

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ambiente y Desarrollo
Ingeniería en Ambiente y Desarrollo



Proyecto Especial de Graduación
**Potencial antimicrobiano de *Ganoderma* spp. encontrados en
Zamorano, Honduras**

Estudiantes

Carlos Antonio López Manzano

Nathaly Elizabeth Ponce Chilán

Asesores

Carolina Avellaneda Barbosa, Ph.D

Eric van den Berghe, Ph.D

Marynes Montiel, Ph.D

Honduras, noviembre 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER

Vicepresidenta y Decana Académica

ERIKA TENORIO MONCADA

Directora Departamento Ambiente y Desarrollo

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo del Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de Zamorano (LFDIMZ). El quipo y materiales utilizados sirvieron en cada una de las etapas para la investigación. Además, el apoyo técnico brindado por sus colaboradores fue indispensable para culminar con éxito este documento que servirá a la comunidad científica.

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	14
Recolección de <i>Ganoderma</i> spp. Silvestre.....	14
Identificación y Caracterización de los Hongos	15
Elaboración de GSM Modificado	15
Obtención y Aislamiento de Micelio de <i>Ganoderma</i> sp.	16
Antagonismo de <i>Ganoderma</i> contra Hongos Fitopatógenos	17
Antagonismo de <i>Ganoderma</i> contra Bacterias Entéricas	18
Resultados y Discusión.....	21
Caracterización e Identificación de las Setas Recolectadas.....	21
Preparación de Medio GSM Modificado en LFDIMZ	33
Pruebas de Antagonismo con Hongos Fitopatógenos	36
Pruebas de Antagonismo con Bacterias Entéricas.....	47
Conclusiones	51
Recomendaciones	52
Referencias.....	53
Anexos.....	58

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Escala para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo con la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación	18
Cuadro 2 Características macroscópicas de setas de <i>Ganoderma</i> spp. encontradas en el campus central de Zamorano	21
Cuadro 3 Caracterización de setas de <i>Ganoderma</i> spp. encontrados en la Reserva Biológica Uyuca .	27
Cuadro 4 Composición química de GSM modificado por López y Ponce	34
Cuadro 5 Interacción diaria entre el <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.	37
Cuadro 6 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Rhizopus</i> sp.....	38
Cuadro 7 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Pestalotia</i> sp.....	39
Cuadro 8 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Curvularia</i> sp.....	40
Cuadro 9 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Lasiodiplodia</i> sp.	42
Cuadro 10 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp.....	43
Cuadro 11 Interacción diaria entre <i>Ganoderma</i> sp. y <i>Aspergillus</i> sp.....	45
Cuadro 12 Evaluación de MICMO entre <i>Ganoderma</i> sp. y hongos fitopatógenos usando la escala de Bell	47

Índice de Figuras

Figura 1 Mapa de ubicación de los hongos <i>Ganoderma</i> spp.	14
Figura 2 Caracteres macroscópicos del hongo GC - 1.....	23
Figura 3 Caracteres macroscópicos del hongo GC - 2.....	25
Figura 4 Caