtuvo un coeficiente de regresión mayor ($R^2 = 0,34$), se lo consideró igualmente bajo, por ello se descartó que el estrecho rango de pH medido después de la esterilización del sustrato, pudiera influir de manera importante en la velocidad de colonización.

El pH de las virutas de coihue es de 3,7 y durante el cultivo semisólido se estableció que la

velocidad de crecimiento es mayor a pH 4- 5 (capítulo II.A). Como se mencionó para *G. gargal*, sería ventajoso encontrar la manera de proveer un pH menor con el fin de aumentar la velocidad de colonización, quizás por medio de la vía de una fermentación láctica usada en una práctica de decontaminación biológica (Sánchez y Royse, 2002).

3.3.4. Incremento en el contenido de proteínas y en la actividad de lacasas

Las variaciones en el contenido de proteínas de los sustratos colonizados por *G. sordulenta* durante 45 días se muestran en la **Tabla 26**. En la **Tabla 27** se muestran los incrementos de proteína en el sustrato para los tratamientos agrupados según el tipo de crecimiento observado.

En algunos casos, los tratamientos con respuesta de *bajo crecimiento* no presentaron cambios respecto al contenido inicial de proteínas en el sustrato. En el grupo de *muy alto crecimiento* se hallaron incrementos promedio de *c.a.* 60 µg/g PSS (**Tabla 27**), lo cual superó en dos veces los contenidos proteicos medidos en el mismo grupo de crecimiento para *G. gargal*, previamente descrito.

De manera tal que aunque los valores de velocidad de colonización fueron menores en *G. sordulenta*, la información aportada por la determinación del contenido de proteínas estaría indicando una mejor biotransformación del sustrato en *G. sordulenta* respecto a *G. gargal*.

La referencia realizada anteriormente entre la diferencia de los mejores tratamientos, T9 y T1, destacaba la eficacia de la suplementación con salvado de trigo; considerando además, la magnitud alcanzada en esta diferencia (T9: 96 y T1:40 µg/g PSS, $p<0,05$) podría colocarse al T9 como el mejor tratamiento de la serie.

Los incrementos de la actividad de lacasas en los sustratos colonizados correspondientes a los tratamientos agrupados de acuerdo a su respuesta de crecimiento se indican en la **Tabla 28**.

El mayor incremento en la actividad de lacasas luego de la colonización de los sustratos con *G. sordulenta* se encontró en los tratamientos con respuestas de *alto crecimiento* (0,60 U/g PSS), seguido por los tratamientos de *bajo crecimiento* (0,49 U/g PSS).

Como se argumentó en el caso de *G. gargal*, la actividad de lacasas estaría indicando una determinada fase de la actividad metabólica degradativa del micelio. En otras palabras, ello permite suponer que a los 45 días de crecimiento micelial, en el caso de los tratamientos de *muy alto crecimiento*, la actividad degradativa estaría disminuyendo, mientras que en los de *alto crecimiento* se encontraría cercana al pico de la actividad.

El fenómeno de retraso del crecimiento seguido por un incremento en la actividad de enzimas se observó en algunos tratamientos de *bajo crecimiento* así como fue descrito previamente en el cultivo en medio tánico de *G. sordulenta* (ver capítulo II.E). Esa demora representaría un estado de adaptación al sustrato que luego sería biodegradado por la producción de las nuevas enzimas polifenol oxidasas generadas. Debido a que este retraso puede ser demasiado extenso es conveniente emplear alguna estrategia como la de introducir aditivos o nutrientes en el medio recalitrante para estimular la producción de estas enzimas y acortar la fase de latencia (Aro *et al.*, 2005; Stajić *et al.*, 2006).

Tabla 27. Variación del contenido de proteínas en el sustrato después de 45 días de colonización por micelio de *Grifola sordulenta* (valores promedios en **Tabla 24**). Los tratamientos están agrupados según el tipo de crecimiento en *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo*. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDI A} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})$.

Tipo de crecimiento	Δ Proteínas $\mu\text{g/g PSS} \pm EE_{MEDI A}$
<i>Muy alto</i>	60 \pm 18
<i>Alto</i>	26 \pm 6
<i>Medio</i>	14 \pm 7
<i>Bajo</i>	4 \pm 1

Tabla 28. Variación de la actividad de lacasas en el sustrato después de 45 días de colonización por micelio de *Grifola sordulenta* (valores promedios en **Tabla 28**). Los tratamientos están agrupados según el tipo de crecimiento en *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo*. El error estándar se calculó con la fórmula $EE_{MEDI A} = (S_{Ti}^2/n_{Ti})^{1/2}$.

Tipo de crecimiento	Δ Lacasas $\text{U/g PSS} \pm EE_{MEDI A}$
<i>Muy alto</i>	0,36 \pm 0,11
<i>Alto</i>	0,60 \pm 0,11
<i>Medio</i>	0,20 \pm 0,04
<i>Bajo</i>	0,49 \pm 0,15

3.3.5. Análisis de contenido fibra posterior a la colonización *Grifola sordulenta*

En la **Tabla 29** se presentan los resultados del contenido de FDN, FDA, LDA, MO y mineral (cenizas) de los sustratos, a los 45 días de cultivo de *G. sordulenta*. En la **Tabla 30** se indican las variaciones (porcentaje final-porcentaje inicial \times 100%) superiores al 10 %, determinadas en los contenidos celular, de fibras y cenizas correspondientes a los diferentes grupos de crecimiento micelial de *G. sordulenta* (*muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo*).

La degradación de la materia orgánica se evaluó a través del incremento en el porcentaje del contenido de cenizas. Las variaciones mayores del 10% en el contenido de cenizas se hallaron en los tratamientos de *muy alto crecimiento* ubicándose entre 13 y 38%; luego se detectaron incrementos en dos de los cuatro casos de los sustratos con *alto crecimiento* (12-13%) y también mayores incrementos se determinaron en dos de tres tratamientos de *medio crecimiento* (16-28%) (**Tabla 30**).

Entre las diferentes fracciones de los nutrientes presentes en los sustratos, las más degradadas en los grupos de *muy alto*, *alto* y *medio* crecimiento (siete tratamientos en total) fueron la de celulosa en T1 T6 y T7, la de hemicelulosa en T9; no se observó ningún tratamiento donde se produjera la degradación simultánea de ambas fracciones de celulosa y hemicelulosa. T3 fue el tratamiento que produjo la mayor disminución en el contenido celular.

Cabe destacar además que en el T9, la degradación de hemicelulosas (-41%) fue paralela a la degradación de lignina (-33) (**Tabla 30**).

Vale destacar aquí la capacidad que posee *G. sordulenta* para degradar la celulosa, que se manifestó predominantemente en el T1 (*muy alto crecimiento*), y que también había sido observada durante el cultivo de micelio de *G. sordulenta* y *G. frondosa* sobre sustratos empleados para demostrar la presencia de actividad de la enzima celobiosa deshidrogenasa (capítulo II.D). En esta tesis no se estudió la estimulación de enzimas celulolíticas, pero podría ser un objetivo de interés.

Tabla 29. Contenido de fibras (FDN y FDA), materia orgánica (MO), contenido celular (CC) y contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina (LDA) y cenizas presentes en sustratos de diferentes fórmulas (T1-T20, 500 mg de sustrato seco de c/u), expresados en % sobre la base de peso seco, luego de 45 días de colonización por micelio de *Grifola sordulenta*. La suma de los valores de CC, hemicelulosa, celulosa, LDA y cenizas es el 100% de la composición de cada fórmula de sustrato.

Fórmulas de sustrato	FDN	FDA	Materia orgánica	Contenido celular	Hemi-celulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas
T1	64	56	90	37	8	30	16	10
T2	54	49	90	47	5	25	14	10
T3	64	57	90	37	7	30	17	10
T4	65	58	89	36	7	28	19	11
T5	63	56	90	38	7	29	18	10
T6	65	57	91	36	8	31	17	9
T7	63	57	91	38	6	31	17	9
T8	64	57	91	37	7	32	17	9
T9	62	53	89	39	9	30	12	11
T10	54	48	90	47	6	25	13	10
T11	57	50	90	44	7	27	14	10
T12	60	51	92	41	9	30	13	8
T13	66	58	92	35	8	33	17	8
T14	62	56	89	39	6	29	16	11
T15	61	54	91	40	7	30	15	9
T16	63	57	90	38	6	30	16	10
T17	64	55	89	37	9	30	14	11
T18	60	53	89	41	7	28	14	11
T19	63	54	90	38	9	30	15	10
T20	59	52	90	42	7	28	14	10

Tabla 30. Variaciones entre el porcentaje final e inicial del contenido celular, fibras y cenizas luego de 45 días de colonización de sustratos por micelio de *Grifola sordulenta*. Los datos se asignaron por grupos de tratamientos con respuestas diferentes de crecimiento: *muy alto*, *alto*, *medio* y *bajo*. Se indican sólo las variaciones mayores al $\pm 10\%$.

Tratamientos agrupados por crecimiento	Δ Contenido celular	Δ Hemi-celulosa	Δ Celulosa	Δ Lignina	Δ Cenizas
<i>muy alto</i>					
T1			-20		+22
T5				+28	+13
T9	+14	-41		-33	+38
<i>alto</i>					
T3	-12			+29	+13
T6		+20	-10		
T7			-10		
T17				-14	+12
<i>medio</i>					
T12	+21	-41	-13	-15	+16
T13					+28
T19	+15	-18			
<i>bajo</i>					
T2	+12	-11	-12		-17
T4		+23	-14	+26	
T8	+12				
T10	+14	-27		-31	
T11		+38		+21	
T14	+12				-15
T15	+19		-13	-20	
T16	+15	-27	-13		
T18	+11			-21	
T20	+11	-23		-14	-17

4. Conclusiones

Ambas especies, *G. gargal* y *G. sordulenta* pueden crecer bien en sustratos a base de cáscara de girasol, sin encontrarse mejoras que incrementen notablemente el crecimiento ante la suplementación con salvado o sustrato gastado de *Pleurotus ostreatus*. Los sustratos que mostraron muy alto crecimiento en *G. gargal* fueron T1, T3, T7 y T9, compuestos por cáscara de girasol y en un caso con el suplemento de salvado presente (en ninguno de éstos se encontraba el sustrato gastado de *Pleurotus* como componente). Mientras que en *G. sordulenta* los tratamientos con muy alto crecimiento fueron T1, T5 y T9, en cuya composición se encontraba alguno de los siguientes materiales: cáscara de girasol, sustrato gastado de *Pleurotus* y salvado.

La extensión de la degradación de sustratos y su magnitud del crecimiento micelial pudo ser evaluada con una interpretación conjunta de la velocidad de colonización, densidad aparente, actividad de lacasas, el contenido de proteínas y análisis de fibra.

B. Estudio de variables culturales para el crecimiento de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*, parte II

1. Introducción

En esta parte del estudio se realizó otro ensayo de crecimiento lineal (TCL) que amplía al primero. En este segundo bioensayo se consideró un conjunto de nuevos factores potencialmente limitantes del crecimiento, como ser: i) algunos micronutrientes minerales (Cu(II), Zn(II), Mn(II)); ii) el tipo de sustrato lignocelulósico (diferentes materiales vegetales); iii) uso de aceite como estimulante del crecimiento fúngico (aceite de girasol) y iv) modificación de la estructura del material lignocelulósico por tratamiento con ácido sulfúrico diluido.

El primer TCL permitió conocer que los micelios de *G. gargal* y *G. sordulenta* pueden crecer en medios a base de cáscara de girasol sola, y que la densidad adecuada se encuentra entre 0,45 y 0,50 g/ml. Se encontró que si bien la suplementación con sustrato gastado de *P. ostreatus* y el salvado de trigo no producen incrementos significativos en la velocidad de colonización, aún es recomendable su empleo puesto que puede mejorar el contenido nutritivo del sustrato (Rinker, 2002; Peksen *et al.*, 2011).

Conociendo que *G. gargal* y *G. sordulenta* utilizan lacasas y muy posiblemente también MnP y LiP para efectuar la ligninólisis, una manera de aumentar la velocidad de colonización en sustratos a base de cáscara de girasol sería estimulando con sales inorgánicas las actividades de dichas enzimas, como se ha demostrado en otros casos (Galhaup y Haltrich, 2001).

El cobre, por ejemplo, es cofactor de las lacasas y otras enzimas involucradas en la ligninólisis como las superóxido dismutasas (Leonowicz *et al.*, 1999). El Zn(II) es cofactor de varias enzimas, incluidas las enzimas superóxido dismutasa, y se ha estudiado que estimula la ligninólisis en *P. ostreatus*, aunque en otras especies no produjo incrementos como por ejemplo en *Trametes versicolor* (Baldrian *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, 2011). El Mn(II) es cofactor de la MnP, y su presencia en el sustrato aumenta la producción de dicha enzima (Aro *et al.*, 2004). Además de su participación directa como cofactores enzimáticos, estos y otros metales también pueden incrementar la producción del conjunto de enzimas ligninolíticas a través de la estimulación del genoma fúngico en ciertas regiones conocidas como “elementos de respuesta a metales” (*Metal Responsive Elements*, Lebrun *et al.*, 2011).

También se ha informado que el contenido y la forma química de nitrógeno del medio regulan la actividad ligninolítica, por ejemplo: las sales de NH₄(I) incrementan la actividad de lacasas, LiP y MnP en varias especies (Kaal *et al.*, 1995; Curvetto *et al.*, 2002a; Stajić *et al.*, 2006).

Si bien muchas veces se hace referencia a los sustratos lignocelulósicos de manera general, todos ellos son diferentes para cada especie y cepa de hongo. Debido a la presencia de diferencias en los contenidos de macro y micronutrientes (inorgánicos y orgánicos) así como en el arreglo de las microfibrillas de celulosa, hemicelulosa y lignina, aparecen marcadas diferencias entre diferentes sustratos lo cual influye decisivamente en la capacidad de una colonia para expresar su mayor potencial biológico. De manera que la suplementación con ciertos nutrientes carentes o insuficientes

específicos de la biodegradación podrían colaborar en la remoción de tal limitación. Es así que para conocer más profundamente la naturaleza del sustrato basado en CG en el sentido señalado, es decir poder observar si la velocidad de colonización mostraba alguna dependencia con las características del sustrato lignocelulósico, se probó suplementar la CG con otros sustratos lignocelulósicos, a saber, virutas de madera (de *N. obliqua*, *Populus nigra*) o paja de trigo (*Triticum aestivum*).

Hace tiempo que se conoce la actividad reguladora de diferentes lípidos presentes en los sustratos y el crecimiento fúngico, ya sea empleado como nutriente o bien causando un efecto estimulante. Los primeros trabajos en el tema fueron los de Wardle y Schisler (1969). Hoy se conoce que en el cultivo líquido de *G. frondosa*, varios aceites, incluyendo el de aceite de girasol, resultaron ser suplementos beneficiosos para la producción de micelio (Hsieh *et al.*, 2008). Por ello, en el presente estudio también se buscó probar la respuesta de colonización del micelio fúngico creciendo en un sustrato basal conteniendo aceite de girasol.

Por otra parte, se ha investigado que un factor que facilita la disponibilidad de nutrientes y una mayor exposición al posterior acceso de las enzimas fúngicas es la combinación de un pre tratamiento con ácidos diluidos en combinación con altas temperaturas (Mtui, 2009). De allí que se incorporó un tratamiento para producir esta hidrólisis mediante un ácido inorgánico diluido (ácido sulfúrico), con calor que fue provisto durante la esterilización del sustrato por autoclavado.

1.1. Hipótesis

La velocidad de colonización y la densidad aparente de las colonias de *G. gargal* y *G. sordulenta* cultivadas en cáscara de girasol pueden incrementarse con el agregado de estimuladores enzimáticos, suplementos nutritivos o un tratamiento de hidrólisis ácida del medio.

1.2. Objetivos

Entonces, como objetivo de esta sección, se pretendió verificar si pueden incrementarse los valores de velocidad de colonización y de densidad micelial aparente cuando se incorporan a la formulación basal diferentes suplementos lignocelulósicos, minerales, o bien cuando se aplica un tratamiento ácido del sustrato.

2. Materiales y métodos

2.1. Sustrato basal

Se formuló un sustrato basal según la distribución de sus componentes obtenida a partir de las formulaciones calificadas de *alto crecimiento* en el primer TCL (ver detalle de los componentes secos de cada fórmula basal en la **Tabla 31**). Los componentes secos fueron embebidos 16 horas con agua para obtener la mezcla de sustrato (60% agua en el sustrato, 37,5% sustrato, 0,5% CO₃Ca y 2% SO₄Ca).

2.2. Ensayos de las fórmulas de sustratos con el TCL

El material usado como sustrato en el TCL (6 u.e. por cada uno) fue el que se describe a continuación: i) sustrato basal (control); ii) sustrato basal seco embebido con la solución de hidratación hecha con 0,01 N de ácido sulfúrico y 2% SO₄Ca (en ausencia de CO₃Ca) para un contenido final de agua del 60%; iii) sustrato basal en presencia de 200 ppm NH₄(I), o 20 ppm Mn(II), o 100 ppm Cu(II), o 100 ppm Zn(II), como sulfatos, sobre la base de peso fresco; iv) sustrato basal (80%) con el agregado de 20 % de virutas (corte grueso de garlopa de carpintería) de roble pellín (*N. obliqua*) o de álamo (*Populus* spp.), o bien 20 % de paja de trigo (*Triticum aestivum*, 1 cm en promedio) y v) sustrato basal conteniendo 5% de aceite de girasol, sobre la base de peso fresco.

Los sustratos se colocaron en los tubos de TCL de manera de obtener igual densidad entre pares de tratamientos en ambas especies. Posteriormente al autoclavado se midió la densidad, el pH, y la humedad relativa (**Tabla 32**).

Los tubos conteniendo los sustratos se esterilizaron a 121°C por 2 horas, y los sustratos luego se inocularon en uno de los extremos con un disco (16 mm) de agar con micelio joven de las especies fúngicas. La incubación se hizo a 18 ±1°C, en oscuridad y humedad de 90%, en cámara de cultivo CCC-20 (Lab. Electrónica, CCT-BB, CONICET); los tubos se dispusieron horizontalmente y se rotaron periódicamente. A los 35 días de cultivo se midió el crecimiento desde el extremo del inóculo hasta el extremo del micelio en crecimiento (promediando 4 mediciones diferentes alrededor del tubo). Con este dato y con la densidad del sustrato se calculó la velocidad de colonización en términos de masa de sustrato seco colonizado por día (mg PSS/día).

2.3. Análisis estadístico

Para la determinación de diferencias en la velocidad de colonización de los sustratos bajo estudio se usó el ANOVA simple y las medias se compararon con el test de Tukey ($\alpha=0,05$) utilizando el programa Infostat (Di Renzo *et al.*, 2010). Los datos de velocidad de colonización fueron transformados con la función logaritmo natural.

Tabla 31. Fórmulas de sustrato para el crecimiento micelial de *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta*. Se presentan las correspondientes a los tratamientos del primer TCL que mostraron las mejores respuestas de crecimiento micelial (T1, T3, T5, T7 y T9) y la formulada para cada especie sobre la base de las anteriores para el segundo TCL. CG: cáscara de girasol, SG: sustrato previamente colonizado por *Pleurotus ostreatus* (2 oleadas), ST: salvado de trigo.

	<i>Grifola gargal</i>	<i>Grifola sordulenta</i>
Fórmulas de sustrato seleccionadas del primer TCL	T1: CG entera (100%) T3: CG molida (100%) T7: CG molida (50%) + SG entero (50%) T9: CG entera (80%) + ST (20%)	T1: CG entera (100%) T5: CG entera (50%) + SG entero (50%) T9: CG entera (80%) + ST (20%)
Fórmula del sustrato basal para el segundo TCL	CG entera: 50% CG molida: 30% SG entera: 15% ST: 5%	CG entera: 80% SG entera: 15% ST: 5%

Tabla 32. Características físicas (densidad, pH, humedad relativa) de los sustratos previos a la colonización de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en el segundo TCL. El sustrato basal (SB) usado para cada especie (G1 o S1, ver **Tabla 31**) fue separadamente tratado con ácido sulfúrico, suplementado con sales minerales, suplementado con materiales lignocelulósicos o suplementado con aceite de girasol.

Sustratos	Densidad (g/ml)	<i>G. gargal</i>			<i>G. sordulenta</i>		
		Nombre del sustrato	pH	HR%	Nombre del sustrato	pH	HR%
SB	0,48	G1	5,1	59	S1	5,0	60
SB + SO ₄ H ₂ 0,01N	0,48	G2	4,8	57	S2	4,7	62
SB + NH ₄ (I) 200ppm	0,48	G3	5,0	57	S3	5,0	58
SB + Mn (II) 20ppm	0,48	G4	4,9	58	S4	5,1	58
SB + Cu(II) 100ppm	0,48	G5	5,0	59	S5	5,0	59
SB + Zn(II) 100ppm	0,48	G6	5,0	58	S6	4,9	58
SB 80% + roble 20%	0,45	G7	4,9	55	S7	5,0	57
SB 80% + álamo 20%	0,45	G8	5,1	57	S8	5,0	56
SB 80% + paja trigo 20%	0,45	G9	5,1	58	S9	4,9	57
SB + aceite girasol 5%	0,48	G10	5,0	58	S10	5,0	55

3. Resultados y discusión

En las **Tablas 32 y 34** se muestran los resultados de la velocidad de colonización y la densidad micelial aparente determinados a los 35 días para *G. gargal* y *G. sordulenta*, respectivamente. En las **Figuras 65 y 66** se muestran placas fotográficas que revelan el aspecto de los micelios creciendo en los sustratos pertenecientes a *G. gargal* y *G. sordulenta*, respectivamente.

El micelio de ambas especies cultivado en los sustratos basales creció rápidamente y mostró una densidad aparente de micelio muy buena (+++). En el sustrato basal y para el caso de *G. sordulenta*, la velocidad de colonización mejoró en relación a la obtenida en el grupo con respuesta de *muy alto crecimiento* en el primer TCL (117 mg PSS/día vs. 97-107 mg PSS/día), mientras que con *G. gargal* la velocidad de colonización resultó ser menor en comparación con la obtenida para el mismo grupo (95 mg PSS/día vs. 102-111 mg PSS/día).

3.1. El crecimiento de *Grifola gargal* en sustratos suplementados

La velocidad de colonización del sustrato correspondiente al sustrato basal G1 fue superada por la obtenida en los tratamientos G8 (roble 20%), G9 (álamo 20%) y G4 (Mn(II) 20 ppm) en un 43, 32 y 20 %, respectivamente ($p < 0,05$). Los tratamientos G2 (SO₄H₂ 0,01N), G6 (Zn(II) 100 ppm) y G9 (paja de trigo 20%) mostraron una mejor densidad aparente micelial respecto al sustrato basal pero no incrementaron su velocidad de colonización. Estos resultados muestran que existe en el sustrato elegido como basal (CG) alguna limitación nutritiva que afecta el crecimiento micelial de *G. gargal*, que podría disminuirse mediante la suplementación del sustrato.

Es importante destacar que el empleo de fuentes lignocelulósicas como suplementos de la CG mostró efectos beneficiosos sobre la colonización a pesar de su diferencia en cuanto al origen vegetal por tratarse de virutas de árboles de crecimiento lento, virutas de árboles de crecimiento rápido o bien paja.

Al respecto, los resultados en los casos de G7 y G8 conteniendo un 20% de roble pellín o álamo respectivamente eran esperables. Por un lado el roble pellín es el sustrato natural de *G. gargal*. Por otro lado, si bien el álamo es una especie exótica, se pudo hallar un ejemplar de este árbol en el mismo hábitat donde *G. gargal* pudo fructificar, lo cual indica que en condiciones naturales podría ser un hospedante facultativo (Pozzi *et al.*, 2009).

Aún es muy llamativa la respuesta de crecimiento de *G. gargal* a la suplementación con paja de trigo. Si bien la paja de trigo no es un sustrato natural para los políporos, posee características nutritivas que son apropiadas para el cultivo de esta especie, incluyendo un contenido de micronutrientes inorgánicos similar al de las virutas de madera (Baldrian *et al.*, 2005). Algunos políporos que han sido cultivados en sustratos a base de paja de trigo son *Ganoderma australe* (Rigas *et al.*, 2007), *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* y *Phlebia rufa* (Dinis *et al.*, 2009), *Lentinus tigrinus* (Lechner y Papinutti, 2006), *Piptoporus betulinus* (Valásková y Baldrian, 2006).

El tratamiento con ácido sulfúrico diluido también mejoró la densidad aparente de colonización. Este tratamiento disminuyó muy poco el valor de pH (pH 4,8) con relación al del sustrato basal (pH 5,1) por eso no se adjudicaron las mejoras a una disminución del pH, sino al efecto hidrolítico sobre el entramado de enlaces de la lignocelulosa. Este resultado preliminar es promisorio y sugiere la posibilidad de amplificar la respuesta de crecimiento utilizando como parte del acondicionamiento del sustrato un pre-tratamiento con ácido sulfúrico y temperatura. Tal ha sido el caso informado para facilitar la producción de biocombustibles con ciertos microorganismos y sustratos (Sun y Cheng, 2005; Guo *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009a).

Con relación a la suplementación mineral, los trabajos previos realizados en CG con *P. ostreatus* (Curvetto *et al.*, 2002a), *H. erinaceus* (Figlas *et al.*, 2007) y *Agaricus blazei* (González- Matute, 2009), fueron tomados como referencia y se escogieron las concentraciones que en estos estudios habían producido diferencias de crecimiento micelial significativas sobre el sustrato basal.

El incremento anteriormente mencionado del 20 % en la velocidad de colonización micelial de *G. gargal* en sustrato suplementado con 20 ppm Mn(II), fue comparable al informado para *P. ostreatus* y *H. erinaceus* (Curvetto *et al.*, 2002a; Figlas *et al.*, 2007). En efecto, la suplementación del sustrato a base de cáscara de girasol con 20-200 ppm de Mn(II) produjo incrementos del 10-25% en la colonización del sustrato por estos hongos.

Posiblemente una mayor dosis de Mn(II) podría incrementar algo más la velocidad de colonización; pero es necesario recordar que las sales de Mn(II) pueden inhibir la enzima LiP (Zhao *et al.*, 1996), por lo cual su uso debería evaluarse cuidadosamente. Aquí habría que considerar además que existen otras sustancias y condiciones que pueden aumentar la actividad de MnP como ser Tween 80, pH, temperatura (Ürek y Pazarlioğlu, 2005), o bien cloruro de amonio en combinación con extracto de malta (Sharma *et al.*, 2010), por mencionar algunos de ellos.

La suplementación con 100 ppm de Zn(II) fue beneficiosa para el crecimiento de *G. gargal*. González- Matute (2011) hallaron un aumento en la eficiencia biológica cuando se incorporó 25 ppm de Zn(I) al sustrato a base de cáscara en girasol para el cultivo de *G. lucidum*. Otros resultados similares fueron reportados por González- Matute (2009) en el cultivo de *A. blazei*, esta vez aplicando dosis de 100 y 200 ppm de Zn(II). Las mejoras observadas pueden atribuirse al rol esencial de este metal en el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos y especialmente en un isotipo de la superóxido dismutasa, de particular significación ya que sería responsable en los hongos de su resistencia al daño oxidativo (Jamieson, 1998; Angelova *et al.*, 2005).

Los tratamientos G5 (Cu(II), 100 ppm) y G10 (aceite de girasol 5%) mostraron velocidades de colonización similares a las del sustrato basal, y en el tratamiento G3 (NH₄(I), 200 ppm) hubo una disminución en la velocidad de colonización y una menor densidad micelial aparente.

Tabla 33. Velocidad de colonización por micelio de *Grifola gargal* de diferentes sustratos a base de cáscara de girasol, a los 35 días de cultivo. Sustrato basal (G1): cáscara de girasol 50% entera y 30% molida, 15% sustrato biotransformado por *Pleurotus ostreatus* y 5% salvado de trigo, sobre la base de peso seco. El sustrato basal fue tratado con ácido sulfúrico o suplementado con sales minerales, con materiales lignocelulósicos o con aceite de girasol. La densidad aparente se clasificó como 0, +, ++ y +++, +++!; en este último caso se usa “!” para indicar que la respuesta de crecimiento micelial resultó ser mejor que en el sustrato basal.

Tratamiento	Velocidad de colonización		Densidad aparente del micelio
	mg PSS/día ± EE _{ANOVA} ^a		
G1 Basal	95 ± 4,1	de	+++
G2 SO ₄ H ₂ 0,01N	100 ± 4,1	cde	+++ !
G3 NH ₄ (I) 200ppm	88 ± 4,1	e	++
G4 Mn(II) 20ppm	114 ± 4,1	bc	+++ !
G5 Cu(II) 100ppm	99 ± 4,1	cde	+++
G6 Zn(II) 100ppm	107 ± 4,1	bcde	+++ !
G7 Roble 20%	136 ± 4,1	a	+++ !
G8 Álamo 20%	123 ± 4,1	ab	+++
G9 Paja trigo 20%	112 ± 4,1	bcd	+++ !
G10 Aceite girasol 5%	93 ± 4,1	de	+++

^a Los valores de velocidad de colonización fueron transformados con la variable logaritmo natural, y corresponden a 6 u.e. por tratamiento. El error estándar se calculó con: $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$. Las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

El contenido de cobre en las virutas de madera de roble pellín, según datos propios, fue de 17 ppm. Por lo tanto en este ensayo se emplearon concentraciones cinco veces superiores a las condiciones naturales. La concentración de cobre utilizada en el ensayo fue considerada suficiente como para eventualmente detectar un incremento en los parámetros de crecimiento del cultivo, si hubiera sido que las lacasas fueran importantes en la biodegradación; además esta dosis no sería micotóxica según fuera informado para *G. frondosa* en cultivos líquidos (Figlas *et al.*, 2010). La ausencia de una mejora en la respuesta del crecimiento de *G. gargal* sugiere que en la biodegradación del material lignocelulósico del sustrato basal existiría una participación más importante de otras enzimas, como MnP y Lip respecto a la de las lacasas, en las particulares condiciones de cultivo del ensayo. Apoyando esta suposición se consideran relevantes las mejoras del crecimiento micelial observadas con la suplementación con Mn (II), los bajos valores de lacasas hallados en el primer test de TCL (ver en este capítulo la sección B) y la actividad asociada a Lip observada durante el cultivo en azure B (ver en capítulo II.D).

En cuanto al aceite de girasol, éste no tuvo el efecto positivo esperado sobre el crecimiento de la biomasa de micelio de *G. gargal*, como sí había sido en el caso con *G. frondosa* durante su cultivo sumergido (Hsieh *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2008). Posiblemente el nivel basal de ácidos grasos no saturados residuales presentes en la cáscara de girasol ya estaban en un nivel de suficiencia en relación

a un posible efecto estimulante. Cabe mencionar aquí que el contenido de materia grasa de la cáscara de girasol es de 3,5 %, con un contenido de *c.a.* 1,4 % en ácidos grasos insaturados (*National Sunflower Association*, 2011).

Finalmente, en el caso del amonio, la respuesta inhibitoria en la densidad aparente de crecimiento encontrada podría atribuirse al hecho de que *G. gargal* pertenece al grupo de hongos que son intolerantes al amonio (Yamanaka, 1995; Soponsathien, 1998), mientras que en *G. sordulenta* la respuesta global de crecimiento micelial no se diferenció de la obtenida con el sustrato basal (ver sección 3.2 siguiente).

Figura 65. Imágenes representativas de cultivos de *Grifola gargal* a los 35 días de colonización. Las formulaciones de sustrato basal (G1), fueron suplementadas con diferentes compuestos para mejorar la velocidad de colonización: SO_4H_2 0,01N (G2), NH_4^+ 200 ppm (G3), Mn(II) 20 ppm (G4), Cu(II) 100 ppm (G5), Zn(II) 100 ppm (G6), virutas de roble 20% (G7), virutas de álamo 20% (G8), paja de trigo 20% (G9) o aceite de girasol 5% (G10).



3.2. Crecimiento de *Grifola sordulenta* en sustratos suplementados

La velocidad de colonización hallada con el sustrato basal fue superior a las registradas en el primer TCL para los tratamientos con respuestas de *muy alto crecimiento*. Sin embargo en este TCL no se pudo superar la velocidad de colonización del tratamiento basal en ninguno de los tratamientos estudiados, si bien algunos tuvieron una mejor respuesta en cuanto a la densidad micelial aparente (**Tabla 34**).

Las mejoras en la densidad de crecimiento micelial aparente se observaron en los tratamientos S2 (ácido sulfúrico diluido), S4 (Mn(II), 20ppm) y S6 (Zn(II), 100ppm). En el caso del tratamiento del material lignocelulósico con ácido sulfúrico a temperatura elevada, la mejor respuesta de crecimiento micelial de *G. sordulenta* en relación al observado en medio basal, puede atribuirse a la hidrólisis térmica anteriormente mencionada en la discusión de la respuesta de crecimiento de micelio de *G.*

gargal en un sustrato formulado de manera similar. Es evidente que tal tratamiento hidrolítico en medio de ácido sulfúrico contribuye de manera significativa a la biodegradación del material lignocelulósico, como se ha informado en otros casos (Zheng *et al.*, 2009a).

Por otro lado, la mejor colonización por micelio de *G. sordulenta* en los sustratos conteniendo 20 ppm Mn(II) o 100 ppm Zn(II), con respecto a la observada para el sustrato basal, coincidió con la observada en *G. gargal*, y entonces se la puede atribuir a una estimulación de enzimas ligninolíticas, especialmente la MnP y otras enzimas dependientes del zinc como cofactor y que estarían involucradas en el metabolismo fúngico (ver discusión en 3.1).

La velocidad de crecimiento micelial y la densidad de crecimiento micelial aparente de *Grifola sordulenta* en el sustrato base suplementado con sulfato de amonio no fue diferente al observado con el sustrato basal. La habilidad para crecer bien en presencia de amonio es una característica de algunos hongos cuyo nicho es el suelo de bosques con mucha materia orgánica (Soponsathien, 1998; Yamanaka, 1995) y la cual es considerada una adaptación que les permite el acceso a fuentes nutritivas donde otros hongos no pueden desarrollarse. Los hongos del complejo *Pleurotus* spp. también crecen o son estimulados en presencia de sales de amonio (Stajic *et al.*, 2006; Sharma y Arora, 2010). Es más, durante el cultivo en sustratos a base de cáscara de girasol de *Pleurotus ostreatus* y otra especie comestible *H. erinaceus*, se halló que una suplementación con NH₄ (I) en el rango de 200 a 750 ppm incrementaba entre 11 y 27% la velocidad de colonización medida con el TCL (Curvetto *et al.*, 2002a; Figlas *et al.*, 2007). En este ensayo con *G. sordulenta*, se usó una concentración relativamente baja de la sal de amonio y es probable que dosis mayores pudieran producir aumentos semejantes en la velocidad de colonización.

La suplementación con otras fuentes de lignocelulosa resultó perjudicial para el crecimiento de *G. sordulenta*, en oposición a lo observado con *G. gargal*. El agregado de virutas de álamo o roble o de paja de trigo disminuyó significativamente la velocidad de colonización y además la densidad micelial aparente. De acuerdo con lo planteado anteriormente, *G. sordulenta* obtendría los nutrientes necesarios sólo del sustrato basal, y en todo caso la estimulación del crecimiento podría hacerse por otra vía. Un ejemplo sería incrementar la actividad CDH previamente observada *in vitro* y así elevar la asimilación de celulosa; algunos estimuladores de esta enzima hallados en un hongo de la pudrición blanca, *Schizophyllum commune*, fueron: pH ácido, Tween 80, celulosa, polvo de algodón (sin ceras) y también varias sales de amonio especialmente el fosfato ácido de di amonio (Fang *et al.*, 1999). Entonces la presencia de N-NH₄ sería responsable también de la mejora en el crecimiento micelial de *G. sordulenta* cuando el sustrato basal fue suplementado con sulfato de amonio.

Tabla 34. Velocidad de colonización por micelio de *Grifola sordulenta* de diferentes sustratos a base de cáscara de girasol, a los 35 días de cultivo. Sustrato basal (S1): 80% cáscara de girasol entera, 15% sustrato biotransformado por *Pleurotus ostreatus* y 5% salvado de trigo, sobre la base de peso seco. El sustrato basal fue tratado con ácido sulfúrico, o suplementado con sales minerales o con materiales lignocelulósicos o con aceite de girasol. La densidad aparente se clasificó con 0, +, ++, +++ y ++++ (“!” indica que la respuesta de crecimiento micelial resultó ser mejor que en el sustrato basal).

Tratamientos	Velocidad de colonización		Densidad aparente del micelio
	mg PSS/día ± EE _{ANOVA}	^a	
S1 Basal	117 ± 4,7	a	+++
S2 SO ₄ H ₂ 0,01N	118 ± 4,7	a	+++ !
S3 NH ₄ (I) 200ppm	109 ± 4,7	ab	+++
S4 Mn(II) 20ppm	111 ± 4,7	ab	+++ !
S5 Cu(II) 100ppm	64 ± 4,7	de	+
S6 Zn(II) 100ppm	118 ± 4,7	a	+++ !
S7 Roble 20%	79 ± 4,7	cd	++
S8 Álamo 20%	89 ± 4,7	bc	+
S9 Paja trigo 20%	64 ± 4,7	de	+
S10 Aceite girasol	50 ± 4,7	e	+

^a Los valores de velocidad de colonización fueron transformados con la variable logaritmo natural, corresponden a 6 u.e. por tratamiento. El error estándar se calculó con: $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$. Las distintas letras indican las diferencias significativas determinadas con el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

La suplementación con Cu(II) a una dosis de 100 ppm inhibió fuertemente el crecimiento en *G. sordulenta* como pudo observarse en la marcada reducción tanto en la velocidad de colonización como en la densidad micelial aparente. Este marcado efecto micotóxico a esta dosis de Cu(II) no era esperado, ya que cultivos sumergidos de *G. frondosa* crecen bien aún hasta 200 ppm de Cu(II) (Figlas *et al.*, 2010). Vale mencionar aquí también que una concentración de 250 ppm de Cu(II) resultó ser óptima para la estimulación de la actividad de lacasas en *Pleurotus pulmonarius* (Tychanowicz *et al.*, 2006). Es más, varios hongos de la pudrición blanca cultivados en medios semisólidos en agar pudieron crecer en presencia de hasta 630 ppm de cobre (Guillén y Machuca, 2008).

Como observación adicional se puede recordar el uso del cobre con fines de preservación de la madera a concentraciones por encima de las 500 ppm, cuando sobrepasa el umbral de atoxicidad biológica (Baldrian, 2003). La comparación de estos valores con el resultado hallado en *G. sordulenta* estaría indicando que se trata de una especie sensible a este metal pesado, y en todo caso el empleo del cobre como posible inductor del metabolismo ligninolítico debería realizarse con concentraciones del orden de 20 ppm, cercanas a las de la madera de árboles de *Nothofagus* spp. que coloniza esta especie de hongo.

La suplementación del sustrato base con 5% de aceite de girasol (S10) produjo una marcada inhibición de ambos, la velocidad de colonización del sustrato y el crecimiento micelial aparente de *G. sordulenta*. Este efecto inhibitorio podría estar relacionado con ciertos metabolitos secundarios en el

aceite con actividad antifúngica, como fue reportado para hongos ascomicetes (Picman *et al.*, 1990; Ko *et al.*, 2003). En la sección anterior se demostró que en el caso de *G. gargal* no produjo tal efecto inhibitorio.

Figura 66. Imágenes representativas de cultivos de *Grifola sordulenta* a los 35 días de colonización. Las formulaciones de sustrato basal (S1) fueron suplementadas con: SO_4H_2 0,01N (S2), $\text{NH}_4(\text{I})$ 200 ppm (S3), $\text{Mn}(\text{II})$ 20 ppm (S4), $\text{Cu}(\text{II})$ 100 ppm (S5), $\text{Zn}(\text{II})$ 100 ppm (S6), virutas de roble 20% (S7), virutas de álamo 20% (S8), paja de trigo 20% (S9), o aceite de girasol 5% (S10).



3.3. Comentarios finales

La mejora de la colonización de sustrato a base de CG, por ambas especies de *Grifola*, puede llevarse a cabo mediante tratamientos hidrolíticos con ácido sulfúrico diluido en combinación con altas temperaturas, y mediante la estimulación del sistema enzimático con el agregado de manganeso y cinc. Según Lebrun *et al.* (2011) aún es posible causar un efecto sinérgico para la estimulación de enzimas suministrando un *coktail* de estos metales. Muy probablemente la combinación adecuada de estos últimos tratamientos -modificación estructural del material lignocelulósico de partida por tratamiento con ácido sulfúrico y uso de Zn y Mn como efectores enzimáticos- reunidos en una nueva fórmula de sustrato, permitiría si no una sinergia al menos potenciar la respuesta de crecimiento micelial de ambas especies del género, algo que no fue probado en este trabajo de tesis y que merecería ensayarse en un estudio posterior.

4. Conclusiones

Para *G. gargal* la colonización mejora con un tratamiento ácido del sustrato, o con el agregado de cofactores enzimáticos ($\text{Mn}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$), o de otras fuentes lignocelulósicas como roble, álamo paja de trigo; para *G. sordulenta* se encontró que la colonización mejora sólo en cuanto a la densidad con un tratamiento ácido del sustrato, o con el agregado de cofactores enzimáticos ($\text{NH}_4(\text{I})$, $\text{Mn}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$).

C. Estudios preliminares para el cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos formulados con cáscara de girasol

1. Introducción

El cultivo de los hongos requiere poseer un profundo conocimiento del ambiente ecofisiológico, *i.e.* del hábitat natural que ocupan. Ello luego permite el ajuste de la fórmula del sustrato y de los parámetros ambientales para obtener un cultivo artificial optimizado y en otras palabras lograr la domesticación de la especie. De esta manera, los ensayos *in vitro* realizados con *G. gargal* y *G. sordulenta* durante el transcurso del trabajo de esta tesis fueron importantes para conocer las condiciones de crecimiento del micelio y las características morfogénicas que acompañaron al proceso de fructificación.

En este punto y previo al desarrollo del tema central de esta sección, resulta conveniente argumentar algo más detenidamente los aspectos anteriores, en función de la experiencia propia de campo y de los estudios presentados en las secciones previas.

En primer lugar, las especies de *G. gargal* y *G. sordulenta* bajo estudio son capaces de degradar lignina, compuestos aromáticos y carbohidratos como celulosa, xilulosa, almidón y pectina (capítulo II.D.). Se observó *in situ* donde ellas crecen que se desarrollan en un solo hospedante mientras que en condiciones de cultivo *in vitro* pudieron crecer en sustratos alternativos como granos de cereales y cáscara de girasol (capítulo IV y secciones previas de este capítulo). Asimismo, fue posible demostrar que las cepas que se disponían para este estudio producen particulares respuestas morfogénicas al frío, a la insuficiencia de nutrientes y a la luz (capítulo II.).

Es importante también destacar que el cultivo en estado sólido de estas especies permitiría preservar a los bosques nativos al suplantar la recolección artesanal y evitar así impactos negativos que llevarían eventualmente a un desequilibrio ecológico. Vale recordar ahora que estos hongos son recolectados en los bosques andinos chilenos y son vendidos en mercados de productos autóctonos (Valdebenito *et al.*, 2003).

Dicho lo anterior, resulta entonces apropiado el cultivo de estas especies no sólo por su hipotético valor medicinal sino además para la preservación ambiental. Como es conocido en tantos otros casos de hongos medicinales, aquí también el ajuste de las variables y de las condiciones necesarias para la corrida del micelio de estas especies en sustratos sintéticos y la subsiguiente fructificación permitirán su cultivo industrial, incluso favoreciendo la difusión de la tecnología de cultivo resultante para estas especies hacia otros lugares. Potencialmente, el sustrato gastado puede ser empleado para otros usos (Rinker, 2002).

Asimismo, no hay que dejar de señalar la escasez de cepas disponibles para el estudio que se propuso llevar adelante con estas especies, y que principalmente se enfocó hasta aquí en la comparación de sus características de cultivo, velocidad de colonización y actividad enzimática.

Por último, una limitación no menor y por ello importante de superar es su lento crecimiento, observado especialmente en sustratos lignocelulósicos, lo cual abre una ventana de oportunidad a

microorganismos competidores, cuando no se dispone de facilidades de infraestructura para asegurar su cultivo axénico. Ello plantea la necesidad de una mayor inversión en la instalación de tales facilidades, que en todo caso *a posteriori* y dependiendo de la utilidad sería justificable si su explotación resultase igualmente rentable.

Habiendo expuesto estas consideraciones generales, también es de utilidad citar el cultivo de otra especie del género, *G. frondosa*, que se ha podido realizar en distintos sistemas (Mayuzumi y Mizuno, 1997), incluyendo el que es de interés abordar en el presente estudio, *i.e.* el cultivo en “troncos sintéticos” con sustratos empaquetados en bolsas de polietileno (Shen, 2001) pero ahora usando a la cáscara de girasol como principal componente del sustrato para este sistema de cultivo. Otros sistemas de cultivo menos empleados en esta especie son el cultivo al aire libre (en camas o en troncos) y el cultivo industrial en botellas; los primeros tienen un ciclo largo de cultivo y los segundos producen fructificaciones demasiado pequeñas (Mayuxumi y Mizuno, 1997).

En los ensayos previos de TCL se determinó que si bien *G. gargal* y *G. sordulenta* también crecen en este tipo de sustrato, lo hacen más lentamente en comparación al resto de otras especies cultivadas anteriormente sobre sustrato conteniendo cáscara de girasol (Curvetto *et al.*, 2002a, 2002b; González- Matute *et al.*, 2002; 2010; Figlas *et al.*, 2007).

En cuanto a los estadios de crecimiento y desarrollo reproductivo de *G. gargal* y *G. sordulenta*, es esperable, por su relación filogenética con *G. frondosa*, que muestren una similitud con esta especie, lo cual puede ser una orientación para la estrategia de manejo del cultivo. En la **Tabla 35** se muestra una síntesis de tres protocolos para el cultivo de *G. frondosa* (Stamets, 1993; Huang, 1997; Montoya- Barreto *et al.*, 2008).

A continuación sigue una breve descripción acerca de las fases del cultivo y las operaciones que permiten conducirlo. La etapa inicial corresponde a la corrida del micelio que es el período en que el micelio presente en los granos de *spawn* coloniza el sustrato. Luego que el micelio cubre completamente la superficie externa del tronco sintético, el micelio madura y comienzan a generarse exudados, indicando que el mismo cambia su metabolismo al de crecimiento secundario con la típica presencia de compuestos del metabolismo secundario en estos exudados. Luego sigue la aplicación de un choque térmico, mediante una disminución significativa de la temperatura, el cual incrementa la formación de exudados y luego induce la formación de primordios. Para completar la fase de fructificación, los primordios formados deben exponerse a una mayor disponibilidad de oxígeno con remoción del CO₂, lo cual se logra con una ventilación adecuada, manteniendo condiciones de alta humedad. Durante su desarrollo, las fructificaciones poseen diferentes formas de diferenciación que según su apariencia se han denominado como *cerebro*, *coliflor* y *racimo* (Stott y Mohamed, 2004).

1.1. Hipótesis

Grifola gargal y *G. sordulenta* pueden alcanzar la etapa de generación de primordios y eventualmente desarrollar fructificaciones maduras cuando son cultivadas en troncos sintéticos conteniendo sustratos basados en cáscara de semilla de girasol en condiciones que se asemejarían a las

del cultivo de *G. frondosa* y una aproximación de las condiciones ambientales normales en el hábitat de fructificación.

1.2. Objetivos

En esta sección se presenta un estudio preliminar con cinco ensayos de fermentación en estado sólido para el cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en la modalidad de tronco sintético con sustratos elaborados a base de cáscara de girasol.

Tabla 35. Parámetros ambientales y operativos del cultivo de *Grifola frondosa* según otros autores. **A:** Stamets, 1993; **B:** Huang, 1997; y **C:** de Montoya- Barreto *et al.*, 2008. La ventilación se expresa como el número de volúmenes del aire del ambiente renovado por día.

A	Corrida de micelio		Inducción de primordios	Fructificación (inicio)	Fructificación (desarrollo)
Temp. (°C)	21/ 24		10/ 15,6	10/ 16	13/ 18
HR (%)	95/ 100		95	95	85/ 90
Duración (días)	14/ 30		30 (maduración) 5/10(crecimiento)	10/14	14/ 21
CO ₂ (ppm)	20.000/ 40.000		2.000/ 5.000	2.000/ 5.000	< 1.000
Ventilación	<1		4/8	4/8	4/8
Luz (lux)	-		100/ 500	100/ 500	500/ 1.000
B	Corrida de micelio		Inducción de primordios		Fructificación (inicio + desarrollo)
Temp. (°C)	22/ 23		22/ 23		16/ 18
HR (%)	70		70		85/ 95
Duración (días)	40		7		20/ 25
CO ₂ (ppm)	Tolera alta concentración		3.000 (bolsas separadas)		1.000/ 1.500
Luz (lux)	-		50		200/ 500
C	Corrida de micelio	Formación de exudados	Inducción de primordios	Fructificación (inicio)	Fructificación (desarrollo)
Temp. (°C)	25 (7 días) 20/ 21(resto)	18/ 20	10	16/ 18	16/ 18
HR (%)	60/ 65	60/ 65	60/ 65	70/ 80	70/ 80
Duración (días)	30/ 35	40/ 45	1	7/ 10	3/ 5
Ventilación	-	-	-	2	12
Luz (lux)	-	-	-	50/ 100	50/ 100

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas

Las cepas empleadas en este estudio fueron la cepa A de *G. gargal* y la única cepa disponible de *G. sordulenta*. Ellas fueron obtenidas por el autor y mantenidas en medio MYPA modificado hasta la preparación del *spawn*, como se explicó previamente (ver capítulo II.A).

2.2. Spawn

El *spawn* se preparó con trigo (pH 6,4) (ver preparación en el capítulo IV ítem 2.1.) y se utilizó entre los 30 y 40 días desde la inoculación. Para realizar el quinto y último ensayo (*E5*), el *spawn* se preparó en base a granos de trigo; trigo/mijo (1:1); maíz; girasol; girasol/maíz (1:1), inoculados con estas cepas y especies según se explicó en el capítulo IV. En todos los ensayos la proporción de inoculación fue del 10-12% sobre la base de peso fresco. La inoculación de los sustratos fue llevada a cabo en condiciones de asepsia, bajo aire estéril en una cámara *ad hoc*.

2.3. Formulaciones de sustratos y elaboración de los troncos sintéticos

Los ingredientes y proporciones de las formulaciones empleadas se muestran en la **Tabla 36**. Luego de la determinación del contenido de humedad de los componentes del sustrato, se prepararon distintas formulaciones de sustrato que contenían material lignocelulósico (37,5%), sales de calcio (2,5%) y agua (60%). Los materiales lignocelulósicos se mezclaron a mano en un recipiente de 50 litros y luego fue agregándose el agua con las sales: 2% SO_4Ca y 0,5% CO_3Ca . Tras un período de 16 h en imbibición, se embolsó una cantidad de sustrato determinada gravimétricamente en bolsas de polietileno de 100 micras (unidades experimentales).

La formulación 1 (F1) se empleó en los cinco ensayos (*E1- E5*), este sustrato consistió en 100% cáscara de girasol (CG) (*Helianthus annuus*) como material lignocelulósico y fue incorporada entera (12 mm × 5 mm en promedio). La formulación 2 (F2) contenía CG entera como mayor componente y un 20% de paja de trigo (PT) (*Triticum aestivum*) suplementados con 3,75% de salvado de trigo (ST). La formulación 3 (F3) fue similar a F1, pero utilizando una combinación de CG entera y molida (2 mm × 1 mm en promedio).

En ambas especies, la formulación F1, sólo con CG entera, fue la que había mostrado la mejor performance de crecimiento micelial en el primer TCL, por eso se decidió probarla en todos los ensayos (*E1-E5*) y la F2 y F3 en los ensayos *E1* y *E3* respectivamente. Cabe mencionar que estos ensayos fueron realizados antes del segundo estudio con el TCL ya visto, por ello las formulaciones basales usadas en el mismo no se han incluido en los ensayos aquí presentados.

Se usaron bolsas de polietileno de 100 micrones y de dos tamaños: 12 × 20 cm y 15 × 30 cm, conteniendo dos cantidades de sustrato: 600 y 900 g, respectivamente. Las bolsas conteniendo el sustrato fresco fueron compactadas uniformemente para obtener troncos sintéticos con una densidad de 0,5 g/ml.

Se armó un cuello con el diámetro del tapón de algodón con el que luego la bolsa se cerró; el tapón se sujetó con cinta adhesiva o una banda elástica. El sustrato embolsado luego se esterilizó durante 2 h a 121°C.

En la **Tabla 37** se muestran para cada ensayo (*E1*, *E2*, *E3*, *E4* y *E5*) las formulaciones, *spawn*, unidades experimentales (u.e.), peso de sustrato y el ambiente donde se realizó cada fase del cultivo para cada uno de ellos.

Tabla 36. Composición de las fórmulas (F1-F3) de los sustratos para el cultivo de *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta* en troncos sintéticos (g/100 gramos de sustrato). CG: cáscara de girasol; PT: paja de trigo; ST: salvado de trigo.

Formulación	Material lignocelulósico (g)				Aditivos y agua (g)		
	CG entera	CG molida	PT	ST	CO ₃ Ca	SO ₄ Ca	agua
F1	37,5	-	-	-	0,5	2	60
F2	29,1	-	7,2	1,2	0,5	2	60
F3	18,75	18,75	-	-	0,5	2	60

Tabla 37. Cuadro resumen de las características principales de los ensayos de cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos, realizados separadamente. Se muestran las formulaciones, el *spawn*, el número de unidades experimentales (u.e.) utilizadas por tratamiento, el peso fresco de cada uno de los sustratos y los ambientes donde se realizó cada una de las fases del cultivo.

Ensayo	Formulaciones	Spawn	N° de u.e.	Peso fresco de sustrato	Fases y lugar de cultivo		
					Corrida	Inducción	Fructificación
<i>E1</i>	F1	Trigo	15	600	CCC-20	CCC-20	CCC-20
	F2	Trigo	15				
<i>E2</i>	F1	Trigo	20	600	CCC-20	nave de cultivo	nave de cultivo
<i>E3</i>	F1	Trigo	15	600	CCC-20	cámara fría	CCC-20
	F3	Trigo	15				
<i>E4</i>	F1	Trigo	20	900	CCC-20	cámara fría	cámara fría
<i>E5</i>	F1	Trigo	10	900	CCC-20	cámara fría	CCC-20
		Trigo:mijo	10				
		Maíz	10				
		Girasol	10				
		Maíz:girasol	10				

2.4. Condiciones ambientales

En las secciones siguientes se describen las condiciones ambientales de cada ensayo y en la **Tabla 38** se presenta un resumen de las mismas.

2.4.1. Corrida del micelio

La corrida del micelio fue igual para todos los ensayos; se hizo en oscuridad a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ con una humedad programada del 60 % HR y con un recambio de aire de aproximadamente 10 litros por hora. Se utilizó la cámara de cultivo CCC-20 (Lab. Electrónica CTT-BB, CONICET), que posee un volumen de 420 litros, lo cual implica que un 80% del volumen total era reemplazado diariamente.

2.4.2. Inducción de primordios

La inducción de primordios se hizo mediante la exposición del micelio a una temperatura menor que la de corrida y manteniendo la oscuridad. Este período abarca ambos procesos, la formación de exudados y la emergencia de los primordios.

En el *E1* se disminuyó la temperatura a $10\text{-}12^\circ\text{C}$, con un termoperíodo programado de 16 h a 10°C y 8 h a 12°C . Estas condiciones se mantuvieron durante un mes.

En el *E2*, realizado en la nave de cultivo, la inducción de primordios se produjo por las bajas temperaturas del invierno (durante 30 días a T° mín.: $-1/3^\circ\text{C}$ y T° máx.: $5/10^\circ\text{C}$, mes de Junio). En la nave de cultivo, la ventilación con aire filtrado fue provista de manera de obtener una renovación suficiente del aire, el que fue humidificado para una humedad de por lo menos 95%.

La inducción de primordios en los *E3*, *E4* y *E5* se realizó en una cámara fría con temperatura controlada ($5 \pm 2^\circ\text{C}$), sin control automatizado de la humedad, la cual que se mantuvo en el rango de 60 -70 % con aplicaciones diarias de un *spray* con agua destilada. La cámara posee 40 m^3 , y se consideró que al menos una vez al día el volumen de aire era recambiado.

2.4.3. Fructificación

En los ensayos *E1*, *E3* y *E5* (cámara CCC-20) la fase de fructificación se hizo en un fotoperíodo de 8 h, y en el *E1* con una alternancia de temperatura desde 12°C en este último a 10°C en el nictoperíodo. En el *E3* y *E5* esa alternancia fue de 8°C en el fotoperíodo y de 5°C en el nictoperíodo. Durante esta fase de fructificación la luz fue provista por un tubo fluorescente de luz blanca, con un flujo de radiación de $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (ver detalles en el capítulo II.D ítem 2.2.1.). Los recambios de aire en el *E1* y *E3* se ajustaron con una mayor apertura del conducto de ventilación de la cámara y se estimó una renovación de al menos 2 recambios diarios del volumen de la cámara.

Una vez formados los primordios, las bolsas se abrieron para exponer los primordios permitiendo que el plástico recortado los protegiera. Cuando fue conveniente exponer una fructificación desde el costado de la bolsa, se lavó la zona con etanol 70% y se empleó un bisturí estéril para evitar la contaminación del primordio.

Durante la fase de fructificación en el *E1* la humedad se mantuvo a 90 % HR con el generador de

niebla automático de la cámara. Con este sistema se produjeron goteos por condensación en el techo de la cámara que favorecieron la contaminación. Por esta razón en los ensayos *E3* y *E5* se probó otra forma de humidificación consistente en el uso de fuentes de vidrio planas con 3 litros de agua destilada y telas de algodón absorbente de 30 × 60 cm con uno de sus extremos sumergidos en el agua y elevadas para maximizar la evaporación, logrando de esta forma una HR del 85%.

En el ensayo *E5* se utilizó nuevamente este sistema y además se buscó saturar de humedad el ambiente de la cámara mediante el burbujeo de aire en un Erlenmeyer conteniendo 3 litros de agua destilada. Este burbujeo se aplicó 5 minutos (equivalente a un cambio de aire de la cámara) 8 veces al día. De esta forma se logró mantener una humedad del 95% HR, mayor que en el *E3*. El aire comprimido se aplicó desde un compresor de 25 litros y 2 HP, con un caudal de 200 l/minutos (BTA[®] Argentina). Como se dijo, también sirvió para aumentar la ventilación.

La fase de fructificación en el ensayo *E2*, realizada en la nave de cultivo, transcurrió dentro de la siguiente amplitud térmica: T° mín.: 2-5 °C - T° máx.: 5-10°C. En la nave de cultivo la intensidad lumínica fue de un máximo de 500 lux provenientes de la luz natural. Las condiciones de humedad para la inducción y fructificación fueron de *quasi* saturación continua (>95% HR). La determinación de la humedad se realizó con un higrómetro portátil (*Lufti*[®], Alemania).

La fase de fructificación en el ensayo *E4* se hizo en la cámara fría antes mencionada. Durante esta etapa se mantuvo una mayor humedad en cada u.e. formando un tubo con una bolsa de plástico de 10 litros y un algodón humedecido en la base de cada u.e. (entre la bolsa protectora y el tronco sintético). Las bolsas protectoras y el algodón se humedecían con un *spray* de agua destilada dos veces al día. Se suministró luz blanca fluorescente en un fotoperiodo de 8 horas.

2.5. Operaciones durante las diferentes fases del cultivo

Durante la corrida del micelio se realizaron observaciones visuales a fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el 100% de colonización y eventualmente descartar u.e. contaminadas. También se controló la humedad que fue considerada apropiada cuando aparecían gotitas de condensación muy pequeñas sobre el plástico de la bolsa en su parte superior. Por el contrario, cuando se acumuló líquido en el fondo del tronco sintético fue considerada en exceso y se procedió a drenarlo practicando en el fondo un corte con bisturí.

Una vez que el sustrato resultó completamente colonizado, es decir cuando el sustrato superficialmente visible estaba blanco, las u.e. se colocaron en condiciones inductivas para intensificar el metabolismo secundario y con ello la aparición de exudados, seguido de la formación de primordios (ver 2.4.2).

Para permitir el progreso de la fase de fructificación, con los esperables cambios morfogénicos hasta el fruto, se expusieron los primordios a una mayor ventilación. En los casos en que se obtuvieron basidiomas, ellos se cosecharon cuando se consideraron maduros ya en su última etapa de *racimo*, tomándolos desde su pie central.

2.6. Degradación de componentes del sustrato

Una manera de estimar la biotransformación del sustrato es mediante el análisis de la degradación de fibras previo y posterior al crecimiento del micelio (ver también secciones B y C de este capítulo). A fin de tener una visión aproximada de tal biotransformación, se realizó este análisis con la técnica de Van Söest al sustrato de troncos sintéticos colonizados (ver en este capítulo sección B).

Para ello se tomaron muestras de sustrato de cáscara de girasol correspondiente a la fórmula F1 a distintos tiempos de colonización, siendo a los 0, 70, 150, 180 y 210 días en el caso de *G. gargal*, y a los 0, 90 y 150 días en el caso de *G. sordulenta*. Se tomaron alícuotas de ca. 15 g de cada bolsa y desde distintas zonas: central y laterales, y con ellas se preparó un *pool* por muestra, que luego se molió con un *Udy Cyclone Mill* (USA).

Similarmente, se procedió a recoger muestras en un tronco sintético de *G. gargal* de 210 días. En este caso las muestras se analizaron por separado para comparar la degradación de los componentes. Consistieron en sustrato proveniente de tres zonas del tronco: zona central, región superficial alejada de una zona de fructificación y en una región superficial debajo de un basidioma.

Además, con el objetivo de tener un término de comparación con la actividad biotransformadora de otros hongos de la pudrición blanca, se hizo un análisis similar en troncos sintéticos de 150 días provenientes del cultivo de *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa*, *Ganoderma lucidum* (cepa E47) y *P. ostreatus*. Cabe mencionar que el tiempo de recolección de muestras para este estudio superó los tiempos de fructificación de las diferentes especies; y con el fin de mantener el cultivo en su actividad degradativa, se cosecharon los frutos al estado de madurez.

Tabla 38. Parámetros ambientales y operativos del cultivo en las diferentes fases del crecimiento de *Grifola gargal* y de *Grifola sordulenta* cultivados en troncos sintéticos formulados a base de cáscara de girasol. La ventilación se expresa como el número de volúmenes del aire del ambiente renovado por día.

Ensayo 1	Corrida de micelio	Inducción de primordios	Fructificación
Ambiente	CCC-20	CCC-20	CCC-20
Temperatura (°C)	18	10 - 12	10 (noche)- 12 (día)
HR (%)	60	60	90
Duración (días)	40 - 60	30	120 - 210
Ventilación	0,8	0,8	4
Luz (lux)	-	-	500
Ensayo 2	Corrida de micelio	Inducción de primordios	Fructificación
Ambiente	CCC-20	Nave de cultivo	Nave de cultivo
Temperatura (°C)	18	-1 - 5	2 - 10
HR (%)	60	>95	>95
Duración (días)	40 - 60	30	15 - 30
Ventilación	0,8	>8	>8
Luz (lux)	-	-	<500
Ensayo 3	Corrida de micelio	Inducción de primordios	Fructificación
Ambiente	CCC-20	Cámara fría	CCC-20
Temperatura (°C)	18	5	5 (noche)- 8 (día)
HR (%)	60	55/ 65	90
Duración (días)	40 - 60	30	15 - 30
Ventilación	0,8	1	4
Luz (lux)	-	-	500
Ensayo 4	Corrida de micelio	Inducción de primordios	Fructificación
Ambiente	CCC-20	Cámara fría	Cámara fría
Temperatura (°C)	18	5	5
HR (%)	60	55/ 65	70/ >95
Duración (días)	40 - 60	30	15 - 30
Ventilación	0,8	1	1
Luz (lux)	-	-	500
Ensayo 5	Corrida de micelio	Inducción de primordios	Fructificación
Ambiente	CCC-20	Cámara fría	CCC-20
Temperatura (°C)	18	5	5 (noche) 8 (día)
HR (%)	60	55/ 65	95
Duración (días)	40 - 60	30	15 - 30
Ventilación	0,8	1	8
Luz (lux)	-	-	500

3. Resultados y discusión

A continuación se presentan y discuten los resultados del cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos. En esta sección se hacen algunos comentarios sobre aspectos metodológicos que se consideran relevantes y que colaboran en la interpretación de los resultados.

3.1. Inoculación y *spawn*

El cultivo axénico en un sentido estricto requiere que el mismo se realice en un sustrato estéril y que en el desarrollo del cultivo las condiciones de asepsia ambiental sean conservadas. En el estudio presente, debido a las facilidades disponibles, el cultivo de las especies de *Grifola* spp. se inició solamente con sustrato estéril, el cual para ello fue autoclavado. Era esperable y dependiendo del tamaño de la masa a esterilizar como la usada en los troncos sintéticos bajo estudio, que dos horas de autoclavado a una sobrepresión de una atmósfera, resultase suficiente para matar microorganismos competidores y luego una segunda esterilización realizada de la misma forma eliminaría el posible surgimiento de microorganismos o sus formas de resistencia que hubiesen sobrevivido al primer autoclavado. Se consideró importante separar bien las bolsas de polietileno en el autoclavado de los sustratos por dos motivos, el primero y más importante es para asegurar que el vapor sobrecalentado circule adecuadamente entre ellas y el segundo evitar que se peguen entre sí.

Las cepas seleccionadas para realizar el *spawn* fueron la cepa A de *G. gargal* ya que la misma había mostrado los mejores valores de velocidad de crecimiento respecto a las demás cepas, así como actividad ligninolítica y respuestas morfogénicas positivas (ver capítulo II.). En el caso de *G. sordulenta*, como se mencionó anteriormente, solo se disponía de una cepa, que también pudo cultivarse en los medios conteniendo compuestos fenólicos y también mostró respuestas morfogénicas comparables a la cepa A de *G. gargal* (ver capítulo II). El *spawn* debe ser fácil de distribuir en el sustrato.

En el ensayo E5 se estudió, durante la corrida del micelio, la velocidad de colonización del sustrato F1 en relación al tipo de *spawn* preparado con trigo, trigo: mijo (8:2), maíz; girasol; maíz: girasol (1:1). No se hallaron diferencias en cuanto al número de días en alcanzar la colonización completa del sustrato contenido en las u.e., que fue entre 40 y 60 días. Además todos los granos fueron colonizados de manera similar en cuanto a la densidad aparente de micelio en las bolsas. Por lo cual se concluyó que todos ellos son adecuados para ser empleados como *spawn*. Algunas imágenes representativas de los primeros días de corrida del sustrato inoculado se muestran en la **Figura 67**

Para poder conseguir una colonización rápida del sustrato, en los ensayos del presente estudio, se usó una alta proporción de inoculación con 10-12 % de *spawn*. Usualmente, cuando las cepas de cultivo están satisfactoriamente adaptadas al cultivo artificial se emplean proporciones de inoculación menores al 10% (Chang y Miles, 2004). Sin embargo en este caso, a juzgar por los extendidos tiempos de colonización observados podrían emplearse aún proporciones mayores para incrementar la velocidad de colonización, siempre y cuando se evite un rápido crecimiento micelial que podría

ocasionar una auto inhibición por aumento de la temperatura metabólica (Stamets, 1993), situación que debería evaluarse.

Figura 67. Estados iniciales de la corrida de micelio de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en sustrato a base de cáscara de girasol. El sustrato fresco de cáscara de girasol (900 g) se inoculó con 10-12% de *spawn*. **A:** corrida de sustrato inoculado con granos de trigo colonizados por *G. gargal* (5 días). **B:** corrida de sustrato inoculado con granos de maíz colonizados por *G. gargal* (15 días). **C:** corrida de sustrato inoculado con granos de maíz colonizados por *G. sordulenta* (15 días).



3.2. Corrida del micelio

La evolución del crecimiento de *G. gargal* y/o *G. sordulenta* desde la inoculación hasta la colonización completa en el sustrato se pudo estimar mediante la observación a través de la superficie transparente de las bolsas de polietileno, obteniendo una estimación del porcentaje de superficie colonizada y densidad micelial aparente de colonización (**Figuras 67** y **68**). Por otra parte el crecimiento también se pudo estimar por la intensidad del aroma almendrado que fue tornándose más pronunciado hacia el final de esta fase; esta característica sin embargo, depende de la capacidad olfativa del operador.

En cuanto a las condiciones ambientales durante la corrida en el cultivo en tronco sintéticos, la temperatura es uno de los factores que más influye (Chang y Miles, 2004). En secciones anteriores, para *G. gargal* y *G. sordulenta* se determinó que a 18 y 20°C se obtenían mejores resultados que a 24°C durante la incubación en medios semisólidos o líquidos, sin embargo para el caso del cultivo en fase sólida sobre granos de trigo la mejor temperatura resultó ser 24°C. Se eligió entre estas la temperatura más baja, 18°C, ya que con ella se podrían prevenir posibles inhibiciones al crecimiento ocasionadas por termogénesis durante una posible colonización rápida (Pérez-Guerrera *et al.*, 2003).

En tal caso, también colabora en la prevención de inhibición por termogénesis la ventilación con aire húmedo (60% HR) y la aireación del tronco a través de los tapones de algodón.

Luego de esta serie de ensayos preliminares no se observaron respuestas anómalas como por ejemplo una aceleración del crecimiento con un cese súbito o zonas del sustrato sin colonizar. Por ello se consideró innecesario la aplicación de microperforaciones, como ha sido recomendado para el cultivos de otros hongos (Curvetto *et al.*, 2002a).

Dentro de cada tratamiento, que involucró tipo de especie fúngica, formulación de sustrato y/o tipo de *spawn*, se registró una gran heterogeneidad de respuesta de crecimiento en el tiempo necesario para culminar la colonización completa del sustrato. El rango temporal en ambas especies para culminar esta etapa se encontró entre los 40 y 60 días. Debido a la dispersión de los datos no se pudieron establecer diferencias entre masa de sustrato usada y las tres formulaciones ensayadas.

Este período de cultivo está en concordancia con lo observado en el primer TCL que en el caso de los tratamientos de *muy alto crecimiento* fue de 45 días. Vale mencionar que en ambos casos la tasa de inoculación fue del 10-12% p/p, ya sea de micelio o *spawn*. Lo anterior justifica el uso del TCL para la búsqueda de mejores fórmulas que luego puedan trasladarse al sistema de troncos sintéticos.

En este punto es importante mencionar que para *G. sordulenta* no se hallaron diferencias entre la formulación F2 conteniendo paja de trigo y CG (1:3) y la F1 conteniendo sólo CG (E1); incluso con la F2 se obtuvieron fructificaciones (ver 3.4), ello a pesar que en la evaluación realizada en el segundo TCL respecto del sustrato S9, el cual contenía paja de trigo, no se habían alcanzado los valores de S1, la formulación basal. Entonces, se pudo establecer que estos sustratos relacionados mostraron distinto comportamiento en el TCL y en el cultivo en troncos sintéticos, lo cual se atribuye parcialmente a que la combinación de paja de trigo con CG redujo la compactación del sustrato, y esto permitió conservar una buena aireación en el mismo por mayor cantidad de tiempo.

La densidad de 0,45 - 0,50 g/ml resultó ser apropiada para el cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos, sin embargo en esta modalidad de cultivo, fue posible observar que debido a los prolongados períodos de corrida del micelio la densidad resultó aparentemente modificada con un mayor empaquetamiento hacia la base de las bolsas en el caso de las formulaciones F1 y F3, lo cual pudo apreciarse táctil y visualmente. Acompañando a este proceso también se observó la acumulación de líquido en la base del tronco sintético en todas las formulaciones, lo cual resulta en un ambiente apropiado para el crecimiento de contaminantes, y por ello se drenaron. Este fenómeno debería considerarse en el cultivo industrial, donde el anegamiento podría evitarse con el sistema de bolsas colgadas (Stamet, 1993) y con perforaciones en su base.

Acorde con la bibliografía de *G. frondosa*, los tiempos necesarios para la corrida del micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta* fueron similares a los establecidos para el cultivo de esta especie modelo. Por ejemplo en troncos sintéticos de 3 kg con sustrato a base de virutas de madera se requieren tiempos de colonización de entre 30 y 60 días. Los factores que más afectan la cantidad de días en completar la colonización del sustrato en *G. frondosa* son la cepa, los sustratos y el tipo de suplementación (Stamets, 1993; Chen *et al.*, 1998; Shen, 2001; Stott y Mohamed, 2004; Montoya-Barreto *et al.*, 2008).

En cuanto al nivel de contaminación observado, en los primeros ensayos, E1 y E2, estuvo entre

80 % y 70%. La contaminación se debió a microorganismos aerobios oportunistas, y su presencia en el sustrato, si se descarta un defecto en la esterilización doble, puede adjudicarse a una falla operacional en el manejo técnico para la preservación de un nivel de asepsia exigente con el sistema de bolsa en el momento de la inoculación. Un eventual exceso de líquido en el sustrato también pudo ser causa de parte del problema. Las contaminaciones se encontraron sobre la superficie del sustrato en el área por debajo del tapón de algodón.

En vista de estos resultados y de las razones argumentadas que hubieran podido llevar a ellos, para los ensayos *E3*, *E4* y *E5* se buscó incrementar la preservación de la asepsia en el manejo del sistema al realizar la inoculación del sustrato. Así se logró disminuir la proporción de contaminación a un 40%, que aún resulta ser alta.

El cultivo axénico presenta la ventaja de un crecimiento sin competidores, sin embargo entre sus desventajas están el costo y la necesidad estricta de preservar la asepsia ambiental a fin de evitar que en cultivos de lento crecimiento crezcan y se desarrollen los microorganismos oportunistas aeróbicos.

Figura 68. Colonización con micelio de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en sustratos de diferentes fórmulas a distintos tiempos durante la fase de corrida. Las imágenes son muestras representativas de los resultados de los diferentes ensayos. Ensayo E1: *G. gargal* (A) a los 60 días de cultivo en F2 durante el E1; *G. sordulenta* (B) a los 60 días de cultivo en F1. Ensayo E2: *G. gargal* (C) y *G. sordulenta* (D) cultivados en F1, 40 días. Ensayo E3: *G. gargal* cultivado 50 días en F3 (E) y F1 (F), y *G. sordulenta* (G) cultivado a los 60 días en F3. Ensayo E4: *G. gargal* (H) cultivado 50 días en F1, y *G. sordulenta* (I) cultivado 60 días en F1. Ensayo E5: *G. gargal* (J) y *G. sordulenta* (K) cultivados en F1, 50 días, inoculados con diferentes granos de spawn.



3.3. Inducción de exudados y primordios

La inducción de exudados seguida por la producción de primordios se realizó mediante la exposición de los troncos sintéticos a un choque térmico mediante la disminución de la temperatura de cultivo durante un período dado.

La primera experiencia de inducción (E1) se realizó siguiendo las condiciones térmicas reportadas para *G. frondosa* por Stamets (1993) que consistieron en un descenso en 8°C a la temperatura del cultivo. Con este tratamiento de choque térmico se formaron exudados a los 10 días (Figura 69A); luego a los 30 días se formaron primordios (Figura 70A).

Figura 69. Formación de exudados en *Grifola gargal* y *G. sordulenta*. Los exudados se formaron en el transcurso de 30 días de maduración del micelio en los troncos sintéticos colocados a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, y en oscuridad. **A:** E1, *G. sordulenta* en F1, inoculado con *spawn* de trigo; **B:** E2, *G. gargal* en F1, inoculado con *spawn* de trigo; **C:** E3, *G. sordulenta* en F3; **D:** E5, *G. gargal* en F1 inoculado con *spawn* de trigo; **E:** E5 *G. gargal* en F1 inoculado con *spawn* de trigo: miijo; **F:** E5, *G. gargal* en F1 inoculado con *spawn* de girasol.



Para el ensayo siguiente (*E2*) se buscó intensificar este choque térmico dado que se había observado en las campañas de recolección que la fecha de fructificación y la cantidad de fructificaciones eran dependientes de la intensidad y cantidad de “heladas” (ver capítulo I ítem 3.2.). Por eso se probó con una disminución a 5°C aplicada hasta el desarrollo de primordios, durante un mes. Efectivamente, el parámetro observado en la naturaleza fue correlativo con lo ensayado en el laboratorio observándose una mayor intensidad en las respuestas aunque sin hallarse un adelanto en el tiempo necesario para que éstas se produzcan (**Figuras 69B-F y 70B-H**). En las experiencias siguientes se empleó el mismo choque térmico para la inducción de exudados y primordios (**Figuras 69C-F y 70B-H**).

Los exudados fueron observados en todas las u.e. de *G. gargal* y *G. sordulenta* y además fueron similares en todas las experiencias. En *G. gargal* fueron más oscuros de tonos marrones, que en *G. sordulenta*, donde fueron principalmente amarillos (**Figura 69**). El aroma almendrado que había empezado a manifestarse durante la corrida del micelio disminuye un poco en esta nueva fase. La apariencia de estos exudados es similar a la descrita en el cultivo semisólido en agar (ver capítulo II).

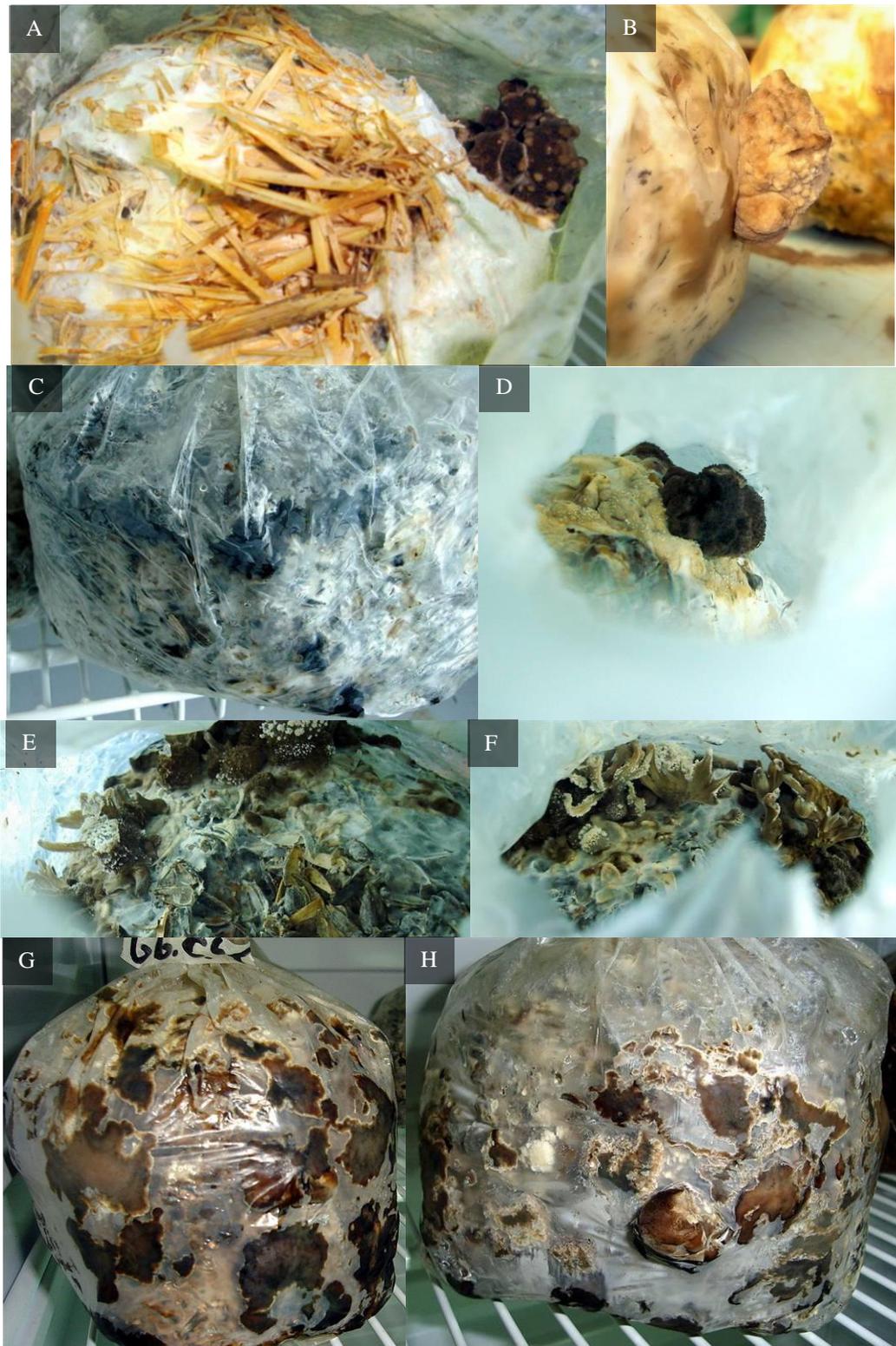
Siguiendo a la presentación de exudados ocurrió la inducción de primordios (**Figura 70**). Estos eventos fueron variables en cantidad y también en morfología, hallándose formaciones globosas a flabeladas, grandes a pequeñas, en gran número o no, de color marrón oscuro a beige claro (**Figura 70**). Al igual que en el caso de los exudados, estas estructuras son semejantes a las descritas en el cultivo semisólido en agar (ver capítulo II), lo cual sustentaría el uso de esos ensayos para mayor investigación de respuestas morfogénicas en estas especies.

Considerando cada ensayo y especie se estimó que el 80 % de las u.e. presentaba primordios. El surgimiento ocurrió a los 20-30 días posteriores al inicio del choque térmico.

No fue posible hallar un factor común para el otro 20% de u.e. que no desarrollaron primordios, si bien se observó en varios casos que a pesar de haber colonizado todo el tronco sintético poseían baja densidad micelial aparente, lo cual indicaría una necesidad umbral de biomasa para desarrollar el metabolismo reproductivo. Esta última proyección hipotética pudo ser observada en el cultivo semisólido que se muestra en la **Figura 19**, de donde surge tejido diferenciado de un cúmulo de micelio que fue inducido produciendo agujeros en el medio de cultivo con sacabocados estéril.

Finalmente, en el ensayo *E5*, se observó que *G. gargal* y *G. sordulenta* manifestaron una hiperproducción de primordios adjudicable a una falta de compactación del sustrato que dejó aire entre el sustrato y la bolsa. Esto perjudicaría eventualmente mucho la producción de hongos derivando las fuentes del sustrato en varios destinos y reduciendo el tamaño final de las fructificaciones (Stamets, 1993). Dos maneras de evitar esto serían colgando las bolsas y usando bolsas oscuras que no permitan el paso de la luz, ya que esta es una señal ambiental importante que influye en el desarrollo de primordios.

Figura 70. Imágenes de primordios de *Grifola gargal* y *G. sordulenta*. **A:** E1, *G. sordulenta* en F2; **B:** E2, *G. gargal* en F1; **C:** E3, *G. gargal* en F1; **D:** E3, *G. gargal* en F1; **E:** E4, *G. sordulenta* en F1; **F:** E4, *G. sordulenta* en F1; **G:** E5, *G. gargal* en F1; **H:** E5, *G. gargal* en F3.



3.4. Fructificación

En la presente serie de ensayos con *G. gargal* y *G. sordulenta* se evaluó el efecto de diferentes condiciones de temperatura, luz, humedad ambiental y ventilación (las condiciones de cultivo se muestran en la **Tabla 38**). Como referencia, se tomaron en cuenta los valores de dichos parámetros correspondientes al cultivo de *G. frondosa* que se muestran en la **Tabla 35**.

Respecto a la temperatura para la fructificación, hubo dos modalidades: mantener el rango térmico desde la inducción hasta el final de la fase de fructificación (ver ensayos *E1* y *E4*); y aumentar la temperatura de fructificación respecto de la de inducción pero conservar una menor temperatura respecto a la de corrida del micelio (ensayos *E3* y *E5*). En el caso del ensayo en nave de cultivo (*E2*) las temperaturas diarias habían aumentado levemente en la etapa en que las bolsas comenzaron a desarrollar los primordios.

En los ensayos *E1*, *E3*, *E4* y *E5* se usó luz fluorescente mientras que el *E2* recibió luz ambiental, aunque en baja intensidad. Para el caso de la humedad, ésta se elevó al máximo evitando a la vez disminuir la ventilación, lo cual fueron los factores más difíciles de ajustar experimentalmente.

En el ensayo *E1* se obtuvieron fructificaciones en ambas especies que manifestaron estadios similares a los citados para *G. frondosa*: *cerebro* a *coliflor* y finalmente *racimo* (Stott y Mohamed, 2004). El porcentaje de las unidades experimentales iniciales que llegaron a esta etapa fueron el 20% en *G. gargal* y el 17% % en *G. sordulenta*. De ellas 6 y 5 u.e. para *G. gargal* y *G. sordulenta* presentaron primordios. Estos permanecían una a dos semanas como tales hasta que comenzaba el desarrollo según la secuencia de formas que conducen a la fructificación madura y que se inician con la etapa de *cerebro*. De éstas fueron dos u.e. de cada especie alcanzó la etapa final de *racimo*, el resto se contaminaron en las etapas de *cerebro* y/o *coliflor*. La causa de esto se debió a que el sistema de humidificación de la cámara formaba condensaciones de gotas que mojaban las u.e.

El tiempo requerido para el proceso *cerebro-coliflor-racimo* fue de 2 a 3 semanas. Las fructificaciones maduras fueron similares morfológicamente a las que se pueden hallar en la naturaleza aunque más pequeñas, alcanzando un tamaño de 10-12 cm × 5-8 cm (diámetro mayor × diámetro menor) (**Figura 71**). En el caso de *G. gargal* los basidiomas pesaron 12 g en promedio y presentaron contenidos de agua de *c.a.* 83%; la eficiencia biológica resultó de 5 %. En *G. sordulenta* las fructificaciones pesaron 14 g y su contenido de agua fue similar, de 85%, y valores de eficiencia biológica de 6%.

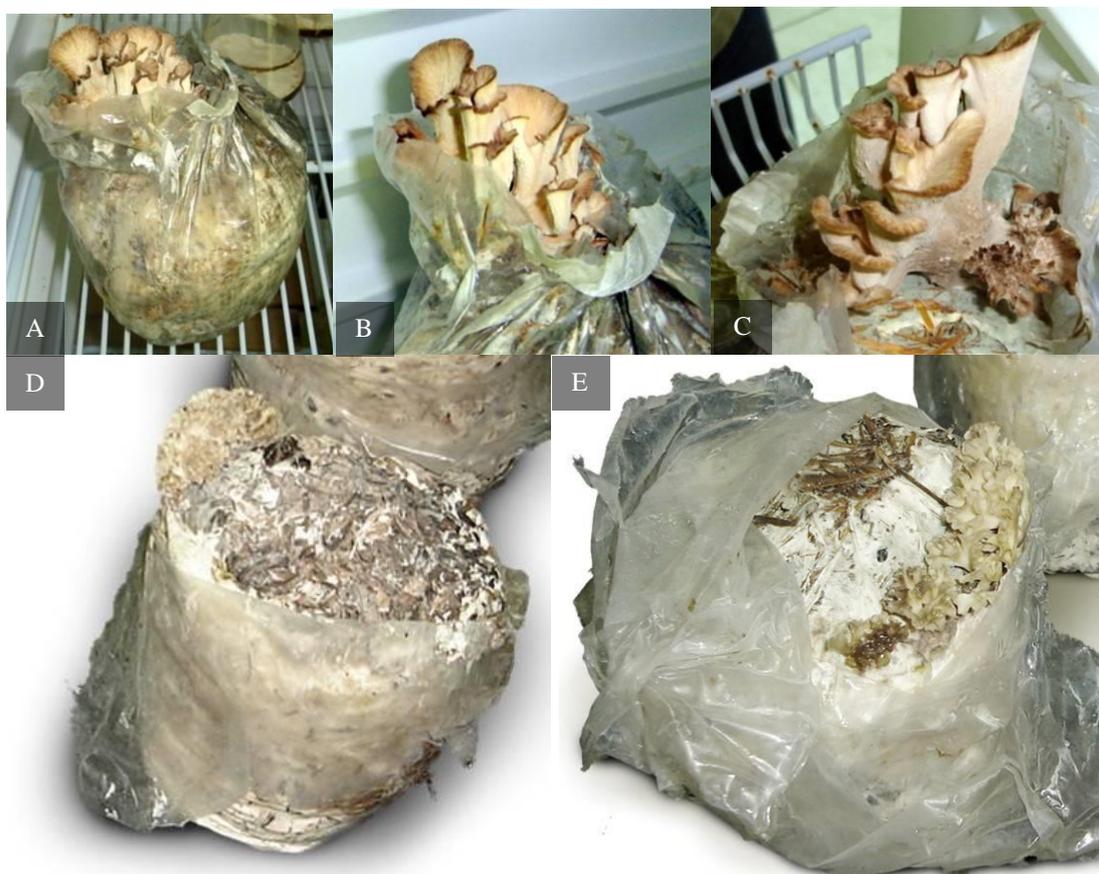
Harada (2007) cultivó *G. gargal* en virutas de maderas (incluyendo virutas de roble pellín) con 60% de contenido de agua y obtuvo valores de eficiencia biológica del 13%. En estas experiencias el ciclo de cultivo llevó 90 días y se realizó en bolsas de 2,2 kg.

En el *E2*, el 40% de las u.e. de cada especie alcanzaron esta etapa, y todas desarrollaron primordios. La etapa de *cerebro* se inició dos semanas después de la aparición de los primordios (**Figura 72**), y desde el traslado de los troncos a la nave de cultivo transcurrieron 6 ½ semanas.

Esta etapa se demoró con respecto al *E1* y mientras se desarrollaba la cuarta semana, estando todavía en etapa de *cerebro*, se contaminaron todas las u.e. Las causas de este crecimiento lento se

atribuyeron principalmente a períodos con muy bajas temperaturas, por lo que en los ensayos subsiguientes, *E3* y *E5*, se buscó incrementar este rango térmico a 5-8°C.

Figura 71. Fructificación de *Grifola gargar* y *G. sordulenta* obtenidas en el *E1*. Las figuras **A**, **B** y **C** corresponden a fructificaciones de *G. gargar* obtenidas en el cultivo con la formulación F1. Las figuras **C** y **D** son de *G. sordulenta* obtenidas en F1 y F2, respectivamente.



En una fructificación en etapa de *cerebro* de *G. gargar* se determinó su peso fresco (15 g) y luego el peso seco (6 g). Con estos datos y asumiendo que el peso seco del fruto sería similar al de la fructificación en etapa de *racimo*, se estimó que las fructificaciones maduras tendrían un peso fresco cercano a los 24 g lo cual representaría a su vez una eficiencia biológica cercana al 10 %.

En el ensayo *E3* se llevó adelante la etapa de fructificación en cámara de cultivo (CCC-20) combinando las condiciones que se determinaron favorables de los ensayos *E1* y *E2*: un rango térmico más bajo cercano al *E2* y evitando los problemas de exceso de humedad causados por el goteo en el ensayo *E1*. Para esto último se reemplazó el sistema de niebla de la cámara por el uso de fuentes conteniendo agua destilada (ver 2.4.3). Se alcanzaron valores de humedad de 85% HR, sin embargo para mantener este valor fue necesario reducir la ventilación cerrando la ventana de intercambio de aire en un 50% respecto al *E1*, que se había colocado al 100% de apertura.

En estas condiciones se evaluó la progresión del desarrollo de la fructificación en 6 u.e. con cada

especie que habían alcanzado la fase de diferenciación de primordios (40% de las u.e. iniciales). Se encontraban 4 y 3 u.e. de F1 para *G. gargal* y *G. sordulenta*, respectivamente, el resto eran F3.

Figura 72. Basidiomas en etapa de *cerebro* de *Grifola sordulenta* (A) y *G. gargal* (B y C) durante el E2.



En *G. sordulenta* (**Figura 73**) hubo un caso que se desarrolló hasta la etapa de *coliflor*, con la formulación F1 (**Figura 73B**), en este caso y en concordancia con los datos anteriores a la cuarta semana se contaminó.

El peso fresco obtenido en el basidioma de *G. sordulenta* fue de 10 g y su peso seco de 3 g (contenido de agua: 70 %). En el resto de las u.e. tanto de *G. sordulenta* como de *G. gargal* el desarrollo no pasó de la fase de *cerebro* y luego se contaminaron en el período de 2 a 4 semanas desde la colocación en las condiciones de fructificación. Entre estas algunas habían abortaron la morfogénesis, ya que había indicios de que el micelio permanecía activo pero la fructificación se mantenía igual conforme pasaba el tiempo.

Se ha indicado que los políporos en cultivo respecto a los hongos con laminillas toleran mejor menores valores de humedad ambiente (Stamets, 1993); sin embargo este no fue el caso para *G. gargal* y *G. sordulenta*, ya que en el presente estudio, un ambiente con un contenido de humedad menor al 85% inhibió el proceso de fructificación.

Sin embargo parecería que sí comparten con *G. frondosa* el requerimiento de grandes cantidades de aire renovado (Stott y Mohamed, 2004), que no fue posible suministrar durante el E3 y se consideró que fue la condición que inhibió el crecimiento y luego brindó la oportunidad a los microorganismos oportunistas de crecer sobre los primordios y fructificaciones.

El empleo de unidades experimentales pequeñas permitió hasta este punto estudiar las fases de corrida e inducción, sin embargo para la etapa de fructificación surgieron dificultades por lo cual se intentaron introducir mejoras en los ensayos subsiguientes, E4 y E5.

Entre las mejoras introducidas se incrementó la masa de sustrato en el tronco a 900 g, ya que se argumentó que la biomasa generada en las u.e. de 600 g no era suficiente para sostener el desarrollo de las fructificaciones. La otra mejora fue incrementar la ventilación evitando disminuir la humedad.

En el ensayo E4 se realizó la inducción y fructificación en cámara fría (5°C), en este caso la temperatura de fructificación fue menor que en los demás ensayos (a excepción del E2) pero el aire

diario renovado era mayor que en la cámara CCC-20 (**Figura 74**). La humedad fue provista por aspersión en un sistema *ad hoc* (ver 2.4.3) que hizo que la humedad sea fluctuante (70 y >95% HR). Al respecto se conoce que para el cultivo de *G. frondosa* las condiciones de humedad fluctuante son satisfactorias para la producción de basidiocarpos (Stott y Mohamed, 2004).

Figura 73. Formaciones morfológicas de *Grifola gargal* cultivado en F1 (**A**) y basidioma iniciando la etapa de *coliflor* de *G. sordulenta* cultivado en F1 (**B**) durante el E3.



Esta fase del ensayo se inició con 8 u.e. de *G. gargal* y 7 de *G. sordulenta*. Luego de 1 a 2 semanas desde la aparición de los primordios se formaron las fructificaciones iniciando la fase de *cerebro*. De todas la unidades experimentales, 3 de *G. gargal* y 2 de *G. sordulenta* avanzaron hasta *racimo*, mientras que el resto se contaminaron en la etapa *cerebro* y/o *coliflor*.

Las u.e. que llegaron a *racimo* mostraron una morfología levemente mejores a las del ensayo E1, siendo estos dos ensayos los que mostraron las fructificaciones más semejantes a las halladas en la naturaleza. El peso en promedio de las mismas en este ensayo fue de 10 g en *G. gargal* y 8 g en *G. sordulenta*, lo cual representa una eficiencia biológica cercana al 3 y 2% respectivamente, por lo que la mayor proporción de sustrato no aumentó proporcionalmente la eficiencia biológica para este estadio.

Finalmente en el último ensayo, el E5, se incrementaron los cambios de aire sin afectar la humedad mediante un sistema de burbujeo con un compresor de aire, es decir una mejora de las condiciones ambientales del E3. El ensayo se desarrolló con 9 u.e. de *G. gargal* y 7 u.e. de *G. sordulenta*. Entre ellas había u.e. inoculadas con diferentes granos de *spawn*, lo cual no se consideró como una fuente importante de variación para el estudio del proceso de fructificación.

En toda esta serie de u.e. de *G. gargal* se produjo una mata micelial de color marrón-beige claro-violeta (**Figuras 75A-D**). La misma fue análoga a la mata gris que ocurre antes de la fase de cerebro en *G. frondosa* (Stott y Mohamed, 2004), y que no se había formado en los ensayos anteriores. Desde esta se desarrollaron los primordios y luego las estructuras de estado de cerebro. Sólo en 3 u.e. de *G. gargal* se avanzó hacia fructificaciones, las cuales fueron flabeliformes y en general carentes de la estructura normal (**Figuras 76A-C**). Éstas y las demás formaciones se contaminaron en el período de 2 a 3 semanas.

Figura 74. Basidiomas de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* durante el E4. Fructificaciones en etapa de racimo de *G. gargal* (A y B) y *G. sordulenta* (C y D); y fructificaciones en etapa de cerebro en *G. gargal* (E) y *G. sordulenta* (F).



Por otra parte en *G. sordulenta* no se desarrolló la mata micelial y los primordios avanzaron hasta *cerebro* donde también luego de un período de 2-3 semanas, terminaron contaminándose (**Figura 75D**).

Si bien pareciera que la ventilación con humedad alta mejoraba las condiciones respecto al ensayo *E3*, también incrementó el ingreso de contaminantes lo cual aceleró el proceso de contaminación a 3 semanas desde la colocación de la ventilación forzada (**Figura 76D**).

Lo anterior sugiere que bajo estas condiciones de temperatura (5-8°C), humedad (85-95% HR), ventilación (8 cambios diarios) y luz (500 lux, fluorescente blanca) sería factible el cultivo artificial de estas especies si se pudiera proveer de aire estéril.

Figura 75. Mata de micelio marrón de *Grifola gargal* formadas durante el *E5* (**A, B, C**) y basidioma de *G. sordulenta* iniciando la fase de *cerebro* (**D**).

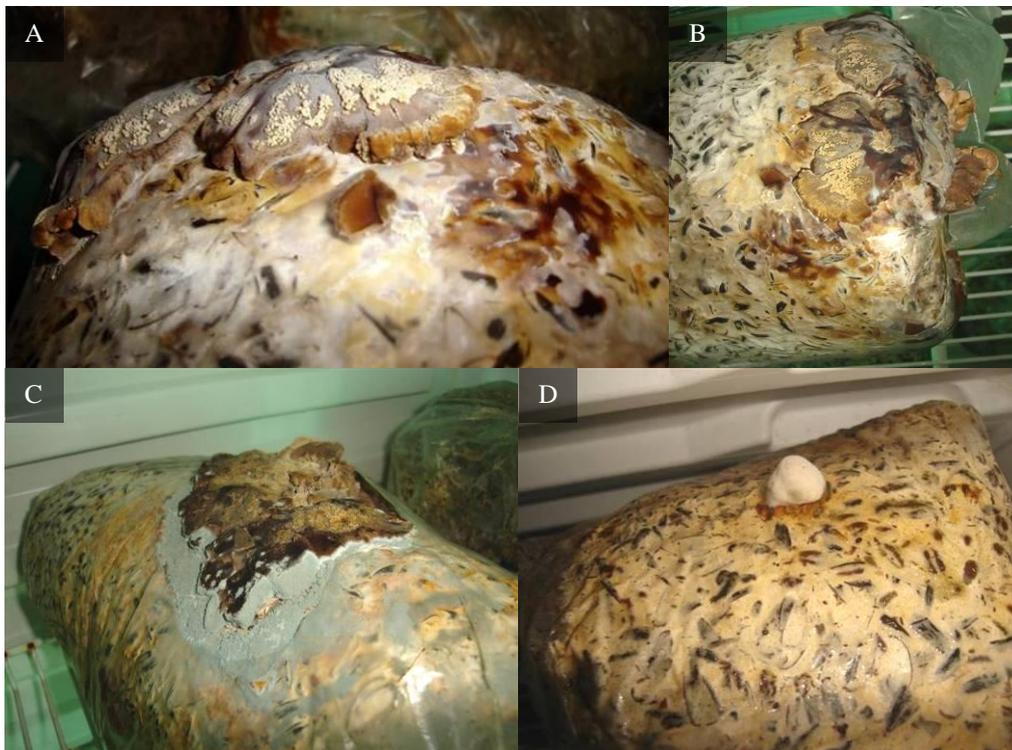


Figura 76. Fructificaciones en etapa de *racimo* de *Grifola gargal* formadas durante el E5 (A, B, C) y sistema de ventilación forzada realizada con la ayuda de un compresor de aire (D).



3.5. Degradación de componentes del sustrato

La degradación de la materia orgánica en la F1 por *G. gargal* y *G. sordulenta* en troncos sintéticos fue inferida por el incremento del contenido de cenizas del sustrato.

El incremento del contenido de cenizas en la formulación luego de 150 días de colonización por *G. gargal* fue desde 7 a 9 % y sobre el día 210 alcanzó un valor de 13% (**Figura 77**). Para el caso de *G. sordulenta*, a los 150 días de colonización el incremento en el contenido de cenizas fue mayor que en *G. gargal*, de 13% (**Figura 77**).

Estos valores comparados con los medidos a los 150 días con el mismo sustrato en *G. frondosa*, *Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus* fueron notablemente menores, ya que en estas especies se alcanzaron valores del 22-23% (**Figura 78**). Es más, la F1 se empleó anteriormente como sustrato gastado (SG) durante el estudio del primer TCL, en ese sustrato se midió que a los 50 días se alcanzó un 12% del contenido de cenizas, y en esta determinación para poder llegar al mismo valor con *G. gargal* y *G. sordulenta* fueron necesarios 210 y 150 días, respectivamente. Era esperable que en esta determinación *P. ostreatus* incremente a 20 % el contenido de cenizas porque 150 días constituyen el triple de tiempo de cultivo habitual con más de cuatro oleadas de fructificación y el micelio terminando en estado de senescencia.

Las fracciones nutritivas más degradadas por *G. gargal* fueron la celulosa y la lignina (**Figura 77**), lo cual fue parcialmente consistente con lo hallado en la formulación del T1 en el primer TCL. En

el primer TCL también se había observado degradación de lignina, sin embargo a diferencia de esta experiencia, las fuentes nutritivas más importantes habían sido el contenido celular y la hemicelulosa (**Tabla 39**). Lo anterior sugiere que independientemente de las condiciones del cultivo, *G. gargal* emplea diferentes fracciones nutritivas del mismo sustrato.

Por otra parte, y para estudiar si existen diferencias en la degradación en diferentes sectores del tronco sintético, se analizaron muestras tomadas de diferentes regiones de un tronco colonizado durante 210 días por *G. gargal* (**Figura 78**). Se halló que los porcentajes de la degradación de cada uno de los sectores fueron semejantes entre ellos. Esta biotransformación homogénea entre el centro del tronco, superficie (en una zona sin basidiomas), y en el sustrato ubicado por debajo de la zona donde estaba surgiendo un basidioma, refleja que las propiedades fisicoquímicas del tronco también fueron homogéneas en todos los sectores. Este tronco sintético estaba formado por una bolsa conteniendo 900 g de sustrato F1.

En el caso de *G. sordulenta* se halló que el contenido celular y la fracción de celulosa fueron los componentes más empleados para el crecimiento en troncos sintéticos, y además, la reducción de sus contenidos relativos estuvo acompañada por un aumento del contenido relativo de la lignina (**Figura 77**). La comparación entre la degradación de la CG en los tratamientos T1 (primer TCL) y F1 mostró que en ambos casos hubo utilización de la fracción de celulosa y no hubo degradación de lignina. La diferencia entre los datos del primer TCL con los del tronco sintético es que en este último caso el micelio hizo mayor uso del contenido celular como fuente de nutrientes.

Las otras especies empleadas como controles: *G. frondosa*, *Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus*, emplearon el contenido celular y la celulosa (*G. frondosa* y *P. ostreatus*) o celulosa (*G. lucidum*), con reducciones similares en el contenido de lignina entre las tres especies (**Figura 79**).

De la comparación de la biotransformación producida por estas especies control con *G. gargal* y *G. sordulenta* surge que los componentes nutritivos *i.e.*: celulosa, hemicelulosa o contenido celular, del sustrato son capaces de sostener el cultivo de hongos de la pudrición blanca.

Asimismo, el valor de la degradación de la materia orgánica en función del tiempo, indicaría que *G. gargal* y *G. sordulenta* necesitan tres a cuatro veces más de tiempo para consumir la misma materia orgánica que la que consume *Pleurotus ostreatus* en dos o tres oleadas, lo cual deja de manifiesto el menor aprovechamiento del sustrato por *G. gargal* y *G. sordulenta*. Se concluye entonces que en unión a mejoras en las condiciones ambientales, *G. gargal* y *G. sordulenta* necesitan aditivos o suplementos en el sustrato que estimulen la biotransformación para poder obtener valores mayores de producción.

Figura 77. Evolución de la degradación de la cáscara de girasol por *Grifola gargal* y *G. sordulenta*.

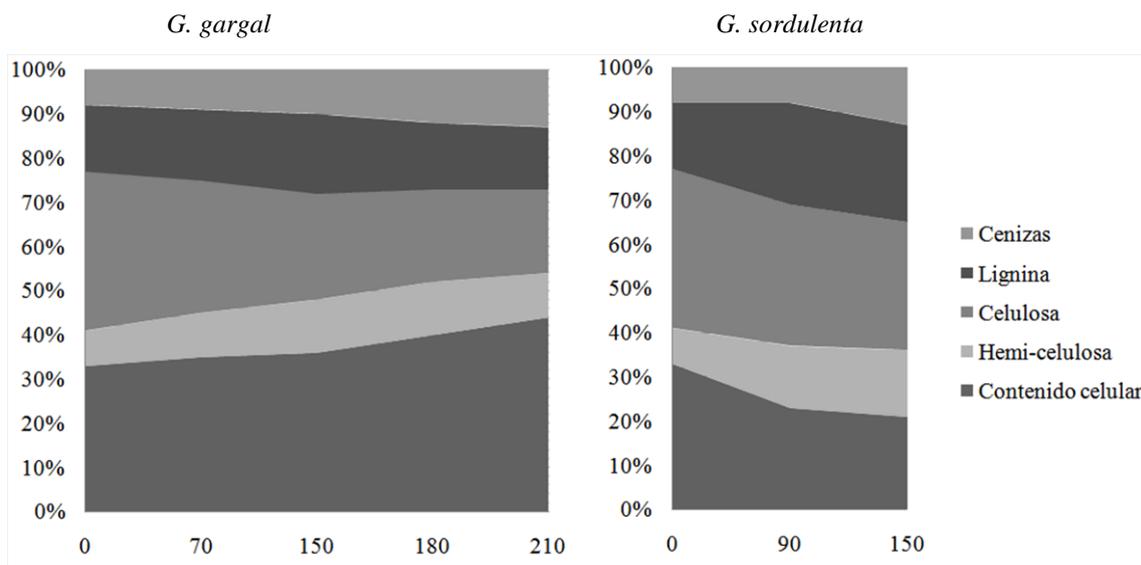


Figura 78. Degradación de diferentes componentes de la cáscara de girasol luego de 210 días de colonización por *Grifola gargal* en diferentes sectores del tronco sintético. Las placas de la derecha muestran el tronco sintético y la muestra correspondiente a la parte del sustrato debajo de un basidioma.

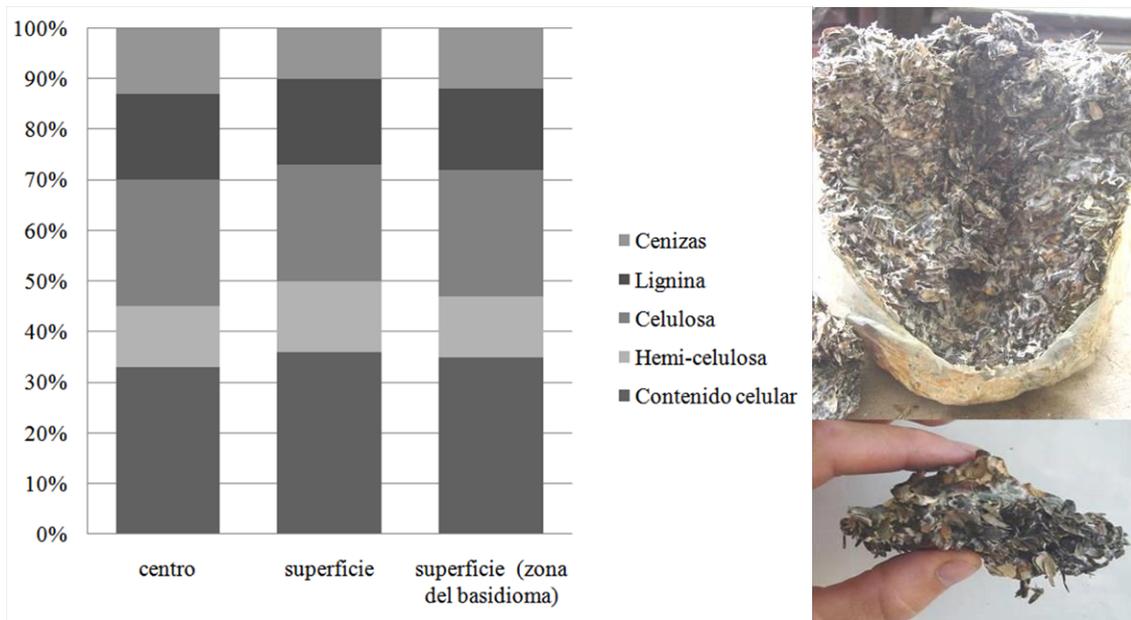
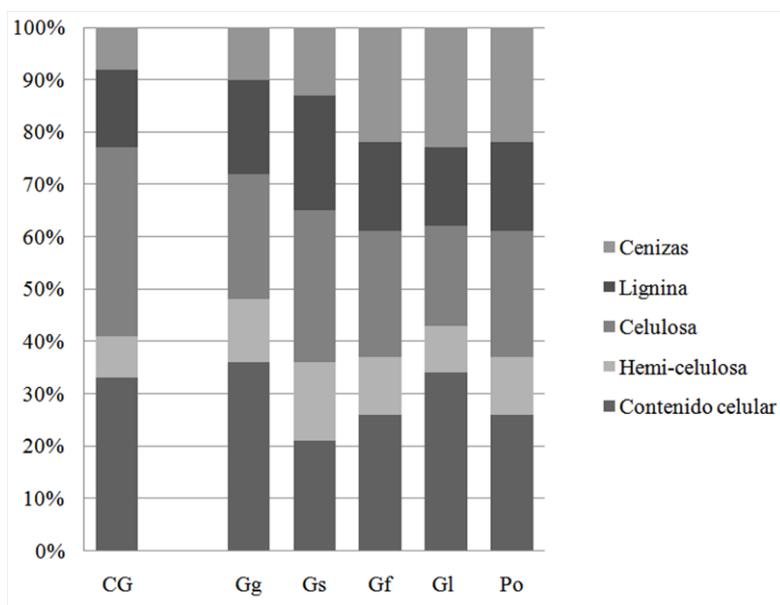


Figura 79. Degradación de diferentes componentes de la cáscara de girasol por hongos basidiomicetes. Los troncos sintéticos tenían 150 días al momento de la toma de las muestras. Se muestran los valores iniciales del sustrato a base de cáscara de girasol (CG) y luego de la colonización por *Grifola gargal* (Gg), *G. sordulenta* (Gs), *G. frondosa* (Gf), *Ganoderma lucidum* (Gl) y *Pleurotus ostreatus* (Po).



4. Conclusiones

Finalmente es importante destacar que es crucial antes de iniciar la producción optimizada de una determinada especie de hongo, poder disponer de diferentes cepas para seleccionar las más adecuadas en unión a un tipo de sustrato y particulares condiciones de cultivo. Harada (2007) solo encontró dos cepas de *G. gargal* de entre doce aislamientos realizados en la zona de Osorno, Chile, capaces de culminar el ciclo reproductivo en sustratos a base de virutas de madera. Este fenómeno ya era conocido en el género, dado que un gran número de cepas de *G. frondosa*, ya sea aisladas de ambientes naturales u obtenidas en bancos de germoplasma, no fructifica bien (Stamets, 1993; Shen, 2001). La información hallada en cuanto a la biología de las cepas de *G. gargal* y *G. sordulenta* indica que la cepa A de *G. gargal* presenta mayor velocidad de crecimiento, producción de enzimas para la biodegradación y respuestas morfogénicas, que las cepas G9 y B. En cuanto a la cepa de *G. sordulenta*, si bien fue la única ensayada, resultaría adecuada para el cultivo ya que también pudo desarrollarse en los medios de compuestos fenólicos y mostró respuestas morfogénicas.

Los ensayos desarrollados en este capítulo muestran que es posible la obtención de fructificaciones morfológicamente aceptables de *G. gargal* y de *G. sordulenta* para el cultivo de estas especies en troncos sintéticos con sustratos formulados a base de cáscara de girasol. En la **Tabla 39** se resume la información más relevante de la experiencia previa para el cultivo de estas especies de *Grifola*, puntualizando las principales condiciones para la obtención de fructificaciones. Asimismo se indica el uso de aditivos y de suplementos útiles y la necesidad del mantenimiento de una humedad

elevada durante el proceso de fructificación con una ventilación adecuada en unión al mantenimiento de condiciones de asepsia durante todo el ciclo productivo.

Tabla 39. Síntesis de los materiales y métodos de cultivo sugeridos por la experimentación que se presenta en este capítulo para el cultivo de *Grifola gargar* (cepa A) y *G. sordulenta* (única cepa disponible) en sustratos formulados a base de cáscara de girasol. CG, cáscara de girasol; SG, sustrato gastado; ST, salvado de trigo.

Materiales y métodos	<i>Grifola gargar</i>	<i>Grifola sordulenta</i>	Días	Observaciones
Medio semisólido Cultivo a 18-21°C, en oscuridad.	MYPA modificado.		20-25	-
Spawn Cultivo a 21-24°C, en oscuridad.	Trigo, trigo: mijo (8:2), maíz:girasol (1:1).	Trigo, maíz, maíz:girasol (1:1).	25-30	Utilizar material en crecimiento activo.
Fórmula del sustrato base CG sola (entera) >16 h en una solución de 2% SO ₄ Ca y 0,5% CO ₃ Ca.	CG entera: 50%, CG molida: 30%, SG entera: 15%, ST: 5%.	CG entera: 80%, SG entera: 15%, ST: 5%.	-	-
Suplementos Reemplazar 20 % en la fórmula base con: paja de trigo, virutas de roble pellín o álamo.	Paja de trigo o virutas de roble pellín, álamo.	Paja de trigo.	-	Sales de Mn(II) y Zn(II) pueden mejorar el crecimiento.
Pretratamiento hidrolítico Incluir en la solución de imbibición: ácido sulfúrico 0,01N.	-	-	-	Las condiciones de la reacción se consiguen durante autoclavado a 1 atm.
Método de cultivo Cultivo axénico en troncos sintéticos. Autoclavado 2 h a 121°C.	Compactar entre 0,45 y 0,55 g/ml.		-	Una aireación aceptable en bolsas pequeñas se obtiene con tapones de algodón.
Inoculación del sustrato Distribución homogénea del inóculo en el sustrato.	10-15% peso en peso.		-	Extremar las condiciones de higiene.
Corrida del micelio 18°C, 60% HR, ventilación ≥1 cambio diario, oscuridad.	La presencia de olor almendrado indica un crecimiento satisfactorio.		40-60	Asegurar el drenaje de líquido en bolsa.
Inducción 5°C, 60%HR., ventilación ≥1 cambio diario, oscuridad.	Evitar la hiperproducción de primordios producida cuando se acumula de aire entre el sustrato y la bolsa.		≤30	Al determinar la presencia de primordios trasladar a cámara de fructificación.
Fructificación Ciclos de 5°C y 8°C, fotoperiodo de 8h con luz fluorescente blanca de 300 a 500 lux, 85-95% HR, ventilación estéril con ≥8 cambios diarios.	La evolución puede seguirse con los cambios morfológicos de <i>cerebro</i> , <i>coliflor</i> y <i>racimo</i> .		15-30	El período no debería ser superior a 30 días.

Capítulo VI

Propiedades antioxidantes en *Grifola* spp.

1. Introducción

En los organismos vivientes la oxidación es un fenómeno esencial para la producción de la energía que utilizan para posibilitar su metabolismo. Sin embargo, una producción no controlada de radicales libres, producto de estas oxidaciones, llevan al desarrollo de enfermedades como cáncer, artritis reumatoidea y aterosclerosis y aceleran diferentes procesos degenerativos, incluyendo el envejecimiento (Halliwell, 2006).

Afortunadamente la mayoría de los organismos están bien protegidos del estrés oxidativo que pueden ocasionar los radicales libres. En efecto, poseen enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa, o bien compuestos como vitamina C, tocoferoles, compuestos fenólicos, carotenoides y glutatión que juegan un rol protector (Niki *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando ocurre un desbalance en los mecanismos para la protección antioxidante, aparecen deterioros de las funciones fisiológicas llevando a enfermedades y acelerando el envejecimiento. Por ello el consumo regular de alimentos con propiedades antioxidantes colabora en la prevención de estas enfermedades (Soares *et al.*, 2009).

Para probar las hipótesis particulares sobre la posible actividad antioxidante de las especies fúngicas nativas *G. gargal* y *G. sordulenta*, se realizaron extracciones metanólicas a micelios provenientes de fructificaciones, de cultivo líquido y a la harina de granos de trigo biotransformados. Una especie muy estudiada del género por su valor funcional es *G. frondosa*. Por ello con el propósito de obtener información comparativa se procedió de igual manera con el micelio proveniente del cultivo líquido de este hongo y la harina del grano de trigo biotransformado por el mismo. Los distintos aspectos de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos fueron analizados usando dos técnicas colorimétricas, una que revela la actividad secuestrante de radicales libres (SR), en este caso del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), y otra que muestra la reducción del catión Fe^{III} a Fe^{II}, una capacidad habitualmente reconocida como poder reductor. Además, con la ayuda de la cromatografía en capa fina, se buscó separar los compuestos responsables de la actividad antioxidante y contrastarla con la proveniente de dos grupos posibles de compuestos en tal actividad: los fenólicos y los oligosacáridos.

1.1. Propiedades antioxidantes en los hongos

Algunos hongos comestibles son considerados alimentos funcionales debido a su capacidad antioxidante (Chang y Miles, 2004). La calidad y contenido de metabolitos con este valor varían entre especies y dentro de la misma especie también varían con el manejo del cultivo, el procesamiento, el estado de maduración del micelio y las diferentes bioformas de micelio *i.e.*: micelio de fructificaciones, de cultivo líquido o de sustratos fermentados en estado sólido (Turkoglu *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2007a; Barros *et al.*, 2007b; Soares *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011).

La fuente de micelio más comúnmente empleada es la constituida por fructificaciones que pueden ser recolectadas en la naturaleza o producidas en invernaderos. También es importante considerar que la concentración de diferentes metabolitos cambia entre las diferentes partes de las fructificaciones y con el estado de maduración (Ribeiro *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2009). Otra fuente de micelio es el proveniente del cultivo líquido. En esta modalidad productiva se pueden controlar mejor las condiciones del medio y así las vías metabólicas de la producción y los niveles de metabolitos antioxidantes. Y además cabe señalar que en ciertas especies, donde el cultivo en sustratos sólidos es complejo, el cultivo en medios líquidos posibilita la obtención controlada de biomasa fúngica y sus metabolitos (Zheng *et al.*, 2009b). Una tercera fuente de micelio es la de los granos de trigo biotransformados, de mayor valor funcional en comparación al trigo, como ha sido probado con *Aspergillus* spp. (Bhanja *et al.*, 2009), *Cordyceps militaris* (Das *et al.*, 2010) y *G. frondosa* (Huang *et al.*, 2011).

1.2. Extracción de metabolitos antioxidantes

En el estudio habitual de las propiedades antioxidantes de hongos o vegetales, el primer paso consiste en extraer con solventes las moléculas de los compuestos de interés. El solvente con mayor capacidad de extracción de sustancias apolares- polares, es el metanol, y se lo emplea para estudiar la presencia de sustancias antioxidantes en general (Soares *et al.*, 2009). Una condición experimental, también importante en el momento de la extracción, es la temperatura, ya que al incrementarse aumenta la solubilidad (Brujin *et al.*, 2008); pero un aumento demasiado alto de la temperatura puede causar la descomposición de biomoléculas, perdiendo su capacidad antioxidante (Choi *et al.*, 2006).

1.3. Estudio *in vitro* de las propiedades antioxidantes

El empleo de ensayos *in vitro* estandarizados para determinar la actividad antioxidante es fundamental para poder validar y comparar los resultados propios con los obtenidos en otras especies de hongos o en otros laboratorios. Una de las técnicas más empleadas es la determinación de la actividad secuestrante de radicales de 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH), que se basa en una reacción colorimétrica capaz de detectar su disminución (Sharma y Bhat, 2009). Además de esta acción directa contra los radicales reactivos, también es posible medir la actividad del poder reductor total (Oyaizu, 1986). Ella se determina mediante la medición del cambio en la concentración de cationes en un estado de oxidación en presencia de moléculas antioxidantes-reductoras, p.e. el caso de la reducción de iones férricos a iones ferrosos.

Otro recurso analítico para la separación e identificación de biomoléculas que participan de esta actividad es la cromatografía en capa fina (TLC, *thin layer chromatography*). En este caso el revelado de las moléculas antioxidantes se hace por medio de un rociado con solución de DPPH y el perfil de bandas resultante se compara con el obtenido en la misma placa sobre moléculas de referencia (Topçu *et al.*, 2007).

También es importante conocer el contenido de compuestos fenólicos, ya que se ha comprobado que varias especies de hongos muestran una alta correlación entre su actividad antioxidante y el contenido de estos metabolitos. En particular ello es así en el caso del micelio proveniente tanto de fructificaciones como del cultivo líquido de *G. frondosa* (Mau *et al.*, 2002; 2004a); y de manera similar en el caso del micelio de fructificaciones de *G. gargal* (Brujin *et al.*, 2008; 2009). Sin embargo, aún no ha sido evaluada la actividad antioxidante en *G. sordulenta*.

1.4. Hipótesis

Se plantea que i) los micelios de las cepas de los aislados propios de *G. gargal* y *G. sordulenta*, incluyendo los provenientes de fructificaciones, poseen actividad antioxidante y que al menos parte de ella puede explicarse por su contenido en compuestos fenólicos; ii) que las diferentes metodologías empleadas para la obtención de micelio de *G. gargal* y *G. sordulenta* en cultivos líquidos (ver capítulo III) influyen en la actividad antioxidante del micelio; iii) que la biotransformación de granos de trigo realizada por el micelio de *Grifola* spp. incrementa el valor antioxidante de los granos de trigo control, lo cual estaría relacionado con el aumento en su contenido de compuestos fenólicos; y iv) que dicha actividad antioxidante es comparable a la de distintas bioformas de *G. frondosa*.

1.5. Objetivos

Los objetivos, que surgen en el cuerpo de la hipótesis anterior, buscan evidenciar y medir *in vitro* la habilidad antioxidante que poseen los micelios de distintos orígenes –de frutos, de los provenientes de cultivo líquido estacionario y agitado- y también del trigo biotransformado por las cepas propias de *G. gargal* y *G. sordulenta*; habilidad que se propone comparar con la exhibida por bioformas de micelio de *Grifola frondosa*.

2. Materiales y métodos

2.1. Fuentes de micelio

Las bioformas del micelio de *G. gargal* empleadas durante este estudio fueron obtenidas de fructificaciones (*GgFB*, ítem 6.3., capítulo I); del cultivo líquido realizado en frascos para el estudio del efecto de reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, solos o en combinaciones (*GgLC I- II- III* y *IV*, capítulo III.B.); del cultivo líquido en presencia de diferentes concentraciones del regulador de crecimiento vegetal bencilaminopurina (*GgLC 0- 0,1- 1- 5* y *10*, capítulo III.C.); y del cultivo sólido de micelio en granos de trigo (*GgWG*, capítulo IV).

En el caso de *G. sordulenta* se utilizó micelio proveniente del cultivo líquido en frascos (*GsLC I- II- III* y *IV*) y crecido en presencia de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (*GsLC 0- 0,1- 1- 5* y *10*) y además micelio del cultivo líquido estacionario (*GsLC-estacionario*, capítulo III.D); y la harina obtenida con granos de trigo biotransformados por esta especie (*GsWG*, capítulo VI).

Para una comparación, se incluyeron muestras de *G. frondosa* provenientes de micelio del cultivo líquido estacionario (*GfLC*-estacionario) y también del cultivo en fermentación en estado sólido usando como sustrato granos de trigo (*GfWG*), en la forma que habitualmente se prepara el blanco de hongo con este material. A manera de control para estos granos de trigo biotransformados se incluyeron granos de trigo control (WF) que recibieron el mismo tratamiento que el realizado en las operaciones de preparación del blanco de hongo, a excepción de la inoculación. La harina de estos granos control y biotransformados se obtuvo, luego de secarlos, utilizando un molino *Udy Cyclone Mill* (malla 20) (USA). Todas las muestras de las bioformas empleadas fueron secadas, mezcladas y molidas para obtener un *pool* homogéneo de cada tratamiento. En los casos del micelio, las muestras se liofilizaron y molieron en mortero, se pasó el material resultante por un tamiz (malla 20) y el polvo resultante se mantuvo en un desecador hasta su uso.

2.2. Extracción

El procedimiento de extracción con metanol fue hecho de acuerdo a Mau *et al.* (2002). Para ello tres muestras de cada tratamiento (2-5 g) se mezclaron con metanol en una proporción 1/10 g/ml y se sonicaron durante 10 minutos (Branson “Bransonic 220”, 50/60 Hz). Para completar la extracción, los extractos fueron mantenidos en agitación orbital horizontal a 150 rpm durante 72 horas a 24°C y oscuridad. A continuación se centrifugaron (3000 rpm por 10 minutos), se separaron los sobrenadantes y luego de registrar el volumen resultante, se filtraron usando papel Watman n°4.

El rendimiento de la extracción se obtuvo gravimétricamente, después de secar alícuotas de 1 ml del extracto: RE (% , mg/g) = [(peso seco de la extracción)/ (peso seco de la muestra) × 100].

Los tres extractos de cada tratamiento fueron juntados en un *pool* único y luego concentrados hasta 20-25 mg/ml con la ayuda de un baño térmico (50 °C) y burbujeo de nitrógeno. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

2.3. Extinción de radicales DPPH

Los extractos fueron disueltos en metanol para obtener las dosis de concentración de trabajo (1, 5, 10, 20 mg/ml). Un mililitro de cada muestra de solución se mezcló con 0,25 ml de la solución de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (Sigma CAS N° 1898-66-4) disueltos en metanol para obtener una concentración final de 0,2 mM del compuesto químico. Luego de permitir que las mezclas de reacción bajo ensayo estuvieran en oscuridad durante 30 minutos, se procedió a determinar su absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro *1600 Plus Metrolab*®.

La actividad secuestrante de radicales se calculó con la fórmula: SR (%) = $[(\Delta A_{517} \text{ del control} - \Delta A_{517} \text{ de la muestra}) / \Delta A_{517} \text{ del control}] \times 100$. Con el propósito de realizar una comparación en la actividad secuestrante de DPPH, fueron medidas las actividades correspondientes del ácido ascórbico, BHA y α -tocoferol.

El valor de referencia *concentración efectiva 50%* (CE50_{SR}, mg extracto/ml) indica la concentración del reactivo antioxidante que extingue la actividad del DPPH presente en la muestra en

un 50 % y fue obtenido con un análisis de regresión lineal. La actividad SR de las muestras analizadas se calculó en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra seca (EqAA_{SR}), el valor CE50_{SR} del ácido ascórbico fue 0,30 mg/ml.

2.4. Poder reductor total

El poder reductor (PR) se determinó siguiendo el método de Oyaizu (1986). Un mililitro de cada extracto metanólico (1, 5, 10, 20 mg/ml) fue mezclado con 1 ml de 200 mM de buffer fosfato de sodio (pH 6,6) y 1 ml de 10 mg/ml ferricianuro de potasio; la mezcla se incubó en oscuridad a 50°C por 20 minutos. Después se agregó 1 ml de ácido tricloroacético 10 % (p/v) se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. La capa superior (1 ml) se mezcló con 1 ml de agua destilada y 0,2 ml de 0,1 % de cloruro férrico. Luego de 5 minutos se registró la absorbancia a 700 nm usando un espectrofotómetro *1600 Plus Metrolab*[®].

Para la comparación con el PR de otros antioxidantes, también se obtuvo el poder reductor del ácido ascórbico, BHA, y α -tocoferol. Una mayor absorbancia indica mayor poder reductor. El poder reductor se calculó con la fórmula: $PR (\%) = [100 - (\Delta A_{700} \text{ máxima} - \Delta A_{700} \text{ muestra} / \Delta A_{700} \text{ máxima}) \times 100]$, en donde la absorbancia máxima fue 1,2 unidades de absorbancia, que fue la obtenida por las tres sustancias de referencia ácido ascórbico, α -tocoferol y BHA, en una concentración de 10 mg/ml.

El valor de referencia CE50_{PR} (mg extracto/ml) se determinó como la concentración del compuesto antioxidante en la cual la absorbancia fue el 50 % del poder reductor máximo y se determinó con un análisis de regresión lineal. Empleando los valores de PR del ácido ascórbico se calculó el PR de las muestras que se expresó en miligramos por gramo de muestra en base seca (EqAA_{PR}), el valor CE50_{PR} del ácido ascórbico fue 0,63 mg /ml.

2.5. Contenido de compuestos fenólicos

Se realizó una determinación cuantitativa de compuestos fenólicos totales usando la metodología de Taga *et al.* (1984). Para ello, a 0,250 ml de extracto metanólico conteniendo 20 mg/ml, se agregó 1 ml de CIH (1,3 % en una mezcla metanol: agua destilada 60:40). Luego 0,1 ml de esta solución fue agregada a 2 ml de una solución 20 mg/ml de CO₃Na₂ en agua. Transcurridos 3 minutos se procedió a agregar 0,1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) al 50 % y se dejó reposar 30 minutos para luego medir la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro *1600 Plus Metrolab*[®]. El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó con una curva de calibrado de ácido gálico (0,01- 2 mg/ml) y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de micelio seco (EqAG).

2.6. Cromatografía en capa fina de compuestos en extractos metanólicos

Se usaron láminas para TLC (10× 20 cm) recubiertas con un espesor 0,2 mm de silicagel (Merck 60 F₂₅₄). Para la separación cromatográfica se sembraron, en forma de banda de 4 mm, 10 microlitros de las soluciones de los patrones y 20 microlitros de cada extracto metanólico (secciones 2.1 y 2.2 de este capítulo), a 15 mm desde el borde de la lámina y con una separación entre las bandas de 4 mm. El solvente desarrollante que se usó fue una mezcla de cloroformo: metanol: agua (65:35:10) (Farombi *et al.*, 2000). La cromatografía fue desarrollada a temperatura ambiente en una cámara de saturación *ad hoc* de vidrio, hasta que el frente del solvente alcanzó los 7 centímetros.

A fin de detectar los compuestos fluorescentes, las láminas se observaron con luz UV₂₅₄ y UV₃₆₆ y los valores de Rf fueron calculados estableciendo la relación entre la distancia de los compuestos separados con respecto al frente. Los extractos fúngicos (20 mg/ml) y las soluciones de las sustancias de referencia (10 mg/ml) se corrieron por triplicado.

Las moléculas usadas como referencia fueron: i) antioxidante hidrosoluble: ácido ascórbico; ii) antioxidante hidrófobo: β-caroteno; iii) compuestos fenólicos hidrófobos: tocoferol, BHA, TBHQ; iv) compuestos fenólicos hidrosolubles: ácido gálico, ácido tánico, pirogalol; v) polisacáridos: quitosano y dextrano.

A los efectos de la consideración de los compuestos separados según su solubilidad en medios de distinta polaridad, los metabolitos se clasificaron en polares (Rf: 0,00 a 0,40), de polaridad intermedia (Rf: 0,40 a 0,80) y apolares (Rf: 0,80 a 1,00). Para evidenciar los diferentes compuestos separados - sustancias antioxidantes, compuestos fenólicos y oligosacáridos - cada lámina fue rociada con una solución de reactivos reveladores de color. En las **Tablas 40** y **41** se presentan las propiedades utilizadas para la identificación de compuestos separados por esta técnica que son Rf, color de la mancha en luz visible y fluorescencia en dos bandas de UV₂₅₄ y UV₃₆₆, color con el reactivo revelador y reacción al amonio observada en luz blanca y en UV₃₆₆.

2.6.1. Revelado de sustancias antioxidantes

La primera lámina se roció con una solución 2,54 mM en metanol de DPPH (Gu *et al.*, 2009). Las bandas amarillas, revelando metabolitos antioxidantes, se registraron según su intensidad en contraste con el fondo violeta a los 30 minutos y luego de las 16 horas de la aplicación. Las manchas se clasificaron en respuesta *rápida e intensa* (+++) si a los 30 minutos mostraban un alto contraste, *lenta e intensa* (++) en el caso que se observara alto contraste a las 16 hs del rociado, y débil (+) si en la lectura realizada a las 16 hs el contraste era bajo.

2.6.2. Revelado de compuestos fenólicos

La segunda lámina fue observada antes y luego de la exposición a vapores de amonio, bajo las tres condiciones de luz (visible, UV₂₅₄ y UV₃₆₆). Ante la presencia de fenoles se observa un oscurecimiento de las bandas en el espectro visible, la presencia de flavonoides se visualizan además

por un aumento de la fluorescencia en UV₃₆₆ (Hammerschmidt y Nicholson, 1977; Toledo-Castro *et al.*, 2008).

Luego de la inspección con vapores de amonio, esta segunda lámina fue rociada con una solución recién preparada de 1% de cloruro férrico y 1% de ferricianuro de potasio (Cl₃Fe-K₃Fe (CN)₆) para determinar la presencia de compuestos fenólicos en general (Hammerschmidt y Nicholson, 1977). Se registraron las bandas a los 30 minutos y nuevamente a las 16 horas.

Las bandas de compuestos fenólicos pueden apreciarse en una variedad de colores -e intensidades- que van desde el color rosa pasando por el rojo y azul, hasta violeta (Soares *et al.*, 2009; Wanasundara *et al.*, 1996); en el caso de sustancias fenólicas muy concentradas también se observan colores que van desde el beige pasan por el marrón y llegan hasta el ocre, como ocurre con BHA, ácido gálico, ácido tánico y pirogalol (**Tablas 40 y 41**, por las propiedades de las sustancias patrones ver **Tabla 46**).

2.6.3. Revelado de hexosas

Para la detección de hexosas (monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos), la tercera lámina se roció con 5% de antrona en 15% ácido sulfúrico en etanol, seguido de un calentamiento a 120 °C por un minuto; las bandas naranja-rojas (máxima absorción: 620 nm) indican la presencia de hexosas (Shetlar, 1952; Helbert y Brown, 1957).

Es importante notar que otras sustancias reaccionan con la antrona dando también una coloración. En efecto, con lípidos la coloración es azul (Frayse *et al.*, 2005); con ácidos orgánicos y aminoácidos es azul, verde y amarillo (400-533 nm) (Shetlar, 1952; Helbert y Brown, 1957); con otros compuestos el color es variable, p.e. el ácido ascórbico muestra un tono grisáceo (**Tabla 45**). En el estudio que se presenta aquí se observó además que el sulfato de dextrano (usado como control), y las fracciones etanólicas conteniendo polisacáridos de *G. gargal* y *L. edodes* (negativas a la reacción con el ferricianuro de potasio) presentaron bandas de colores grises y negras (**Tabla 45**).

2.7. Análisis de los datos

Los datos para el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante SR y PR fueron analizados mediante un ANOVA simple. Se utilizó el test de Tukey con un error global de $\alpha=0,05$, para la comparación de valores promedio. Los análisis se realizaron con el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010). Los valores de CE50 de SR y PR se obtuvieron mediante un análisis de regresión lineal empleando el software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Prism 5 software Inc. CA USA).

Tabla 40. Caracterización por cromatografía en capa fina de compuestos antioxidantes observados en diferentes longitudes de onda y bajo la exposición de vapores de amonio. El factor “Rf” indica la distancia de migración de la sustancia desde el punto de siembra en relación a la migración del frente del solvente utilizado (cloroformo:metanol:agua, 65:35:10). Se indican los colores que presentan los compuestos bajo la luz blanca y el color resultante después de reaccionar con vapores de amonio, también se indican los colores fluorescentes bajo luz UV₂₅₄ y luz UV₃₆₆.

Tipo de compuesto	Rf	Luz Visible	Amonio	LuzUV ₂₅₄	LuzUV ₃₆₆
Carotenoides (antioxidantes apolares)	>0,95	ámbar	<i>no cambia</i>	azul	negro
Ác. ascórbico (antioxidante polar)	<0,20	<i>ninguno</i>	<i>no cambia</i>	violeta	celeste
Fenoles apolares (BHA, TBHQ)	>0,75	<i>ninguno</i> azul	<i>oscurece</i>	violeta	negro, azul celeste (*)
Fenoles de polaridad intermedia (pirogalol)	0,40-0,80	beige, marrón	<i>oscurece</i>	marrón, azul, violeta	negro, celeste (*)
Fenoles polares (gálico-tánico)	<0,40	beige, marrón	<i>oscurece</i>	celeste, azul, violeta	celeste (*)
Hexosas, oligosacáridos y polisacáridos.	0,00-1,00	<i>ninguno</i>	<i>no cambia</i>	<i>ninguno</i> violeta	<i>ninguno</i> celeste

(*) La fluorescencia de color celeste observado en luz UV₃₆₆ que aumenta en presencia de vapores de amonio está relacionada con flavonoides.

Tabla 41. Caracterización por cromatografía en capa fina de compuestos antioxidantes observados en luz visible luego de las reacciones para revelado de fenoles y oligosacáridos. Se indican los colores que presentan los compuestos bajo la luz blanca después de reaccionar con ferricianuro de potasio y antrona sulfúrico, reactivos específicos para polifenoles y polisacáridos, respectivamente.

Tipo de compuesto	Rf	Ferricianuro de potasio	Antrona sulfúrico
Carotenoides (antioxidantes apolares)	>0,95	ámbar	negro
Ác. ascórbico (antioxidante polar)	<0,20	azul	gris
Fenoles apolares (BHA, TBHQ)	>0,75	beige, marrón rosa, fuxia, violeta	violeta, verde, pardo
Fenoles de polaridad intermedia (pirogalol)	0,40-0,80	beige, marrón, ocre, rosa, fuxia, violeta	verde pardo
Fenoles polares (gálico-tánico)	<0,40	beige, marrón, ocre, rosa, fuxia, violeta	verde pardo
Hexosas, oligosacáridos y polisacáridos.	0,00-1,00	<i>ninguno</i>	rojo, gris

3. Resultados y discusión

3.1. Rendimiento de las extracciones metanólicas

3.1.1. *Grifola gargal*

Seguido a la extracción con metanol de las distintas bioformas del micelio de *G. gargal*, se obtuvieron rendimientos que resultaron ser variables, dependiendo las bioformas extraídas, y que estuvieron entre 2,7 y 49,2 %, *i.e.*: gramos cada 100 gramos de muestra seca (**Tabla 42**).

Con la fructificación de *G. gargal* se obtuvo un rendimiento en los extractos de 21,8 %, que fue similar al informado por Mau *et al.* (2002) para *G. frondosa* (20,8 %). Estos autores sostienen que sus extractos metanólicos contienen azúcares y azúcares-alcoholes como metabolitos principales y que el rendimiento de sus extracciones está relacionado con el contenido de fibra de la fructificación (Mau *et al.*, 2004a). Para el caso de *G. gargal* el contenido de fibras es de 22%, según datos propios y en *G. frondosa* es 10,1 %, según estos autores.

Otros autores emplearon etanol: agua (80:20) como solvente para la extracción de metabolitos desde fructificaciones Chilenas de *G. gargal* (Brujin *et al.*, 2008) y encontraron valores de rendimiento algo menores (17,4 %).

Interesantemente, los rendimientos de extracción obtenidos con fructificaciones fueron superados por los obtenidos con micelio fúngico proveniente del cultivo líquido (**Tabla 42**). De manera particular, mayores rendimientos con respecto al las fructificaciones fueron obtenidos con micelios provenientes del cultivo en medio líquido en frascos I, II y IV (30,1- 34,4 %) y en todos los tratamientos de Erlenmeyers en cultivos agitados (34,4- 49,2 %) (**Tabla 42**). Estos valores de extracción en micelio de cultivo líquido son algo mayores a los reportados por Mau *et al.* (2004a) para micelio de *G. frondosa* obtenido con un sistema similar: 24 %.

El cultivo en medio líquido agitado en Erlenmeyers produjo un mayor rendimiento de extracción que el cultivo en medio líquido estacionario en frascos, ($p < 0,05$, **Tabla 42**); ello sería atribuible a una mejora en la tasa metabólica por una mejor aireación del sustrato en el caso de los cultivos agitados. El mismo resultado se observó en el caso del cultivo en medio nutritivo líquido de *G. sordulenta*.

Dentro de los tratamientos del grupo GgLC-frascos I, II, III y IV se encontraron diferencias significativas que señalan un menor contenido de sustancias extraíbles para el micelio cultivado en medio basal con reguladores respecto al del vitaminas/aminoácidos. Por otra parte se halló un menor rendimiento en el micelio cultivado con las dosis de 1 y 5 mg/l de BAP (**Tabla 42**).

Considerando que a la dosis de 5 mg/l de BAP se habían producido los rendimientos de biomasa más altos (ver capítulo III.C), es posible que los menores valores obtenidos en la extracción metanólica correspondiente a este tratamiento sea debido a un mayor contenido de fibras de este micelio, si bien no excluye la posibilidad de producir una demora en el metabolismo secundario, al estimular el crecimiento vegetativo.

Finalmente, con la harina de granos de trigo biotransformado por *G. gargal*, se obtuvo un rendimiento de extracción menor al obtenido en el extracto del material control WF, y también menor a los rendimientos de extracción de las otras harinas de granos de trigo biotransformados con *G. sordulenta* y *G. frondosa* (**Tabla 42**). Es posible que la degradación causada por *G. gargal* fuera menor que la realizada por las otras dos especies fúngicas, explicando el menor contenido de solutos extraíbles.

3.1.2. *Grifola sordulenta*

Los rendimientos de la extracción de sustancias solubles en metanol realizada sobre muestras de micelio provenientes de cultivo líquido en frascos, en Erlenmeyers o en fuentes de *G. sordulenta* fueron en general significativamente diferentes entre cada una de ellas. El micelio obtenido del cultivo en frascos produjo menor cantidad de metabolitos extraíbles en metanol que el proveniente del cultivo en Erlenmeyers o en medio líquido estacionario contenido en fuentes. En este último se determinaron valores similares a la extracción metanólica de micelio proveniente de Erlenmeyers (**Tabla 42**).

En el cultivo en frascos, el rendimiento correspondiente al tratamiento con el medio basal fue superado por el correspondiente del micelio cultivado con los medios nutritivos conteniendo reguladores de crecimiento vegetal (III) y vitaminas, aminoácidos (II) y reguladores de crecimiento vegetal (IV).

En comparación con *G. gargal*, se halló que los rendimientos del cultivo en frascos y Erlenmeyers fueron similares. Es importante mencionar que el contenido de fibras en el micelio de cultivo líquido fue bajo: menor al 5%, lo cual explicaría, al menos en parte, el alto rendimiento de extracción de compuestos solubles en metanol hallado en términos generales con esta bioforma de micelio.

Con la metodología de cultivo en medio líquido estacionario, se hallaron diferencias significativas entre los rendimientos del extracto metanólico para micelio de *G. sordulenta* respecto del correspondiente para el micelio de *G. frondosa*, siendo *c.a.* de 22% mayor para el primero ($p < 0,05$, **Tabla 42**).

El extracto de la harina de granos de trigo biotransformado por *G. sordulenta* produjo un rendimiento semejante al el de la harina control WF, 5,7 vs. 4,8 %, y de entre 3 y 4 veces menor con respecto al obtenido en el extracto del micelio de *G. frondosa* (19,4%) ($p < 0,05$, **Tabla 42**).

Grifola sordulenta cultivado en granos tuvo una tendencia mayor a la de *G. gargal* para producir extractivos metanólicos, lo cual puede atribuirse a una mayor degradación de componentes celulósicos y xilulósicos del grano de trigo. Cabe mencionar que previamente se había mostrado una preferencia de *G. sordulenta* por estas fuentes carbonadas antes que almidón (que sería el caso de *G. gargal*, ver **Tabla 13** del capítulo II).

3.1.3. *Grifola frondosa*

El rendimiento de la extracción de sustancias solubles en metanol obtenido desde el micelio de *G. frondosa* proveniente del cultivo líquido estacionario contenido en fuentes fue un 30 % superior al informado por Mau *et al.* (2004a) para su cepa, *i.e.* 36,3 vs. 24,5 %; vale aclarar que estos autores no especificaron cómo obtuvieron el micelio. Estas diferencias en el contenido de metabolitos solubles en

metanol no estarían relacionadas con la proporción de fibras, ya que en ambos casos su contenido estuvo alrededor del 12 % (datos propios y de Mau *et al.* 2004a).

La extracción de sustancias solubles en metanol desde la harina de granos de trigo biotransformado por *G. frondosa* mostró valores de rendimiento significativamente mayores, entre 6 y 3 veces por encima de los rendimientos obtenidos para similares materiales en los trigos biotransformados con *G. gargal*, *G. sordulenta* 19,4 vs. 2,7 y 5,7%, respectivamente y también del correspondiente a la harina de trigo control (4,8%) ($p < 0,05$, **Tabla 42**).

El rendimiento de la extracción metanólica realizado sobre harina de granos de trigo biotransformados por *G. frondosa* fue 19,4 % que fue significativamente mayor al obtenido con la harina control, 4,8%. Un hallazgo similar en cuanto al aumento de los solutos extraídos en harinas de granos biotransformados fue informado por Huang *et al.* (2011), quienes obtuvieron incrementos desde un rendimiento de extracción del 2 % a uno de 19 %, en la extracción etanólica y desde un 24 a un 45 % en la extracción acuosa. Este aumento registrado para *G. frondosa* supera ampliamente a los correspondientes informados en este capítulo para *G. gargal* y *G. sordulenta*, lo cual indica que la actividad biotransformadora del trigo realizada por *G. frondosa* fue mayor.

Sin embargo, la biotransformación fúngica sobre los granos de trigo no fue tan extensa como para afectar de manera marcada su contenido de fibra dietaria. En efecto, el análisis de fibra detergente neutra mostró que el contenido de fibra es similar tanto en la harina de trigo control como luego de la biotransformación (43 %). Ello sugiere que para el trigo biotransformado, el contenido de fibra no es un indicador adecuado del rendimiento de la extracción metanólica, en claro contraste con lo observado en los rendimientos de extracción metanólica realizada sobre micelio de las fructificaciones y del proveniente del cultivo líquido.

Tabla 42. Rendimiento de las extracciones metanólicas de micelio de *Grifola* spp (g cada 100 g de materia seca). Las letras indican las diferencias estadísticas entre las medias (Tukey, $\alpha=0,05$). Columna I: comparación de los valores medios de todos los tratamientos. Columna II: comparación de los valores medios dentro de cada grupo de tratamientos. Los grupos corresponden a los tratamientos de cultivo líquido en “frascos”, en cultivos líquidos agitados conteniendo “BAP”, en cultivos líquidos “estacionarios” y las harinas de trigo entero (WF) y biotransformado (*Gg*WG, *Gs*WG y *Gf*WG).

Especies y muestras ^a	Rendimiento		
	%	I	II
<i>Grifola gargal</i>			
<i>Gg</i> FB	21,8	hi ^b	-
<i>Gg</i> LC-frascos I	30,1	fg	AB ^c
<i>Gg</i> LC-frascos II	34,4	ef	A
<i>Gg</i> LC-frascos III	26,2	gh	B
<i>Gg</i> LC-frascos IV	33,4	ef	A
<i>Gg</i> LC-BAP 0 mg/l	46,9	a	C ^d
<i>Gg</i> LC-BAP 0,1 mg/l	49,2	a	C
<i>Gg</i> LC-BAP 1 mg/l	39,3	cde	DE
<i>Gg</i> LC-BAP 5 mg/l	34,4	ef	E
<i>Gg</i> LC-BAP 10 mg/l	44,2	abcd	CD
<i>Gg</i> WG	2,7	j	H ^e
<i>Grifola sordulenta</i>			
<i>Gs</i> LC-frascos I	31,0	fg	K ^f
<i>Gs</i> LC-frascos II	35,1	ef	J
<i>Gs</i> LC-frascos III	39,6	bcde	I
<i>Gs</i> LC-frascos IV	38,0	de	I J
<i>Gs</i> LC-BAP 0 mg/l	49,4	a	L ^g
<i>Gs</i> LC-BAP 0,1 mg/l	49,9	a	L
<i>Gs</i> LC-BAP 1 mg/l	48,9	a	L
<i>Gs</i> LC-BAP 5 mg/l	45,7	abc	L
<i>Gs</i> LC-BAP 10 mg/l	46,1	ab	L
<i>Gs</i> LC-estacionario	46,8	a	M ^h
<i>Gs</i> WG	5,7	j	G
<i>Grifola frondosa</i>			
<i>Gf</i> LC-estacionario	36,3	ef	N
<i>Gf</i> WG	19,4	i	F
WF	4,8	j	G

^a *Gg*: *G. gargal*; *Gs*: *G. sordulenta*; *Gf*: *G. frondosa*; FB: fructificaciones; LC: cultivo líquido; WG: cultivo de micelio en granos de trigo; WF granos de trigo. Medios del cultivo en “frascos” (ver materiales y métodos 2.1.): I control; II vitaminas y aminoácidos; III reguladores de crecimiento vegetal y IV vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento vegetal. Cultivo en Erlenmeyers con bencilaminopurina desde 0 a 10 mg/l: BAP 0-10. Cultivo en fuentes sin agitación: “estacionario”.

El error estándar de los valores medios ($EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$) fue: ^b1,2; ^c1,2; ^d1,4; ^e0,2; ^f0,9; ^g1,7; ^h1,1.

3.2. Actividad antioxidante

Entre las especies reactivas de oxígeno que se producen *in vivo* se incluyen el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden a su vez interactuar con metales de transición produciendo radicales hidroxilo y así incrementar aún más la cadena de agentes oxidantes altamente reactivos. Los antioxidantes reaccionan con el radical libre DPPH convirtiéndolo en una hidracina de otro color (Soares *et al.*, 2009).

La actividad SR de los extractos metanólicos revela la capacidad para reaccionar irreversiblemente con radicales libres. Esta característica permite distinguir alimentos funcionales que colaboran con la finalización de la reacción en cadena que los multiplica (Wong y Chye, 2009), ayudando a preservar la salud.

Por otra parte, la habilidad calificada como poder reductor refiere a la capacidad de donar hidrógenos a moléculas conteniendo átomos oxidantes como el Fe^{III} (Shimada *et al.*, 1992). La presencia de agentes reductores causa la conversión del complejo Fe^{III}/ferricianida del reactivo desarrollante de color, que se usa para su medición espectrofotométrica, a su forma ferrosa denominada azul de Prusia de Perl, que es medible a 700 nm (Soares *et al.*, 2009).

En las **Tablas 43** y **44** se muestran las concentraciones efectivas para alcanzar el 50% de la actividad antioxidante (CE_{50SR} y CE_{50PR}); y el contenido expresado en equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra sobre la base de peso seco (EqAA_{SR} y EqAA_{PR}).

La CE_{50SR} del ácido ascórbico fue de 0,3 mg/ml alcanzando la máxima actividad a la concentración de 10 mg/ml (**Tabla 43** y **Figura 82**). Este valor de CE_{50SR} se ubicó por encima y debajo de otras halladas en la literatura, *i.e.* 0,07 mg/ml (Liu *et al.*, 2007), 2,1 mg/ml (Sharma y Bhat, 2009) y 3,0 mg/ml (Mau *et al.*, 2004a).

La CE_{50PR} del ácido ascórbico fue de 0,65 mg/ml y se alcanzó la actividad máxima a partir de la concentración de 10 mg/ml (**Tabla 43** y **Figura 82**). En otros trabajos se informaron valores de CE_{50PR} similares (Mau *et al.*, 2004a, Tseng *et al.*, 2008).

Tabla 43. Actividad de extinción de radicales libres (SR) de extractos metanólicos de *Grifola* spp. Se muestran las concentraciones efectivas para alcanzar el 50 % de la máxima actividad (CE50_{SR}) y la equivalencia en contenido de ácido ascórbico por gramo de muestra sobre la base de peso seco (EqAA_{SR}). Se muestra el intervalo de confianza de CE50_{SR} (i.c. 99%), y con letras las diferencias estadísticas entre las medias de EqAA_{SR} (Tukey, $\alpha=0,05$). Columna I: comparación de los valores medios de todos los tratamientos. Columna II: comparación de los valores medios dentro de cada grupo de tratamientos. Los grupos corresponden a los tratamientos de cultivo líquido en “frascos”, en cultivos líquidos agitados conteniendo “BAP”, en cultivos líquidos “estacionarios” y las harinas de trigo control (WF) y biotransformado (*Gg*WG, *Gs*WG y *Gf*WG).

Especies y muestras ^a	CE50 _{SR}		EqAA _{SR}	
	mg/ ml (\pm i.c. 99%)	mg/g	I	II
<i>Grifola gargal</i>				
<i>Gg</i> FB	3,2 (3,0- 3,4)	20,4	kl ^b	-
<i>Gg</i> LC-frascos I	3,3 (2,9- 3,6)	27,5	ghi	AB ^c
<i>Gg</i> LC-frascos II	3,4 (3,0- 3,8)	30,0	fgh	A
<i>Gg</i> LC-frascos III	4,0 (3,5- 4,5)	19,7	klm	C
<i>Gg</i> LC-frascos IV	4,1 (3,9- 4,4)	24,3	ijk	B
<i>Gg</i> LC-BAP 0 mg/l	4,1 (3,4- 4,8)	34,5	ef	D ^d
<i>Gg</i> LC-BAP 0,1 mg/l	4,6 (4,1- 5,1)	32,1	fg	D
<i>Gg</i> LC-BAP 1 mg/l	6,3 (5,8- 6,9)	18,7	lm	E
<i>Gg</i> LC-BAP 5 mg/l	5,7 (5,6- 5,7)	18,3	lm	E
<i>Gg</i> LC-BAP 10 mg/l	6,0 (5,6- 6,5)	22,1	jkl	E
<i>Gg</i> WG	0,6 (0,5- 0,6)	14,5	m	G ^e
<i>Grifola sordulenta</i>				
<i>Gs</i> LC-frascos I	3,6 (3,4- 3,8)	25,8	hij	J ^f
<i>Gs</i> LC-frascos II	3,4 (3,1- 3,6)	31,3	fg	K
<i>Gs</i> LC-frascos III	3,7 (3,5- 3,9)	32,3	fg	K
<i>Gs</i> LC-frascos IV	4,9 (4,2- 5,5)	23,4	ijkl	J
<i>Gs</i> LC-BAP 0 mg/l	3,3 (2,7- 3,8)	45,2	bc	LM ^g
<i>Gs</i> LC-BAP 0,1 mg/l	3,8 (3,2- 4,5)	39,0	de	MN
<i>Gs</i> LC-BAP 1 mg/l	3,1 (2,6- 3,6)	47,7	b	L
<i>Gs</i> LC-BAP 5 mg/l	3,2 (2,9- 3,6)	42,3	cd	LM
<i>Gs</i> LC-BAP 10 mg/l	4,2 (3,5- 5,0)	32,6	fg	N
<i>Gs</i> LC-estacionario	3,0 (2,7- 3,2)	47,5	bc	O ^h
<i>Gs</i> WG	5,8 (5,5- 6,2)	3,0	n	H
<i>Grifola frondosa</i>				
<i>Gf</i> LC-estacionario	3,6 (3,2- 4,0)	30,2	fgh	P
<i>Gf</i> WG	0,8 (0,7- 0,9)	71,7	a	F
WF	57,6 (38,6- 76,6)	0,3	n	H
Ác. ascórbico	0,30 (0,29- 0,31)	-	-	-
α -Tocoferol	0,18 (0,17- 0,19)	-	-	-
BHA	0,15 (0,14- 0,16)	-	-	-

^a *Gg*: *G. gargal*; *Gs*: *G. sordulenta*; *Gf*: *G. frondosa*. FB: fructificaciones; LC: cultivo líquido; WG: cultivo de micelio en granos de trigo; WF granos de trigo. I-IV: cultivo agitado en frascos con: medio basal (I); vitaminas y aminoácidos (II); reguladores (III) o vitaminas, aminoácidos y reguladores (IV). BAP 0-10: cultivo agitado en Erlenmeyers con bencilaminopurina en concentraciones desde 0 a 10 mg/l. Estacionario: cultivo en fuentes sin agitación.

El error estándar de los valores medios se calculó con la fórmula $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$ y fue: ^b1,0; ^c 0,9; ^d 0,9; ^e 0,4; ^f0,7; ^g 1,5; ^h 1,1.

Tabla 44. Poder reductor (PR) de extractos metanólicos de *Grifola* spp. Se muestran las concentraciones efectivas para alcanzar el 50 % del máximo (CE50_{PR}) y la equivalencia de contenido de ácido ascórbico por gramo de muestra sobre la base de peso seco (EqAA_{PR}). Se muestra el intervalo de confianza de CE50_{PR} (i.c. 99%), y con letras las diferencias estadísticas entre las medias de EqAA_{PR} (Tukey, $\alpha=0,05$). Columna I: comparación de los valores medios de todos los tratamientos. Columna II: comparación de los valores medios dentro de cada grupo de tratamientos. Los grupos corresponden a los tratamientos de cultivo líquido en “frascos”, en cultivos líquidos agitados conteniendo “BAP”, en cultivos líquidos “estacionarios” y las harinas de trigo control (WF) y biotransformado (*Gg*WG, *Gs*WG y *Gf*WG).

Especies y muestras ^a	CE50 _{PR}	EqAA _{PR}		
	mg/ ml (\pm i.c. 99%)	mg/g	I	II
<i>Grifola gargal</i>				
<i>Gg</i> FB	4,2 (3,9-4,4)	33,1	mn ^b	-
<i>Gg</i> LC-frascos I	2,8 (2,4- 3,2)	68,7	jkl	A ^c
<i>Gg</i> LC-frascos II	3,1 (2,3- 3,9)	70,4	jk	A
<i>Gg</i> LC-frascos III	3,8 (3,2- 4,4)	43,4	klm	B
<i>Gg</i> LC-frascos IV	3,1 (2,7- 3,6)	67,4	jkl	A
<i>Gg</i> LC-BAP 0 mg/l	0,8 (0,8- 0,9)	351,8	a	C ^d
<i>Gg</i> LC-BAP 0,1 mg/l	1,1 (0,9- 1,2)	295,2	b	D
<i>Gg</i> LC-BAP 1 mg/l	1,2 (1,1- 1,3)	209,8	cd	E
<i>Gg</i> LC-BAP 5 mg/l	0,9 (0,8- 1,0)	230,6	c	E
<i>Gg</i> LC-BAP 10 mg/l	0,9 (0,8- 0,9)	316,4	b	CD
<i>Gg</i> WG	0,6 (0,5- 0,6)	31,4	mn	G ^e
<i>Grifola sordulenta</i>				
<i>Gs</i> LC-frascos I	3,1 (2,8- 3,4)	63,4	jkl	J ^f
<i>Gs</i> LC-frascos II	3,8 (3,4- 4,2)	57,5	klm	J
<i>Gs</i> LC-frascos III	4,0 (3,4- 4,7)	61,7	kl	J
<i>Gs</i> LC-frascos IV	5,6 (5,0- 6,2)	42,8	lm	K
<i>Gs</i> LC-BAP 0 mg/l	2,0 (1,3- 2,6)	158,8	fg	L ^g
<i>Gs</i> LC-BAP 0,1 mg/l	1,9 (1,6- 2,2)	163,7	f	L
<i>Gs</i> LC-BAP 1 mg/l	1,8 (1,4- 2,3)	167,5	ef	L
<i>Gs</i> LC-BAP 5 mg/l	2,5 (2,2- 2,7)	116,0	hi	M
<i>Gs</i> LC-BAP 10 mg/l	1,9 (1,6- 2,2)	151,3	fg	L
<i>Gs</i> LC-estacionario	2,2 (1,9- 2,5)	134,1	gh	N ^h
<i>Gs</i> WG	4,2 (3,5- 4,9)	8,7	no	H
<i>Grifola frondosa</i>				
<i>Gf</i> LC-estacionario	2,6 (2,2- 2,9)	89,3	ij	O
<i>Gf</i> WG	0,6 (0,4- 0,9)	193,7	de	F
WF	55,0 (42,4- 67,6)	0,6	o	I
Ác. ascórbico	0,64 (0,63 -0,65)	-	-	-
α -Tocoferol	0,66 (0,59- 0,73)	-	-	-
BHA	0,56 (0,52- 0,60)	-	-	-

^a *Gg*: *G. gargal*; *Gs*: *G. sordulenta*; *Gf*: *G. frondosa*. FB: fructificaciones; LC: cultivo líquido; WG: cultivo de micelio en granos de trigo; WF granos de trigo control. I-IV: cultivo agitado en frascos con: medio basal (I); vitaminas y aminoácidos (II); reguladores (III) o vitaminas, aminoácidos y reguladores (IV). BAP 0-10: cultivo agitado en Erlenmeyers con bencilaminopurina en concentraciones desde 0 a 10 mg/l. Estacionario: cultivo en fuentes sin agitación. El error estándar de los valores medios se calculó con la fórmula $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$ y fue: ^b 4,9; ^c 2,3; ^d 9,2; ^e 1,0; ^f 1,4; ^g 5,2; ^h 3,1.

3.2.1. Actividad antioxidante en *Grifola gargal*

Los valores de $CE50_{SR}$ de los extractos de micelio de fructificaciones y de cultivo líquido de *G. gargal* se ubicaron entre 3,2 y 6,3 mg/ml, mientras que en el caso del extracto de la harina de granos de trigo biotransformados se obtuvo un valor de 0,6 mg/ml que fue marcadamente menor (**Tabla 43**, columna D). En cambio con el PR no se hallaron tales diferencias siendo los valores de $CE50_{PR}$ pertenecientes a dos grupos, uno con de valores de 0,6 a 1,2 mg/ml y otro con valores de 2,8 a 4,2 mg/ml (**Tabla 44**).

En la **Figura 80** se aprecian las curvas de actividad SR y PR vs. la concentración de los extractos metanólicos. Se puede observar que la curva correspondiente al extracto de *GgWG* incrementa rápidamente alcanzando el 85 % de actividad SR y PR a la concentración de 1 mg/ml. Por otra parte, como se muestra en la **Figura 82**, los granos de trigo control (WF) solo poseen una baja actividad de SR y PR a partir de 20 mg/ml de su extracto metanólico. A continuación se describen estas propiedades de manera separada para cada una de las bioformas y modos de cultivo líquido estudiados.

3.2.1.1. Actividad antioxidante en fructificaciones

La $CE50_{SR}$ obtenida con el extracto metanólico de la fructificación de *G. gargal* (*GgFB*) fue de 3,2 mg/ml, y con una concentración del extracto de 10 mg/ml se registró una actividad SR de 99,6 %, el valor $EqAA_{SR}$ resultó ser 20,4 mg/g (**Tabla 43**). Interesantemente, esta $CE50_{SR}$ resultó ser menor que la informada por Mau *et al.* (2002) para micelio proveniente de la fructificación de *G. frondosa*, indicando una menor actividad de extinción de DPPH. La $CE50_{SR}$ obtenida con *G. gargal*, estuvo dentro del rango de actividad de extinción de los radicales DPPH de otras especies consideradas “buenas” portadoras de dicha actividad antioxidante ($CE50_{SR}$ entre 2 y 10 mg/ml), p.e. *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. (Yang *et al.*, 2002) y *Agaricus blazei* (Soares *et al.*, 2009). Sin embargo hay otras especies que se consideran “muy buenas” portadoras de actividad antioxidante porque tienen valores de $CE50_{SR}$ aún menores (0,5- 2 mg/ml) p.e. *Auricularia* spp. *Tremella* spp. (Mau *et al.*, 2001) y varias otras especies silvestres (Elmastas *et al.*, 2007; Wong y Chye, 2009).

Respecto al poder reductor de la fructificación de *G. gargal*, se obtuvo una $CE50_{PR}$ de 4,2 mg/ml, y un contenido de 33,1 mg/g $EqAA_{PR}$ (**Tabla 44**). La $CE50_{PR}$ de los extractos metanólicos de fructificaciones de *G. frondosa* según el gráfico presentado por Mau *et al.* (2002) se ubicaría en unos 10 mg/ml. Especies con buen poder reductor poseen $CE50_{PR}$ de 10 a 35 mg/ml p.e. *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. (Yang *et al.*, 2002), mientras que especies con un excelente poder reductor poseen valores menores, p.e. 3 mg/ml en *Dictyophora indusiata* (Mau *et al.*, 2002), 8 mg/ml en *Agaricus blazei* (Soares *et al.*, 2009).

De manera que se puede concluir que el extracto metanólico de micelio de fructificaciones de *G. gargal* posee un muy buen poder reductor y buena actividad secuestrante de radicales libres.

Un trabajo realizado con extracciones etanólicas de frutos de *G. gargal* mostró que una concentración de 200 mg/ml sobre la base de peso fresco del micelio del fruto alcanzaba el 90 % de

actividad SR (Brujin *et al.*, 2008). Los resultados de las extracciones metanólicas del estudio de la presente tesis muestran que poseen valores similares de entre 80 y 100 % de actividad SR a concentraciones aproximadas de 150 y 300 mg/ml, valores expresados sobre la base de peso fresco que corresponden a 5 y 10 mg/ml, considerando que la humedad relativa fue de 85%.

Estos autores también estudiaron el poder reductor y encontraron que el extracto etanólico de *G. gargal* posee un contenido en equivalentes a ácido ascórbico de 136 mg/ 1000 g de fructificaciones sobre la base de peso fresco (Brujin *et al.*, 2008), un valor que es inferior a *c.a.* 250 mg/1000 g, encontrado en esta tesis. Esta diferencia podría ser explicada en parte por las diferentes propiedades de extracción de los solventes (Wong y Chye, 2009). Sin embargo aún podría relacionarse con la variabilidad natural de las poblaciones de *G. gargal* que pudiera existir entre la región de Osorno, Chile y la región del Parque Nacional Lanín, Neuquén, Argentina.

3.2.1.2. Actividad antioxidante en micelio cultivado en frascos con medios complejos

No se hallaron diferencias muy marcadas entre los valores de CE50_{SR} y CE50_{PR} para las comparaciones del micelio de cultivo líquido en frascos y las otras bioformas de *G. gargal* o los cultivos líquidos de *G. sordulenta* o *G. frondosa* (Tabla 43 y 44).

Pero sí se encontró que el extracto metanólico de micelio de cultivo en frascos (con los medios *Gg*-frascos I, II y IV) posee un mayor contenido en EqAA_{PR} respecto de la fructificación de *G. gargal*. La relevancia de este resultado es importante porque para obtener igual poder reductor se necesita la mitad del micelio. Además, como se había discutido previamente, el valor del poder reductor de la fructificación ya era alto en comparación con el informado para otros hongos medicinales.

Al observar el grupo de tratamientos correspondiente a “frascos” se encontró que los extractos del micelio crecido tanto en medio basal como en el suplementado con vitaminas y aminoácidos (I y II, respectivamente) poseen los mejores valores de ambos: CE50_{SR} y CE50_{PR}. Por otra parte el extracto del micelio proveniente del cultivo en medio conteniendo reguladores de crecimiento vegetal (*Gg*LC-frascos III) produjo una menor actividad SR y PR y un menor contenido de antioxidantes medido en equivalentes de ácido ascórbico que el obtenido con el extracto de micelio cultivado en medio basal ($p < 0,05$, Tablas 43 y 44). Esto además resultó ser independiente de la biomasa micelial ya que como se muestra en la Figura 46 (capítulo III) la producción de micelio fue similar en ambos medios. Lo anterior sugiere que el medio basal dispuesto en frascos no requiere de una suplementación con aminoácidos y vitaminas, ni el uso de reguladores de crecimiento vegetal, para poder obtener micelio con propiedades antioxidantes. En otras palabras, en *G. gargal* estos factores de crecimiento no producen una mejora en su respuesta antioxidantes global.

3.2.1.3. Efecto de la BAP sobre la actividad antioxidante en micelio cultivado en Erlenmeyers

Las citocininas han recibido una atención especial en la relación simbiótica planta-micelio de los hongos micorrícicos (Kraigher *et al.*, 1991; Dutra *et al.*, 1996; Kampert y Strzelczyk, 1990; Dua y Jandaik, 1979) y también en la regulación del metabolismo secundario del micelio de *Agaricus bisporus* (Pohleven 1990; Champavier *et al.*, 2000; Braaksma *et al.*, 2001).

Los valores de CE50_{SR} y CE50_{PR} muestran una disminución creciente a medida que se incrementa el agregado de BAP. Por un lado disminuye ligeramente la capacidad de extinción de DPPH, mientras que en el caso del poder reductor, también disminuye la actividad antioxidante en las dosis de 0,1 y 1 mg/l, y no las afecta en las concentraciones superiores. Tal independencia de la regulación del tipo de actividad antioxidante estaría indicando la presencia de diferentes moléculas expresando cada propiedad.

Aquí es interesante remarcar el hecho de que en el extracto del micelio de cultivo líquido en Erlenmeyers se halló una importante actividad antioxidante asociada al PR, *i.e.* superó en 10 veces al observado para el micelio de la fructificación de *G. gargal* en su contenido en EqAA_{PR} (**Tabla 44**). Esto señala un potencial costo-eficiente del cultivo líquido en condiciones controladas para la obtención de estos metabolitos útiles del hongo. Asimismo, el valor de contenido equivalente de ácido ascórbico del medio basal fue el más alto en comparación al obtenido en las otras dos especies en estudio.

En la **Figura 80** se muestran las curvas de la respuesta de actividad antioxidante en cuanto a sus propiedades de extinción de radicales (SR) y poder reductor (PR) en función de la concentración de los extractos metanólicos de los micelios de *G. gargal*. La misma permite una rápida visualización de tales actividades originadas ya sea por la fructificación, los micelios obtenidos en cultivo líquido en condiciones de sustrato basal, el correspondiente al cultivo líquido estacionario en frascos (*GgLC*-frascos I), el correspondiente al cultivo líquido en Erlenmeyers en sustrato basal (*GgLC*-BAP 0) y el de la harina de grano de trigo biotransformado.

Todos los tipos de micelios mostraron un patrón de respuesta antioxidante en SR similar. Este comportamiento se caracterizó por un rápido crecimiento en la actividad SR, casi a saturación a partir de la concentración de 5 mg/ml, para entrar en la meseta a los 10 mg/ml. El poder reductor del extracto metanólico de la harina biotransformada, mostró una muy alta capacidad antioxidante a la concentración de 1 mg/ml asemejándose a las curvas de respuesta antioxidante de las sustancias patrones (**Figura 82**).

Los estudios realizados por otros autores en extractos metanólicos de micelio de *G. frondosa* proveniente de fructificaciones (Mau *et al.*, 2002) y del cultivo líquido (Mau *et al.*, 2004a) mostraron para ambas bioformas de micelio que poseían valores similares de CE50_{SR} y CE50_{PR}, mientras que el presente caso con *G. gargal* mostró valores similares sólo en CE50_{SR} y mejores valores de CE50_{PR} en el micelio de cultivo líquido proveniente tanto de Erlenmeyers como de frascos en comparación con el extracto de fructificaciones.

El extracto del cultivo líquido de micelio de *G. gargal* obtuvo valores similares de CE50_{SR} de 3,3-4,1 mg/ml (*GgLC*-frascos I y *GgLC*-BAP 0) respecto al hallado por otros autores en el extracto del micelio de cultivo líquido de *G. frondosa*, de 5 mg/ml (Mau *et al.*, 2004a). Lo mismo sucedió en la

comparación con las CE50_{PR} siendo esta vez mucho mejores las propiedades antioxidantes halladas en *G. gargal* con CE50_{PR} de 2,8- 0,8 mg/ml (*GgLC*-frascos I y *GgLC*-BAP 0) vs. la de *G. frondosa* que fue de 10 mg/ml (Mau *et al.*, 2004a). En este último caso los valores de CE50_{PR} fueron excelentes comparándose con los de *Antrrodia camphorata*, que es uno de los mejores hongos con PR, y cuyos extractos metanólicos poseen valores de CE50_{PR} de 1,8-2 mg/ml (Mau *et al.*, 2004b).

3.2.1.4. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados

Llamativa e interesantemente los valores más bajos en CE50_{SR} y CE50_{PR} obtenidos en todas las muestras de la serie de tratamientos realizados con *G. gargal* correspondieron al extracto de harina de granos de trigo biotransformados (*GgWG*), 0,6 mg/ml en ambas propiedades antioxidantes (**Tablas 43, 44 y Figura 80**). En efecto, tales actividades de SR y el PR presentes en los extractos metanólicos fueron tan altas como las producidas por las sustancias patrones y sugieren la presencia de mayor contenido de metabolitos antioxidantes y aún distintos a los que se pudieron obtener en la extracción metanólica del micelio proveniente ya sea de la fructificación o del cultivo en medio líquido.

Debido al bajo rendimiento obtenido en la extracción metanólica, los valores EqAA_{SR} (14,5 mg/g) y EqAA_{PR} (31,4 mg/g) revelaron contenidos en equivalente de ácido ascórbico que resultaron ser estadísticamente menores que los correspondientes contenidos obtenidos con micelio proveniente del cultivo líquido en frascos y/o Erlenmeyers.

Asimismo, es posible observar que la harina de granos colonizados por *G. gargal* y el micelio de fructificaciones (*GgFB*) poseen un contenido semejante de EqAA_{SR}, 14,5 y 20,4 mg/g, lo cual indica que, en lo referente a esta propiedad, la harina de granos de trigo biotransformados podría ser una alternativa de reemplazo del micelio de fructificaciones de *G. gargal*; enfatizando el potencial de los granos de trigo biotransformados por *G. gargal* como fuente para obtener una harina funcional, que además posee un particular aroma y sabor almendrado.

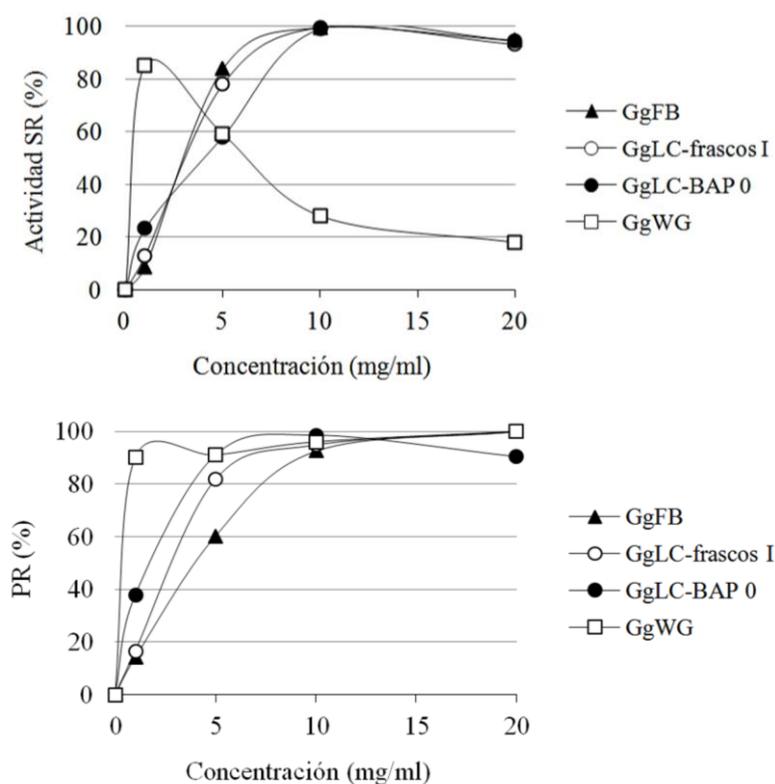
Con el extracto metanólico de la harina de trigo control (WF) se obtuvieron bajos valores de CE50_{SR} y CE50_{PR}, no superando el 20% a la concentración de 20 mg/ml (**Figura 82**).

En este punto conviene explicar que la respuesta anómala en el caso de la curva SR de la harina de granos de trigo biotransformados (**Figura 80**) fue debida a una coloración marrón oscura que enmascaró la reacción con el DPPH, este no fue caso para la concentración de 1 mg/ml del extracto. Más aún, si se considera que la absorbancia obtenida con 20 mg/ml del extracto metanólico de *GgWG* fue de 0,980 unidades y que las absorbancias medidas separadamente para ese extracto metanólico y para 0,2 mM DPPH, en las mismas condiciones del análisis, fueron de 0,976 y 1,2 unidades de absorbancia respectivamente. Se puede concluir que esa dosis del extracto metanólico produjo la extinción total del DPPH. Además, a la concentración de 1 mg/ml extracto metanólico los valores de actividad CE50_{SR} y del CE50_{PR} estuvieron alrededor del 85 % (**Figura 80**).

3.2.2. Actividad antioxidante en *Grifola sordulenta*

Los valores de $CE50_{SR}$ y $CE50_{PR}$ entre las diferentes bioformas de *G. sordulenta* se ubicaron entre 3,0 - 4,9 mg/ml y 1,8 y 5,6 mg/ml, respectivamente para las muestras de micelio de cultivo líquido y en 5,8 y 4,2 mg/ml, respectivamente, en el caso de la harina biotransformada (Tablas 43 y 44). En la Figura 81 se observa que las curvas de la actividad antioxidante ya sea debida a SR o PR en función de la concentración de los extractos metanólicos, generadas para las diferentes bioformas de micelio, muestran un patrón similar pero presentan un menor efecto en el caso del extracto de harina de granos de trigo biotransformados. Estas actividades incrementaron fuertemente con bajas concentraciones del extracto metanólico de las diferentes bioformas y en todos ellos se alcanzó o bien superó una actividad antioxidante del 80% a la concentración de 10 mg/ml.

Figura 80. Actividad SR y PR de *Grifola gargal* en función de la concentración del extracto metanólico. Se muestran los valores medios (n=3) de actividad antioxidante determinada al extracto metanólico de micelio proveniente de fructificaciones (\blacktriangle GgFB), del cultivo líquido en frascos con el medio basal (\circ GgLC-frascos I), del cultivo líquido en Erlenmeyers de 500 ml con el medio basal (\bullet GgLC-BAP 0) y de harina de granos de trigo biotransformados (\square GgWG).



3.2.2.1. Actividad antioxidante en micelio cultivado en frascos con medios complejos

El análisis de la actividad SR de los micelios correspondientes a distintos tratamientos en el cultivo en medio nutritivo líquido en frascos, mostró que el agregado al medio basal de vitaminas/aminoácido en combinación con reguladores de crecimiento vegetal produjo un incremento en su $CE50_{SR}$ (Tabla 43); mientras que el agregado de ellos por separado incrementó significativamente el contenido de $EqAA_{SR}$ (Tabla 42).

En cuanto al PR, se halló que el agregado de reguladores de crecimiento vegetal al sustrato basal (GsLC-frascos III) o bien el agregado de estos en combinación con vitaminas/aminoácidos (GsLC-frascos IV), producían un aumento de la CE50_{PR}, y además en el último caso disminuía el contenido en EqAA_{PR} ($p < 0,05$, **Tabla 44**).

3.2.2.2. Efecto de la BAP sobre la actividad antioxidante en micelio cultivado en Erlenmeyers

El extracto del cultivo de micelio de *G. sordulenta* en medio líquido agitado en Erlenmeyers produjo valores de CE50_{SR} similares a los obtenidos desde el micelio cultivado en medio líquido agitado en frascos, pero mayores en relación al contenido en EqAA_{SR} (**Tabla 43**). En cuanto al poder reductor para el primer tipo de cultivo, se obtuvieron valores menores en la CE50_{PR}, indicando la presencia de compuestos antioxidantes más potentes que los que se encontraron en el micelio cultivado en frascos; también se halló que se duplicaba el contenido en EqAA_{PR} (**Tabla 44**).

El cultivo en Erlenmeyers en medio basal sería suficiente para obtener micelio con alta actividad antioxidante (SR y PR), ya que ésta no fue incrementada por BAP e incluso disminuyó el contenido en EqAA_{SR} y EqAA_{PR} a la concentración de 10 y 5 mg/l de BAP, respectivamente (**Tabla 43**).

Se puede concluir que, similarmente a lo observado con *G. gargal* y bajo las condiciones experimentales utilizadas, el cultivo en Erlenmeyers produce mayor actividad y contenido de antioxidantes que el del cultivo en frascos.

3.2.2.3. Actividad antioxidante en micelio de cultivo estacionario en fuentes

El extracto metanólico del micelio proveniente del cultivo en medio nutritivo líquido en fuentes y sin agitación (GsLC-estacionario) se asemejó en los valores hallados de las propiedades antioxidantes (CE50_{SR} = 3,0 mg/ml, CE50_{PR} = 2,2 mg/l; contenido en EqAA_{SR} = 47,5 mg/g, EqAA_{PR} = 134,1 mg/g) al extracto proveniente del cultivo en Erlenmeyers con agitación presentados precedentemente (**Tabla 43**). Cabe recordar que los rendimientos de la extracción metanólica para ambas metodologías de cultivo líquido fueron similares (**Tabla 42**), mientras que el tiempo de obtención de una biomasa equivalente de micelio en cultivo en Erlenmeyers fue menor que el registrado en cultivo en fuentes (20 días vs. 48 días, **Tabla 16** capítulo III).

Como se mencionó en el capítulo I (ítem 2.2.), el cultivo líquido de *G. sordulenta* es hasta el momento la vía más accesible para la obtención de micelio y metabolitos, las fructificaciones de esta especie son pequeñas y difíciles de hallar en la naturaleza. De manera que este hallazgo del elevado contenido en antioxidantes en *G. sordulenta* mediante el cultivo líquido estacionario en fuentes y en cultivo líquido agitado en Erlenmeyers justifican realizar posteriores estudios a fin de escalar su producción mediante fermentadores.

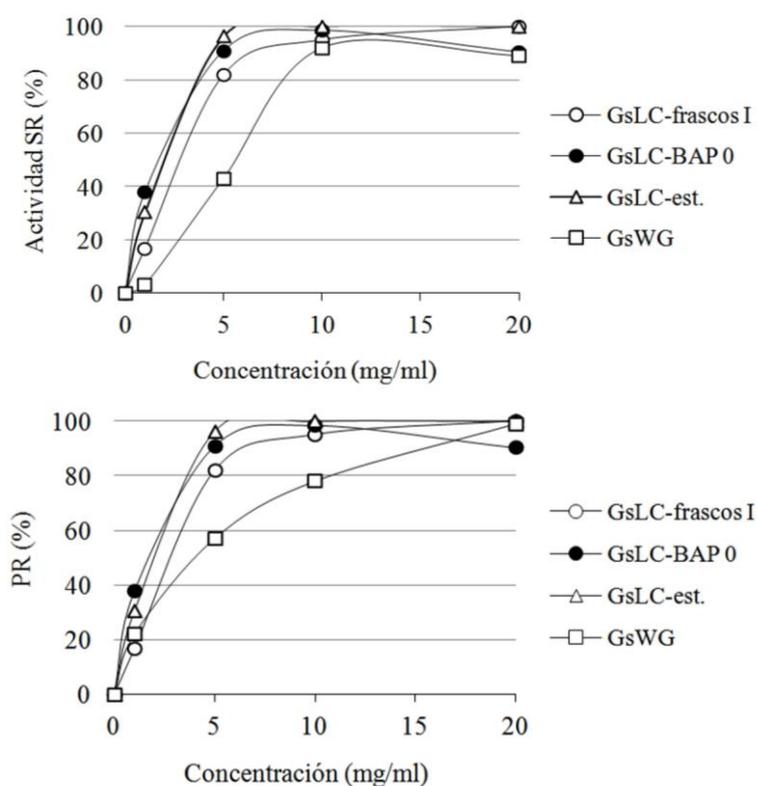
Los valores obtenidos en capacidad antioxidante (CE50_{SR} y CE50_{PR}) y contenidos en equivalentes de ácido ascórbico (EqAA_{SR} y EqAA_{PR}) con el extracto metanólico del cultivo estacionario de *G. frondosa* fueron similares a los obtenidos con el extracto metanólico de micelio de *G. sordulenta* cultivado con el mismo sistema (**Tablas 43 y 44**).

3.2.2.4. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados

El análisis de actividad SR del extracto metanólico de la harina de granos de trigo biotransformados por *G. sordulenta* (*GsWG*) mostró que la $CE50_{SR}$ fue entre 1,5-2 veces superior y el contenido en equivalentes de ácido ascórbico ($EqAA_{SR}$) resultó ser el más bajo de las muestras estudiadas. Incluso no se diferenció estadísticamente del obtenido con el extracto metanólico de harina de trigo control WF que fue de 0,3 mg/g, en comparación a los $EqAA_{SR}$ obtenidos con los extractos metanólicos de estas especies, a saber: *GsWG* 3,0 mg/g, *GgWG* 14,5 mg/g, *GfWG* 71,7 mg/g (**Tabla 43**).

El extracto metanólico de la harina del grano de trigo biotransformado por *G. sordulenta* produjo una $CE50_{PR}$ (4,2 mg/ml) igual al encontrado con los extractos de las fructificaciones de *G. gargal* pero que no fue comparable a los extremadamente bajos valores obtenidos con los extractos metanólicos correspondientes a las otras especies: *GgWG* y *GfWG*, con $CE50_{PR}$ de 0,6 mg/ml en ambos casos (**Tabla 44**). Sin embargo, aún cuando el extracto de la harina de trigo biotransformado por *G. sordulenta* exhibió valores menores en sus propiedades antioxidantes que las correspondientes exhibidas por las otras especies de *Grifola*, el incremento en ellas por sobre los valores hallados para el extracto metanólico de la harina de trigo control es aún importante, como puede apreciarse en las curvas de actividad SR y PR de las **Figuras 81 y 82**.

Figura 81. Actividad SR y PR de *Grifola sordulenta* en función de la concentración del extracto metanólico. Se muestran los valores medios ($n=3$) de actividad antioxidante determinada al extracto metanólico de micelio proveniente de cultivo líquido en frascos con el medio basal (\circ *GsLC*-frascos I), del cultivo líquido en Erlenmeyers de 500 ml con el medio basal (\bullet *GsLC*-BAP 0), del cultivo líquido estacionario (Δ *GsLC*- est.) y de granos de trigo biotransformados (\square *GsWG*).



3.2.3. Actividad antioxidante en *Grifola frondosa*

3.2.3.1. Actividad antioxidante en micelio de cultivo estacionario en fuentes

La CE50_{SR} del extracto metanólico de micelio de *G. frondosa* proveniente del cultivo en medio nutritivo líquido en fuente en condición estacionaria (G/FC-estacionario) muestra que el micelio obtenido con esta cepa y método de cultivo exhibió una mayor efectividad en la extinción de radicales DPPH en comparación a la informada por Mau *et al.* (2004a) para micelio de este hongo cultivado en medio líquido, *i.e.* 3,6 vs. 4,9 mg/ml.

Por otra parte, el poder reductor del mismo extracto metanólico expresado en términos de CE50_{PR}, fue más de tres veces superior a la hallada por aquellos autores para *G. frondosa*, *i.e.* 2,6 mg/ml vs. 10 mg/ml.

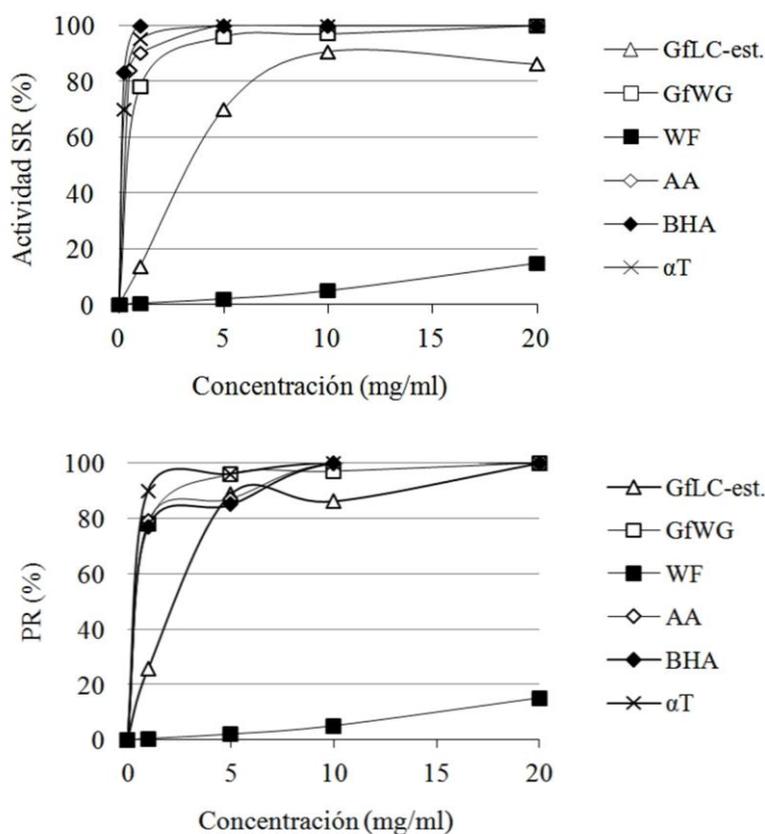
Huang *et al.* (2011) informaron que las concentraciones efectivas en las capacidades SR y PR de micelio de *G. frondosa* obtenido del cultivo líquido eran muy diferentes entre sí. Por ejemplo con su extracto etanólico obtuvo CE50_{SR} y CE50_{PR} de 2,4 y 17,2 mg/ml respectivamente; mientras que en su extracto acuoso obtuvo los correspondientes valores fueron de 116,8 y 4,63 mg/ml. En el presente estudio empleando extracciones metanólicas se hallaron concentraciones efectivas similares (G/FC-estacionario: CE50_{SR}: 3,6 mg/ml y CE50_{PR}: 2,6 mg/ml, **Tablas 43 y 44**). La discrepancia en la concentración efectiva ante diferentes solventes extractivos sería entonces un factor determinante en la extracción cuali y cuantitativa de metabolitos activos para cada una de estas propiedades antioxidantes.

El extracto metanólico del micelio de *G. frondosa* cultivado en fuentes exhibió una menor actividad antioxidante estimada por el valor de 3,6 mg/ml CE50_{SR} con respecto a la correspondiente para *G. sordulenta*, de 3,0 mg/ml. Además, en el contenido de EqAA_{SR}, el extracto metanólico del micelio de *G. sordulenta* resultó ser superior al correspondiente de *G. frondosa*: 47,5 y 30,2 mg/g, respectivamente ($p < 0,05$, **Tabla 43**). Lo mismo fue hallado en la comparación de la actividad de PR, con una menor actividad antioxidante en el micelio de *G. frondosa* respecto al de *G. sordulenta* siendo la CE50_{PR} similar en ambos casos (2,6 y 2,2 mg/ml, **Tabla 44**) pero con EqAA_{PR} menor en *G. frondosa* (89,3 vs. 134,1 mg/g, **Tabla 44**).

3.2.3.2. Actividad antioxidante en harina de granos de trigo biotransformados por *Grifola frondosa* y en harina control

La CE50_{SR} del extracto metanólico de la harina de granos de trigo biotransformados por *G. frondosa* fue comparable al obtenido con el extracto de la harina de *G. gargal*, 0,8 y 0,6 mg/ml, hallándose sin embargo contenidos en EqAA_{SR} cinco veces mayores en *G. frondosa* (**Tabla 43**). Huang *et al.* (2011) informaron que el extracto etanólico de la harina de granos de trigo biotransformados por *G. frondosa* exhibía una CE50_{SR} de 2,8 mg/ml, y otro más elevado, de 7,3 mg/ml para el caso del extracto acuoso.

Figura 82. Actividad SR y PR de *Grifola frondosa* y harina de trigo control en función de la concentración del extracto metanólico, y de las soluciones de sustancias patrones disueltas en metanol. Se muestran los valores medios (n=3) de actividad antioxidante determinada al extracto metanólico del micelio de cultivo líquido estacionario de *G. frondosa* (Δ GfLC- est.) y del extracto metanólico de granos de trigo biotransformados (\square GfWG), harina control (\blacksquare WF). Las sustancias antioxidantes fueron: ácido ascórbico (\diamond AA), hidroxianisol butilado (\blacklozenge BHA) y alfa tocoferol (\times α T).



Por otro lado, la harina de granos biotransformados de ambas especies *G. frondosa* y *G. gargal* desarrollaron excelentes valores en cuanto a su poder reductor, exhibiendo una $CE50_{PR}$ en ambos casos de 0,6 mg/ml. Sin embargo cabe señalar que en esta propiedad antioxidante *G. frondosa* tenía un contenido en $EqAA_{PR}$ que fue seis veces superior al hallado en *G. gargal*, 193,7 vs. 31,4 mg/g. Huang *et al.* (2011) también hallaron un excelente poder reductor en sus muestras de harina biotransformada por *G. frondosa*; además sus extractos etanólicos y acuosos tenían alto PR, siendo mayor el poder reductor del extracto acuoso, con $CE50_{PR}$ de 2,0 vs 1,1 mg/ml. Nótese que tanto estas concentraciones efectivas para el PR informadas por estos autores como la obtenida en la presente tesis resultaron ser más bajas que las correspondientes concentraciones efectivas para el SR, independientemente del solvente utilizado para realizar la extracción.

Al estudiar las capacidades antioxidantes de la harina de trigo control (WF) que se utilizó como control en el presente estudio, los valores obtenidos de su actividad antioxidante fueron: $CE50_{SR}$: 57,6 mg/ml, y $CE50_{PR}$: 55,0 mg/ml; mientras que los contenidos en $EqAA_{SR}$ y $EqAA_{PR}$ para esas actividades fueron despreciables, 0,3 y 0,6 mg/g respectivamente. En la **Figura 82** se muestran las

curvas de actividad SR y PR en los tres extractos metanólicos de las muestras de *GfLC* y *GfWG* y también las obtenidas para las sustancias patrón y el control de harina de trigo control (WF).

Huang *et al.* (2011). analizando las capacidades antioxidantes de la harina de trigo control (WF) informaron una buena actividad SR, que fue mayor en el extracto etanólico en relación al acuoso con un moderado PR en el extracto etanólico, siendo muy bajo en el extracto acuoso. Un aspecto que es necesario mencionar es que el tratamiento térmico al cual se sometió el trigo a utilizar como control (90 minutos a 121°C, ver 2.1 en el capítulo IV) puede haber afectado marcadamente el contenido antioxidante original del grano de trigo.

3.3. Compuestos antioxidantes de *Grifola* spp.

En los hongos la actividad antioxidante se atribuye generalmente a la presencia de compuestos fenólicos y polisacáridos (Barros *et al.*, 2007a; Heleno *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2010b); aunque también pueden existir otros compuestos antioxidantes y en cantidades variables según la especie, p.e. β -caroteno, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y/o alcaloides (Elmastas *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2007b; Ribeiro *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos se solubilizan tanto en sustancias polares como apolares, y ello depende de la sustitución de los hidrógenos del anillo fenólico por diferentes grupos moleculares. Es así que son más apolares cuando predominan los grupos CH₃, como sería el caso de BHA y TBHQ; y aumentan en polaridad al incrementar el número de grupos OH y COOH, como ocurre p.e. con el ácido gálico, el ácido tánico y el pirogalol. Además los compuestos fenólicos pueden ser pequeños, *i.e.*: un solo anillo con grupo fenólico p.e. el ácido gálico, o bien pueden unirse numerosos monómeros -de manera similar a lo que ocurre en la lignina de los vegetales- alcanzando tamaños moleculares de 0,5-4 KDa (Haslam y Cai, 1994; Quideau *et al.*, 2011). Los resultados del contenido de fenoles totales en los extractos metanólicos de las distintas muestras conteniendo micelio de las especies de *Grifola* bajo estudio se muestran en la **Tabla 45**, y en las **Figura 83** y **84** se muestran las correlaciones para *G. gargal* y *G. sordulenta* entre la actividad antioxidante expresada por ambas la EqAA_{SR} y la EqAA_{PR} vs. la presencia de compuestos fenólicos medida en EqAG en los extractos.

Los polisacáridos de los hongos son en general moléculas de alto peso molecular y por ello solubles en agua a bajas concentraciones, aunque existen también ciertos polisacáridos de relativo bajo peso molecular, de alrededor de 5 KDa, que poseen propiedades antioxidantes (Liu *et al.*, 2010b). Para su solubilidad dependen de la habilidad que tiene el agua libre para formar uniones por puentes de hidrógeno, por eso no es esperable la presencia de polisacáridos de este tamaño molecular en los extractos metanólicos, sí bien podrían encontrarse algunos oligosacáridos más pequeños.

Tabla 45. Contenido de compuestos fenólicos en muestras conteniendo micelio de *Grifola gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa*. Valores promedio expresados en equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca obtenida de los tratamientos correspondientes al cultivo de micelio en medio nutritivo líquido en “frascos”, al cultivo de micelio en medio nutritivo líquido agitado conteniendo “BAP”, al cultivo de micelio en medio nutritivo líquido “estacionario” y a las harinas de trigo control (WF) y de trigo biotransformado (*Gg*WG, *Gs*WG y *Gf*WG). Columna I: comparación de los valores medios de todos los tratamientos. Columna II: comparación de los valores medios dentro de cada grupo de tratamientos. Las letras indican las diferencias estadísticas entre las medias (Tukey, $\alpha=0,05$).

Especies y muestras ^a	EqAG		
	mg/g	I	II
<i>Grifola gargal</i>			
<i>Gg</i> FB	3,4	ijklm ^b	-
<i>Gg</i> LC-frascos I	5,3	f	A ^c
<i>Gg</i> LC-frascos II	5,4	f	A
<i>Gg</i> LC-frascos III	3,4	ijklm	B
<i>Gg</i> LC-frascos IV	4,0	ijk	B
<i>Gg</i> LC-BAP 0 mg/l	10,3	b	C ^d
<i>Gg</i> LC-BAP 0,1 mg/l	7,8	c	D
<i>Gg</i> LC-BAP 1 mg/l	5,0	fgh	E
<i>Gg</i> LC-BAP 5 mg/l	5,1	fg	E
<i>Gg</i> LC-BAP 10 mg/l	4,3	ghi	E
<i>Gg</i> WG	3,3	klm	G ^e
<i>Grifola sordulenta</i>			
<i>Gs</i> LC-frascos I	5,7	def	J ^f
<i>Gs</i> LC-frascos II	2,9	m	L
<i>Gs</i> LC-frascos III	4,2	hij	K
<i>Gs</i> LC-frascos IV	3,7	ijklm	K
<i>Gs</i> LC-BAP 0 mg/l	5,9	def	MN ^g
<i>Gs</i> LC-BAP 0,1 mg/l	3,9	ijkl	O
<i>Gs</i> LC-BAP 1 mg/l	6,4	d	M
<i>Gs</i> LC-BAP 5 mg/l	5,6	ef	N
<i>Gs</i> LC-BAP 10 mg/l	3,0	lm	P
<i>Gs</i> LC-estacionario	10,3	b	Q ^h
<i>Gs</i> WG	1,0	n	H
<i>Grifola frondosa</i>			
<i>Gf</i> LC-estacionario	6,4	de	R
<i>Gf</i> WG	19,6	a	F
Wf	0,1	n	I

^a *Gg*: *G. gargal*; *Gs*: *G. sordulenta*; *Gf*: *G. frondosa*. FB: fructificaciones; LC: cultivo líquido; WG: cultivo de micelio en granos de trigo; WF granos de trigo control. I-IV: cultivo agitado en frascos con: medio basal (I); vitaminas y aminoácidos (II); reguladores (III) o vitaminas, aminoácidos y reguladores (IV). BAP 0-10: cultivo agitado en Erlenmeyers con bencilaminopurina en concentraciones desde 0 a 10 mg/l. Estacionario: cultivo en fuentes sin agitación.

El error estándar de los valores medios se calculó con la fórmula $EE_{ANOVA} = (CM_{error} / n_i)^{1/2}$ y fue: ^b 0,2, ^c 0,2, ^d 0,2, ^e 0,1, ^f 0,1, ^g 0,2 y ^h 0,2.

Figura 83. Análisis de regresión de actividad SR (EqAA_{SR}) vs. contenido de compuestos fenólicos (EqAG) en *Grifola* spp. *Grifola gargal* (○, línea sólida), *G. sordulenta* (◊, línea punteada), *G. frondosa* (■) y harina de trigo control “WF” (▲).

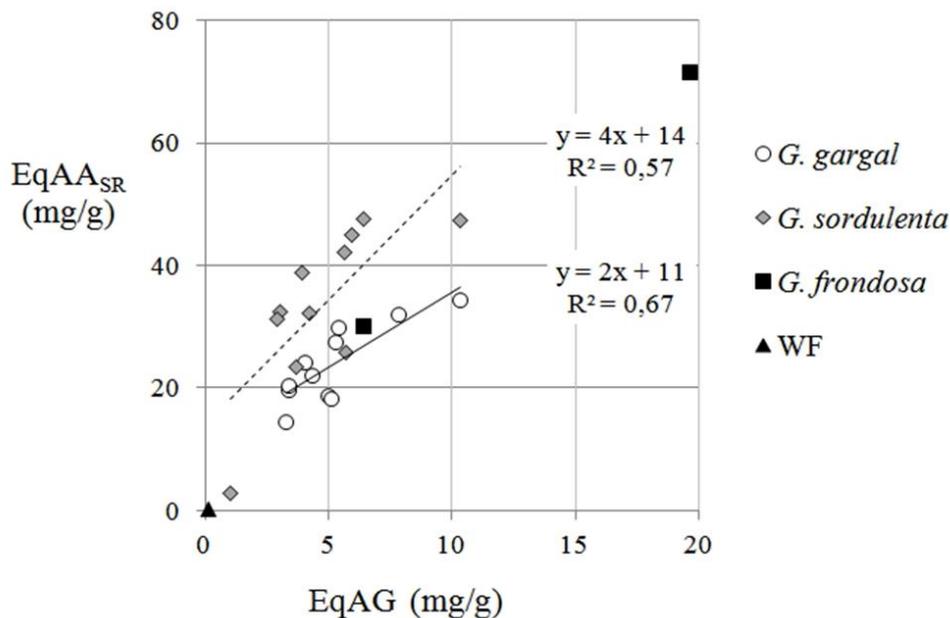
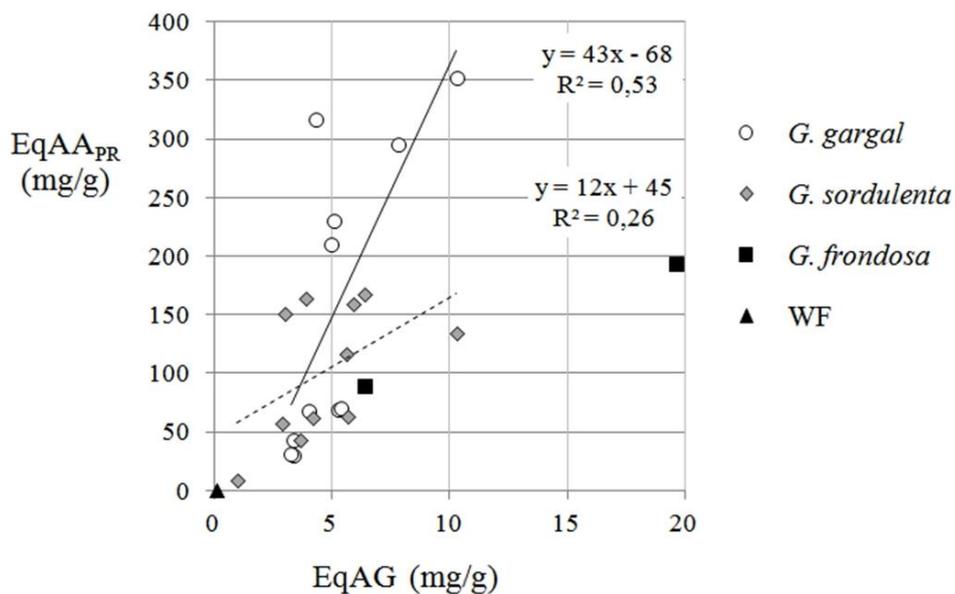


Figura 84. Análisis de regresión de actividad PR (EqAA_{PR}) vs. el contenido de compuestos fenólicos (EqAG) en *Grifola* spp. *Grifola gargal* (○, línea sólida), *G. sordulenta* (◊, línea punteada), *G. frondosa* (■) y harina de trigo control “WF” (▲).



3.3.1. Compuestos antioxidantes en *Grifola gargal*

El extracto metanólico de micelio obtenido mediante cultivo líquido de *G. gargal* presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos que el proveniente del micelio de la fructificación y también mayor que el obtenido de la harina de granos de trigo biotransformados. En especial los tratamientos GgLC-frascos I y GgLC-frascos II presentaron valores promedio de 5,3- 5,4 mg/g EqAG, y los tratamientos GgLC-BAP 0 y GgLC-BAP 0,1 produjeron contenidos tan altos como de 10,3 y 7,8 mg/g, respectivamente. En comparación, los contenidos en EqAG en la fructificación y en la harina biotransformada fueron un 40-60 % menores, *c.a.* 3 mg/g (**Tabla 45**).

El contenido de compuestos fenólicos en EqAG en la harina de granos de trigo biotransformados (GgWG) fue menor respecto al obtenido en los micelios provenientes de los otros tratamientos de *G. gargal*, así como lo había sido el contenido medido en EqAA_{SR} y EqAA_{PR} (**Tablas 43 y 44**). Mas allá de la baja concentración de estos compuestos fenólicos, presumiblemente formen parte de los compuestos responsables de la alta capacidad antioxidante observada por los valores bajos de CE50_{SR} y CE50_{PR} (**Tablas 43 y 44**).

El contenido de compuestos fenólicos de las fructificaciones de *G. gargal* fue en promedio de 3,4 mg/g EqAG sobre la base de peso seco; Brujin *et al.* (2008; 2009) obtuvieron valores de contenidos en compuestos fenólicos de 60- 77 mg/ 100 g sobre la base de peso fresco en extractos de basidiomas- de *G. gargal* obtenidos con 20% de etanol. Estos valores expresados sobre la base de peso seco (considerando un contenido relativo de agua de 85 %) representarían un contenido de 4- 5 mg/g EqAG. Además, en una extracción con 90% etanol obtuvieron valores de 3,6 mg/g EqAG, valor muy similar al mencionado precedentemente para el extracto en metanol. Según los estudios de estos autores un 5 a 10 % de este contenido fenólico serían flavonoides Brujin *et al.* (2009).

Es interesante señalar que en casi todas las muestras de los tratamientos analizados, los contenidos altos de compuestos fenólicos expresados en EqAG fueron consistentes con los valores bajos de las CE50_{SR} y CE50_{PR} y valores altos de EqAA_{SR} y EqAA_{PR}, es decir que las muestras de origen tenían una alta actividad antioxidante. Sin embargo se halló una excepción en el caso de GgLC-BAP 10 mg/ml, porque a pesar de que exhibió un bajo contenido en EqAG mostró poseer una buena capacidad antioxidante expresada en términos de CE50_{PR}, EqAA_{SR} y EqAA_{PR}. Puede argumentarse que ello sería causado por la presencia de uno o más metabolitos antioxidantes no fenólicos cuya vía de biosíntesis resultaría inducida por la concentración más elevada de BAP.

El análisis de regresión de la propiedad de extinción de DPPH de los extractos metanólicos de las muestras de *G. gargal* expresado mediante el contenido en equivalentes de ácido ascórbico EqAA_{SR} vs. EqAG indicó que gran porcentaje de la variación en los valores de EqAA_{SR} podrían explicarse por el contenido de compuestos fenólicos (**Figura 83**, $R^2=0,67$). La extrapolación de la curva de regresión al eje de EqAA_{SR} (valor cero para EqAG, **Figura 83**) indica que en ausencia de fenoles la actividad antioxidante resultó ser equivalente a 11 mg/g de ácido ascórbico; de manera que también participan de la respuesta SR global otros metabolitos no fenólicos.

En el análisis de la regresión de la propiedad del poder reductor de los extractos metanólicos de las muestras de *G. gargal* expresado mediante el contenido en equivalentes de ácido ascórbico EqAA_{PR} vs. EqAG, el coeficiente de regresión hallado indicó que el contenido fenólico explicaría en un 53 % la variación del PR. Además por extrapolación de la curva de regresión se muestra que el PR debido al contenido de compuestos fenólicos se desarrollaría a partir de 2 mg/g EqAG (**Figura 84**).

En la **Tabla 46** se muestran los resultados de las sustancias patrones separados y revelados en cromatografía en TLC y en la **Tabla 47** se muestran los resultados de la cromatografía en el mismo sistema de TLC con extractos metanólicos de *G. gargal*. Algunas imágenes ilustrativas de los cromatogramas de *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa* y la harina control se muestran en la **Figura 85**.

En el conjunto de muestras de *G. gargal* se encontraron 16 manchas con actividad antioxidante, de las cuales 11 fueron de muy alto poder antioxidante (valor +++ en la columna de DPPH, **Tabla 47**). Los extractos metanólicos de las muestras provenientes de los diferentes grupos de micelios de cultivos líquidos mostraron patrones similares de bandas entre ellos, por este motivo se muestran los resultados para todo el conjunto *i.e.* I, II, III y IV para “frascos” y 0, 0,1, 1, 5 y 10 para “BAP” (**Tabla 47**). De igual manera se procedió más adelante para *G. sordulenta* (**Tabla 48**).

En el cromatograma se hallaron manchas con actividad antioxidante cuyas características de revelado, en comparación a los patrones empleados y a la literatura (ver ítem 2.6.), indicaban la existencia de compuestos fenólicos. Los más reactivos al DPPH fueron los compuestos polares. En ellos se observó que eran de color beige-marrón que se oscurece en presencia de amonio, la reacción con cloruro férrico- ferricianuro de potasio daba colores fuxia- rosa y la de antrona-ácido sulfúrico colores verde pardos, además fueron UV₂₅₄ y UV₃₆₆ positivos. Dos de estos compuestos con características de fenoles mostraron además, aumento en la fluorescencia en UV₃₆₆ seguida a una exposición al amonio, lo cual se lo relaciona con compuestos flavonoides (ver ítem 2.6.2.).

Si bien se intentó separar las manchas por su grado de polaridad, no hubo una separación clara entre las bandas. Este efecto fue más marcado en el caso de GgWG donde se halló que la banda antioxidante forma un *continuum* de compuestos desde el sitio de siembra hasta la altura correspondiente al Rf: 0,80, siendo los más polares los más reactivos al DPPH (Rf: 0,00 hasta 0,40) (**Tabla 47**). Es necesario mencionar que el control del extracto metanólico de la harina de trigo control (WF) solo mostró actividad antioxidante moderada en la fracción polar (**Tabla 49**).

Los compuestos fenólicos y en especial los flavonoides son compuestos del metabolismo secundario de los reinos *Plantae* y *Fungi* y por ello están presentes en el género *Grifola*. El análisis comparativo del contenido de fenoles y en particular de flavonoides, en extractos con diferentes solventes vs. la respuesta en la actividad antioxidante fue estudiada en fructificaciones de *G. gargal* por Brujin *et al.* (2008 y 2009). Estos autores observaron que en extracciones de agua/etanol en diferentes proporciones el contenido de fenoles y flavonoides permanece constante, así como el PR, mientras que la actividad SR aumenta a mayor proporción de etanol (Brujin *et al.*, 2009).

Tabla 46. Resultados del análisis de la cromatografía en capa delgada de las sustancias empleadas como patrones. Las sustancias con resultado positivo en el revelado con DPPH fueron registradas y la velocidad de esta reacción antioxidante se dividió en rápida e intensa: +++ (lectura realizada a los 30 minutos); lenta e intensa: ++ (la lectura se realizó a las 16 h) y débil: + (lectura realizada a las 16 h). Se indican los colores de las bandas en luz blanca, antes y después de una exposición a vapores de amonio, a UV₂₅₄ y UV₃₆₆. El revelado con ferricianuro de potasio y con la antrona-sulfúrico se realizó para la detección de compuestos fenólicos y polisacáridos, respectivamente.

Controles	Rf	DPPH	Visible	Amonio	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Ferricianuro de potasio	Antrona sulfúrico
Ác. ascórbico	0,20	+++	-	-	violeta	celeste	azul	gris
α-tocoferol	0,95	+++	-	-	violeta	-	violeta	negro
β-caroteno	0,95	++	ámbar	-	azul	negro	ámbar	negro
BHA	0,85	+++	-	gris	violeta	negro	beige	violeta
TBHQ	0,75	+++	azul	violeta	violeta	negro	violeta	beige
Ác. gálico	0,35	+++	beige	ocre	violeta	negro	ocre	violeta
Ác. tánico	0,45	+	marrón	ocre	violeta	negro	ocre	pardo
Pirogalol	0,65	+++	beige	marrón	marrón	negro	ocre	pardo
Sulfato de dextrano	0,10 0,20	- -	- -	- -	violeta -	- -	- -	- gris
Glicol quitosano	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. gargal</i> polisacárido	0,95 0,20	nd	- -	- -	violeta violeta	celeste -	- -	gris gris
<i>G. frondosa</i> polisacárido	0,95 0,20	nd	- -	- -	violeta violeta	celeste -	- -	- -
<i>A. blazei</i> polisacárido	0,95 0,20	nd	- -	- -	violeta violeta	celeste -	- -	- -
<i>L. edodes</i> polisacárido	0,95 0,20	nd	- -	- -	violeta violeta	celeste -	- -	negro gris

Lo anterior es coherente con los datos obtenidos trabajando en esta tesis con extractos metanólicos, que indican una mayor dependencia de la presencia de fenoles para el PR que para la actividad SR. Con otros solventes de diferentes polaridades (de mayor a menor): agua, etanol, acetona, etil acetato y hexano hallaron distinta capacidad antioxidante en cuanto a SR y PR así como contenidos de fenoles y flavonoides (Brujin *et al.*, 2009). En la extracción acuosa hallaron valores altos de fenoles y flavonoides y no se detectó una actividad SR importante e incluso nada de PR; en etanol y acetona hallaron menor contenido de fenoles y flavonoides que en la extracción acuosa y con estos solventes obtuvieron los mayores valores de SR y PR, finalmente con etil acetato y hexano obtuvieron valores despreciables de fenoles y flavonoides, y sin embargo los valores de SR fueron *c.a.* del 20% correspondiente a los extractos con mayor actividad (etanol y acetona).

Los resultados obtenidos sobre la actividad antioxidante de las fructificaciones de *G. gargal* indican que el contenido de compuestos fenólicos no puede estar completamente asociado con la actividad SR y PR. La actividad antioxidante de extractos ricos en compuestos fenólicos se ha relacionado comúnmente con el contenido fenólico determinado con la reacción de Folin–Ciocalteu;

sin embargo se ha argumentado que la variación de cada compuesto fenólico influye en la actividad antioxidante resultando en sinergismo, antagonismo, co-antioxidación y retardo en la oxidación (Becker *et al.*, 2004).

En el estudio de TLC se halló que la banda apolar del extracto metanólico de fructificaciones de *G. gargal* posee una actividad antioxidante muy buena y no está relacionada con fenoles, su coloración roja en respuesta al reactivo de antrona sulfúrico sugiere para aquella banda una identidad compatible con oligosacáridos.

Tabla 47. Resultados del análisis de TLC de *Grifola gargal*. Las sustancias con resultado positivo en el revelado con DPPH fueron registradas y la velocidad de esta reacción antioxidante se dividió en rápida e intensa: +++ (lectura realizada a los 30 minutos); lenta e intensa: ++ (la lectura se realizó a las 16 hs) y débil: + (lectura realizada a las 16 hs). Se indican los colores de las bandas en luz blanca, antes y después de una exposición a vapores de amonio, a UV₂₅₄ y UV₃₆₆. El revelado con ferricianuro de potasio y con la antrona-sulfúrico se realizó para la detección de compuestos fenólicos y polisacáridos, respectivamente.

<i>Grifola gargal</i>	Rf	DPPH	Visible	Amonio	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Ferricianuro de potasio	Antrona sulfúrico
<i>GgFB</i>								
m. polares I	0,00- 0,20	+++	marrón	ocre	violeta	azul	fuxia	verde
m. polares II	0,20- 0,45	+++	beige	marrón	celeste	-	rosa	pardo
m. apolares	0,95- 1,00	+++	-	beige	azul	celeste	-	rojo
<i>GgLC-frascos</i>								
m. polares I	0,00- 0,10	++	beige	marrón	celeste	-	fuxia	verde
m. polares II	0,10- 0,20	+++	marrón	ocre	violeta	azul	rosa	pardo
m. polares III	0,20- 0,40	++	marrón	ocre	violeta	azul	-	pardo
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	marrón	azul	celeste	-	rojo
<i>GgLC-BAP</i>								
m. polares I	0,00- 0,20	++	-	beige	violeta	celeste*	fuxia	verde
m. polares II	0,20- 0,40	+++	beige	marrón	violeta	celeste*	fuxia	pardo
m. polares III	0,50- 0,60	+++	marrón	ocre	azul	-	rosa	-
m. apolares	0,95- 1,00	+++	-	beige	celeste	-	-	-
<i>GgWG</i>								
m. polares I	0,00- 0,20	+++	marrón	ocre	gris	azul	fuxia	verde
m. polares II	0,20- 0,40	+++	marrón	ocre	violeta	azul	fuxia	pardo
m. polares III	0,40- 0,60	++	marrón	ocre	violeta	-	rosa	pardo
m. polaridad intermedia	0,60- 0,80	+	-	beige	gris	-	rosa	pardo
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	marrón	violeta	celeste	-	pardo

(*) Respuesta asociada a flavonoides: celeste brillante en UV₃₆₆ que aumenta luego de exposición al amonio, y además con características de fenoles en la reacción con cloruro férrico- ferricianuro de potasio.

3.3.2. Compuestos antioxidantes de *Grifola sordulenta*

El contenido de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de *G. sordulenta* fue variable entre las diferentes bioformas de micelio. El mayor contenido en EqAG fue el hallado en GgLC-estacionario: 10,3 mg/g, mientras que el micelio proveniente del cultivo líquido en frascos (*Gs*LC-frascos) y el proveniente del cultivo líquido en Erlenmeyers (*Gs*LC-BAP) mostraron un contenido en EqAG que varió desde 2,9 a 6,4 mg/g. Cabe señalar que el extracto metanólico de las muestras correspondientes a los medios basales de ambos grupos de tratamientos, tenían un contenido similar de compuestos fenólicos de 5,7-5,9 mg/g EqAG. El extracto metanólico con menor contenido en EqAG fue el de *Gs*WG con un contenido de apenas 1,0 mg/g en EqAG (**Tabla 45**).

Para comparar la magnitud de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos entre *G. gargal* y *G. sordulenta* (EqAA_{SR} o EqAA_{PR} vs. EqAG) es útil considerar la pendiente de las correspondientes ecuaciones de las curvas de regresión. En efecto, considerando la capacidad de extinción de radicales DPPH en términos de contenido de ácido ascórbico (EqAA_{SR}), para un mismo contenido de compuestos fenólicos (EqAG), puede apreciarse que los compuestos fenólicos de *G. sordulenta* son más activos que los que presenta *G. gargal* (**Figura 83**). Similarmente, al considerar al PR desde este enfoque, se encuentra que los compuestos fenólicos presentes en *G. sordulenta*, poseen menor actividad de PR en relación a la encontrada para los compuestos fenólicos de las muestras de *G. gargal* (**Figura 84**).

Las curvas de regresión de *G. sordulenta* mostraron un ajuste moderado y bajo, siendo los coeficientes de regresión de 0,57 para SR y de 0,26 para PR; sugiriendo la presencia de fenoles inactivos para estas actividades antioxidantes y aún también que otros compuestos no fenólicos participan de las actividades SR y PR del extracto metanólico. En adición, la extrapolación de las curvas de EqAA_{SR} y EqAA_{PR} vs. EqAG, indican que en ausencia de compuestos fenólicos – determinados por el reactivo de Folin-Ciocalteu - existe una actividad antioxidante de 14 mg/g EqAA_{SR} y 45 mg/g EqAA_{PR}. En *G. gargal* se había determinado tal presencia de actividad antioxidante en ausencia de compuestos fenólicos sólo para el caso de la actividad antioxidante expresada mediante el contenido EqAA_{SR}.

Otro argumento a favor de la presencia de fenoles inactivos o compuestos no fenólicos activos para SR y PR es que de manera global, las diferencias estadísticas halladas en el análisis grupal de “frascos” y “BAP” para las CE50_{SR}, CE50_{PR} y los contenidos en EqAA_{SR} y EqAA_{PR} (**Tablas 43 y 44**) fueron coherentes entre sí, pero todas esas diferencias no fueron consistentes con los contenidos de compuestos fenólicos (**Tabla 45**). Por lo que podría adjudicar a los medios utilizados una modulación cualitativa del contenido de fenoles y/o una modulación cuantitativa de compuestos antioxidantes no fenólicos.

Tabla 48. Resultados del análisis de TLC de *Grifola sordulenta*. Las sustancias con resultado positivo en el revelado con DPPH fueron registradas y la velocidad de esta reacción antioxidante se dividió en rápida e intensa: +++ (lectura realizada a los 30 minutos); lenta e intensa: ++ (la lectura se realizó a las 16 hs) y débil: + (lectura realizada a las 16 hs). Se indican los colores de las bandas en luz blanca, antes y después de una exposición a vapores de amonio, a UV₂₅₄ y UV₃₆₆. El revelado con ferricianuro de potasio y con la antrona-sulfúrico se realizó para la detección de compuestos fenólicos y polisacáridos, respectivamente.

<i>Grifola sordulenta</i>	Rf	DPPH	Visible	Amonio	UV ₂₅₄	uv ₃₆₆	Ferricianuro de potasio	Antrona sulfúrico
<i>GsLC-frascos</i>								
m. polares I	0,00- 0,20	++	beige	marrón	celeste	-	azul	verde
m. polares II	0,20- 0,30	+++	beige	marrón	violeta	azul	fuxia	pardo
m. polares III	0,30- 0,60	+	marrón	ocre	violeta	azul	rosa	pardo
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	marrón	azul	celeste*	rosa	rojo
<i>GsLC-BAP</i>								
m. polares I	0,00- 0,20	+++	marrón	ocre	celeste	rosa	azul	verde
m. polares II	0,20- 0,40	+++	beige	marrón	violeta	celeste*	rosa	pardo
m. polares III	0,50- 0,60	++	beige	-	celeste	verde	rosa	-
m. apolares	0,95- 1,00	+++	-	-	azul	rosa	-	-
<i>GsLC- fuentes</i>								
m. polares I	0,00- 0,10	+++	marrón	ocre	celeste	-	rosa	pardo
m. polares II	0,10- 0,20	+++	marrón	ocre	violeta	celeste*	rosa	verde
m. polares III	0,30- 0,50	+++	marrón	ocre	violeta	azul	rosa	verde
m. polaridad intermedia	0,60- 0,80	+	-	beige	celeste	azul	-	beige
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	marrón	azul	celeste	-	rojo
<i>GsWG</i>								
m. polares	0,00- 0,50	++	-	-	azul	-	rosa	-
m. polaridad intermedia	0,60- 0,80	+	-	-	celeste	azul	-	rojo
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	-	violeta	celeste*	naranja	rojo

(*) Respuesta asociada a flavonoides: celeste brillante en UV₃₆₆ que aumenta luego de exposición al amonio, y además con características de fenoles en la reacción con cloruro férrico- ferricianuro de potasio.

En la cromatografía en capa delgada se pudieron distinguir 16 bandas de compuestos con actividad antioxidante, de los cuales 10 mostraron muy alto valor antioxidante ante la reacción con DPPH (**Tabla 48**). El efecto de bandas antioxidantes formando un *continuum* también fue registrado en todos los extractos de esta especie, especialmente en los provenientes de las muestras de *GsLC-fuentes*.

En todas las bandas altamente reactivas con DPPH se encontraron características de compuestos fenólicos, como ser el color beige-marrón que se oscurecía en presencia de vapores de amonio o las bandas fuxia-rosadas ante la reacción con ferricianuro de potasio y verde-pardo en la reacción con el revelador de antrona- ácido sulfúrico. Con DPPH también aparecieron bandas apolares altamente reactivas con una coloración roja en la reacción de antrona- ácido sulfúrico, que fueron de color rosa

anaranjado o bien con reacción negativa al ferricianuro de potasio, y que estarían relacionadas con oligosacáridos, solos o combinados con compuestos fenólicos.

La presencia de fenoles, con aumento de fluorescencia en UV₃₆₆ luego de la exposición al amonio compatible con una respuesta flavonoide- positiva, fue encontrada en bandas polares para las muestras de micelio de cultivo líquido y una banda apolar en el caso del grano de trigo biotransformado. En los 5 casos en que se encontró esta respuesta, también se halló que la actividad antioxidante era la más potente del extracto cromatografiado (**Tabla 48**), lo cual enfatiza el papel antioxidante de los flavonoides presentes en *G. sordulenta*.

3.3.3. Compuestos antioxidantes de *Grifola frondosa*

El contenido de compuestos fenólicos de 6,4 mg/g EqAG en el extracto metanólico del micelio de *G. frondosa* obtenido con la metodología de cultivo líquido estacionario (*Gf*LC-estacionario) fue marcadamente menor que el obtenido en el extracto de *G. sordulenta* utilizando la misma metodología de cultivo (*Gs*LC-estacionario) (10,3 mg/g EqAG), siendo además el más elevado de toda la serie de muestras analizadas para esta última especie. Por otra parte, cabe recordar que el mayor contenido en compuestos fenólicos en *G. gargal* fue el del extracto metanólico del micelio proveniente de cultivo líquido en Erlenmeyers (*Gg*LC-BAP 0) también con 10,3 mg/g EqAG.

El contenido de compuestos fenólicos en un extracto metanólico de micelio de *G. frondosa* hallado por Lin (1999) fue menor (1,6 mg/g EqAG). Este autor además encontró un contenido muy elevado de compuestos fenólicos en las fructificaciones de esa especie (12,3 mg/g EqAG).

La harina de granos de trigo control exhibió el contenido más bajo en compuestos fenólicos: 0,1 mg/g EqAG. El extracto metanólico de la harina de grano de trigo biotransformado con *G. frondosa* (*Gf*WG) exhibió el contenido más alto de compuestos fenólicos (19,6 mg/g EqAG, **Tabla 45**). Este particularmente alto contenido en compuestos fenólicos no fue hallado en las harinas de grano de trigo biotransformado por *G. gargal* ni por *G. sordulenta*, con 3,1 y 1,0 mg/g EqAG, respectivamente. Otros autores (Huang *et al.*, 2011) determinaron que en los extractos etanólicos y acuosos de harina de trigo biotransformada con *G. frondosa* había contenidos de 13 y 23 mg/g EqAG, tan altos como los de las extracciones metanólicas de estos ensayos.

El valor del contenido en compuestos fenólicos correspondiente a las muestras de *Gf*LC-estacionario en la gráfica de actividad EqAA_{SR} de *vs.* EqAG se ubicó entre las dos curvas de regresión de *G. gargal* y *G. sordulenta* (**Figura 83**), de manera tal que se considera que la actividad antioxidante en su capacidad SR expresada en contenido equivalente de ácido ascórbico de estos compuestos es similar en estas especies.

En el caso de *Gf*WG, se observó mayor contenido en compuestos fenólicos, que seguía la tendencia global de las curvas EqAA_{SR} para las otras especies (**Figura 83**).

Tabla 49. Resultados del análisis de TLC de micelio de cultivo líquido de *Grifola frondosa* y harina de granos de trigo biotransformados por esta especie y la harina de granos de trigo control (WF). Las sustancias con resultado positivo en el revelado con DPPH fueron registradas y la velocidad de esta reacción antioxidante se dividió en rápida e intensa: +++ (lectura realizada a los 30 minutos); lenta e intensa: ++ (la lectura se realizó a las 16 hs) y débil: + (lectura realizada a las 16 hs). Se indican los colores de las bandas en luz blanca, antes y después de una exposición a vapores de amonio, a UV₂₅₄ y UV₃₆₆. El revelado con ferricianuro de potasio y con la antrona-sulfúrico se realizó para la detección de compuestos fenólicos y polisacáridos, respectivamente.

<i>Grifola frondosa</i> Harina control	Rf	DPPH	Visible	Amonio	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Ferricianuro de potasio	Antrona sulfúrico
<i>Gf</i> LC-fuentes								
m. polares I	0,00- 0,20	+++	beige	marrón	azul	celeste*	azul	-
m. polares II	0,20- 0,60	++	-	-	celeste	azul	rosa	pardo
m. apolares	0,95- 1,00	+	-	beige	azul	celeste	-	rojo
<i>Gf</i> WG								
m. polares I	0,00- 0,20	+++	marrón	ocre	celeste	celeste*	-	marrón
m. polares II	0,20- 0,40	+++	beige	marrón	azul	azul	rosa	marrón
m. polaridad intermedia	0,60- 0,90	+	-	beige	celeste	celeste	-	marrón
m. apolares	0,95- 1,00	+++	beige	-	azul	rosa	rosa	rojo
WF								
m. polares	0,00- 0,20	+	-	-	-	-	rosa	rojo
m. apolares	0,95- 1,00	++	amarillo	-	azul	celeste	-	rojo

(*) Respuesta asociada a flavonoides: celeste brillante en UV₃₆₆ que aumenta luego de exposición al amonio, y además con características de fenoles en la reacción con cloruro férrico- ferricianuro de potasio.

En cuanto al PR se observó que ambos extractos metanólicos de los micelios provenientes, ya sea de *Gf*LC - estacionario o de *Gf*WG, se ubicaban en la curva de regresión obtenida al relacionar actividad antioxidante (PR) con el contenido fenólico de *G. sordulenta* (**Figura 84**). En otras palabras, *G. frondosa* y *G. sordulenta* poseen similares capacidades en cuanto a PR a causa de sus compuestos fenólicos, siendo además menos potentes en comparación a la capacidad en PR que poseen los compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de micelios de *G. gargal*.

En ambas gráficas que muestran las capacidades de los compuestos fenólicos en términos de sus capacidades SR y PR (**Figuras 84 y 85**, respectivamente), se destaca que el valor correspondiente al extracto metanólico preparado con la harina control (WF) se encontró cerca del origen en ambos ejes, indicando que no posee contenido fenólico ni actividad antioxidante importantes.

El análisis del cromatograma de los extractos metanólicos desarrollado en capa delgada reveló que tanto el micelio de cultivo líquido como la harina de granos de trigo biotransformados de *G. frondosa* poseían 7 bandas de compuestos con actividad antioxidante, de los cuales cuatro mostraron muy alto valor antioxidante ante la reacción con DPPH (**Tabla 49**). El efecto de bandas antioxidantes formando un *continuum*, también fue registrado en todos los extractos de esta especie, especialmente en los provenientes de las muestras de *Gf*WG.

En todas las bandas altamente reactivas con DPPH (+++) se encontraron características de compuestos fenólicos, como las mencionadas para *G. gargal* y *G. sordulenta* (Tabla 49). En el extracto proveniente del *GfLC*-estacionario se detectaron compuestos no fenólicos apolares asociados a oligosacáridos con baja actividad antioxidante. En cambio, se encontró una banda apolar en el cromatograma del extracto correspondiente a *GfWG* que fue de alto poder antioxidante y que estaba asociada a fenoles y oligosacáridos. En dos bandas con polaridad alta separadas en los cromatogramas del extracto de *GfLC*-estacionario y *GfWG* se halló actividad asociada a compuestos flavonoides.

Por su parte, el cromatograma del extracto de harina de granos de trigo control reveló una moderada actividad antioxidante en la banda apolar con características de compuestos carotenoides (Tabla 49); como es ampliamente conocido estos compuestos están presentes en el grano de *Triticum durum*. Este análisis en cromatografía de capa delgada permitió además mostrar la presencia en los extractos metanólicos de compuestos antioxidantes que se mantuvieron activos luego del proceso al que fueron sometidos los granos de trigo y demostrar además que el incremento sobre tal actividad antioxidante basal en los granos biotransformados fue producto del metabolismo de los hongos.

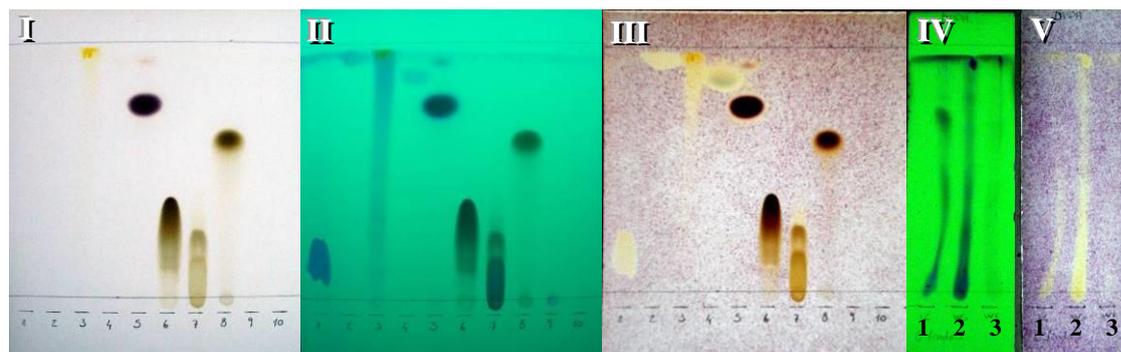
4. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo permitieron comprobar las hipótesis formuladas, a saber: i) que *G. gargal* y *G. sordulenta* son especies de hongos que poseen muy buenos atributos antioxidantes especialmente poder reductor; ii) que esta actividad antioxidante se debe en parte a la presencia de compuestos fenólicos pero no son los únicos compuestos activos; iii) que las diferentes bioformas de micelio como las formas de cultivo modifican cuali y cuantitativamente el contenido de antioxidantes causando variaciones en la actividad SR y en el PR, iv) que el micelio puede ser inducido a modificar su contenido en antioxidantes usando reguladores de crecimiento vegetal, y v) que la variación en el contenido de una propiedad antioxidante es independiente de la producida en otra propiedad antioxidante.

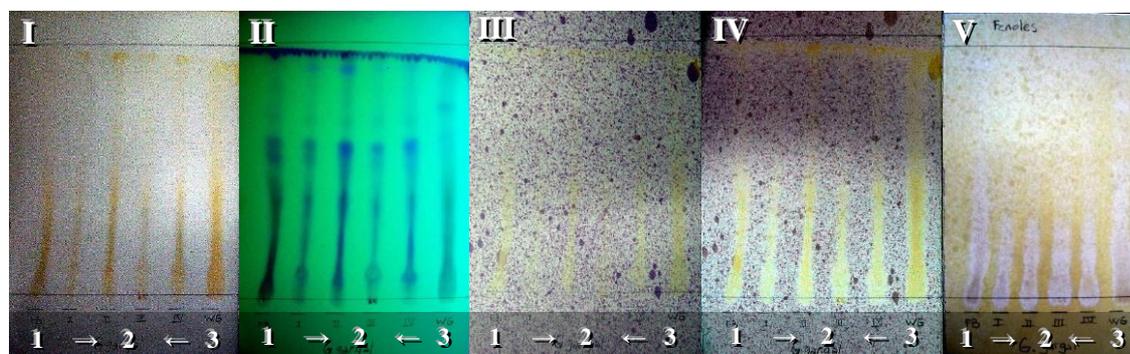
Fue particularmente notable la actividad antioxidante de metabolitos apolares constatada en todos los extractos metanólicos de *G. gargal* y *G. sordulenta*; que en algunos casos podría asociarse a compuestos fenólicos, mientras que en otros podría deberse a metabolitos no fenólicos, explicando en este último caso algunas inconsistencias encontradas entre los contenidos de compuestos fenólicos y las $CE50_{SR}$, $CE50_{PR}$, $EqAA_{SR}$ y $EqAA_{PR}$.

Figura 85. Cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de *Grifola* spp. para la corrida separativa de los estándares y extractos metanólicos fueron sembrados en placas de silicagel y desarrollados en una solución de cloroformo:metanol:agua (65:35:10).

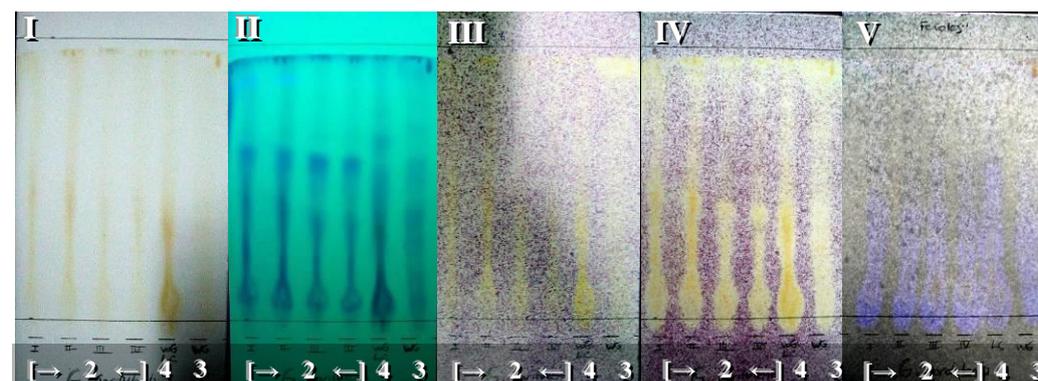
A: las imágenes I, II y III muestran las corridas cromatográficas de los estándares químicos: (1) ácido ascórbico, (2) α -tocoferol, (3) β -caroteno, (4) BHA, (5) TBHQ, (6) ácido gálico (7) ácido tánico, (8) pirogalol, (9) dextrano, (10) quitosano; en luz visible (I), UV₂₅₄ (II), y luego de 16 hs del rociado con DPPH (III). Las imágenes IV y V muestran las corridas cromatográficas de extractos de micelio de cultivo líquido de *G. frondosa* (1), harina biotransformada por *G. frondosa* (2) y harina control (3) en UV₂₅₄ (IV) y después de 30 minutos del rociado con DPPH (V).



B: imágenes del espectro visible (I) y del UV₂₅₄ (II) de las corridas cromatográficas de extractos metanólicos de *G. gargal*: cuerpos fructíferos (1), micelio de cultivo líquido en frascos (2, GgLC I II III y IV) y harina biotransformada (3), y su respuesta al rociado con DPPH a los 30 minutos (III) y a las 16 horas (IV). La presencia de compuestos fenólicos (V) fue revelada con el rociado de una solución de $\text{Cl}_3\text{Fe}-\text{K}_3(\text{CN})_6$.



C: ídem (B) con los extractos metanólicos de *G. sordulenta*: micelio de cultivo líquido en frascos (2, GgLC I II III y IV), harina biotransformada (3) y micelio de cultivo líquido en fuentes (4).



Capítulo VII

Propiedades antigenotóxicas en *Grifola* spp.

1. Introducción

Grifola gargal y *G. sordulenta* son considerados hongos comestibles según los habitantes de los bosques patagónicos. El conocimiento sobre el estatus tóxico y genotóxico de estas especies permitiría, en el caso que fueran atóxicas, el desarrollo de nuevos productos alimenticios y eventualmente medicinales en base a estos hongos. *Grifola frondosa*, por su parte, es un conocido hongo medicinal, y existe suficiente evidencia de su efecto como inmunomodulador y antitumoral (Kodama *et al.*, 2003), y de sus efectos benéficos derivados de sus propiedades antioxidantes (Mau *et al.*, 2002; 2003), sin embargo, hasta el presente hay pocos estudios de su acción genotóxica/antigenotóxica (Jin y Qian, 1994).

1.1. Genotoxicidad y hongos como alimentos funcionales

La síntesis y replicación del ADN no son procesos infalibles, las alteraciones genéticas pueden ocurrir espontáneamente durante las divisiones celulares. Ello se debe en parte a que en condiciones normales del metabolismo aeróbico las células producen especies reactivas de oxígeno (en inglés ROS) capaces de reaccionar y alterar al ADN (Wallace Hayes, 2008). Algunos ejemplos de estas moléculas reactivas de oxígeno son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), el singlete de oxígeno (1O_2), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La fidelidad e integridad de la información genética se mantiene mediante varios tipos de reparaciones enzimáticas del ADN. Esta característica de auto-reparación enfatiza la importancia de la integridad de esta molécula para la supervivencia del organismo. Algunos sistemas de reparación de ADN son constitutivos de las células, y otros pueden ser adaptativos o inducidos por la exposición a genotóxicos (Wallace Hayes, 2008).

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos, entendiéndose por “material genético” no solo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Los genotóxicos o xenobióticos se clasifican entonces en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos; y otras tres de acuerdo a su modo de acción o efectos: mutágenos, carcinógenos o teratógenos, que dan lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Abrevaya, 2008)

La antimutagénesis consiste en la inhibición de la tasa de mutación y consecuentemente influye disminuyendo la incidencia de cáncer y otras afecciones (Vogel y Nivard, 2000). Kada y Shimoi (1987) propusieron diferenciar estos agentes según su actividad antigenotóxica en dos categorías: los desmutagénicos que son aquellos que previenen el daño al ADN actuando sobre el agente mutagénico antes que ocurra el daño; y los bioantimutagénicos que actúan luego que el daño al ADN se produjo, regulando los procesos de reparación que suprimen la fijación de la mutación.

Una dieta funcional con propiedades desmutagénicas y bioantimutagénicas ayudaría a inhibir o

reparar los daños provocados por los agentes genotóxicos. En efecto, algunos alimentos han sido efectivos en modelos de estudios preclínicos (de Flora *et al.*, 2001). Entre los alimentos funcionales figuran ciertos hongos medicinales que han demostrado poseer muchos ingredientes quimiopreventivos que inhiben la actividad de varios mutágenos y carcinógenos (Chang, 1996; Zjawiony, 2004). En la actualidad, basado en descubrimientos científicos existe un continuo desarrollo de medicinas, alimentos funcionales y suplementos dietarios derivados de los hongos (Chang, 1996; Wasser., 2010).

Taira *et al.* (2005) encontraron que las fructificaciones de *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* inhiben el daño al ADN causado por varios mutágenos. Efectos similares se han descritos para *Agaricus blazei* (Delmanto *et al.*, 2001; Menoli *et al.*, 2001; Martins de Oliveira *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2004) y varias especies de hongos investigadas por Grüter *et al.* (1990).

Los resultados presentados en el capítulo anterior indican la presencia de diferentes sustancias antioxidantes con diferentes contenidos según el medio de crecimiento del micelio empleado y cuya presencia también varía cuali y cuantitativamente con las condiciones del cultivo. Las sustancias antioxidantes suelen ser las responsables de la desmutagénesis al reaccionar con el agente genotóxico interrumpiendo su llegada a la cadena de ADN, evitando así el consecuente daño (Lohman *et al.*, 2001). Asimismo existen otras sustancias en el micelio que tienen efecto mediante la biomodulación de enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Lakshmi *et al.*, 2006).

1.2. Bioensayo SMART (somatic mutation and recombination test)

Un agente genotóxico puede dañar las cadenas de ADN de cualquier organismo más allá de las diferencias en el metabolismo celular; por ello para su estudio se pueden usar células vegetales, bacterias, hongos, invertebrados (especialmente nematodos y *Drosophila* spp.) y vertebrados (ratas, ratones, y células humanas). Sin embargo, la predicción de los efectos carcinogénicos entre especies requiere que el metabolismo y el mecanismo de acción de los agentes químicos sea igual tanto a altas dosis (como ocurre en los bioensayos) como a bajas dosis, siendo estas últimas las exposiciones más frecuentes para el ser humano (Wallace Hayes, 2008).

De los bioensayos disponibles para la prueba de geno/antigenotoxicidad del material fúngico correspondiente a *G. gargal* y *G. sordulenta* obtenido durante la realización de esta tesis, se eligió el test de mutaciones y recombinaciones somáticas (SMART) en el tejido del ojo de la mosca *Drosophila melanogaster*. Existen evidencias que ciertos alimentos, incluyendo los hongos medicinales, son capaces de reducir la genotoxicidad inducida en larvas de *Drosophila melanogaster* cuando se les suministra un carcinógeno químico. Con el SMART es posible revelar si un alimento es inocuo en cuanto a genotoxicidad y/o presenta actividad antígeno-tóxica.

Los materiales a evaluar y el agente carcinógeno se agregan al medio nutritivo donde crecen las larvas (Vogel y Nivard, 2000). Es un test rápido, económico que permite fácilmente encontrar entre diferentes materiales cuáles presentan agentes activos y se basa en el cómputo de la frecuencia de manchas blancas, (*light spots*) producto de una recombinación somática, en los ojos de moscas

hembras heterocigotas para el color de ojos. (Taira *et al.*, 2005).

En efecto, este test *in vivo* ha demostrado ser una herramienta eficiente en la detección de actividad genotóxica de compuestos puros o mezclas complejas así como en el estudio de las propiedades y mecanismos de sustancias antimutagénicas en la inhibición de la genotoxicidad de compuestos carcinógenos (Vogel y Nivard, 1993; 2000; Taira *et al.*, 2005; de Rezende *et al.*, 2009). El *SMART* también fue exitoso para demostrar los efectos genotóxicos de diferentes radicales libres (Palermo *et al.*, 1994; Fragiorge *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2008). *Drosophila melanogaster* es un organismo que comparte los mecanismos del metabolismo de los compuestos xenobióticos con los vertebrados y este hecho permite la extrapolación de los resultados obtenidos en el *SMART* (Vogel y Nivard, 1993; Kaya *et al.*, 2004; Palermo *et al.*, 2004).

1.3. Agentes genotóxicos

Para evaluar los efectos antimutagénicos de las sustancias hipotéticamente medicinales se utilizan diferentes agentes genotóxicos. Algunos de estos agentes son inocuos en sí mismos y requieren una activación metabólica en el organismo para adquirir la actividad mutagénica; estas sustancias se conocen como promutagénicas o procarcinógenas.

En esta tesis se utilizó como promutagénico el 7,12-dimetilbenzo(α)antraceno (DMBA). Esta sustancia es un hidrocarburo policíclico aromático que luego de la oxidación biológica se transforma en un epóxido muy reactivo que puede unirse covalentemente al ADN causando mutaciones y/o aberraciones cromosómicas. En el ambiente, el DMBA, así como otros hidrocarburos policíclicos aromáticos, se produce por la combustión incompleta de combustibles fósiles, carbón, durante la cocción de comidas fritas o asadas y también está presente en el humo de cigarrillo (Zakrzewski, 2002). Este tipo de sustancias ingresan en la cadena alimentaria y se depositan en los tejidos, siendo entonces un riesgo para el ser humano cuando se alimenta de productos así contaminados (*ibíd.*). En *Drosophila* spp. y en humanos la activación de este tipo de promutágenos se lleva a cabo mediante el sistema enzimático citocromo P-450. Existen antecedentes en el uso de DMBA para el bioensayo *SMART* en *Drosophila* (Taira *et al.*, 2005; Vogel y Nivard, 1993; 2000). Cabe mencionar además que el DMBA es ampliamente usado en ratas como agente causante de tumores de mama (Russo y Russo, 2000).

1.4. Hipótesis

Grifola gargal y *G. sordulenta* son inocuos en cuanto a toxicidad y esto puede ser demostrado evaluando la mortalidad en larvas de *Drosophila* expuestas al crecimiento en medios de cultivo conteniendo el micelio de estos hongos.

Grifola gargal y *G. sordulenta* son inocuos en cuanto a genotoxicidad y esto puede ser demostrado evaluando la mutagénesis en moscas que crecieron durante todos los estadios de larva y durante este proceso fueron expuestas a medios de cultivo conteniendo micelio de estos hongos.

Grifola gargal, *G. sordulenta* y *G. frondosa* poseen agentes quimiopreventivos que pueden disminuir la tasa de mutación causada en moscas que fueron expuestas a un agente genotóxico antropogénico.

1.5. Objetivos

El propósito del estudio que se presenta en este capítulo fue evaluar diferentes fuentes de micelio de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* en cuanto a sus propiedades antígenotóxicas. Asimismo se indagó sobre su inocuidad tóxica y genotóxica. Para el estudio se utilizó el bioensayo *SMART* en ojos de *Drosophila melanogaster*.

2. Materiales y métodos

2.1. Promutágeno

El 7,12-dimetilbenzo(α)antraceno (DMBA, CAS N° 57-97-6) se obtuvo de Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. El solvente para el DMBA se preparó con etanol, polisorbato 20 (Tween 20, CAS N° 9005-64-5), dimetil sulfóxido (DMSO, CAS N° 67-68-5) y dimetil formamida (DMF, CAS N° 68-12-2) en una proporción 12:3:1:1. Se utilizaron como controles agua destilada y el solvente del DMBA.

Las dosis de DMBA utilizadas en la evaluación de toxicidad fueron de 12,5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{mol/vial}$. El objetivo de este análisis fue evitar resultados falsos negativos debido a alta toxicidad del promutágeno. Seguidamente se realizó una evaluación de genotoxicidad del DMBA empleando una serie de dosis de 12,5, 25, y 50 $\mu\text{mol/vial}$. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la dosis de 25 $\mu\text{mol/vial}$ para la evaluación de los materiales con el *SMART* en su efecto antígenotóxico.

2.2. Fuentes de micelio de *Grifola* spp.

Las bioformas del micelio de *G. gargal* empleadas durante este estudio fueron obtenidas de fructificaciones (*GgFB*), de cultivo líquido (*GgLC*) y de cultivo de micelio en granos de trigo (*GgWG*).

Las fructificaciones de *G. gargal* (*GgFB*) se recolectaron en el Parque Nacional Lanín, Neuquén, Argentina (ver capítulo I ítem 6.3.). El cultivo líquido de *G. gargal* (se usó micelio proveniente de *GgLC*-frascos I, ver capítulo III.B) se realizó en frascos de 3 litros con 500 ml de medio basal; el micelio obtenido se liofilizó, se pulverizó en mortero, se tamizó (20 mesh) y se mantuvo en un desecador hasta su uso.

En los casos de *G. sordulenta* y *G. frondosa* el test se hizo sobre micelio cultivado en granos de trigo (*GsWG*, *GfWG*, respectivamente). El micelio de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* proveniente del cultivo en medio sólido en granos de trigo se obtuvo como se describe en el ítem 2.1. del capítulo IV. Los granos colonizados se secaron a 60°C en estufa con ventilación forzada. Se incluyó un control de granos de trigo (WF) que consistió en aplicar a los granos el mismo tratamiento a excepción de la inoculación. La harina de estos granos se obtuvo utilizando un molino *Udy Cyclone Mill* (USA).

2.3. Cultivo de *Drosophila*

Las cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en este ensayo fueron gentilmente donadas por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) de Argentina.

La solución a emplear en el medio de cultivo se preparó con agua (815,4 ml) y ácido láctico (3,08 ml). Esta solución (pH 3) se entibió a 70°C en microondas (BGH, Mod. 16600, 1250 watts) y según los tratamientos se agregó 36,9 ml de solución de DMBA, de su solvente o agua. Finalmente, una mezcla de 136,74 g de puré de papas hecho con “escamas de papa deshidratada del tipo puré instantáneo” y 17,09 g de agar se agregó a la solución tibia y se homogeneizó completamente. Para los tratamientos GgLC o GgFB, a 15,38 g de medio sólido se lo reemplazó con micelio liofilizado y pulverizado. Para GgWG, GsWG y GfWG y el control de esta serie WF, se hizo el reemplazo de 76,9 g de medio sólido por la misma cantidad de la harina correspondiente. El pH final resultó 3,5 y la densidad de los medios de 1 g/ml. Los medios se colocaron en tubos de vidrio (21 × 100 mm) de 30 ml y fondo chato, a razón de 6,5 ml por tubo; una vez fríos, se agregaron 60 mg de extracto de levadura seco a la superficie a los medios.

Los tubos se mantuvieron en una cámara de cultivo a 60% RH y 25°C y semanalmente se agregaron 50 µl de la mencionada solución de ácido láctico (pH 3) en cada tubo para mantener la humedad de los medios y para prevenir la contaminación de los cultivos de *Drosophila*.

2.4. Evaluación de la toxicidad

Para los bioensayos de genotoxicidad/antigenotoxicidad es un pre requisito conocer la toxicidad de las sustancias empleadas en las condiciones del test (Zeiger, 2007). Para tal fin, se estudió la mortalidad de larvas de *D. melanogaster* mediante el cultivo de larvas en el tercer estadio en presencia de las diferentes sustancias utilizadas como tratamientos: agua, vehículo, la solución de DMBA en el rango de dosis y los tratamientos conteniendo micelio de hongos en presencia y en ausencia de DMBA.

Los medios con los materiales a evaluar fueron inoculados con larvas de 64-72 h. Para ello, las larvas provenientes de medios de cultivo *stock* se lavaron con una solución acuosa de sacarosa 20%, y luego se inocularon en los medios tratamientos y control, con la ayuda de un pincel y una lupa (aumento 40×). Los frascos, con 50 larvas cada uno, se incubaron hasta la producción de pupas. La toxicidad se evaluó determinando el porcentaje de larvas que murieron sin alcanzar el estado de pupa. Para producir la genotoxicidad con DMBA en los tratamientos con materiales fúngicos y la harina de granos de trigo control se empleó la dosis de 25 µmol/vial de DMBA. Este método permitió conocer que ningún tratamiento superó la DL₅₀, y así poder evitar la obtención de resultados falsos negativos en el análisis de genotoxicidad. En la **Figura 86A** se muestran imágenes de la cámara de cultivo de *Drosophila*, la siembra de larvas en viales y cultivo al tiempo del recuento de las larvas que empuparon.

2.5. Bioensayo *SMART eyes*

Para estudiar el efecto de las diferentes fuentes de micelio sobre el daño genético inducido por el DMBA, se utilizó el test *white/white*⁺ (*w/w*⁺) en *Drosophila melanogaster* (Vogel y Nivard, 1993; 2000). Este test mide la existencia de clones de omatídeos blancos conocidos como *light spots* (LS) en ojos de hembras heterocigotas *w/w*⁺.

Para su desarrollo se toman hembras vírgenes de genotipo *w/w* (*white*) y se las cruza con machos *y/Y* (*yellow*) por 72 ±4 h en viales de tratamientos o controles. Luego se remueven los adultos y las larvas se desarrollan hasta su eclosión. En este momento las hembras F1 son anestesiadas con CO₂ y sacrificadas por inmersión en una solución de etanol, agua y Tween 20 (90:9:1). Este procedimiento permite una buena observación de los *spots* blancos (LS) entre los *spots* normales, rojos. En la **Figura 86B** se muestran imágenes de *spots* blancos de gran tamaño.

2.6. Análisis de los datos

Las comparaciones estadísticas del porcentaje de mortalidad para la evaluación de la toxicidad se realizaron utilizando el test exacto de Fisher según Lowry (2011) ($\alpha=0,05$). El error estándar de los porcentajes de mortalidad, porcentaje de moscas con LS y el porcentaje de ojos con LS se determinó con la ecuación $ES (\%) = (P_{(\text{Sobrevivientes})} \times P_{(\text{Muertos})} / n)^{1/2} \times 100$.

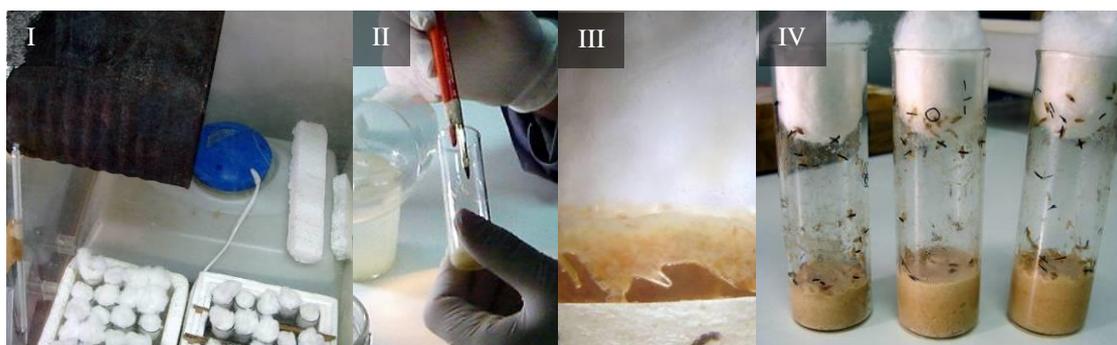
Para la evaluación estadística de las frecuencias de LS se empleó el test Chi-cuadrado para proporciones y cada serie se comparó con el correspondiente control ($\alpha=\beta=0,05$; Frei y Würzler, 1988; 1995). Se analizaron las frecuencias en los tamaños de LS (número de omatidios afectados) mediante la comparación de a pares de las frecuencias entre tratamientos y controles de cada serie (Vogel y Nivard, 1993).

Los datos de cada serie se agruparon en tres categorías correspondiendo con los estadios larvales según el criterio de Vogel y Nivard (2000) para facilitar la interpretación de resultados. Se compararon estas frecuencias utilizando también el test Chi cuadrado mencionado anteriormente (Frei y Würzler, 1988; 1995).

Las mutaciones somáticas se expresaron como el número de LS cada cien ojos (LS/100 ojos) y como el número de ojos con LS dividido el número total de ojos (% ojos con LS).

Figura 86. Bioensayo SMART. Las placas fotográficas muestran imágenes representativas del sistema usado para el ensayo de la mutación somática y recombinación en ojos de *Drosophila melanogaster* utilizado en el estudio de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de micelios de diferentes cepas del género *Grifola*.

A: cultivo de *Drosophila melanogaster*. I: fuente de humedad, fuente de calor, termómetro y envases. II: siembra de larvas de 72 hs de vida para la evaluación de la toxicidad. III: vista de una larva de 60-72 hs alimentándose cerca de la superficie. IV: marcas hechas sobre el vidrio para el recuento de las larvas que empupan.



B: SMART eyes. I: lupa y cama de tela con suministro constante de dióxido de carbono humidificado para mantener las moscas dormidas y húmedas durante su manipulación II y III: moscas presentando cada una un *spot* blanco de gran tamaño indicando una mutación temprana.



3. Resultados y discusión

3.1. Toxicidad

3.1.1. Toxicidad del DMBA

En la comparación de los resultados de mortalidad en el control con agua y en el solvente del DMBA (*DMBA 0*) se halló que las sustancias del solvente de la droga no incrementaron la mortalidad (**Tabla 50**).

En cambio, todas las dosis de DMBA empleadas elevaron de 2,3 a 2,8 veces los valores de mortalidad, si bien ninguna de estas lo hizo por encima de la DL_{50} (31-36%, **Tabla 50**). Por otra parte, la comparación de a pares de los valores de mortalidad obtenidos con las diferentes dosis de DMBA no

mostrará diferencias entre ellos ($p>0,05$). Los resultados también indicaron que aún cuando se usó un rango de dosis de DMBA relativamente amplio (12,5-100 $\mu\text{mol/vial}$), la toxicidad no aumentó, mostrando su independencia de la dosis aplicada (**Tabla 50**). Las mortalidades similares observadas entre las diferentes concentraciones es coherente con el hecho de que el metabolismo de este xenobiótico y por lo tanto su efecto potencialmente tóxico, depende de su activación metabólica en el tejido de la larva (Rodríguez-Arnaiz y Telléz, 2002).

3.1.2. Toxicidad de las muestras en presencia del solvente del DMBA

La comparación de a pares entre las proporciones de mortalidad debida a los tratamientos *GgFB*, *GgLC*, *GgWG* o *WF* en combinación con el *DMBA 0* versus los valores de mortalidad hallados en el *DMBA 0* no mostró diferencias significativas que indiquen algún incremento en la mortalidad originada por estos materiales, quedando demostrado que los mismos son atóxicos (**Tabla 50**).

En un ensayo posterior se compararon los valores de mortalidad de las harinas colonizadas por *G. sordulenta* y *G. frondosa* versus los valores respectivos de *WF+DMBA 0*. Se halló que *GsWG* y *GfWG*, y la otra harina de *GgWG* ensayada previamente, disminuyeron la mortalidad hallada en los controles (**Tabla 50**).

Esto no fue así en el caso de las respuestas de toxicidad al micelio de *GgFB* y *GgLC*, en parte posiblemente porque este último material fue ensayado en concentraciones menores en el medio de cultivo en relación a las usadas con las harinas.

El efecto benéfico de las harinas biotransformadas por estas tres especies podría deberse a un mejor aporte nutricional y también a una suplementación con una cantidad significativa de metabolitos antioxidantes. Es conocido que los antioxidantes son muy importantes para la extensión de la vida de *Drosophila melanogaster* (Bonilla *et al.*, 2002) y que estos metabolitos se encuentran presentes en la harina de granos de trigo biotransformado por estos y otros hongos medicinales (Huang *et al.*, 2011; Halpern, 2007; capítulo VI de esta tesis).

3.1.3. Toxicidad de las muestras en presencia de 25 $\mu\text{mol DMBA}$

Los resultados del bioensayo realizado con la serie de material fúngico correspondiente a *G. gargal*, *i.e.* *GgFB*, *GgLC* y *GgWG* en presencia de 25 $\mu\text{mol/vial}$ de DMBA se compararon con los valores de mortalidad hallados en sus respectivos controles en ausencia del promutágeno. Del análisis de estas comparaciones, se pudo concluir que las tres bioformas de micelio de *G. gargal* disminuyen la mortalidad del *DMBA 25* (**Tabla 50**). En los casos de las respuestas al micelio de fructificaciones y al micelio proveniente del cultivo líquido, los valores de sobrevivencia no se diferenciaron del hallado con los controles en ausencia del DMBA, indicando un notable efecto protector de estos micelios contra el efecto letal del promutagénico.

Por otra parte la combinación de 25 μmol de DMBA con harina de granos de trigo control no se diferenció de los valores del *DMBA 25*, lo cual manifiesta claramente que solo se encuentra un efecto

protector en la harina que fue biotransformada por *G. gargal*. Todas estas determinaciones indican que *G. gargal* posee un importante efecto protector en las larvas contra la toxicidad del DMBA.

La comparación de la mortalidad causada por 25 μmol de DMBA en presencia de la harina de granos de trigo biotransformados por *G. sordulenta* o *G. frondosa*, fue menor respecto a los respectivos valores de mortalidad de esta dosis de DMBA en presencia de harina de trigo control (WF), aunque no alcanzaron a establecer diferencias significativas (**Tabla 50**).

Los valores de mortalidad estas muestras no pudieron compararse con los obtenidos en el tratamiento de *DMBA 25*, ya que provenían de un ensayo posterior en el cual no se pudieron obtener datos por problemas de contaminación de los cultivos.

Finalmente, es importante mencionar que ninguno de los tratamientos evaluados superó la DL_{50} , por lo que quedaron habilitados para ser investigados luego con el *SMART* en sus posibles efectos geno/antigenotóxicos en *Drosophila melanogaster*.

3.2. Genotoxicidad

Los resultados de genotoxicidad evaluados con *SMART eyes* en *Drosophila* se muestran en la **Tabla 51**. Los parámetros utilizados para la comparación de las respuestas de eventos genotóxicos fueron número de *LS/100 ojos* y *% de ojos con LS*. Asimismo, para el análisis de la significación biológica de las frecuencias de mutaciones observadas se introdujo el “factor de multiplicación” que es el cociente entre las frecuencias de mutaciones de los tratamientos que se compararon ($fm=f1/f2$). Así, se ha considerado por convenio que si este valor es estadísticamente igual o superior a 2 o menor o igual a 0,5 entonces existirían efectos biológicos importantes (Frei y Würigler, 1988). El diagnóstico estadístico de la genotoxicidad también depende del número de ojos contados, del número de LS causados, y del error estadístico que en este estudio fue $\alpha=\beta=0,05$. En el desarrollo estadístico para *SMART*, las hipótesis analizadas son dos y los resultados posibles de cada análisis son cuatro. En otras palabras, se podrá obtener i) un resultado *positivo* que implica el rechazo de la hipótesis H_0 ($f1=f2$) y la aceptación de la hipótesis H_a ($f1 \neq f2 \times$ factor de multiplicación); ii) resultados *negativos* aquellos que aceptan H_0 y rechazan H_a ; iii) también resultados *positivos débiles* que si bien rechazan H_0 también rechazan H_a ; y finalmente iv) los resultados *inconclusos* porque éstos aceptan ambas hipótesis.

Tabla 50. Mortalidad en larvas de *Drosophila melanogaster*. Las larvas en el tercer estadio fueron expuestas a agua, al solvente del DMBA, a diferentes dosis de DMBA, al material fúngico en estudio y a la harina de granos de trigo en combinación ya sea con el solvente del DMBA o con una única dosis de 25 μ mol de DMBA.

Tratamientos ^a	Larvas sembradas	Mortalidad %	Error estándar ^c	Comparación estadística ^d	Fisher ^e 2 colas 1 cola	
1	Agua	300	9	2	-	
2	DMBA 0 ^b	250	11	2	vs. 1	Ns
3a	WF + DMBA 0	150	9	2	vs. 2	Ns
3b	WF + DMBA 0	100	32	5	-	
4	GgFB + DMBA 0	150	15	3	vs. 2	Ns
5	GgLC + DMBA 0	50	8	3	vs. 2	Ns
6	GgWG + DMBA 0	150	2	1	vs.3a	**
7	GsWG + DMBA 0	100	15	4	vs.3b	**
8	GfWG + DMBA 0	200	19	3	vs. 3b	*
9	DMBA 12,5	50	32	7	vs. 2	*
10	DMBA 25	200	34	3	vs. 2	**
11	DMBA 50	150	36	4	vs. 2	**
12	DMBA 75	150	31	4	vs. 2	**
13	DMBA 100	200	33	3	vs. 2	**
14a	WF + DMBA 25	100	26	4	vs.3a vs. 10	Ns **
14b	WF + DMBA 25	100	45	5	vs.3b	*
15	GgFB + DMBA 25	200	18	3	vs. 4 vs. 10	Ns **
16	GgLC + DMBA 25	100	8	3	vs. 5 vs. 10	Ns **
17	GgWG + DMBA 25	100	21	4	vs. 6 vs. 10 vs. 14a	** * Ns
18	GsWG + DMBA 25	100	38	5	vs.7 vs. 14b	** Ns
19	GfWG + DMBA 25	100	41	5	vs.3b vs. 14b	** Ns

^a GgFB: *G. gargal*, fructificaciones; GgLC: *G. gargal*, micelio de cultivo líquido; GgWG: *G. gargal*, micelio en granos de trigo; WF: harina de trigo control; GsWG: *G. sordulenta*, micelio en granos de trigo; GfWG: *G. frondosa*, micelio en granos de trigo.

^b DMBA, dosis expresada en μ mol/vial.

^c El error estándar se calculó con la fórmula $ES(\%) = (P_{(Sobrevivientes)} \times P_{(Muertos)} / n)^{1/2} \times 100$.

^d Comparaciones de a pares realizadas entre el tratamiento de cada fila *versus* el n° de tratamiento señalado.

^e Diagnóstico del test exacto de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Ns: no significativo.

Tabla 51. Resultados obtenidos con el *SMART eyes* en *Drosophila melanogaster* bajo exposición crónica a diferentes tratamientos conteniendo bioformas de *Grifola gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* en presencia de DMBA. Controles: *Agua*, harina sin colonizar (WF), y DMBA (12,5, 25, 50 $\mu\text{mol/vial}$). Para el análisis de antigenotoxicidad los materiales fueron combinados con 25 $\mu\text{mol/vial}$ DMBA.

Tratamientos ^a	N° ojos	N° LS ^c	N° LS /100 ojos ^d					% Ojos con LS ^f	Geno/antigenotoxicidad		
			Estadio larval ^e			Total	Compa- ración ^g		Diagnós- tico ^h	fm= fc/ft ⁱ	
			3	2	1						
1	<i>Agua</i>	383	82	16	4	1	21	19			
2	<i>DMBA 0</i> ^b	326	122	34	2	1	37	28	vs.1	+	1,7
3	WF + <i>DMBA 0</i>	450	90	16	2	2	20	19	vs. 2	+	0,5
4	<i>GgFB</i> + <i>DMBA 0</i>	304	52	14	3	0	17	15	vs. 2	+	0,5
5	<i>GgLC</i> + <i>DMBA 0</i>	450	105	19	3	1	23	18	vs. 2	+	0,6
6	<i>GgWG</i> + <i>DMBA 0</i>	450	94	17	4	0	21	17	vs. 2	+	0,6
7	<i>DMBA 12,5</i>	480	260	47	6	1	54	38	vs. 2	d+	1,4
8	<i>DMBA 25</i>	545	482	77	10	1	88	57	vs. 2	+	2,3
9	<i>DMBA 50</i>	550	603	99	10	1	110	65	vs. 2	+	3,2
10	WF+ <i>DMBA 25</i>	375	298	67	11	1	79	60	vs. 3 vs. 8	+ -	4,2 0,9
11	<i>GgFB</i> + <i>DMBA 25</i>	513	221	31	11	1	43	34	vs. 4 vs. 8	+ +	2,5 0,5
12	<i>GgLC</i> + <i>DMBA 25</i>	422	295	61	8	1	70	50	vs. 5 vs. 8	+ d+	3,0 0,8
13	<i>GgWG</i> + <i>DMBA 25</i>	450	255	49	7	1	57	42	vs. 6 vs.8 vs.10	+ + d+	2,7 0,6 0,7
14	<i>GsWG</i> + <i>DMBA 25</i>	453	294	64	1	0	65	35	vs. 8 vs.10	+ d+	0,7 0,8
15	<i>GfWG</i> + <i>DMBA 25</i>	429	268	55	7	1	62	42	vs. 8 vs.10	d+ d+	0,7 0,8

^a *GgFB*: *G. gargal*, fructificaciones; *GgLC*: *G. gargal*, micelio de cultivo líquido; *GgWG*: *G. gargal*, micelio en granos de trigo; WF: harina de trigo control; *GsWG*: *G. sordulenta*, micelio en granos de trigo; *GfWG*: *G. frondosa*, micelio en granos de trigo.

^b DMBA, dosis expresada en $\mu\text{mol/vial}$.

^c LS: *spots* blancos.

^d Número de LS /100 ojos: [(LS \times 100)/ Número de ojos contados].

^e Número de LS/100 ojos por estadio larval: 1er estadio incluye LS de 33- >64 omatídeos, 2do estadio incluye LS de 5-32 omatídeos y 3er estadio incluye LS de 2-4 omatídeos (Vogel y Nivard, 2000).

^f Ojos con LS (%): [(Ojos con LS/Número total de ojos contados) \times 100].

^g Las comparaciones de a pares se realizaron entre los tratamientos de cada fila *versus* el que figura entre paréntesis.

^h D: El diagnóstico estadístico de la comparación de frecuencias de LS de acuerdo a Frei y Würigler (1988) = +, positivo; d+, positivo débil; -, negativo; i, inconcluso; P < 0,05.

ⁱ El factor de multiplicación *fm* es la razón entre las frecuencias de LS en controles y tratamientos (fc/ft) (Frei y Würigler, 1988).

3.2.1. Genotoxicidad del DMBA

La genotoxicidad del DMBA fue evaluada para establecer, en las condiciones del ensayo, cuál sería la dosis más conveniente para combinar con los materiales que se querían ensayar por su efecto geno/antigenotóxico. Para ello se analizaron las curvas de genotoxicidad del DMBA con los resultados de LS/100 ojos, % ojos con LS, % de moscas con *spots* y % de ojos con *spots*, que se muestran en la **Figura 87**.

En los controles agua y solvente del DMBA, se observó un incremento de 21 a 37 LS/100 ojos, respectivamente (**Figura 87** y **Tabla 51**). Todas las dosis de DMBA causaron efectos genotóxicos, los que pueden observarse en las curvas obtenidas con el número de LS/100 ojos y % de ojos con LS *versus* la dosis de tratamiento con DMBA.

En las comparaciones con el solvente, la concentración de 12,5 $\mu\text{mol/vial}$ dio como resultado un efecto genotóxico calificable como *positivo débil*, y ambos 25 $\mu\text{mol/vial}$ y 50 $\mu\text{mol/vial}$ produjeron un efecto genotóxico claramente *positivo*.

Luego, en la comparación de a pares entre las dosis de DMBA se hallaron resultados de genotoxicidad positiva solamente entre las dosis de 12,5 y 50 $\mu\text{mol/vial}$ DMBA. Cuando se considera la respuesta del % de ojos exhibiendo LS, se observa un paralelismo con los LS/100 ojos lo cual demuestra una fuerte respuesta genotóxica de este compuesto para esta cepa y rango de dosis, según Vogel y Nivard (2000).

La dosis de exposición por vial calculada en términos de concentración molar de DMBA fue de 2,4; 3,8 y 7,6 mM, para 12,5 25y 50 $\mu\text{mol/vial}$, respectivamente. A los fines de permitir la comparación con resultados de la literatura existente, se buscó expresar la genotoxicidad del DMBA con estos valores de exposición en términos de molaridad y entonces se calculó que la respuesta mutagénica al DMBA para cada nivel de dosis resultó ser de 22,5; 23,2 y 14,5 LS/mmol DMBA, respectivamente; siendo entonces la dosis de 25 $\mu\text{mol/vial}$ DMBA la que causó el efecto con el mayor número de LS/mmol DMBA.

Por otra parte esta dosis produjo resultados *positivos* en la comparación con el solvente del DMBA. A partir de esta información, para los ensayos de geno/antigenotoxicidad de los materiales fúngicos y de WF con el *SMART eyes* en *D. melanogaster*, se encontró adecuado utilizar la dosis de 25 $\mu\text{mol/vial}$ DMBA, *i.e.* 3,8 mM, ya que sin producir una mortalidad significativamente excesiva mostraría resultados significativamente diferentes a los debidos al solvente del DMBA.

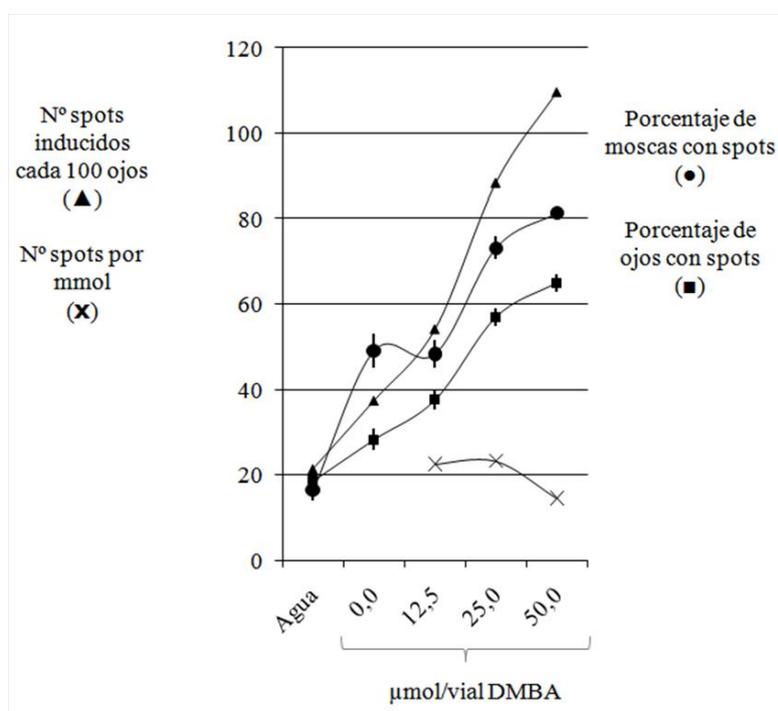
Utilizando diferentes cepas de *Drosophila melanogaster*, Vogel *et al.*, (1991) encontraron respuestas muy variables entre frecuencias de LS en ojos en respuesta a DMBA y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos. Esta variabilidad genotipo-dependiente en la respuesta a diferentes procarcinógenos es un fenómeno conocido y es debida a diferencias en el metabolismo de estos promutágenos mediada por el citocromo P450 (Hällström *et al.*, 1984; Zjilistra y Vogel, 1984).

Existe una relativa independencia entre la toxicidad, el daño al ADN y las cepas de *Drosophila* según el compuesto químico y el manejo del protocolo experimental. Por ejemplo, Vogel y Nivard (1993) realizaron extensivos estudios de *SMART eyes* en los cuales emplearon una cepa susceptible,

llamada Leiden Standard, y entre las drogas evaluadas emplearon DMBA. Los autores hallaron tolerancias de dosis de hasta 2 mM DMBA que además resultaban en una alta respuesta genotóxica de 41 LS/mmol.

Otros autores hallaron con la cepa Leiden Standard que podía tolerar la toxicidad de 4 mM de 1-2;5-6 dibenzo(α)antraceno, un compuesto muy relacionado al DMBA, lo cual ilustra que las diferencias químicas en el promutágeno influyen en la toxicidad que producen en las larvas (Arnaiz y Telléz, 2002). Nuestro estudio fue realizado con una cepa más resistente a la toxicidad del DMBA, dado que toleró una dosis de 3,8 a 7 mM de DMBA, y además mostró menor susceptibilidad al daño genotóxico, porque produjo *c.a.* 40 % menos de LS/mmol.

Figura 87. Genotoxicidad del DMBA evaluado mediante *SMART eyes* en *Drosophila melanogaster*. Las barras de error de los porcentajes representan el error estándar ES (%) = $[(P_{\text{ojos con LS}} \times P_{\text{ojos sin LS}}) / n]^{1/2} \times 100$.



3.2.2. Genotoxicidad de las muestras en presencia del solvente del DMBA

El solvente incrementó la genotoxicidad 1,7 veces por encima de la producida en ausencia del mismo y en presencia de agua (tratamiento n°1 Agua). No se hallaron incrementos en la genotoxicidad en las muestras GgFB, GgLC, GgWG o WF. Es más, se halló que todas ellas disminuían la genotoxicidad basal causada por el solvente del DMBA, desde 37 a 17-23 LS /100 ojos y desde 28 a 15-19 % ojos con LS (**Tabla 51**). De esta manera quedó demostrado para el caso de *G. gargal* la ausencia de genotoxicidad.

Para las muestras de micelios correspondientes a GsWG y GfWG no fue posible obtener datos de la genotoxicidad de los materiales en interacción sólo con el solvente. Sin embargo, sí pudo inferirse que el micelio no es genotóxico porque no causó incrementos en la genotoxicidad de una dosis de 25

μmol /vial DMBA, en efecto produjo menores frecuencias de mutaciones que la harina de trigo control (ver ítem siguiente).

3.2.3. Geno/antigenotoxicidad de las muestras fúngicas en presencia de 25 μmol/vial de DMBA

Los diferentes materiales fúngicos y la harina de trigo se probaron en combinación con una dosis de 25 μmol/vial de DMBA en el estudio de su hipotética actividad antigenotóxica con el *SMART*.

Como era esperable, en todas las comparaciones de las frecuencias de mutaciones correspondientes a los tratamientos conteniendo solvente del DMBA (ver tratamientos 3 al 6 en **Tabla 51**) se halló que aquellas fueron incrementadas cuando se aplicó a estos materiales una dosis de 25 μmol/vial DMBA (ver tratamientos 10 al 13 en **Tabla 51**); el resultado del diagnóstico fue *positivo* en todos los casos. La harina de granos de trigo control fue el material que obtuvo mayor aumento, como lo muestra su factor de multiplicación que fue de $fm = 4,2$ (ver tratamiento 10 **Tabla 51**).

Luego, en las comparaciones de las frecuencias de mutaciones entre el *DMBA 25* vs. los materiales combinados con 25 μmol/vial DMBA, se hallaron reducciones en las frecuencias de diagnóstico *positivo*, que implican una actividad antigenotóxica biológicamente significativa en: *GgFB*, *GgWG*, *GsWG*, con reducciones del 30-50 %. Otras reducciones en la frecuencia, esta vez con diagnóstico *positivo débil* se hallaron en *GgLC* y *GfWG* (con reducciones del 20%). En el caso de la harina de trigo control se halló una reducción del 10% que fue de diagnóstico *negativo*, y por ende no tuvo un efecto antigenotóxico, además en este caso se encontró que se incrementaba el % de ojos con LS.

Al compararse los tratamientos con harinas de granos de trigo biotransformados (tratamientos 13, 14 y 15, **Tabla 51**) vs. el tratamiento de WF + *DMBA 25* (tratamiento 10, **Tabla 51**), se halló que en los tres materiales se redujeron las frecuencias de mutaciones, con diagnóstico *positivo débil*. De manera que los granos de trigo biotransformados poseen un nivel de metabolitos antigenotóxicos que pudo manifestarse a pesar de la baja cantidad de micelio (*c.a.* 0,4% en base seca, según datos propios). Según argumenta Halpern (2007), el sistema de cultivo en granos posee una gran ventaja respecto a las fructificaciones y al micelio recolectado de cultivo líquido, ya que durante el cultivo en fase sólida se conservan metabolitos bioactivos que bajo las otras formas de obtención de micelio son normalmente secretados al medio y se pierden. Investigaciones recientes hallaron que la actividad antioxidante en los granos de trigo biotransformados por *G. frondosa* es comparable, y en algunos casos mayor, a la obtenida en las fructificaciones y en micelio del cultivo líquido (Huang *et al.*, 2011).

Como se había descrito en la introducción, las actividades antigenotóxicas que se encuentran en los hongos y en otros materiales biológicos puede ser calificada como desmutagénica y bioantimutagénica, dependiendo la forma en que protegen contra los mutágenos (Kada y Shimoi, 1987).

La actividad observada en los materiales de estos ensayos podría estar mediada por una vía desmutagénica, es decir por la presencia de factores antioxidantes que inhiben que el agente mutágeno alcance la cadena de ADN, en este caso podría tratarse de polifenoles, especialmente algunos

flavonoides que reaccionarían con sustancias de este tipo (Ferguson, 2001). También, otra vía posible de acción sería a través de una actividad bioantimutagénica, que regularía la actividad de enzimas metabólicas como el citocromo p-450 y la superóxido dismutasa, entre otras, y reduciría de esa manera la cantidad de mutágeno activado capaz de dañar el ADN.

Esta actividad antígenotóxica sería una forma alternativa y no excluyente para la prevención de cáncer a la planteada por la hipótesis de la regulación del sistema inmune, en la cual el papel de los polisacáridos y las células del sistema inmune juegan un papel central (Inoue *et al.*, 2002).

Varios ejemplos de géneros de hongos con propiedades desmutagénicas fueron descritos por Grüter *et al.* (1990).

Por su parte las propiedades bioantimutagénicas pueden deberse a péptidos o proteínas como fue descrito para *Agrocybe cylindracea* en un modelo de *Drosophila* que empleó al DMBA como promutágeno (Taira *et al.*, 2005). También estas propiedades bioantimutagénicas pueden ser adjudicadas a polisacáridos, tal es el caso de *Phellinus linteus*, *Agrocybe cylindracea*, *Phellinus igniarius* (Shon y Nam, 2001), *Ganoderma lucidum* (Lakshmi *et al.*, 2006) y *Pleurotus cornucopiae* (El Bohi *et al.* 2005).

En el caso de *Agaricus blazei* se hallaron ambas propiedades, desmutagénicas y bioantimutagénicas, debidas a la presencia de polisacáridos (Luiz *et al.*, 2003; Menoli *et al.*, 2001), manifestándose en forma variable según las diferentes cepas (Delmanto *et al.*, 2001).

La variabilidad biológica que se encuentra en la interacción modelo biológico de estudio, sustancia mutagénica, mecanismo de bioactivación si fuera el caso, bioforma del hongo, y/o fracción extraída de alguna de las bioformas, así como la cepa empleada, generan un amplio espectro de posibilidades que merecen una profunda investigación para finalmente poder transferir estos resultados a una aplicación valiosa, como sería en la producción de alimentos funcionales que prevengan contra el daño genotóxico, por ejemplo pastas y productos de panificación elaborados con harina de trigos biotransformados por estos hongos.

3.3. Análisis de la geno/antigenotoxicidad en diferentes estadios larvales

El conglomerado de células que da forma a los omatídeos del ojo se denomina “disco imaginal” y en el primer estadio larval está compuesto por apenas 20 células, que luego durante el crecimiento continúan multiplicándose con cuatro divisiones mitóticas hasta llegar a unos 800 omatídeos, cuando alcanzan el tercer estadio larval. De esta manera el tamaño (número de omatídeos/*spot*) de los LS depende del momento en el cual se presenta el evento mutagénico, y entonces conociendo el número de omatídeos blancos se puede conocer el momento, *i.e.* el estadio larval en que la droga interfiere en el metabolismo del ADN (Vogel y Nivard, 1993).

La **Figura 88** y la **Tabla 51** muestran la distribución de los valores de LS /100 ojos para cada estadio larval en los tratamientos con *Agua* y diferentes dosis de DMBA/vial. La genotoxicidad registrada como eventos espontáneos en el tratamiento *Agua* fue de 1, 4 y 16 LS/100 ojos para el primero, segundo y tercer estadio respectivamente; las dosis crecientes de DMBA elevaron

especialmente las mutaciones en el tercer estadio. Por ejemplo para el caso de 25 µmol/vial de DMBA se observó que el número de LS/100 ojos fue de 1, 10 y 77 para el primero, segundo y tercer estadio respectivamente, es decir que la genotoxicidad fue elevada siendo de aproximadamente 5 veces en el tercer estadio, sólo 2 veces en el segundo y no presentó cambios en el primero. Esto es consistente con el modo de acción del DMBA que requiere una activación previa, lo cual implica un tiempo de retraso y también la larva al crecer puede activar mayor cantidad de este compuesto; la tercera posibilidad es que en el tejido ocular en maduración hay más células diana para el efecto genotóxico de los epóxidos de DMBA.

La acción genotóxica del DMBA se caracterizó por una incidencia baja de mutaciones en los primeros estadios y una gran incidencia de mutaciones en el tercer estadio. En los tratamientos de aplicación crónica con promutágenos los LS pequeños pueden originarse por aneuploidía de segmentos de los cromosomas, la cual resulta en una no disyunción y produce una reducida capacidad de proliferación o también por un daño tardío por los metabolitos activados (del DMBA en este caso) (Graf y Singer, 1992; Vázquez-Gómez *et al.* 2010).

Por otra parte la antigenotoxicidad producida por los tratamientos conteniendo micelios correspondientes a *GgFB* y *GgLC* se manifestó principalmente en la reducción de la frecuencia de mutaciones en el tercer estadio. En efecto, el tratamiento *GgFB* redujo 2,5 veces la frecuencia de mutación del *DMBA 25* en el tercer estadio, mientras que *GgLC* lo hizo en 1,3 veces (**Figura 89**). Por otro lado, mientras que el micelio correspondiente a *GgLC* disminuyó los valores de mutaciones producidas por el *DMBA 25* en el segundo estadio, el micelio del *GgFB* las incrementó. Estos resultados enfatizan el hecho de que las diferencias en el método de cultivo originan la aparición de diferentes metabolitos con diferentes propiedades biológicas, en particular antigenotóxicas contra el DMBA en el caso que nos ocupa, y de potencia, dependiendo de sus contenidos relativos.

En la **Figura 90** se muestran los valores del número de LS/100 ojos de las muestras de harina de los granos de trigo biotransformados por *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa*. Al observar el gráfico, es evidente la actividad antigenotóxica contra 25 µmol /vial DMBA de estas muestras de granos colonizados con respecto a la harina de granos sin colonizar. Entre éstos el micelio de *GgWG* fue el que mayor reducción produjo en el tercer estadio, de 77 a 49 LS/100 ojos; mientras que el micelio de *GsWG* redujo la frecuencia de mutaciones de 10 a 1 LS/100 ojos en el segundo estadio.

Figura 88. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los tres estadios larvales de *Drosophila*. Los valores corresponden a los tratamientos con *Agua*, con el solvente de DMBA y con diferentes dosis de DMBA.

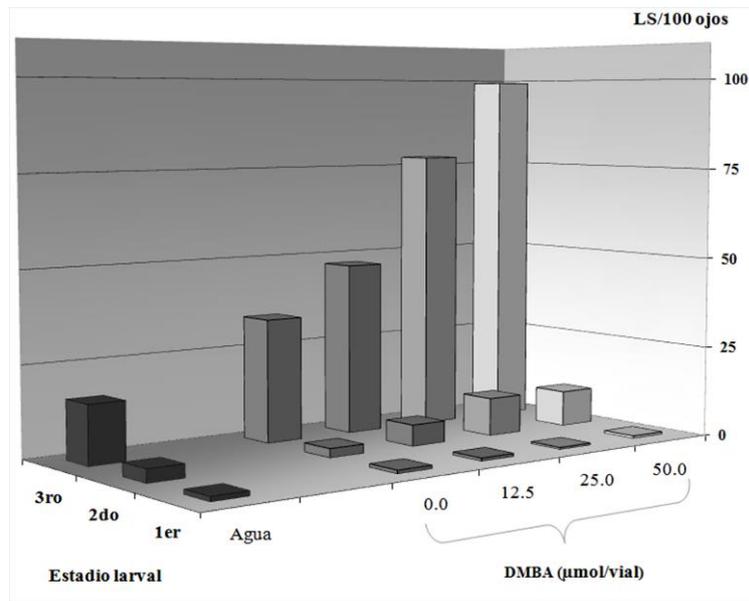


Figura 89. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los estadios larvales de *Drosophila*. Los valores corresponden a los tratamientos *DMBA 0* (0 μmol/vial) y *DMBA 25* (25 μmol/vial) en ausencia y presencia de micelio proveniente de fructificaciones y de cultivo líquido de *Grifola gargal*.

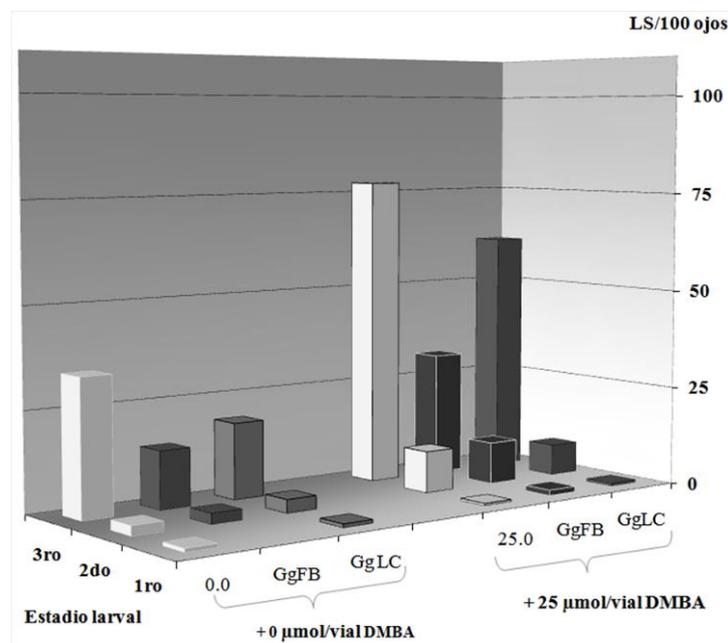
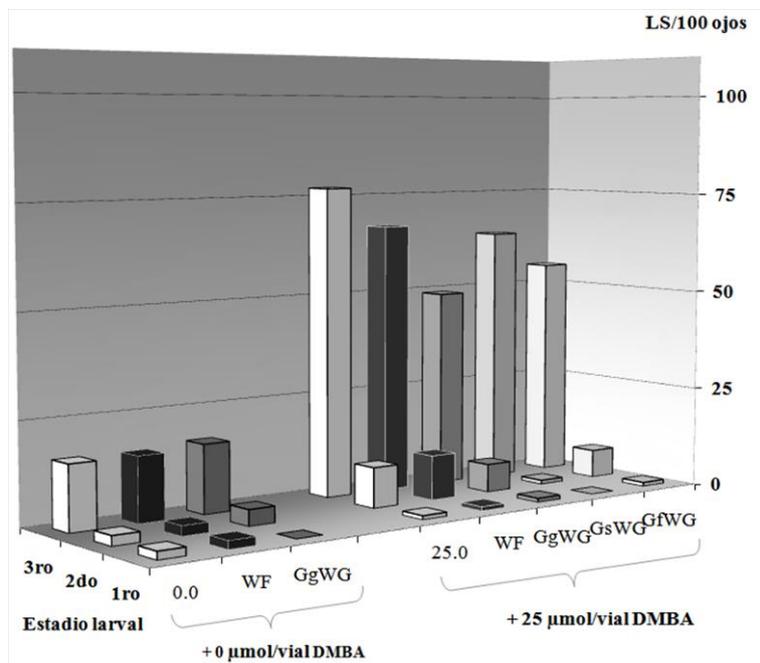


Figura 90. Distribución del número de LS/100 ojos para cada uno de los estadios larvales de *Drosophila*. Los valores corresponden a los tratamientos de *DMBA 0* (0 $\mu\text{mol/vial}$) obtenidos en presencia de harina de granos de trigo control y harina de granos de trigo biotransformados por *Grifola gargal* y *DMBA 25* (25 $\mu\text{mol/vial}$) obtenidos en presencia de harina de granos de trigo control y de harinas de granos de trigo biotransformados por *G. gargal*, *G. sordulenta* o *G. frondosa*.



4. Conclusiones

A lo largo de este estudio se pudo obtener evidencias acerca de la presencia de factores antimutagénicos en estas especies fúngicas previamente poco estudiadas, *G. gargal* y *G. sordulenta*, y también nuevos resultados que confirman otros precedentes para el caso de *G. frondosa*; estos factores antimutagénicos se muestran así como responsables de una posible vía de acción anticancerígena previniendo la generación de células tumorales, especialmente en sus fases iniciales.

Una manera de ampliar este estudio con *Drosophila* implicaría evaluar otras drogas mutagénicas que no requieren activación metabólica, y así conocer en mayor extensión las cualidades de las propiedades antigenotóxicas de estas especies, especialmente en los estadios iniciales.

Conclusiones finales

Cultivo en medios nutritivo semisólido (Capítulo II)

1. Se demostró una dependencia de la tasa de crecimiento y la acumulación de biomasa con el pH y la temperatura del cultivo. El agregado de 0,4% de polvo de cáscara de girasol incrementó la velocidad de colonización y la acumulación de biomasa.
2. Ambas especies no perdieron vigor después de varios subcultivos. En el caso de *G. sordulenta* se observó una mayor velocidad de colonización.
3. No se hallaron diferencias entre las cepas de *G. gargal* (cepas A, B y G9) en cuanto a la velocidad de colonización.
4. Entre todos los caracteres taxonómicos comparados, se hallaron algunos que indican cierta variabilidad morfológica entre las cepas de estas especies.
5. La tinción de colonias permitió distinguir el micelio vegetativo del micelio reproductivo.
6. La irradiación con luz blanca previno la demora del crecimiento de las colonias de *G. gargal* cuando las temperaturas son desfavorables.
7. La ausencia o presencia de estímulos lumínicos produjo cambios morfogénicos, sin embargo dichos cambios fueron mayores en las colonias irradiadas, especialmente en el caso de irradiación con luz blanca.
8. La cepa A de *G. gargal* fue más sensible que la B en la presentación de respuestas fotomorfogénicas.
9. Los resultados obtenidos en distintos anchos de banda sugirieron la participación de más de un fotorreceptor.
10. Ambas especies poseen actividad asociada a la enzima LiP y lacasas.
11. *Grifola gargal* creció mejor en xilulosa, mientras que *G. sordulenta* creció bien en celulosa y xilulosa y además pudo demostrarse en esta especie la presencia de la enzima celulosa deshidrogenasa.

Cultivo en medios líquidos (Capítulo III)

1. Ambas especies presentaron distintas tasas de crecimiento y la acumulación de biomasa según la temperatura del cultivo en Erlenmeyers de 250 ml. Ambos parámetros aumentaron con el agregado de un aditivo de caldo de semillas de girasol.
2. Con el cultivo de micelio en frascos se obtuvo micelio de manera más sencilla, pero con rendimientos de biomasa menores a los hallados con Erlenmeyers de 250 ml. Los suplementos nutritivos orgánicos no incrementaron biomasa.
3. Con el cultivo en Erlenmeyers de 500 ml se obtuvo un menor rendimiento de biomasa que se adjudicó al homogenado del micelio empleado como inóculo, si bien en términos experimentales este procedimiento fue favorable ya que redujo la variabilidad en la cantidad de biomasa entre las muestras del mismo tratamiento. Por otra parte la bencilaminopurina no estimuló el crecimiento del

micelio.

4. Con el cultivo estacionario se obtuvo menor biomasa de micelio de *G. sordulenta* y *G. frondosa* en comparación con la obtenida en cultivo agitado; sin embargo presentó muy buena actividad antioxidante como fuera determinado *a posteriori*.

Cultivo en granos de cereales y/u oleaginosas (Capítulo IV)

1. El cultivo en granos de trigo fue más rápido a 24 °C que a 20°C.
2. En ambas condiciones de pH, todos los granos evaluados pueden emplearse para la obtención de blanco de hongo.

Cultivo en medio sólido sobre sustratos a base de cáscara de girasol (Capítulo IV)

1. *Grifola gargal* y *G. sordulenta* colonizaron la cáscara de girasol sin que fuera necesario el empleo de aditivos y suplementos. No obstante en *G. gargal* se halló una mejora en la colonización con el pre tratamiento ácido del sustrato, el agregado de Mn(II), de Zn(II), o de roble, álamo y/o paja de trigo. En el caso de *G. sordulenta* se halló una mejora con el pre tratamiento ácido, también con el agregado de NH₄(I), Mn(II) y/o Zn(II).
2. La velocidad de colonización, densidad aparente, el contenido de proteínas y análisis de fibra fueron parámetros que permitieron establecer la degradación de cada uno de los sustratos evaluados.
3. En el cultivo en troncos sintéticos a base de cáscara de girasol se pudo establecer de manera preliminar que es posible la obtención de fructificaciones morfológicamente aceptables con este tipo de sustratos.

Propiedades antioxidantes en Grifola spp. (Capítulo VI)

1. Se halló que *G. gargal* y *G. sordulenta* poseen en general muy buen poder reductor y buena actividad secuestrante de radicales libres.
2. La actividad antioxidante estuvo relacionada con la presencia de sustancias fenólicas y con otras moléculas activas como sacáridos.
3. Las propiedades antioxidantes varían entre las bioformas de micelio y entre las metodologías para la obtención de micelio de cultivo líquido.

Propiedades antigenotóxicas en Grifola spp. (Capítulo VII)

1. Las muestras de micelio no mostraron toxicidad y en las dos muestras evaluadas de *G. gargal* se halló una disminución a la causada por el DMBA.
2. En todas las muestras que poseían micelio se encontró una disminución en la tasa de mutación que fué más marcada en el cuerpo fructífero y harina de granos de trigo de *G. gargal*.
3. En el caso del control con harina común no se hallaron resultados que indiquen propiedades antimutagénicas.

Apéndice 1

Características taxonómicas de *Grifola* spp.

Grifola frondosa (Dicks.: Fr.) S. F. Gray., *G. sordulenta* (Mont.) Singer y *G. gargal* Singer son especies que fueron descritas por primera vez por Dickson, Montagne y Singer en 1785, 1850 y 1969, respectivamente. Los caracteres taxonómicos y de cultivo de *G. sordulenta* y *G. gargal* fueron descritos por Rajchenberg y Greslebin (1995) y Rajchenberg (2002, 2006).

A continuación se describen los caracteres taxonómicos comunes entre estas tres especies. Poseen un *sistema hifal* con presencia de células generativas engrosadas e interpretadas o no, como hifas esqueléticas lo cual ha llevado a diferentes autores a considerar este sistema como monomítico (Rajchenberg, 2006), dimítico (Gilbertson y Ryvarden, 1986) y también descrito como sarcodi(tri)mítico (Corner, 1966). Las enzimas *oxidasas* extracelulares que exudan en un sustrato son características que comparten con otros hongos de la pudrición blanca. Estas especies del género *Grifola*, en medios de cultivo semisólido son capaces de degradar tanto el ácido gálico como el ácido tánico; también decoloran los colorantes poly R478 (enzimas ligninolíticas) y azure B (lignina peroxidasa). La *sexualidad* es heterotálica de polaridad desconocida, y se desconoce el comportamiento nuclear de los micelios (Rajchenberg, 2006). Los *primordios* se diferencian desde el sustrato como una serie de protuberancias macizas, raras veces claras y más comúnmente pigmentadas de color violeta, marrón, y/o gris oscuro. Esta formación pasa por diferentes estadios: los primordios comienzan a diferenciarse con proyecciones que dan origen a la forma de *cerebro*, que continúa creciendo formando un pequeño *coliflor*, hasta llegar a una estructura de *racimo* que prosigue creciendo hasta su tamaño final. El *basidiocarpo* es del tipo poroide a folioso lamelado, anual, multipileado, constituido por numerosos píleos dispuestos en forma arrosada y/o imbricados con un pie central o lateral. Los píleos son carnosos y aromáticos, leñosos al secarse, marrones, amarillos, beige claro a grisáceos, el contexto color blanco. La pigmentación está influenciada por las condiciones lumínicas. El *micelio de fructificaciones* posee hifas generativas fibuladas, de paredes delgadas o engrosadas homogéneamente, hialinas, de reacción negativa al reactivo de Melzer (IKI-), acianófilas, metacromáticas. Sin cistidios, los basidios son pedunculados y con cuatro esporas. Basidiósporas ovoidales, elipsoidales a anchamente elipsoidales, con pared delgada a ligeramente engrosada, IKI-, acianófilas. En el contexto y el micelio cultivado en agar se encuentran hifas gloeopleuras y clamidosporas.

En la **Tabla 1** se muestra un resumen de las características taxonómicas de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* cultivadas en agar, con información obtenida en el transcurso de realización de esta tesis y su comparación con la obtenida por Rajchenberg (2006) y Rajchenberg y Greslebin (1995). En la **Tabla 2** se comparan las observaciones en cultivos de *G. frondosa* realizadas durante el desarrollo de esta tesis, con las de Nobles (1948), Stalpers (1978), Chang y Chou (2003). En la **Figura 1** se muestran imágenes del cultivo de *G. gargal* y *G. sordulenta* en medio MYPa modificado, y en las

Figuras 2 y 3 se muestran las imágenes del cultivo de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* en medio de ácido gálico, ácido tánico y de los colorantes poly R478 y azure B.

Tabla 1. Características taxonómicas de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* en cultivo en agar.

Características taxonómicas	<i>G. gargal</i>		<i>G. sordulenta</i>	
	Rajchenberg (2006)	Estetesis	Rajchenberg y Greslebin (1995)	Estetesis
Enzimas				
Lacasa	+	+	+	+
Tirosinasa	-	Nd	+	Nd
Medio gálico colorea	+	+	-	-
Medio gálico decolora	-	+	-	+
Medio tánico colorea	+	+	+	+
Medio tánico decolora	-	+	-	+
Crecimiento				
25-40 mm en 14 días	+	(+)	(+)	+
>40 mm en 14 días	-	+	(+)	+
Las cajas de Petri no se cubren en 6 semanas	+	-	+	-
Las cajas de Petri se cubren en <5 semanas	-	+	-	+
Características macroscópicas				
Reverso de la caja de Petri blanqueado	+	+	+	+
Reverso de la caja de Petri oscurecido	-	-	-	-
Olor almendrado	+	+	+	+
Micelio aéreo lanoso	-	+	+	+
Micelio aéreo algodonoso	-	+	+	+
Micelio aéreo afelpado	-	(+)	+	+
Micelio farináceo	+	-	-	-
Hifas y mata de micelio blanca	+	+	+	+
Hifas con otras coloraciones, al menos en partes	-	+	-	+
Características microscópicas				
Paredes finas, fibuladas	+	+	+	+
Ancho de la hifa 1,5-3 µm	+	+	+	+
Ancho de la hifa 3-5 µm	+	+	+	+
Fibras esqueletales	-	(-)	+	(-)
Hifas gloeopleuras	-	+	+	+
Hifas encrustadas en la zona del inóculo	+	-	-	-
Alocistos	+	-	-	-
Clamidosporas	+	+	-	+
Cristales en el agar	-	-	-	-
Otros				
Sexualidad heterotálica de polaridad desconocida	+	Nd	Nd	Nd
Esporulación en cultivo en menos de 6 semanas	-	+	-	+
Sustrato angiospermas (pudrición blanca)	+	+	+	+
Mata de micelio se despega fácil del agar	Nd	+	Nd	+

Claves: Presente + ; presente a veces (+); ausente -; no observadas (-); Nd.: no determinado.

Tabla 2. Características taxonómicas de *Grifola frondosa* en cultivo en agar.

Características taxonómicas	Nobles (1948)	Stalpers (1978)	Chang y Chou (2003)	Esta tesis
Enzimas				
Lacasa	+	+	+	+
Tirosinasa	Nd	-	-	Nd
Peroxidasa	Nd	+	+	+
Reacción al KOH	Nd	+	+	Nd
Medio gálico colorea	+	Nd	+	-
Medio gálico decolora	-	Nd	-	+
Medio tánico colorea	+	Nd	+	-
Medio tánico decolora	Nd	Nd	-	+
Crecimiento				
> 70mm en 7 días	+	-	-	-
> 70mm en 14 días	+	-	-	+
40-70mm en 14 días	-	(+)	(+)	+
25-40mm en 14 días	-	(+)	(+)	-
Tasa de crecimiento Mea:Cha	Nd	0,8-1,2	0,8-1,2	Nd
Características macroscópicas				
Hifas marginales apesadas o sumergidas	+	+	+	+
Distancia separada entre ápice de hifas	+	+	+	+
Micelio aéreo lanoso	+	+	+	+
Micelio aéreo algodonoso	-	-	-	+
Micelio aéreo afelpado	+	+	+	(+)
Colonia blanca	+	+	+	+
Colina cremosa	+	+	+	+
Colonia naranja o colorada	-	+	-	-
Colonia amarilla u ocre	+	+	(+)	-
Olor distintivo definible	+	+	-	-
Reverso blanqueado	-	-	-	+
Reverso oscurecido	+	+	+	-
Características microscópicas				
Fíbulas	+	+	+	+
Fíbulas en verticilos	Nd	+	+	(-)
Fíbulas en germinación	Nd	+	(+)	(-)
Ratio diam hifa:diam fíbula =1	Nd	+	+	(+)
Hifas esqueléticas ramificadas	-	(+)	(+)	-
Hifas generativas con paredes finas	Nd	+	+	+
Lumen meándrico	-	-	-	-
Ramificación inequivalente	Nd	(+)	(+)	+
Ancho de la hifa <1,5 µm	-	(+)	(+)	-
Ancho de la hifa 1,5-3 µm	+	+	+	(+)
Ancho de la hifa 3-5 µm	-	+	+	(+)
Cristales en micelio aéreo	-	(+)	(+)	-
Cristales en el agar	+	+	+	-
Clamidosporas	+	+	+	+
Otras				
Esporulación en cultivo en menos de 6 semanas	+	(+)	-	-
Sustrato angiospermas	+	+	+	Nd
Mata de micelio se despega fácil del agar	+	Nd	Nd	+

Claves: Presente + ; presente a veces (+); ausente -; no observadas (-); Nd.: no determinado.

Figura 1. Imágenes representativas del micelio en cultivo de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* sobre medios nutritivos semisólidos. **A:** *G. gargal* (cepa A), **B:** *G. gargal* (cepa B), **C:** *G. gargal* (cepa G9), **D:** *G. sordulenta*. El cultivo se realizó durante 28 días en medio MYPA modificado, a 18°C y en oscuridad.

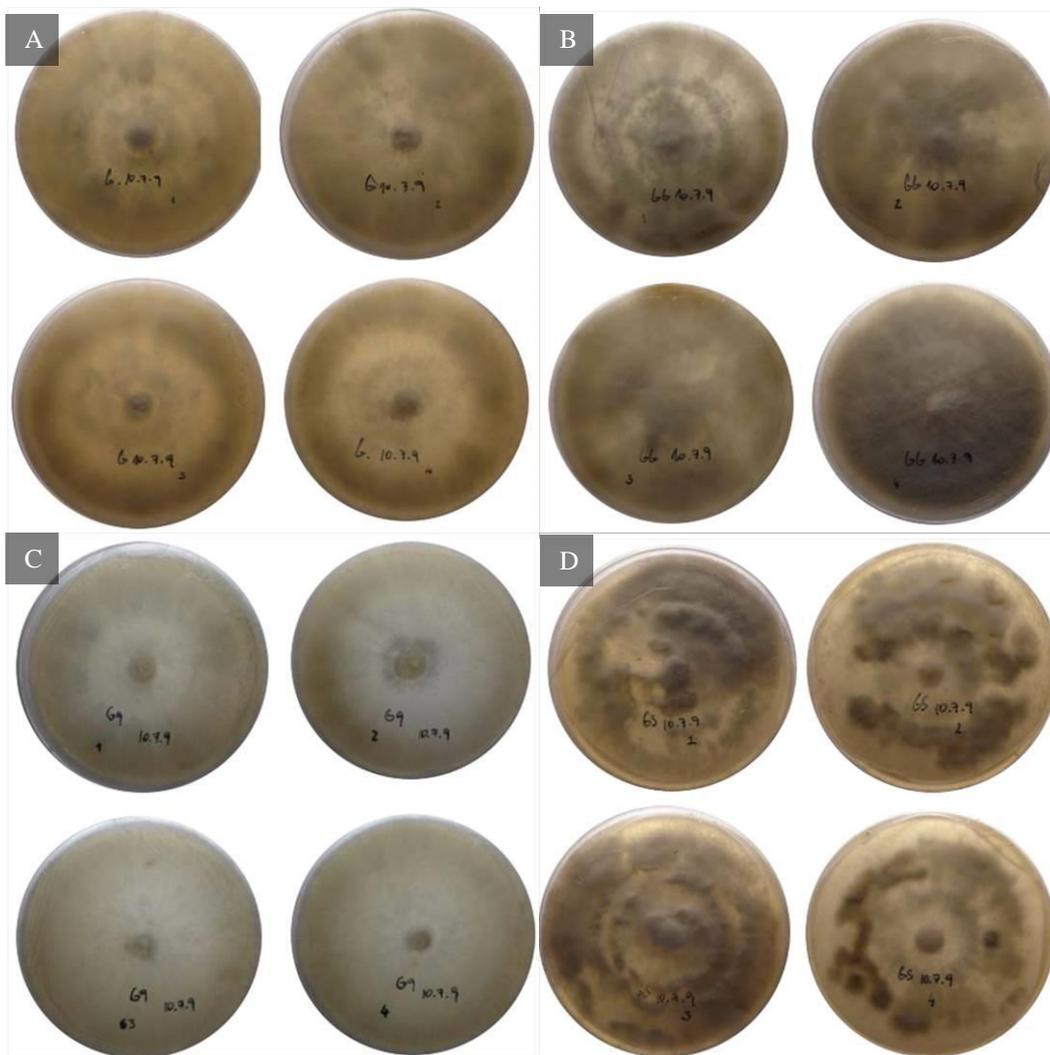
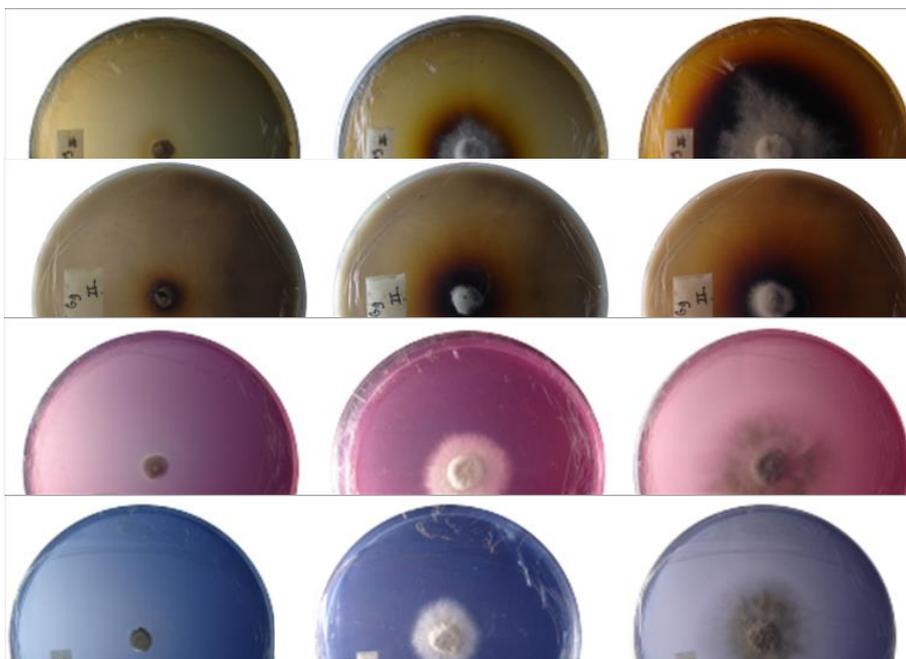


Figura 2. . Imágenes representativas del micelio en cultivo de *Grifola* spp. en medios de ácido gálico, ácido tánico y los colorantes poly R478 y azure B (de arriba hacia abajo), a los 3, 11 y 18 días de cultivo (de izquierda a derecha).

A: *Grifola gargal* cepa A.



B: *Grifola gargal* cepa B.



C: *Grifola gargal* cepa G9.



D: *Grifola sordulenta*.



E: *Grifola frondosa*.



Figura 3. *Grifola gargal* (Cepas A, B y G9), *G. sordulenta* y *G. frondosa* a los 46 días de cultivo, las fotografías se tomaron del lado inferior de la caja de Petri. Cuando el contraste de la fotografía lo permite es posible observar el proceso de decoloración.

G. gargal cepa A



G. gargal cepa B



G. gargal cepa G9



G. sordulenta



G. frondosa



Apéndice 2

Ensayo de fotomorfogénesis

A continuación se muestran algunas imágenes representativas del ensayo de fotomorfogénesis tratado en el Capítulo II.D. Se muestran los cultivos de *Grifola gargal* y *G. sordulenta* a los 120 días desde la inoculación, que fueron sometidos a una exposición durante los últimos 62 días a un fotoperíodo de 7 horas con luz *blanca*, *azul*, *verde* o *roja*; un grupo control que fue cultivado en *oscuridad*.

Figura 1. Colonias de *Grifola gargal* (cepa A) cultivadas bajo condiciones de luz *blanca*, *azul*, *verde*, *rojo* y en *oscuridad* (de arriba hacia abajo).

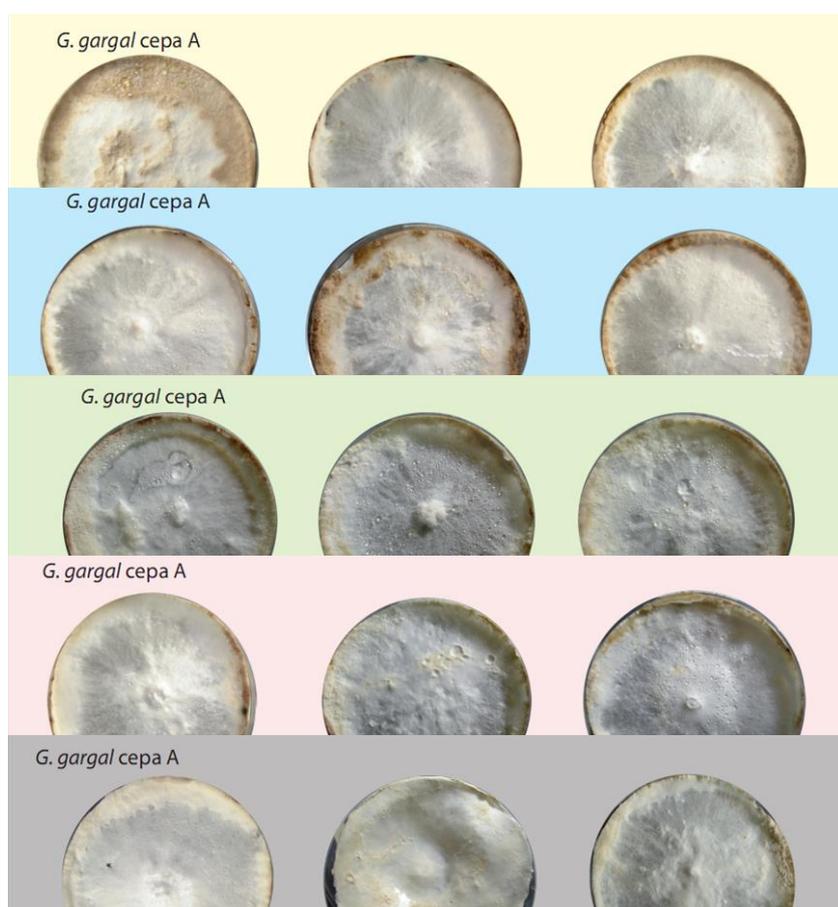


Figura 2. Colonias de *Grifola gargal* (cepa B) cultivadas bajo condiciones de luz blanca, azul, verde, rojo y en oscuridad (de arriba hacia abajo).

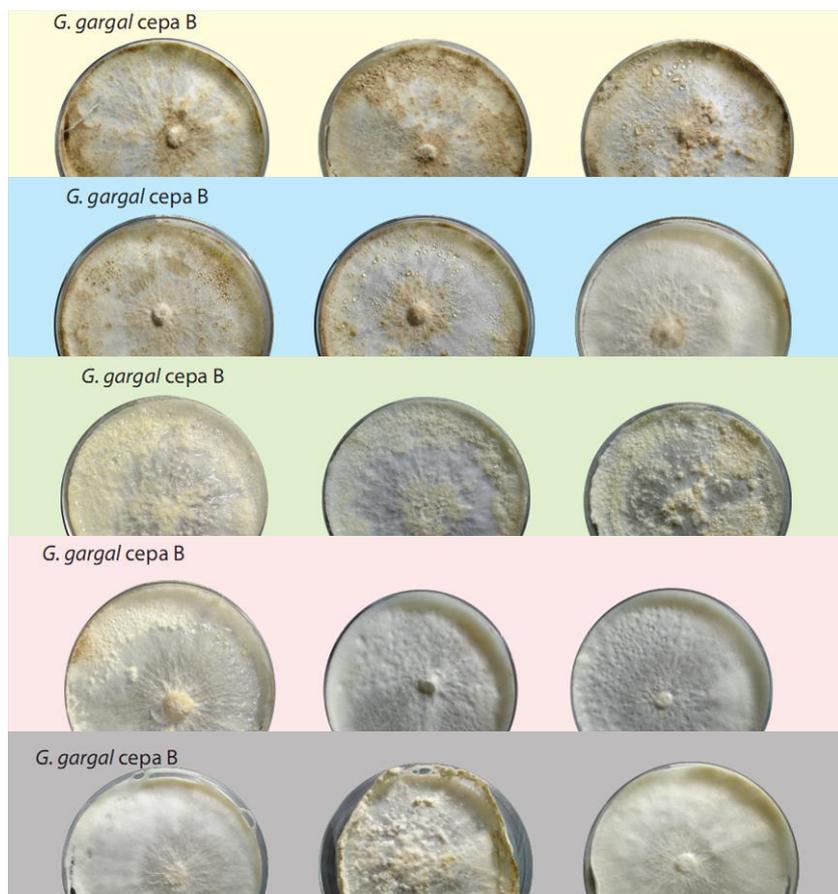


Figura 3. Colonias de *Grifola sordulenta* cultivadas bajo condiciones de luz blanca, azul, verde, rojo y en oscuridad (de arriba hacia abajo).

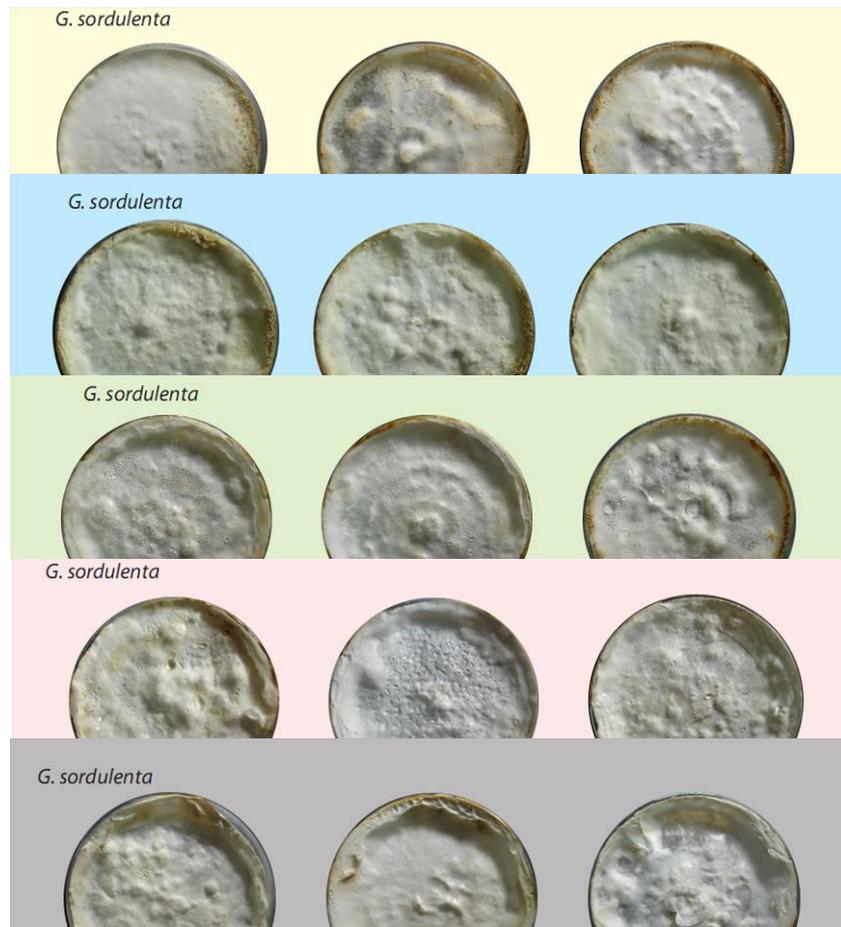


Tabla 1. Fotomorfogénesis en hongos. Condiciones experimentales y referencias bibliográficas.

Especie	Flujo de irradiación y tipo de luz	Tiempo	Respuesta morfológica	Referencia
<i>Panus fragilis</i>	160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente blanca.	1,5 h 12 h	Inducción de primordios. Maduración completa de primordios.	Miller y Palmer, 1973.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,1 -1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Luz azul (incandescente o fluorescente)	Ciclos de 12 h, 4 días	Inducción de primordios.	Arjona <i>et al.</i> , 2009.
<i>Coprinus macrorhizus</i>	7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente blanca con filtro 440 - 485nm.	Ciclos de 12 h	Diferenciación del píleo. Shock de 5°C induce mayor nº de primordios.	Tsusué, 1969.
<i>Coprinus macrorhizus</i>	7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente blanca.	30 s	Inducción a la fructificación.	Kamada <i>et al.</i> , 1978. Morimoto <i>et al.</i> , 1973.
<i>Coprinus lagopus</i>	0,2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente blanca.	1 h	Diferenciación y fructificación.	Lu, 1974. Madelin, 1956.
<i>Cercospora zae-maydis</i>	16 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente blanca.	3-4 días, contante.	Regulación del desarrollo.	Bluhm y Dunkle, 2008.
	0,05 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Fluorescente UV.	30 min	Protección del daño UV	
<i>Flammulina velutipes</i> <i>Schizophyllum commune</i> <i>Trametes versicolor</i>	15 W 60 cm. Fluorescente blanca.	Ciclos de 12 h	Inducción y maduración de cuerpos fructíferos	Croan y Kim, 1997.
<i>Nectria haematococca</i>	0.7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Xenon con filtro 350-480nm.	5 min	Inducción de peritecios	Curtis, 1972.
<i>Neurospora crassa.</i>	40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fluorescente blanca.	24 h	Expresión de fitocromos.	Froehlich <i>et al.</i> , 2005.
	40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fluorescente blanca.	Ciclos de 12 h, 14 días	Fototropismo de peritecios.	

Apéndice 3

Contenido nutritivo de *Grifola* spp.

Composición proximal

En la **Tabla 1** se presentan los contenidos de carbono, nitrógeno, la relación entre el contenido de carbono y nitrógeno y los contenidos de proteínas, quitina, carbohidratos, y grasas totales de distintas bioformas de micelios de *Grifola* spp.

El *contenido de carbono* estuvo entre el 40 y el 48 % en el conjunto de muestras. El *contenido de nitrógeno* fue más variable estuvo en el rango de 1,4- 4,1 % sobre la base de peso seco (**Tabla 1**). La relación de C/N fueron *c.a.* de 17 para los granos de trigo (control y biotransformados), *c.a.* de 11 para el micelio de cultivo líquido, 29 para las fructificaciones de *G. gargal* y 18 en aserrín de *Nothofagus obliqua*.

El *contenido proteico* y de *quitina* se estimó mediante la multiplicación del contenido de nitrógeno por factores apropiados. En el micelio de cultivo líquido o de cuerpos fructíferos se empleó el factor 4,38 y 1,87 para el contenido de proteína y quitina, respectivamente; en grano de trigo biotransformado se utilizó el factor: 5,7 (Danell y Eaker, 1992, Owusu-Apenten, 2002) y en este caso el contenido de quitina fue despreciado (ver en el Apéndice 4 el contenido de micelio en grano). El contenido de proteína en aserrín de *N. obliqua* se calculó con el factor 3,19 % (Dill *et al.*, 1984). El contenido de proteínas de los cuerpos fructíferos de *G. gargal*, sobre la base de peso seco, fue de 6,1 %; otros autores informaron un valor similar del 5% y otro mucho más elevado del 28% (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1998; Harada, 2007, respectivamente). Para los basidiomas de *G. frondosa*, Harada (2007) y Stamets (1993) reportaron valores de 22 y 27%, respectivamente. El micelio de cultivo líquido tuvo valores altos de proteína: 14-18%. Finalmente en los granos de trigo control se halló un contenido proteico de 14,3%, hallándose valores similares en las muestras de trigo biotransformado.

El *contenido de carbohidratos* (%) se calculó por diferencia: $100\% - [\% \text{ proteína} + \% \text{ quitina} + \% \text{ grasa} + \% \text{ ceniza}]$. En cuerpos fructíferos de *G. gargal* fue de 84,3 %; un valor más bajo fue informado por Harada (2007): 53% y otro más alto por Schmeda-Hirschmann *et al.* (1998): 90,4%. La bibliografía respecto a las fructificaciones de *G. frondosa* menciona contenidos de carbohidratos de 50, 60 y 74% (Stamets 1993; Harada, 2007; USDA 2009, respectivamente). En el micelio de cultivo líquido y granos de trigo control se hallaron contenidos similares de carbohidratos, entre 75-81 %. El contenido energético está relacionado con el contenido de carbohidratos. Harada (2007) determinó valores similares de contenido energético entre las fructificaciones de *G. gargal*, *G. frondosa*, y *Lentinus edodes*: de 180 kcal por 100 g de hongos secos. La página web de USDA (2009) muestra valores mayores para estas tres especies de: 329, 296, 300 kcal %. El contenido energético del trigo es 339 kcal % (USDA, 2009).

Como se mencionó anteriormente el *contenido de quitina* se estimó en base al contenido de nitrógeno utilizando el factor 1,87 propuesto por Danell y Eaker (1992) para el micelio y cuerpos

fructíferos, de esta forma mostraron valores del 6 al 10 % sobre la base de peso seco que son consistentes con los determinados para otras especies (Vetter, 2007).

La *materia grasa total* fue extraída con éter de petróleo y en el caso de cuerpos fructíferos de *G. gargal* se realizó también una extracción en cloroformo según Folch *et al.* (1957). En las fructificaciones de *G. gargal* se determinó un contenido graso de 5,4 y 6,3 % (técnica de Folch, y extracción con éter de petróleo, respectivamente); otros autores reportaron valores menores, de 2,5 % (Schmeda-Hirschmann *et al.* 1998) y 4,8 % (Harada, 2007). En *G. frondosa* también se hallaron valores bajos de 2,2 % (USDA, 2009) y 3,9 % (Harada, 2007). Estos niveles de fracción lipídica son similares a los hallados en la mayoría de fructificaciones de hongos comestibles que es de 2- 8% sobre la base de peso seco (Breene, 1990). Para el micelio de cultivo líquido el contenido de materia grasa fue similar con valores de 5 y 7% para las tres especies. El trigo control mostró un valor del 3% de materia grasa que no fue modificado por la biotransformación de *Grifola* spp. Es importante mencionar que la proporción de ácidos grasos no saturados en los hongos es alta *c.a.* 80 % y con un alto contenido de ácido linoleico de 30 a 70% (Chang y Miles, 2004), lo cual es un factor significativo como alimento saludable.

Contenido de fibra dietaria

En la **Tabla 2** se muestran los valores del *contenido de fibra dietaria* determinados siguiendo la técnica de Van Soest *et al.* (1991). La fibra dietaria está constituida por compuestos que son sólo parcialmente digeribles por la flora intestinal, su análisis se realiza según su insolubilidad en detergentes neutros (FDN), ácidos (FDA) y en ácido sulfúrico al 72% (ver detalles del método en el Cap. V). En el micelio proveniente del cultivo líquido se encontró que estaba compuesto casi en su totalidad por la fracción nutritiva correspondiente al *contenido celular* con valores entre 87- 95 %. El contenido de FDN en el basidioma de *G. gargal* fue de 22%, mayor al 10% reportado por Schmeda-Hirschmann *et al.* (1998) y menor al 37 % que fuera obtenido por Harada (2007). Este último autor también obtuvo valores altos en *G. frondosa*: 41%. Cabe mencionar que los valores de FDN hallados en *G. gargal* son similares a los de *Lentinula edodes*, que posee entre 19-23% de FDN (Escobar *et al.*, 2007).

El valor de FDA indica porciones de fibra muy difícilmente digeribles (en materiales vegetales corresponden a la lignina y las partes de las cadenas de celulosa menos accesibles a la degradación bacteriana). Los granos de trigo control y los granos biotransformados por *Grifola* spp. se caracterizaron por una baja relación de FDA/FDN que indica una mejor palatabilidad dada la mayor proporción de fibras más fácilmente digeribles

El tratamiento con 72 % SO_4H_2 del residuo FDA solubiliza la materia orgánica a excepción de ciertas moléculas recalcitrantes como la lignina y algunos polifenoles producidos por el hongo. En los materiales fúngicos estudiados se halló un contenido muy bajo de estas sustancias recalcitrantes. Los valores más elevados fueron los de las fructificaciones de *G. gargal* con apenas 1%. Nótese en la

Tabla 2 que el basidioma de *Ganoderma lucidum*, de consistencia más leñosa, posee un 6 % de estos compuestos y a su vez un alto contenido en cenizas.

Tabla 1. Contenido de carbono, nitrógeno, relación C/N y composición proximal de nutrientes de muestras secas de cuerpos fructíferos de *G. gargal* y *G. frondosa* y de micelios de *G. sordulenta*, *G. gargal* y *G. frondosa* cultivados en medio líquido y en granos de trigos biotransformados por estas tres especies. Se incluyen los correspondientes valores para el trigo (control) y el aserrín de *Nothofagus obliqua*.

Materiales ^a	C % ^b	N % ^c	C/N	Proteínas % ^d	Quitina % ^e	Grasa total % ^f	Carbohidratos % ^g
<i>Grifola gargal</i>							
Cuerpos fructíferos	40,7	1,4	28	6,1	2,6	6,3- 5,4	84,3
Micelio de cultivo líquido	40,5	3,2	13	14,0	6,0	7	78,1
Granos de trigo biotransformados	43,9	2,7	13	15,4	- ⁱ	3	79,6
<i>Grifola sordulenta</i>							
Micelio de cultivo líquido	42,8	4,1	10	18,0	7,7	6	75,0
Granos de trigo biotransformados	42,3	2,6	17	14,8	- ⁱ	3	79,2
<i>Grifola frondosa</i>							
Cuerpos fructíferos	- ^h	- ^h	- ^h	27	11,5	2,2	50
Micelio de cultivo líquido	42,2	4,0	11	17,5	7,5	5	76,5
Granos de trigo biotransformados	41,6	2,4	18	13,7	- ⁱ	3	81,3
Trigo control	42,4	2,5	17	14,3	- ⁱ	3	80,7
<i>Nothofagus obliqua</i>	47,7	2,6	18	8,2	- ⁱ	- ^j	- ^j

^a Cuerpos fructíferos de *G. gargal* corresponde a “GgFB” (Cap. I, VI, VII), los micelios de cultivo líquido de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* corresponden a “GgLC-frascos I, GsLC-frascos I y GfLC-fuentes”(Cap. III, VI y VII), los granos de trigo control y biotransformados corresponden a “Wf, GgWG, GsWG y Gf WG (Cap. IV, VI y VII). Los valores para cuerpos fructíferos de *Grifola frondosa* fueron tomados de Stamets (1993). *Nothofagus obliqua* virutas del xilema de roble pellín.

^b Valores obtenidos con un analizador *Leco Carbon Analyzer* en el laboratorio LANAIS, CONICET-UNS.

^c Valores obtenidos con el método Kjeldahl en el laboratorio LANAIS, CONICET-UNS.

^d Proteína micelio y basidioma= $N \times 4,38$ y proteína granos de trigo = $N \times 5,7$, acorde con Dannell y Eaker (1992) y Dannell (1994); *Nothofagus obliqua* $N \times 3,19$ acorde con Dill *et al.* (1984).

^e Quitina basidioma de *G. gargal* y micelios = $N \times 1,87$.

^f Extracción exhaustiva en éter de petróleo; en el caso de cuerpos fructíferos de *G. gargal* además con cloroformo metanol acorde con Folch *et al.* (1957), respectivamente.

^g Carbohidratos = $100 \% - [\text{proteína} + \text{quitina} + \text{grasa} + \text{cenizas}]$, en el caso del basidioma de *G. gargal* se empleó el valor de la extracción en éter de petróleo.

^h No reportados.

ⁱ No posee o es muy bajo,

^j No determinado.

Tabla 2. Fibra dietaria, porcentaje en base seca de fibra detergente neutra y ácida de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa*. Los valores de contenido celular, y fibras están corregidos por el contenido de cenizas (metodología en Cap. V.)

Materiales ^a	Contenido celular	FDN	FDA	Insolubles en SO ₄ H ₂ ^b	Cenizas
<i>Grifola gargal</i>					
Cuerpos fructíferos	76	22	19	1	2
Micelio de cultivo líquido	95	4	3	0	1
Granos de trigo biotransformados	60	38	11	1	2
<i>Grifola sordulenta</i>					
Micelio de cultivo líquido	94	5	3	0	1
Granos de trigo biotransformados	57	43	13	0	3
<i>Grifola frondosa</i>					
Cuerpos fructíferos	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	1
Micelio de cultivo líquido	87	12	6	0	1
Granos de trigo biotransformados	62	36	10	1	2
Trigo control	63	35	12	1	2
<i>Nothofagus obliqua</i>	16	76	68	19	10
<i>Ganoderma lucidum</i> Cuerpos fructíferos	38	62	41	6	3
<i>Pleurotus ostreatus</i> Cuerpos fructíferos	60	40	21	0	1
<i>Agaricus blazei</i> Cuerpos fructíferos	77	23	12	0	2

^a Cuerpos fructíferos de *G. gargal* corresponde a “GgFB” (Cap. I, VI, VII), los micelios de cultivo líquido de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* corresponden a “GgLC-frascos I, GsLC-frascos I y GfLC-fuentes”(Cap. III, VI y VII), los granos de trigo control y biotransformados corresponden a “Wf, GgWG, GsWG y Gf WG (Cap. IV, VI y VII). El valor para cuerpos fructíferos de *Grifola frondosa* fue tomado de Stamets (1993). *Nothofagus obliqua* virutas del xilema de roble pellín. Fructificaciones de *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus blazei* obtenidas con el cultivo en fase semisólida en cáscara de girasol.

^b Corresponde a la fracción de lignina o compuestos fenólicos complejos e insolubles en detergentes.

^c No reportados.

Contenido de vitaminas

Si bien durante el trabajo de desarrollo de esta tesis no se realizaron determinaciones del contenido de vitaminas, vale aquí hacer una breve referencia a la información existente al respecto en general y por estas especies fúngicas. En general, los hongos cultivados constituyen una buena fuente de vitaminas: C y D, complejo B, ergosterol y provitamina D (Koyyalamudi *et al.*, 2009). Otras vitaminas como A, C y D son detectables sólo en algunas especies (Mau *et al.*, 2001). Específicamente, en la literatura existe también información relativa al contenido de vitaminas de *G. gargal*, *G. frondosa* (Harada, 2007; Stamets, 1993; USDA, 2009). Los valores de requerimientos diarios y máximos permitidos que se mencionan a continuación en relación a las especies de *Grifola* de interés, se obtuvieron de reportes de FAO-WHO (1998), Recommended Dietary Allowances (1989).

El contenido de vitamina B1 (tiamina) en *G. gargal* es de 1,2 mg %, y en *G. frondosa* de 1,2- 1,5 mg %. Su ingesta diaria recomendada es 1,2 mg, siendo que 100 g secos cumplen con esta. La ingesta

diaria recomendada de vitamina B2 es 1,7 mg, ambos *G. gargal* (2,3 mg %) y *G. frondosa* (1,9 mg %) superan esta medida en 100 g secos. La dosis recomendada de vitamina B3 es de 16 mg diarios y es tóxica por encima de 1,5-6 g diarios. El contenido de B3 en 100 g en *G. gargal* o *G. frondosa* secos supera *c.a.* de 3 veces la dosis diaria (y es 23 veces menor que la dosis tóxica). El contenido de vitamina C en *G. frondosa* es de 63 mg %, que supera la dosis diaria recomendada de 40 mg y no se conoce su contenido en *G. gargal*. La cantidad recomendada de vitamina D (10 µg) se halla en 100g de cuerpos fructíferos secos de *G. frondosa*, siendo su contenido semejante al hallado en pescados. La irradiación con UV λ 254 nm a cuerpos fructíferos de *G. frondosa* y *G. gargal* aumenta *c.a.* de 70 veces su contenido (Harada, 2007) de manera tal que en este producto irradiado con solo 1,5 g secos se cumple el requerimiento diario.

Contenido de minerales

Las propiedades quelantes únicas que poseen las paredes celulares de los hongos ha llevado a considerar que en ellas se encuentra cada mineral que haya estado presente en el sustrato (Mattila *et al.*, 2001), y en términos nutritivos esto trae consigo la desventaja de concentrar también metales peligrosos. Por eso en términos biotecnológicos los hongos se han empleado para la biorremediación de suelos o efluentes contaminados (Baldrian, 2003). Teniendo en cuenta que los minerales están adheridos por a las paredes celulares del micelio sus propiedades quelantes (y no formando sales precipitadas) es de esperar que el contenido de cenizas en el análisis de fibras haya resultado muy bajo de 1 a 2%, ya que los minerales fueron lavados durante las solubilizaciones en los detergentes (**Tabla 2**).

En las **Tablas 3 y 4** se presentan contenidos de algunos minerales presentes en fructificaciones de *G. gargal*, *G. frondosa*, en micelio de cultivo líquido y en granos biotransformados de *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa*, en la harina de granos de trigo control, en aserrín de *Nothofagus obliqua*, en micelio de cultivo líquido de *Ganoderma lucidum* de las cepa E47 y S (ver Cap.I), los valores máximos y mínimos de un grupo de cuatro hongos lignícolas y también los valores de las dosis diarias recomendadas. Los valores están expresados en miligramos del elemento mineral contenidos en 100 gramos de materia seca (mg %).

Calcio. El contenido de calcio en los cuerpos fructíferos analizados de *G. gargal*: 53 mg %, fue superior al reportado en *G. frondosa* de 10 mg %. Estos contenidos representan el 1-5 % del requerimiento diario. Las fructificaciones de *G. gargal* no presentaron un efecto de acumulación de calcio comparadas con el contenido hallado en *N. obliqua*. En el micelio de cultivo líquido de las tres especies de *Grifola* se obtuvieron valores similares de calcio, de entre 35 a 38 mg %. En los granos de trigo control se midieron valores de calcio semejantes a los reportados en la literatura: 260 mg % en estas determinaciones y 340 mg % acorde con White y Broadley (2005). Sin embargo en los granos biotransformados el contenido de calcio sí aumentó respecto a los granos control a 347, 713 y 855 mg %, para *G. gargal*, *G. frondosa* y *G. sordulenta*, respectivamente. El requerimiento diario de calcio estaría cubierto con el consumo de 120-300 g de estas harinas biotransformadas.

Potasio. Los cuerpos fructíferos de *G. gargal* contienen 900 mg %, menor al determinado en *G. frondosa* y en otras especies lignícolas. El micelio de cultivo líquido de *Grifola* spp. , y *G. lucidum* contienen cantidades similares a las mencionadas en cuerpos fructíferos: 1000-2140 mg %. Los granos de trigo control y biotransformados mostraron los valores más bajos de potasio entre: 390-610 mg %.

Magnesio. La dosis diaria recomendada de magnesio para adultos es de 220 mg; cantidades mayores a 380 mg producen síntomas negativos. Los cuerpos fructíferos de *G. gargal* no acumularon mayor contenido que el presente en *N. obliqua* (179 y 205 mg %, respectivamente). Comparado con otros hongos lignícolas los valores fueron bajos, no obstante el consumo de 100 g secos de este hongo aportaría el 81 % de la ingesta diaria recomendada para adultos. Los cuerpos fructíferos de *G. frondosa* aportan cantidades menores a *G. gargal*. El micelio cultivado en medio líquido mostró ser un buen acumulador de este ión encontrándose en las tres especies de *Grifola* contenidos de 218-260 mg %. Usualmente los granos de trigo contienen 144 mg % de este elemento (USDA, 2009), aunque en estas determinaciones se hallaron contenidos superiores de: 270 mg % que no aumentaron luego del proceso de biotransformación con *Grifola* spp. (230-330 mg %).

Sodio. El basidioma de *G. gargal* presentó bajos valores de sodio (40,3 mg %), similares a los medidos en *N. obliqua*. Harada (2007) reportó un contenido de sodio aún menor: 5 mg % para esta especie. Los hongos lignícolas y *G. frondosa* presentan contenidos bajos de sodio 10 a 22 mg %. En cultivo líquido se hallaron los valores mayores de 121-173 mg % para *Grifola* spp. y *Ganoderma lucidum*. En los granos de trigo control se halló un contenido de 43 mg %, y el crecimiento del micelio no incrementó la concentración de este elemento. La dosis diaria de sodio es de 115-500 mg.

Fósforo. El contenido de fósforo en los hongos se ubica en el rango de 200-800 mg % alcanzando la dosis diaria recomendada (800 mg adultos, 1200 mg mujeres en lactancia). Los cuerpos fructíferos de *G. gargal* tienen contenidos de 222 mg %, mientras que otros autores determinaron 22 y 705 mg % (Schmeda-Hirschmann, 1998; Harada 2007). En el caso de *G. frondosa* el contenido en este mineral es mayor posiblemente debido al mayor contenido de proteínas. En el micelio cultivado en medio líquido se encontraron contenidos similares entre las tres especies de *Grifola* y *G. lucidum*: 465 y 692 mg %. En los granos de trigo se midieron contenidos de fósforo de 300 a 400 mg %.

Azufre. Dado que las dietas cumplen con el requerimiento no existen dosis recomendadas, y la toxicidad solo ocurre en determinado tipo de enfermedades congénitas. El contenido de azufre en los granos de trigo biotransformados aumentó con *G. sordulenta* y *G. frondosa* de 318 mg % a 652-589 mg % respectivamente, mientras que se mantuvo en valores similares al trigo control en el caso de *G. gargal* (318 y 370 mg %, respectivamente). En cuanto al cultivo líquido de micelio, las especies de *Grifola* mostraron contenidos de 375 a 426 mg %, mientras que las cantidades de azufre de *G. lucidum* estuvieron por encima y por debajo de estos valores para cada una de las cepas (**Tabla 3**). Los cuerpos fructíferos de *G. gargal* no concentraron el azufre que estaba disponible en *N. obliqua* (88-93 mg %, respectivamente).

Cromo. No se detectó presencia de cromo por encima de la sensibilidad del método analítico usado, de 0,05 mg %.

Cobre. La dosis recomendada de cobre es 1,15 mg, siendo la dosis tóxica de 10 mg diarios. Usualmente los granos de trigo contienen 0,5 mg % de Cu (USDA, 2009), en el nuestro el contenido en granos enteros sin colonizar fue de 0,97 mg %. En los granos colonizados por *G. gargal* y *G. frondosa* este contenido aumentó a 2-3 mg %. En cambio en los granos de trigo biotransformados por *G. sordulenta* los valores se mantuvieron iguales al del grano de trigo control. En las muestras de micelio de *Grifola* spp. los valores variaron entre 0,76-1,19 mg %. Estos valores fueron superados en *G. lucidum* y otras especies de hongos lignícolas (**Tabla 4**). El contenido de cobre en *G. gargal* fue de 3,4 mg %, la bibliografía señala para *G. frondosa* cantidades *c.a.* 2,5mg %. Los cuerpos fructíferos de *G. frondosa* y *G. gargal* acumulan más cobre que el micelio cultivado en medio líquido y que los granos de trigo biotransformados.

Hierro. El consumo diario recomendado de hierro varía según el tipo de dieta y oscila entre 5 y 70 mg diarios. Los cuerpos fructíferos de *G. gargal* contienen más hierro que *G. frondosa* con valores promedio de 11,7 y 0,5 mg %, respectivamente. En cambio en medios líquidos *G. gargal* acumula menos que *G. frondosa* y que *G. sordulenta* en promedio 4, 21 y 24 mg %, respectivamente. La concentración de hierro en las tres especie de *Grifola* superó a la de los granos sin colonizar: *c.a.*: 25, 15 y 12 vs. 10 mg %.

Selenio. No se encontraron cantidades superiores a 0,025 mg %, que es el límite de detección del análisis empleado y en el caso de *G. frondosa* los contenidos reportados son más bajos que estos de: 0,022 mg %.

Cinc. Los requerimientos diarios son de 15 mg %. Los granos de trigo convencionales aportan 4,2 mg % (USDA, 2009), en nuestro trabajo se encontraron valores similares en granos de trigo control y biotransformados con *G. gargal*. Estos valores aumentaron a 5,6 y 6,3 mg % en trigo biotransformado con *G. frondosa* y *G. sordulenta*, respectivamente. El micelio de cultivo líquido de *G. sordulenta* acumuló más cinc que el resto de los micelios cultivados (15,1mg %). El basidioma de *G. gargal* concentró este elemento en comparación con el medido en *N. obliqua* de 3,02 a 5,95 mg %. Otros hongos presentan valores de 4 a 14 mg %.

Tabla 3. Contenido de minerales con dosis diaria recomendada mayor a 220 mg %. Los valores de *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa*, granos de trigo control, aserrín de *Nothofagus obliqua*, micelio de cultivo líquido de dos cepas *Ganoderma lucidum*, y rango de valores de hongos lignícolas) están expresados en mg % (peso seco).

Materiales ^a	miligramos de mineral por 100 g de materia seca ^b					
	Ca	K	Mg	Na	P	S
<i>Grifola gargal</i>						
Cuerpos fructíferos	53	900	179	40,3	222	879
Micelio de cultivo líquido	38	1480	230	173	465	405
Granos de trigo biotransformados	347	390	229	34	303	370
<i>Grifola sordulenta</i>						
Micelio de cultivo líquido	36	1300	260	150	692	426
Granos de trigo biotransformados	855	580	330	45,7	415	652
<i>Grifola frondosa</i>						
Cuerpos fructíferos	10	2040	100	10	740	- ^c
Micelio de cultivo líquido	35	1090	218	121	616	375
Granos de trigo biotransformados	713	610	307	39,5	440	589
Trigo control	260	414	270	43,3	339	318
<i>Nothofagus obliqua</i>	183	170	205	34	112	93
<i>Ganoderma lucidum</i>						
Micelio de cultivo líquido	69-189	980-2140	82 -173	<0,5 -131	538-710	197-633
Hongos lignícolas Cuerpos fructíferos	84-3900	1750-2400	140 -330	3-22	326-345	- ^c
Dosis diaria recomendada	1000	24000	220	2000-3500	800	- ^d

^a Cuerpos fructíferos de *G. gargal* corresponde a “GgFB” (Cap. I, VI, VII), los micelios de cultivo líquido de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* corresponden a “GgLC-frascos I, GsLC-frascos I y GfLC-fuentes”(Cap. III, VI y VII), los granos de trigo control y biotransformados corresponden a “Wf, GgWG, GsWG y Gf WG (Cap. IV, VI y VII). *Ganoderma lucidum*: valores de las cepas E47 y S, respectivamente. *Grifola frondosa* cuerpos fructíferos: valores obtenidos de Harada (2007), Stamets (1993) y MedRat® NutriArchives (<http://medrat.com/nutrition/sr20/>). *Nothofagus obliqua*: virutas del xilema de roble pellín. Hongos lignícolas: selección de los valores máximos y mínimos de un conjunto de cuatro especies lignícolas (*Polyporus squamosus*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*.) reportados por Gençcelep *et al.* (2008). Los valores de dosis diaria recomendada fueron tomados de FAO-WHO (1998); O’Dell (1997); Prasad, (2008); Recommended Dietary Allowances (1989).

^b Análisis realizado con espectrometría de emisión atómica por plasma inducido (Shimadzu mod. ICPS - 1000 III, en el LANAQUI, CONICET-UNS, a excepción de las fructificaciones de *G. frondosa* y de hongos lignícolas.

^c Valores no reportados.

^d Valores de la dosis diaria recomendada de azufre son cumplidos en dietas normales.

Tabla 4. Contenido de algunos minerales con dosis diaria recomendada menor a 30 mg. Los valores de *G. gargal*, *G. sordulenta*, *G. frondosa* y controles (granos de trigo control, aserrín de *Nothofagus obliqua*, micelio de cultivo líquido de dos cepas *Ganoderma lucidum*, y rango de valores de hongos lignícolas) están expresados en mg % (peso seco).

Materiales ^a	miligramos de mineral por 100 g de materia seca ^b				
	Cr	Cu	Fe	Se	Zn
<i>Grifola gargal</i>					
Cuerpos fructíferos	<0,05 ^c	3,37	11,7	<0,025 ^c	5,95
Micelio de cultivo líquido	<0,05 ^c	1,19	3,8	<0,025 ^c	4,64
Granos de trigo biotransformados	<0,05 ^c	1,16	25,2	<0,025 ^c	4,53
<i>Grifola sordulenta</i>					
Micelio de cultivo líquido	<0,05 ^c	0,95	24,1	<0,025 ^c	15,1
Granos de trigo biotransformados	<0,05 ^c	0,87	14,7	<0,025 ^c	6,23
<i>Grifola frondosa</i>					
Cuerpos fructíferos	- ^d	2,52	0,5	0,022	7,5
Micelio de cultivo líquido	<0,05 ^c	0,76	21,6	<0,025 ^c	5,96
Granos de trigo biotransformados	<0,05 ^c	1,26	12,0	<0,025 ^c	5,58
Trigo control	<0,05 ^c	0,97	10,1	<0,025 ^c	4,72
<i>Nothofagus obliqua</i>	<0,05 ^c	1,68	25,6	<0,025 ^c	3,02
<i>Ganoderma lucidum</i>					
Micelio de cultivo líquido	- ^d	4,00	- ^d	- ^d	7-9
Hongos lignícolas					
Cuerpos fructíferos	- ^e	1 - 6	35 -70	- ^e	4 -14
Dosis diaria recomendada	0,035	1,15	14 -30	0,05-,026	15

^a Cuerpos fructíferos de *G. gargal* corresponde a “GgFB” (Cap. I, VI, VII), los micelios de cultivo líquido de *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* corresponden a “GgLC-frascos I, GsLC-frascos I y GfLC-fuentes”(Cap. III, VI y VII), los granos de trigo control y biotransformados corresponden a “Wf, GgWG, GsWG y Gf WG (Cap. IV, VI y VII). *Ganoderma lucidum*: valores de las cepas E47 y S, respectivamente. *Grifola frondosa* cuerpos fructíferos: valores obtenidos de Harada (2007), Stamets (1993) y MedRat® NutriArchives (<http://medrat.com/nutrition/sr20/>). *Nothofagus obliqua*: virutas del xilema de roble pellín. Hongos lignícolas: selección de los valores máximos y mínimos de un conjunto de cuatro especies lignícolas (*Polyporus squamosus*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*.) reportados por Genççelep *et al.* (2008). Los valores de dosis diaria recomendada fueron tomados de FAO-WHO (1998); O’Dell (1997); Prasad, (2008); Recommended Dietary Allowances (1989).

^b Análisis realizado con espectrometría de emisión atómica por plasma inducido (Shimadzu mod. ICPS - 1000 III, en el LANAQUI, CONICET-UNS, a excepción de las fructificaciones de *G. frondosa* y de hongos lignícolas.

^c Valores no detectados por ser menores a la sensibilidad de esta metodología.

^d Valores no analizados.

^e Valores no reportados.

Cuantificación de micelio en granos de trigo

Los granos de trigo biotransformados pueden secarse y molerse para obtener un alimento funcional con los beneficios nutritivos que resultan de la combinación del trigo y del micelio. En efecto, este tipo de trigo en su forma de grano entero posee buen contenido de proteína, fibras dietéticas beneficiosas para el correcto funcionamiento del sistema digestivo, y un importante contenido de beta-carotenos con propiedades antioxidantes, además de otras moléculas bioactivas. El micelio por su parte provee esteroides (ergosterol, provitamina D, vitamina D), aminoácidos esenciales, polisacáridos, polifenoles y otras moléculas bioactivas derivadas de su metabolismo secundario, como por ejemplo los triterpenoides.

Un beneficio extra de esta combinación de cereal- micelio es que en la preparación del *spawn* se utilizan sales de calcio, el cual necesita para su absorción de la vitamina D producida por los mismos hongos (así como también de sus precursores) (Harada, 2007); de manera tal que la harina preparada a partir de los granos de trigos biotransformados por hongos comestibles en general y por especies de *Grifola* también, colaboraría en la calcificación o sea al proveer el mineral y la vitamina necesarios para su asimilación. Este último efecto combinado entre el mineral y el micelio fue reportado recientemente por Lee *et al.* (2009) quienes pudieron prevenir la osteoporosis de ratones expuestos a sistema experimental siendo alimentados con shiitake y calcio mineral.

Cuantificación de micelio en granos de trigo biotransformados

Para estimar el contenido de micelio en granos de trigo biotransformados se realizó una cuantificación del contenido de glucosamina. La glucosamina proviene de ciertos biopolímeros fúngicos: la quitina y el quitosano. De manera que previo a su cuantificación fue necesario producir la solubilización de glucosamina con enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum* siguiendo esencialmente el protocolo de Dillon *et al* (2003). El trigo contiene pequeñas cantidades de glucosamina en sus glicoproteínas (Muzzarelli y Peter, 1997), de manera que también se determinó el contenido de glucosamina en granos de trigo control. El contenido de glucosamina medido en estos granos sin colonizar fue sustraído del contenido de glucosamina obtenido en los granos colonizados. La detección colorimétrica de glucosamina se realizó usando el reactivo de Erlich (Chen y Johnson, 1983). El contenido de glucosamina determinado a muestras de micelio de cultivos líquidos fue utilizado como patrón de referencia. La curva de calibrado de glucosamina se muestra en la **Figura 1**.

El contenido de glucosamina en el trigo control fue de 1,86 mg/g sobre la base de peso seco y en el micelio de cultivo líquido de las tres especies se ubicaron entre 37 y 39 mg/g (**Figura 2**). Empleando éstos valores y los del contenido de glucosamina en granos de trigo control y biotransformados, se calculó el contenido de micelio en los granos de trigo biotransformados de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{mg micelio (b.s.)} / \text{g spawn (b.s.)} = (\text{mg micelio (b.s.)} / \mu\text{g Glu micelio (b.s.)}) \times (\mu\text{g Glu spawn (b.s.)} / \text{g spawn (b.s.)}) - \mu\text{g Glu trigo (b.s.)} / \text{g trigo (b.s.)}$$

Donde:

$\text{mg micelio (b.s.)} / \text{g spawn (b.s.)}$: cantidad de micelio en un gramo de spawn sobre la base de peso seco.

$\text{mg micelio (b.s.)} / \mu\text{g Glu micelio (b.s.)}$: cantidad de micelio por cada μg de glucosamina sobre la base de peso seco.

$\mu\text{g Glu spawn (b.s.)} / \text{g spawn (b.s.)}$: cantidad de glucosamina en un gramo de spawn sobre la base de peso seco.

$\mu\text{g Glu trigo (b.s.)} / \text{g trigo (b.s.)}$: cantidad de glucosamina en un gramo de granos de trigo control secos y con el tratamiento para elaborar spawn sobre la base de peso seco.

Determinándose finalmente que el contenido de micelio en los granos de trigo biotransformados por *G. gargal*, *G. sordulenta* y *G. frondosa* es: 4,0, 3,6 y 4,4 mg/g, respectivamente; sin hallarse diferencias entre ellos ($p > 0,05$, Anova simple, **Figura 3**).

Figura 1. Curva estándar de glucosamina. La recta y su fórmula fueron calculados con los valores de 0- 20 $\mu\text{g/ml}$ de glucosamina-Cl.

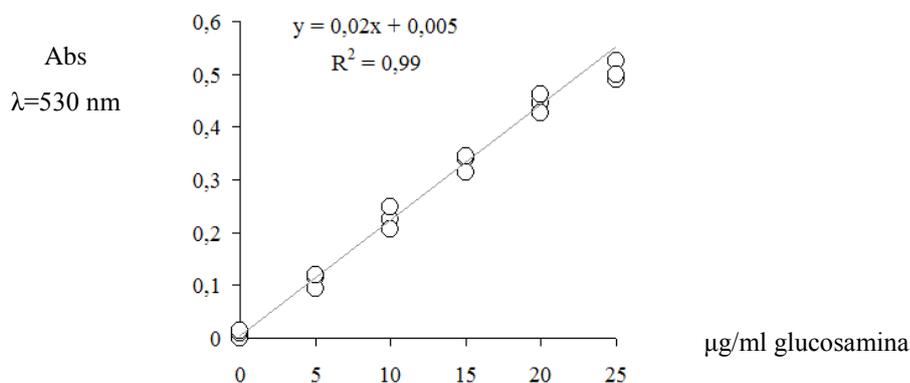


Figura 2. Contenido de glucosamina (miligramos por gramo de peso seco) en trigo control y en micelio de cultivos líquidos de *G. frondosa*, *G. sordulenta* y *G. gargal*.

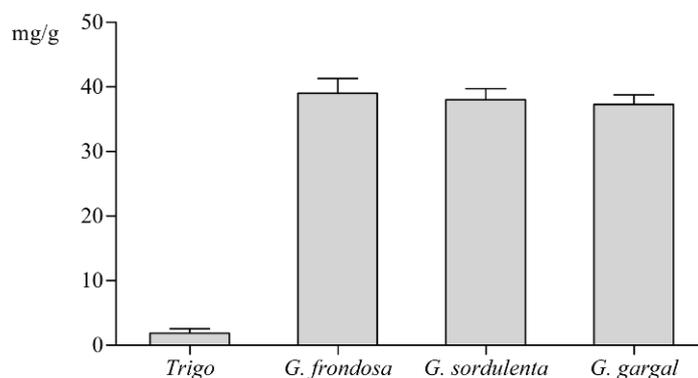
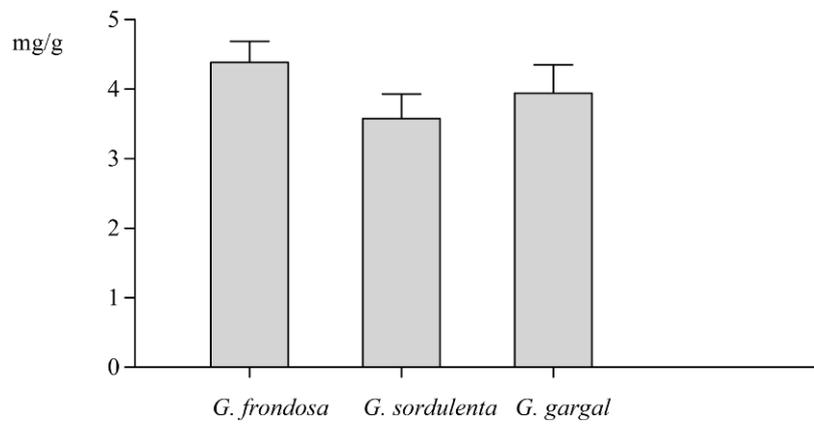


Figura 3. Contenido de micelio en miligramos por gramo sobre la base de peso seco en granos de trigo biotransformados por *Grifola frondosa*, *G. sordulenta* y *G. gargar*.



Bibliografía

- Abrevaya X. 2008. Genotóxicos o xenobióticos: ¿Qué es la genotoxicidad?. <http://www.intramed.net/> Visitado 23-5-2011.
- Aguilar A., Ferraz A. 2007. Fe³⁺ and Cu²⁺ reduction by phenol derivatives associated with azure B degradation in Fenton-like reactions. *Chemosphere*, 66: 947–954.
- Aitken-Christie J., Davis H. 1988. Development of a semiautomated micropropagation system. *Acta Hort.* 230: 81- 87.
- Akavia E., Beharav A., Wasser S., Nevo E. 2009. Disposal of agro-industrial by products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Waste management*, 29:1622-1627.
- Alasoadura S., Visser S. 1972. The pigments of *Sphaerobolus stellatus* (Tode) Pers. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 47(3):301-5.
- Albertó E. 2008. Cultivo intensivo de los hongos comestibles. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Albertó E., Curvetto N., Deschamps J., González- Matute R., Lechner B., (ex aequo). 2010. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo: Hongos silvestres y de cultivo en la Argentina. Historia, regiones y sistemas de producción, consumo, mercado interno y externo, legislación, oferta tecnológica e investigación y desarrollo. ISBN 970-9752-01-4, Méjico.
- Alcalde M., Bulter T., Arnold F. 2002. Colorimetric Assays for Biodegradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungal Laccases. *Journal of Biomolecular Screening*, 7(6):547-553.
- Ander, P., Marzullo L. 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53:115-31.
- Angelova M., Pashova S., Spasova B., Vassilev S., Slokoska L. 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*, 109(2):150-158.
- Arjona D., Arago C., Aguilera J., Ramírez L., Pisabarro A. 2009. Reproducible and controllable light induction of *in vitro* fruiting of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycological Research*, 113(5):552-558.
- Aro N., Pakula T., Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4): 719-739.
- Arnaiz R., Téllez G. 2002. Structure-activity relationships of several anisidine and dibenzanthracene isomers in the w/w+ somatic assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 2002; 514:193-200.
- Azpillicueta M., Marchelli P., Gallo L. 2009. The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics & Genomes*, 5(4):561-571.
- Azpillicueta M., Gallo L. 2009. Shaping forces modelling genetic variation patterns in the naturally fragmented forests of a South American Beech. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:290–297.
- Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1,2):78-91.
- Baldrian P. 2005. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30:215-242.
- Baldrian P., Valaskova V., Meerhautova V., Gabriel J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese lead and zinc. *Res. Microbiol.*, 156:670–676.
- Barros L., Baptista P., Ferreira I. 2007a. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45:1731-1737.
- Barros L., Ferreira MJ, Queirós B., Ferreira I., Baptista P. 2007b. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 103:413–419.
- Becker E. Nissen L., Skibsted L. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561–571.
- Bending G., Friloux M., Walker A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212:59-63.
- Berrios P. 2002. Artrópodos asociados a suelo de renovales de *Nothofagus obliqua* (mirb.) Oersted (*fagacea*) en la zona costera de la VIII Región. *Gayana (Concepc.)*, 66(1):1-6.
- Bhanja T., Kumari A., Banerjee R. 2009. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresour. Technol.*, 100:2861–6.
- Bianchi I. 2008. Maitake. *International Mycotherapy Institute, Boletín*, 2(1): 4-6.
- Bidlack J., Malone M., Benson R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.*, 72:51-56.
- Bieszke J., Braun E., Bean L., Kang S., Natvig D., Borkovich K. 1999. The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8034-8039.
- Binder M., Hibbett D. 2002. Higher level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22:76-90.
- Bluhm B., Dunkle L. 2008. PHL1 of *Cercospora zea-maydis* encodes a member of the

- photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genetics and Biology*, 45:1364–1372.
- Bonilla E., Medina-Leendertz S., Díaz S. 2002. Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin. *Experimental Gerontology*, 37:629-638.
- Borkovich K., Alex L., Yarden O., Freitag M., Turner G., Read N., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., *et al.* 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68:1-108.
- Boyce C., Hotton C., Fogel M., Cody G., Hazen R., Knoll H. 2007. Devonian landscape heterogeneity recorded by a giant fungus. *Geology*, 35:399-402.
- Braaksma A., Schaap D., Donkers J., Schipper C. 2001. Effect of cytokinin on cap opening in *Agaricus bisporus* during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 23:171–173.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54.
- Breene W. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J. Food Protection*, 53: 883-894.
- Brujin J., Loyola C., Aqueveque P., Cañumir J., Cortéz M., France A. 2008. Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifola gargal* hydro-alcoholic extracts. *Micologia Aplicada Internacional*, 20:27-34.
- Brujin J., Loyola C., Aqueveque P., Cañumir J., Cortéz M., France A. 2009. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargal* mushrooms. *Micologia Aplicada Internacional*, 21:11-18.
- Brum A. 2005. Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos. Tesis de Maestría, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Cameron M., Aust S. 2001. Cellobiose deshidrogenase- an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:129-138.
- Canclon P. 1971. Chemical composition of sunflower seed hulls. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 48: 629-632.
- Champavier Y., Pommier M., Arpina N., Voilanda A., Pellon G. 2000. 10-Oxo-trans-8-decenoic acid (ODA): production, biological activities, and comparison with other hormone-like substances in *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 243–251.
- Chang R. 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr. Rev.* 54(11),91-3.
- Chang S. 1999 a. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: Non-green revolution. *Int. J. Med. Mushr* 1: 1-7.
- Chang, S. 1999 b. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997. *Int. J. Med. Mush.* 1: 291-300.
- Chang T., Chou W. 2003. Five polypores (Basidiomycota) new to Taiwan and their cultural characteristics. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2003) 44:245-251.
- Chang S., Miles P. 2004. *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Second Edition. CRC Press, USA.
- Chang S., Miles P. 1989. *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. CRC Press, Inc. FI (USA).
- Chen G., Johnson B. 1983. Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(1):13-16.
- Chen A., Huang N., Han S.H. 2001. Maitake at a Glance. *Mushworld*, Vol. 2001.
- Chiu S., Moore D., Chang S. 1989. Basidiome polymorphism in *Volvariella bombycina*. *Mycological Research*, 92:69-77.
- Choi Y., Lee S., Chun J., Lee H., Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99:381–387.
- Corner, E. 1966. *A Monograph of Cantharelloid Fungi*. London, Oxford University Press.
- Coughlan M., Lungdahl L. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In Aubert P., Beguin & Millet (Eds), *FEMS Symposium N°43, Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. Academic Press.
- Croan S., Kim Y. 1997. Carpogenesis and basidiosporogenesis by *Flammulina velutipes*, *Schizophyllum commune*, and *Trametes vericolor* *in vitro*. *Material und Organismen* (Berlin), 31, 1-16.
- Cui Y., Okkerse W., van der Lans R., Luyben, K. 1998. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 60: 216–229.
- Curtis C. 1972. Action Spectrum of the Photoinduced Sexual Stage in the Fungus *Nectria haematococca* Berk. and Br. var. *cucurbitae* (Snyder and Hansen) Dingley. *Plant Physiol.*, 49, 235-239.
- Curvetto N., Figlas D., Devalis R., Demastro S. 2002a. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄(I) and/or Mn(II). *Biosource Technology*, 84:171-176.
- Curvetto N., Figlas D., Devalis R., Delmastro S. 2002b. Sunflower seed hulls as substrate for the cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms. *Hort-Technology*, 12:652-655.
- Curvetto N., Gonzalez- Matute R., Figlas D., Delmastro S. 2004. Cultivation of oyster mushrooms on sunflower seed hull substrate. En: *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*. *MushWorld*, Corea, p101-106.

- Curvetto N., Gonzalez Matute R., Figlas D., Delmastro S. 2005. Sunflower Seed Hulls as an Alternative Substrate for Shiitake. En Mushroom Growers Handbook 2: Shiitake Cultivation. 119-124. MushWorld, Corea.
- Danell, E., Eaker D., 1992. Aminoacid and total protein content of the edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries). J. Sci. Food Agric., 60: 333-337.
- Danell E. 1994. *Cantharellus cibarius*: Mycorrhiza formation and Ecology. Doctoral dissertation, Department of Physiological Botany, Uppsala University.
- Das S., Masuda M., Sakurai A., Sakakibara M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. Fitoterapia, 81:961–968.
- De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R., Noonan D. Albini, A. 2001. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. Mut. Res., 480: 9-22.
- De Leonardis A., Albanese T., Macciola V. 2005. Biodegradation in vivo and *in vitro* of chlorogenic acid by a sunflower-seedling (*Helianthus annuus*) like-polyphenoloxidase enzyme. Eur. Food Res. Technol., 223:295-301.
- Delmanto R., Alves de Lima P., Sugui M., Ferreira da Eira A., Fávero- Salvadori D., Speit G., Ribeiro L. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutation Research, 496:15-21.
- De Rezende A., Alves A., Graf U., Guterres Z., Kerr W., Spanó M. 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 47:1466-1472.
- De Souza- Silva C., Soares de Melo I., Roberto de Oliveira P. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. Enzyme and Microbial Technology, 37(3):324-329.
- Dinis M., Bezerra R., Nunes F., Dias A., Guedes C., Ferreira L., Cone J., Marques G., Barros A., Rodrigues M. 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. Bioresource Technology, 100:4829–4835.
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>
- Dill I., Salmikow J., Kraepelin G. 1984. Hydroxyproline-Rich Protein Material in Wood and Lignin of *Fagus sylvatica*. Applied and Environmental Microbiology, 4(6):1259-1261.
- Dillon A., Silva S., Almeida P. 2003. Avaliação de massa de *Pleurotus sajor-caju* em cultivo semi-sólido, por análise de proteínas e quitina. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM), 2003, Florianópolis.
- Donoso C., Gallo L., Donoso P., Azpilicueta M.M., 2004. Variación en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina.
- Donovan P., Smith G., Nardone R. 2004. The mutagenic effects of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene, 3-methylcholanthrene and benzo[α]pyrene to the developing Syrian hamster fetus measured by an *in vivo/in vitro* mutation assay. Mutation Research, 554:111-120.
- Draelos Z. 2005. The Future of Cosmeceuticals: An Interview with Albert Kligman. Dermatology Surgery, 31:890-891.
- Dritsa V., Rigas F. 2006. Influence of cultivation temperature on the ligninolytic activity of selected fungal strains. Proceedings of 5th WSEAS International Conference on Environment, Ecosystems and Development, Venice, Italy, November 20-22, 2006.
- Dua I.S., C.L. Jandaik. 1979. Cytokinins in two cultivated edible mushrooms. Scientia Horticulturae, 10(3):301-304.
- Dubost N., Ou B., Beelman R. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chemistry, 105:727-735.
- Duncan K. 1997. An ecophysiological approach to the evaluation, modification and production of mushroom growing media. Mush. News, 45(2): 12-27.
- Durand R., Furuya M. 1985. Action spectra for stimulatory and inhibitory effects of UV and blue light on fruit-body formation in *Coprinus congregatus*. Plant and Cell Physiology, 26(6):1175-1183.
- Duret J. 1989. El género *Mycetophila* Meigen, 1803, en la Patagonia Argentina. (*Diptera, Mycetophilidae*) Parte XIII. Descripción de *Mycetophila brachyptera* sp. n. Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. Tomo 60, pp. 111-122.
- Dutra P.V., Abad M., Almela V., Agustí M. 1996. Auxin interaction with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith improves vegetative growth of the citrus rootstocks. Scientia Horticulturae, 66:77-83.
- Edalli V., Kamanavalli M. 2010. Removal of phenolic compounds by mushroom polyphenol oxidase from *Pleurotus* species. The Ecoscan 4(1): 89-92.
- El Bohi K., Sabik L., Muzandu K., Shaban Z., Solimam M., Ishizuka M., Kazusaka A., Fujita S. 2005. Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA elicited by benzo [a] pyrene and oxidative DNA lesions in V hamster lung cells. Japanese Journal of Veterinary Research, 52:163-172.

- Ellis R., Bragdon G., Schollosser B. 1999. Properties of blue light requirements for primordia initiation and basidiocarp maturation in *Coprinus strecorarius*. *Mycol. Res.*, 103(6): 779-784.
- Elmastas M., Isildaka O., Turkecul I., Temur N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:337-345.
- Escobar V., Pérez A., Arredondo C. 2007. Ingeniería y ciencia. Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. ISSN 1794-9165 Volumen 3(6), 23-39.
- Fang F., Huang F., Gao P. 1999. Optimization of cellobiose dehydrogenase production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Process Biochemistry*, 34(9):957-961.
- FAO-WHO, 1998. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21-30 September 1998.
- Farombi E., Britton G., Emerole G. 2000. Evaluation of the antioxidant activity and partial characterisation of extracts from browned yam flour diet. *Food Research International*, 33:493-499.
- Ferguson L. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475:89-111.
- Ferreira- Leitão V., José Godinho da Silva, Bon E. 2003. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. *Applied Catalysis Environmental*, 42:213-221.
- Field J. Jong E. Costa G. Bont M. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7):2219-2216.
- Figlas D., González- Matute R., Curvetto N. 2007. Cultivation of culinary-medicinal lion's mane mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (*Aphyllorphoromycetidae*) on substrate containing sunflower seed hulls. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9 (1):67-73.
- Figlas D, Oddera M., Curvetto N. 2010. Bioaccumulation and Bioavailability of Copper and Zinc on Mineral – Enriched Mycelium of *Grifola frondosa*. *Journal of Medicinal Food*, 13(2):469-475.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Fonseca G., Gandra E., Scowitz L., Corrêa A., Costa J.. 2008. Protein enrichment and digestibility of soft rush (*Juncus effusus*) and rice residues using edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3):449-456.
- Fragiorge E., de Rezende A., Graf U., Spanó M. 2007. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 46:393-401.
- Frayse N., Lindner B., Kaczynski Z., Sharypova L., Holst O., Niehaus K., Poinsot V. 2005. *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular-mass capsular polysaccharide that is a homopolymer of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid harboring a phospholipid anchor. *Glycobiology*, 15 (1):101-108.
- Frei H., Würgler F. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203:297-308.
- Frei H., Würgler F. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, 1995; 334:247-258.
- Froehlich A., Noh B., Vierstra R., Loros J, Dunlap J. 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 4:2140-2152.
- Furutani Y., Bezerra A., Waschuk S., Sumii M., Brown L., Kandori H. 2004. FTIR spectroscopy of the K photointermediate of *Neurospora* rhodopsin: structural changes of the retinal, protein, and water molecules after photoisomerization. *Biochemistry*, 43:9636-9646.
- Galhaup, C., Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:225-32.
- Gallo L., Marchelli P., Britembücher A. 1997. Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus* spp.) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics*, 4(1):15-23.
- Gallois A., Gross B., Langlois D., Spinnerler H., Brunerie P. 1990. Galhaup C., Haltrich D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:225-32.
- Galston A., Satter R. 1974. Phytochrome and photomorphogenesis. In: *Experimental Plant Physiology*, Editor: San Pietro A. Mosby Company St. Louis, USA.
- Gençcelep, H., et al. Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chemistry*, 113(4):1033-1036.
- Gilbertson R., Ryvarden L. 1986. North American Polypores vol. 1. *Abortiporus-Lindtneria*. Oslo, Norway: Fungiflora.
- González- Matute R., Figlas D., Devalis R., Delmastro S., Curvetto N. 2002. Sunflower Seed Hulls as a Main Nutrient Source for Cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micologia Aplicada Internacional*, 14(2):1-6.

- González- Matute R. 2009. Biotransformación de cáscara de girasol para la producción del hongo comestible y medicinal *Agaricus blazei* y obtención de subproductos de valor económico. Tesis de PhD. Agronomía. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- González- Matute R., Figlas D., Curvetto N. 2010. Sunflower seed hull based compost for *Agaricus blazei* Murrill cultivation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64:742-747.
- González- Matute R., Serra A., Figlas D., Curvetto N. 2011. Copper and zinc bioaccumulation and bioavailability of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Medicinal Food*, 14(10): 1273-1279.
- Gramss G., Günther Th., Fritsche W. 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying *fungi*. *Mycological Research*, 102(1):67-72.
- Graf U., Singer D. 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 8: 15–27.
- Gregori A., Svagelj M., Berovic M., Liu Y., Zhang J., Pohleven F. Klinar D. 2009. Cultivation and bioactivity assessment of *Grifola frondosa* fruiting bodies on olive oil press cakes substrates. *New Biotechnology*, 26(5)260-262.
- Grimaldi D., Engel M. 2005. *The Evolution of the insects*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Grüter A., Friederich U., Würzler F. 1990. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutation Research*, 231:243-249.
- Gu L., Wu T., Wang Z. 2009. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *Acuta*. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 131–136.
- Guha A.K., Banerjee A.B. 1974. Effect of indole-3 acetic acid and kinetin on submerged growth of *Agaricus bisporus*. *Acta Microbiol. Po.*, 1(6):133–4.
- Guillén Y., Machuca A. 2008. The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1):31-37.
- Gutierrez Z., Mantovani M., Eira A., Ribeiro L., Jordão B. 2004. Variation of the mutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murril *in vitro*. *Toxicology in vitro*, 18:301-09.
- Guo G.L., Chen W.H., Chen W.H., Men L.C., Hwang W.S. 2008. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 99(14): 6046-6053.
- Guo L.Q., Lin S.H., Zheng X.B., Huang Z.R., Lin J.F. 2011. Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3):731-735.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141:312–322.
- Hällström I., Blanck A., Atuma S. 1984. Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology*, 33(1):13-20.
- Halpern G. 2007. *Healing mushrooms*. Square One Publishers, NY, USA.
- Hammerschmidt R., Nicholson R. 1977. Resistance of Maize to Anthracnose: Changes in Host Phenols and Pigments. *Phytopathology*, 67: 251-258.
- Hapiot P., Pinson J., Neta P., Rolando C. 1993. Electrochemical behaviour of syringaldazine, a colorimetric redox reagent. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 353(1-2):225-235.
- Harada E. 2007. Studies on the flavor and nutritional components of *Grifola gargal*, the Chilean edible mushroom. Thesis dissertation. University of Miyazaki. <http://hdl.handle.net/10458/1139>
- Haslam E., Cai Y. 1994. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.*, 11:41-66.
- Helbert J., Brown K. 1957. Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo- and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids. *Analytical Chemistry*, 29(10):1464-66.
- Heleno S., Barros L., Sousa MJ., Martins A., Ferreira I. 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry* 119: 1443–1450.
- Helgeson D., Cobia D., Coon R., Hardie W., Schaffner L., Scott D. 1978. The Economic Feasibility of Establishing Oil Sunflower Processing Plants in North Dakota. *North Dakota St. Univ. Economic Develop. Bulletin* 508.
- Heusser C. 1984. Late-Glacial-Holocene climate of Lake District of Chile. *Quat. Res.*, 22:77–90.
- Hiroshi S., Takeda M. 1993. Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. In: Chang ST, Buswell JA, Chiu SW, et al, editors. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Hong Kong: Chinese University Press. 237-245.
- Hobbs C. 1995. *Grifola frondosa* monograph. Santa Cruz, CA: Botanica Press 110-11.
- Hobbs C. 1996. *Medicinal Mushrooms: An exploration of tradition, healing & culture*. Botanica Press, Santa Cruz, CA, USA.
- Hsieh C., Liu C.J, Tseng M.H., Lo C. T., Yang Y.C. 2006. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3):434-439.

- Hsieh C., Wang H.L., Chen C.C., Hsu T.H., Tseng M.H. 2008. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa* Biochemical Engineering Journal, 38(2):198-205.
- Huang N. 1997. Japanese *Grifola frondosa*. In Huang N.L. (Ed.): Cultivation of eighteen precious and delicious edible fungi. Beijing, China. The Agricultural Press págs. 145-153.
- Huang S.L., Tsai S.Y., Lin S.Y., Liang C.H., Lian P.Y., Mau J.L. 2011. Preparation of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (*Aphyllphoromycetideae*)-fermented Wheat and its Antioxidant Properties. International Journal of Medicinal Mushrooms, 13(1): 61-71.
- Idnurm A., Heitman J. 2005. Photosensing *Fungi*: Phytochrome in the Spotlight. Current Biology, 15(20): 829-832.
- Ingold C., Peach J. 1970. Further observations on fruiting in *Sphaerobolus* in relation to light. Trans. Br. Mycol. Soc., 54:211–220.
- Inoue A., Kodama N., Nanba H. 2002. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide D-fraction on the control of T-lymph node Th-1/Th-2 proportion. Biol. Pharm. Bull., 25:536-40.
- Ikekawa, T., Ueharra N., Maeda Y., Nakanishi M., Fukuoka, F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. Cancer Res., 29:734-735.
- Isikhuemhen O., Vaughans- Ward K. 2005. Spore Germination and Breeding Pattern in *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray. Int. J. Med. Mush.,7(4):414-415.
- Jamieson D. 1998. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14:1511–1527.
- Jin Z.C., Qian J. Inhibitory effects of fifteen kinds of Chinese herbal drugs, vegetables and chemicals on SOS response. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi., 28(3):147-50.
- Jiskani M., Bhatti M., Wagan K., Pathan M., Bhatti G. 2007. Determination of sorghum grains for spawn growth of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr) Kummer. J. Bot., 39(7):2681-2684.
- Jonathan S., Fasidi I. 2001a. Effect of carbon, nitrogen and mineral resources on growth of *Psathyrella atroumbonata*, a Nigerian edible mushroom. Food Chemistry, 72:479-83.
- Jonathan S., Fasidi I. 2001b. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements on *Lentinus subdunus* and *Schizophyllum commune* from Nigeria. Food Chemistry, 75:303-07.
- Jonathan S., Fasidi I. 2003. Studies on *Psathyrella atroumbonata* a Nigerian edible fungus. Food Chemistry 81:481-84.
- Jonathan S., Fasidi I., Ajayi E. 2004. Physico-Chemical studies on *Volvariella esculenta* a Nigerian Edible fungus. Food Chemistry 85:339-42.
- Jong S., Birmingham J. 1990. The medicinal value of the mushroom *Grifola frondosa*, Maitake. World J. Microbiol. Biotechnol., 6:227-35.
- Jong S., Birmingham J. 1993. Mushrooms as a source of natural flavor and aroma products. En: Mushroom biology and mushroom products. Chang S, Buswell, Chiu S. Eds. The Chinese University Press, Hong Kong, China. Cap. 37.
- Jordan S., Mullen G., Murphy M. 2008. Composition variability of spent mushroom compost in Ireland. Bioresource Technology, 99:411-418.
- Kaal E., Field J., Joyce T. 1995. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. Bioresource Technology, 53:133-139.
- Kada T., Shimoi K. 1987. Desmutagens and bio-antimutagens-their modes of action. Bioessays, 7(3):113-6.
- Kadiri M., Arzai A. 2004. Cultivation of *Lentinus subnudus* Berk (Polyporales: *Polyporaceae*) on woodlogs. Bioresour. Technol., 94(1):65-7.
- Kamada T., Kurita R., Takemaru T. 1978. Effects of light on basidiocarp maturation in *Coprinus macrorrhizus*. Plant Cell Physiol., 19:263–275.
- Kampert M., Strzelczyk E. 1990. Effect of amino acids on cytokinin-like substances production by mycorrhizal fungi of pine *Pinus sylvestris* L. Agriculture, Ecosystems & Environment, 28:219-228.
- Katayose Y., Kajiwara S., Shishido K., 1990. The basidiomycete *Lentinula edodes* linear mitochondrial DNA plasmid contains a segment exhibiting a high autonomously replicating activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res.,18:1395–1400.
- Kato N., Brooks W., Calvo A. 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. Eukaryot. Cell, 2:1178-1186.
- Kausrud H., Colman J., Ryvarde L. 2008. Relationship between basidiospore size, shape and life history characteristics: a comparison of polypores. Fungal Ecology, 1:19–23.
- Kavanag K. 2007. *Fungi*: biology and applications. John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Kaya B., Marcos R., Yanikoglu A., Creus A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. Mutation Research, 557:53-62.
- Kim H., Han K., Kim K., Han D., Jahng K., Chae K. 2002. The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal. Genet. Biol., 37:72-80.

- Kitamoto Y., Takahashi M., Kasai Z. 1972. Light-induced formation of fruitbodies in a basidiomycete, *Favolus arcularius* (Fr.) Ames. *Plant Physiol.*, 49:338-340.
- Kirk T., Cullen D. 1998. *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi*. Young, R., Akthar, M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Jhon Wiley and Sons, Inc. New York, USA.
- Kirk, 2010. Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org/>.
- Klein B., Perry K. 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47: 941-48.
- Ko W., Wang S., Hsieh T., Ann P. 2003. Effects of Sunflower Oil on Tomato Powdery Mildew Caused by *Oidium neolycopersici*. *Journal of Phytopathology*, 151(3):144-148.
- Kodama N., Komuta K., Nanba H. 2002. Can Maitake MD-fraction aid cancer patients?. *Altern. Med. Rev.*, 7(3):236-9.
- Kodama N., Komuta K., Nanba H. 2003. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *Journal of Medicinal Food*, 6(4):371-377.
- Kodama N., Murata Y., Asakwa A., Inui A., Hashayi M., Sakai N., Nanba H. 2005. Maitake D-fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by Mitomycin-C in tumor bearing mice. *Nutrition*, 21, 624-29.
- Kok C., Hof C., Lenssen J., Velde G. 1992. The influence of pH on concentrations of protein and phenolics and resource quality of decomposing floating leaf material of *Nymphaea alba* L. (*Nymphaeaceae*) for the detritivore *Asellus aquaticus* (L.). *Oecologia*, 91(2):229-234.
- Konishi M., Hagimoto H., 1961. Studies on the growth of fruit body of *fungi* iii. Occurrence, formation and destruction of indole acetic acid in the fruit body of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Plant and Cell Physiology*, 2(4):425-434.
- Koyyalamudi S., Jeong S., Song C., Cho K., Pang G. 2009. Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (8): 3351-5.
- Kubo K., Nanba H. 1998. Modification of cellular immune responses in experimental autoimmune hepatitis in mice by maitake (*Grifola frondosa*). *Mycoscience*, 39:351-360.
- Kües U. 2000. Life history and Developmental processes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2(4):316-353.
- Kuforiji O., Fasidi I. 2009. Biodegradation of agro-industrial wastes by a edible mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.). *Journal of Environmental Biology*, 30(3):355-358.
- Kraigher H., Grayling A., Wang T., Hanke D. 1991. Cytokinin production by two ectomycorrhizal *fungi* in liquid culture. *Phytochemistry*, 30(7):2249-2254.
- Lakshmi B., Ajith T., Nayana J., Janardhanan K. 2006. Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene. *Journal of Ethnopharmacology*, 107:297-303.
- Leatham G., Stahmann M. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.*, 125:147-157.
- Leatham G., Kirk T. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 16(1)65-67.
- Lebrun J., Demont- Caulet N., Cheviron N., Laval K., Trinsoutrot- Gattin I., Mougin C. 2011. Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 82:340-345.
- Lechner B., Papinutti V. 2006. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochem.*, 41:594-598.
- Lee B., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J., Yun J.W. 2003. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:574-81.
- Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J., Yun J.W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microbial Technol.*, 35:369-376.
- Lee G., Byun H., Yoon K., Lee J., Choi K., Jeung E. 2009. Dietary calcium and vitamin D2 supplementation with enhanced *Lentinula edodes* improves osteoporosis-like symptoms and induces duodenal and renal active calcium transport gene expression in mice. *European Journal of Nutrition* 48(2)75-83.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas- Wasilewska M., Cho N.S., Hofrichter M., Rogalski J. 1999. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27:175-185.
- Levin L., Papinutti L., Forchiassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot *fungi* for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, 94(2):169-176.
- Levin L., Malignani E., Ramos A. 2010 Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, 101: 4554-4563.

- Li X., Pang Y., Zhang R. 2001. Compositional changes of cottonseed hull substrate during *Pleurotus ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresource Technology*, 80:157-161.
- Lin E., Chen Y. 2007. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology*, 98:2511–2517.
- Lin H. 1999. Evaluation of taste quality and antioxidant properties of edible and medicinal mushrooms. Masters Thesis, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Liu W., Wang H., Pang X., Yao W., Gao X. 2010b. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 46:451–457.
- Liu X., Dong M., Chen X., Jiang M. Lv X., Yan G. 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 105:548–554.
- Liu X., Zhou B., Lin R., Jia L., Deng P., Fan K. Wang G., Wang L., Zhang J. 2010. Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47:116–119.
- Liu Y, He Q, Cheng P. 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two white collar proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 60:2131-2138.
- Locci E., Laconi S., Pompei R., Scano P., Lai A., Cesare Marincola F. 2008. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technology*, 99:4279–4284.
- Lohman P., Gentile J., Gentile G., Ferguson L. 2001. Antimutagenesis/anticarcinogenesis screening, methods and biomarkers. *Mutat. Res.*, 496:1-4.
- Lowry R. VassarStats [website for statistical computation]. Faculty of Vassar, 2001-2011. Available from: <http://faculty.vassar.edu/lowry/tab2x2.html>
- Luiz R. Jordão B., da Eira A., Ribeiro L. Mantovani M. 2003. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutation Research*, 528:75–79.
- Madelin, M. F. 1956. The influence of light and temperature on fruiting of *Coprinus lagopus* Fr. in pure culture. *Ann. Bot.*, 20:467–480.
- Mamiro D., Royse D. 2008. The influence of spawn type and strain on yield, size and mushroom solids content of *Agaricus bisporus* produced on non-composted and spent mushroom compost. *Bioresource Technology*, 99 (8):3205-3212.
- Mandel S., Packer L., Youdima M., Weinreb O. 2005. Proceedings from the Third International Conference on Mechanism of Action of Nutraceuticals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:513-520.
- Mao X.B, Zhong J.J. 2006. Significant effect of NH₄(I) on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 343–350.
- Martínez A., Ruiz-Dueñas F., Martínez M., del Río J., Gutiérrez A. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:348–357.
- Martins de Oliveira J., Jordão B., Ribeiro L., Ferreira da Eira A., Mantovani M. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 40:1775-1780.
- Mattila, P., Konko, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., et al. 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49(5), 2343–2348.
- Mau J.L., Chao G.R., Wu K.T. 2001. Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49:5461-67.
- Mau J., Lin H., Song S. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35:519-26.
- Mau J., Chang C., Huang S., Chen C. 2004a. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchela esculenta* and *Termitomyces albuminisus* mycelia. *Food Chemistry*, 87(1): 111-18.
- Mau J., Huang P., Huang S., Chen Ch. 2004b. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry* 86:25–31.
- Mayer A. 2006. Polyphenol oxidases in plants and *fungi*: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67 (21): 2318–2331.
- Mayuzumi Y., Mizuno T. 1997. Cultivation methods of maitake (*Grifola frondosa*). *Food Reviews International*, 13(3):357-364.
- Medina E., Paredes C., Pérez- Murcia M., Bustamante M., Moral R. 2009. Spent mushroom substrates as component of growing media for germination and growth of horticultural plants. *Bioresource Technology*, 100:4227–4232.
- Menoli R., Mantovani M., Ribeiro L., Speit G., Jordão B. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Research*, 496:5-13.
- Miller O., Palmer J. 1973. Effect Of Light Quality On Development Of Fruiting Bodies Of *Panus fragilis*. USDA Forest Service Research Paper Fpl 300. Forest products laboratory, Forest service U.S. Department of agriculture.

- Miyauchi S., Kon K., Yamauchi T., Shimomura M. 1998. Cultural characteristics of mycelial growth of *Pleurotus eryngii*. *Nippon-Kingakukai-Kaiho*, 39: 83-87.
- Mizuno T., Zuang C. 1995. Maitake, *Grifola frondosa*: pharmacological effects. *Food Reviews International*, 11(1):135-49.
- Mizuno T. 1999. The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1:9-29.
- Montoya-Barreto S., Varón-López M., Levin L. 2008. Effect of culture parameters on the production of the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:1361–1366.
- Mooney J., Yager L. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.*, 4:1473-1482.
- Moore D. 1998. Mushrooms upright, sideways and inside-out. *Mycological Research*, 102(6):641-657.
- Moore D. 2005. Principles of Mushroom Developmental Biology. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7:79–10.
- Moore-Landecker E. 1996. *Fundamentals of the Fungi* 4^o Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Morimoto, N., Oda Y. 1973. Effects of light on fruitbody formation in a basidiomycete, *Coprinus macrorrhizus*. *Plant Cell Physiol.*, 14:217–225.
- Mtui G. 2009. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*, 8(8):1398-1415.
- Mukhopadhyay R., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A. 2005. Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. *Process Biochemistry*, 40: 1241–1244.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15(3): 473-497.
- Muzzarelli R., Peter M. 1997. *Chitin Handbook*. European Chitin Society. ISBN 88-86889-01-1.
- MycoBank, 2010. Fungal databases nomenclature and species banks online taxonomic novelties submission. Administered by the International Mycological Association. <http://www.mycobank.com/>.
- Nakasone K. 1990. Cultural studies and identification of wood-inhabiting *Corticaceae* and selected *Hymenomycetes* from North America. Berlin, J. Cramer.
- Nasreen Z., Bajwa R., Kausar T., Baig S., Habib N., Bhatti M. 2008. Productivity of *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation on lignocellulosic substrates. *Mycopath.*, 6(1-2):51-56.
- National Sunflower Association, 2011. [<http://www.sunflowerusa.com>] Mandan, USA.
- Niki E., Shimaski H., Mino M. 1994. Antioxidantism-free radical and biological defence. Tokyo: Gakkai Syuppan Center.
- Nobles M. 1948. Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res.*, 26:281–431.
- Nogala W., Rozniecka E., Rogalski J., Opalło M. 2007. PH-Sensitive syringaldazine modified carbon ceramic electrode for bioelectrocatalytic dioxygen reduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 608(1): 31-36.
- Novotný Č., Svobodová K., Erbanová P., Cajthaml T., Kasinatha A., Lang E., Šašek V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*, 36:1545–1551.
- O'Dell, R. 1997 *Handbook of nutritionally essential minerals*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Oei P. 1996. *Mushroom Cultivation: With Special Emphasis on Appropriate Techniques for Developing Countries*. Tool Publications, Leiden, the Netherlands.
- Owusu-Apenten R. 2002. *Food protein analysis: quantitative effects on processing*. Marcel Dekker Inc. New York. USA.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307–315.
- Palermo A.M., Rey M., Muñoz R. 1994. Protective effect of ethanol on X-ray induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 24:137-142.
- Palermo A.M., Reynoso A., López Nigro M., Carballo M., Mudry M. 2004. Teratogenic evaluation of metronidazole and ornidazole using *Drosophila melanogaster* as an experimental model. *Birth Defects Research (Part A)*, 70: 157 – 162.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22:189–259.
- Paredes-Leal NP. 2006. Tesis de Grado: Determinación cualitativa de enzimas relacionadas con la degradación de compuestos carbonados y nitrogenados en cepas de *Aphylophorales*. Profesor patrocinante Valenzuela E. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Park J.P., Kim Y.M., Kim S.W., Hwang H.J., Cho Y.J., Lee Y.S., Song C.H., Yun J.W. 2002. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochem*, 37:1257–1262.

- Peksen A., Yakupoglu G., Yakupoglu T., Gulser C., Ozturk E., Ozdemir N. 2011. Changes in chemical compositions of substrates before and after *Ganoderma lucidum* cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6):3637-642.
- Pérez- Guerra A., Torrado- Agrasar, López- Macias C., Pastrana L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *EJEAFChe*, 2(3):343-350.
- Perkins J. 1969. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. I. Effects of White Light. *Plant Physiology* 44:1706-1711.
- Perkins J. Gordon S. 1969. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. II. Effects of monochromatic Light. *Plant Physiology* 44:1712-1716.
- Picman A., Schneider E., Gershenzon J. 1990. Antifungal activities of sunflower terpenoids *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(5):325-328.
- Philpott M., Fergusson L. 2004. Immunonutrition and cancer. *Mutation Research*, 551:29-42.
- Pohleven F. 1990. The influence of cytokinin 2iPA on growth, ion transport and membrane fluidity in mycelia of the mycorrhizal fungus *Suillus variegates*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 28:399-402.
- Postemsky P., González- Matute R., Figlas D., Curvetto N. 2006. Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargar* growth in agar and liquid nutrient media. *Micología Aplicada Internacional*, 18:7-12.
- Pozzi C., Lorenzo L., Rajchenberg M. 2009. Un hospedaje exótico del hongo comestible *Grifola gargar* (Basidiomycota, *Fungi*). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 44(1-2):9 - 10.
- Prasad M. 2008. Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
- Purschwitz J., Müller S., Kastner C., Fischer R. 2006. Seeing the rainbow: light sensing in *Fungi*. *Current Opinion in Microbiology* 9:566–571.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int.*, 50:586 – 621.
- Rabinovich M., Figlas D., Delmastro S. Curvetto N. 2007. Copper and zinc enriched mycelium of *Agaricus blazei* Murrill. Bioaccumulation and bioavailability. *J. Med. Food*, 10: 175-183.
- Rajchenberg M., Greslebin A. 1995. Cultural characters, compatibility tests and taxonomic remarks of selected polypores of the Patagonian Andes forests of Argentina. *Mycotaxon*, 56: 325-346.
- Rajchenberg M. 2002. The genus *Grifola* (*Aphylllophorales*, *Basidiomycota*) in Argentina revisited. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 37: 19-27.
- Rajchenberg M. 2006. Los Políporos (Basidiomycetes) de los Bosques Andino Patagónicos de Argentina. *Polypores (Basidiomycetes) from the Patagonian Andes Forests of Argentina*. Bibliotheca Mycologica Band 201, J. Cramer Verlag, Stuttgart. ISBN 978-3-443-59103-8. ISSN 0067-8066.
- Rau U., Kuenz A., Wray V., Nimtz M., Wrenger J., Cicek H. 2009. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5): 827-837.
- Raudaskoski M., Yli-Mattila T. 1985. Capacity for photoinduced fruiting in a dikaryon of *Schizophyllum commune*. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(1):145-151.
- Recommended Dietary Allowances 10th Ed. Food and Nutrition Board Commission on Life Sciences National Research Council NATIONAL ACADEMY PRESS. Washington, D.C. 1989 USA.
- Regina, M. 2001. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto. Tesis de Maestría, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Ribas L., de Mendonça L., Camellini C., Soares C. 2009. Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. *Bioresource Technology*, 100:4750–4757.
- Ribeiro B., Lopes R., Andrade P., Seabra R., Gonçalves R., Baptista P., Quelhas I., Valentão P. 2008. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*, 110:47–56.
- Rico M., Piattoni C., Gonzalez C., Monela R., Latorre M., Lurá M. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista FABICIB*, 8:163-172.
- Rigas F., Papadopoulou K., Dritsa V., Doulia D. 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *J. Hazard Mater.*, 140(1-2):325-32.
- Rinker D., 2002. Handling and using “spent” mushroom substrate around the world. In: *Mushroom biology and mushroom products* (Sánchez J.E., Huerta G., Montiel E., eds). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México.
- Rodríguez- Arnaiz R., Téllez G. 2002. Structure-activity relationships of several anisidine and dibenzanthracene isomers in the w/w+ somatic assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 514:193–200.

- Rodríguez- Couto S., Rivela I., Muñoz M., Sanromán A. 2000. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 74:159-164.
- Rohlf M, Churchill A. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genet. Biol.*, 48(1):23-34.
- Royse D., Guardino J. 1997. Specialty mushrooms: Enokitake and Maitake. 45: 28-31
- Rockwell N., Su Y. Lagarias J. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:837-858.
- Sadler M., Saltmarsh M. 1998. Functional Foods, the Consumer, the Products, and the Evidence. M.J. Sadler, M. Saltmarsh (Eds.); The Royal Society of Chemistry, ISBN 0-85404-792-1.
- Sánchez C., Moore D. 1999. Conventional histological stains selectively stain fruit body initials for both light and scanning electron microscopy. *Mycological Research*, 103:315-318.
- Sánchez J., Royse D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Editorial Ecosur, Uteha (Eds.), México, D.F. ISBN 9-681-86357-7.
- Sano H., Kaneko S., Sakamoto Y., Sato T., Shishido K. 2009. The basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes* white collar-2 homolog PHRB, a partner of putative blue-light photoreceptor PHRA, binds to a specific site in the promoter region of the *Lentinula edodes* tyrosinase gene. *Fungal Genetics and Biology*, 46:333-341.
- Sasiain J. 2003. Reseña de “cien años del colorante de Giemsa”. *Biomédica*, 23(1):5-18.
- Schmidt O. 2006. Habitat of Wood *Fungi* En: Wood and Tree *Fungi*, Biology, damage, protection and Use. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006, pp 183-186.
- Schwerdtfeger C., Linden H. 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photo-adaptation. *EMBO J.*, 22:4846-4855.
- Schmeda-Hirschmann G., Razmilic I., Gutierrez M., Loyola J. 1999. Proximate composition and biological activity of food plants gathered by chilean amerindians. *Economic Botany*, 53:177-187.
- Seo G., Otani H., Kohoto K. 1995. Effect of light on the formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum*. *Mycoscience*, 36:227-233.
- Sharma R., Arora S. 2010. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of *in vitro* digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresource Technology*, 101:9248-9253.
- Sharma O., Bhat T. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113:1202-1205.
- Shen Q. 2001. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (Maitake) and related species and the influence of selected nutrient supplements on mushroom yield. Thesis in Plant Pathology, The Pennsylvania State University, USA.
- Sherwood-Pike M. 1991. Fossils as keys to evolution in *fungi*. *Biosystems*, 25(1-2):121-129.
- Shetlar R. 1952. Use of Anthrone Reaction for Determination of Carbohydrates in the Presence of Serum Protein. *Analytical Chemistry*, 24(11): 1844-46.
- Shih I.L., Chou B.W., Chen C.C., Wu J.Y., Hsieh C. 2008. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology* 99:785-793.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.
- Shon Y., Nam K. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 77:103-109.
- Silva E., Martins S., Milagres A. 2008. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. *Bioresource Technology*, 99:2471-2475.
- Silva Coelho J., Luiza de Oliveira A., Giatti Marques de Souza C., Bracht A., Peralta R. 2010. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2):156-161.
- Singer R. 1969. Mycoflora Australis. Beihefte Nova Hedwigia, 29: 1-405.
- Sinha J., Bae J.T., Park J.P., Kim K.H., Song C.H., Yun J.W. 2001. Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56,88-92.
- Smith J., Rowan N., Sullivan R. 2002. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Cancer Research UK, Special Report. University of Strathclyde.
- Soares A., Marques de Souza C., Francielle Marina Daniel, Pezente Ferrari G., Gomes da Costa S., Peralta R. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112: 775-781.
- Soponsathien S., 1998. Some characteristics of ammonia fungi 1. In relation to their ligninolytic enzyme activities. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44:337-345.

- Splivallo R., Fischer U., Göbel C., Feussner I., Karlovsky P. 2009. Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology*, 150:2018-29.
- Stahmann M., Abramson P., Wu L. 1975. A chromatographic method for estimating growth by glucosamine analysis of diseased tissues. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 168:267-276.
- Stajić M., Persky L., Friesemb D., Hadar Y., Wasser S., Nevo E., Vukojevi J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus species*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 65-73.
- Stalpers J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting *Aphyllophorales* in pure culture. *Studies in Mycology* 16, 1-248.
- Stamets P, Chilton J. 1983. *The Mushroom Cultivator*. Olympia, Washington. Agarikon Press.
- Stamets P. 1993. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley CA 94707.
- Stamets P. 1999. *Mycomedicinals*, an informative booklet on medicinal mushrooms. Mycomedica, Olympia, Washington.
- Stevens F., 2011. Copyright © 2009 Mycological Society of San Francisco. Photographs Copyright © Michael Wood. All Rights Reserved. http://www.mssf.org/cookbook/part_4.html. Copyright © 1987,2000 by Louise Freedman and the Mycological Society of San Francisco
- Stott K., Mohammed C. 2004. *Specialty Mushroom Production Systems: Maitake and Morels*. Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), Australia. Publication No 04/024. Project No. UT-30A.
- Streeter C., Conway K., Horn G., Mader T. 1982. Nutritional evaluation of wheat straw incubated with the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Anim. Sci.*, 54:183-188.
- Sun Y., Cheng J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 96(14):1599-1606.
- Taga S., Miller E., Pratt E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemical Society*, 61:928-993.
- Taira K., Mishayita Y., Okmoto K., Arimoto S., Takahashi E., Neghishi T. 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutation Research*, 586:115-23.
- Taiz L., Zeiger E. 1998 *Plant Physiology 2ed*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Tan K. 1975. Interaction of near-ultraviolet, blue, red and far red Light in sporulation of *Botrytis cinerea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 64:215-222.
- Tang Y.J., Zhu L.W., Li H.M., Li D.S. 2007. Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors- Challenges, Current State of the Art, and Future Prospects. *Food Technol. Biotechnol.*, 45(3):221-229.
- Terashima K., Auki K., Muraguchi H., Akiyama M., Kamada T. 2005. The dst1Gene Involved in Mushroom Photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* Encodes a Putative Photoreceptor for Blue Light. *Genetics* Vol. 171, 101-108.
- Toledo-Castro S., González-Lavaut J., Echemendía O., García-González N. 2008. Evaluación fitoquímica y farmacológica de frutos de *Erythroxyllum minutifolium* Griseb. (Erythroxyllaceae). *Rev Cubana Plant Med*, 13:2.
- Tomita K., Murayama T., Nakamura T. 1984. Effects of auxin and gibberellins on elongation of young hyphae in *Neurospora crassa*. *Plant Cell Physiol.*, 25: 355-8.
- Topçu G., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103:816-822.
- Torrea M., Marinissen J., Pevsner D., Curvetto N., Amela M. 1998. Biotransformación de cáscara de girasol por basidiomicetes del género *Pleurotus*. *Jornada de Actualización sobre el uso de Oleaginosos y Subproductos en la Alimentación Animal y su Interacción con los Sectores Industriales*. 1 Oct. 1998, Fac. Cs. Agrarias, Lomas de Zamora, Buenos Aires. Publicado en *Agroindustria*, Año 16, 1998.
- Tsang L., Reid I., Coxworth E. 1987. Delignification of Wheat Straw by *Pleurotus* spp. under Mushroom-Growing Conditions. *Applied And Environmental Microbiology*, 53(6):1304-1306.
- Tseng YH., Yang JH., Mau JL. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 107: 732-738.
- Tsusué Y. 1969. Experimental control of fruit-body formation in *Coprinus macrorrhizus*. *Development, Growth and Differentiation*, 11(2):164-178.
- Turkoglu A., Duru E., Mercan I., Gezer K. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101:267-273.
- Tychanowicz G., de Souza D., Souza C., Kadowaki M., Peralta R. 2006. Copper Improves the Production of Laccase by the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 49(5):699-704.
- Ürek R., Pazarlıoğlu N. 2005. Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 40:83-87.
- USDA, 2009. National Nutrient Database for Standard Reference. United States Department of Agriculture. www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/

- Valásková V., Baldrian P. 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*- production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology*, 152(12):3613-22.
- Valadares B., Graf U., Spanó M. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1103–1110.
- Valdebenito G., Campos R., Larrain O., Aguilera M., Kahler C., Ferrando M., García E., Sotomayor A. 2003. Hongos comestibles no tradicionales: Changle, Loyo, *Gargal*, Digueñe, Chicharrón, Pique, Proyecto Fondef, Infor y Fundación Chile. *Boletín Divulgativo* n°13.
- Valenzuela A., Maiz A. 2006. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. Role of dietary fiber in enteral nutrition. *Rev. Chil. Nutr.*, 33(2): 342-351.
- Van Soest P., Robertson J., Lewis B. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy. Sci.*, 74:3583-3597.
- Vázquez- Gómez G., Sánchez- Santos A., Vázquez- Medrano J., Quintanar- Zuniga R., Monsalvo- Reyes A., Piedra- Ibarra E., Duenas- García I., Castaneda- Partida L., Graf U., Heres- Pulido M. 2010. Sulforaphane modulates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Food Chem. Toxicol.*, 48:3333-3339.
- Vetter J. 2007. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102: 6–9.
- Vierstra R., Karniol B. 2005. Phytochromes in microorganisms, p.171–195. In: W. Briggs and J. Spudich (ed.), *Handbook of photosensory receptors*. Wiley-VCH, Berlin, Germany.
- Vogel E., Nivard M. 1993. Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, 8(1):57-81.
- Vogel E., Nivard M. 2000. Parallel monitoring of mitotic recombination, clastogenicity and teratogenic effects in eye tissue of *Drosophila*. *Mutation Research*, 455:141-53.
- Vogel E., Nivard M., Zijlstra J. 1991. Variation of spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: a pilot study on the effects of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. *Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 250:291-298.
- Wallace Hayes. 2008. Principles and methods of toxicology. 5°ED. Cap. 2: Ed.Wallace Hayes. Informa Healthcare USA, INC.
- Wan C., Li Y. 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, 47:31–36.
- Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidit F. 1996. Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. *Food Research International*, 28(6): 525-530.
- Wardle K., Schisler L. 1969. The Effects of Various Lipids on Growth of Mycelium of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 61(2):305-314.
- Wasser S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3):258-274.
- Wasser S. 2010. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89:1323–1332.
- Wasser P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S., Timor-Tismenetsky M. 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2:1-19.
- Wasser S., Weis A. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of medicinal mushrooms*, 1:31-62.
- White P., Broadley M. 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science*, 10(12):586-593.
- Wong J., Chye F. 2009. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22:269–277.
- Wood D. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of general Microbiology*, 117:327-338.
- Worral J., Anagnost S., Zabel R. 1997. Comparison of wood decay among diverse lignicolous *fungi*. *Mycologia*, 89(2):199-219.
- Yamanaka T. 1995. Changes in organic matter composition of forest soil treated with a large amount of urea to promote ammonia fungi and the abilities of these fungi to decompose organic matter. *Mycoscience*, 36:17-23.
- Yang JH., Lin HC., Mau JL. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77: 229–235.
- Yang Q., Jong S. 1987. A quick and efficient method of making mushroom spawn. *Mushroom Science*, 12: 317-324.
- Yanagishima N. 1963. Effect of auxin and antiauxin on cell elongation in yeast. *Plant Cell Physiol.*, 4:257–64.

- Yap A., Ng M. 2001. An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 6-19.
- Yli-Mattila T. Action spectrum for fruiting in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Physiologia Plantarum*, 65(3): 287 – 293.
- Ying J., Mao X., Ma Q., Zong Y., Wen H. 1987. *Icones of medicinal fungi from China*. Translated by Y. Xu. Science press, Beijing.
- Zabel R., Morrel J. 1992. *Wood microbiology*. Academic Press. San Diego. USA. P476.
- Zakrzewski F. Chemical carcinogenesis and mutagenesis. 2002. In: Zakrzewski, S.F. (Ed), *Environmental Toxicology*, Oxford University Press, USA, p71-97.
- Zeiger E. 2007. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript?. *Mutation Research*, 626:1-3.
- Zhang M., Cui S., Cheung P., Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Technol.*, 18:4-19.
- Zhang R., Xiujin L., Fadel J. 2002. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology*, 82(3): 277-284
- Zhao J., Koker T., Janse B. 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiol. Lett.*, 145:393–399.
- Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Wang Y., Miao K., Wei Z. 2009. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology*, 100:1327–1335.
- Zheng Y., Zhongli P., Zhang R. 2009a. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, 2(3):51-68.
- Zijlstra J., Vogel E. 1984. Mutagenicity of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene and some other aromatic mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 125:243-261.
- Zjawiony J. 2004. Biologically Active Compounds from *Aphyllophorales* (polypore) *fungi*. *J. Nat. Prod.*, 67:300-310.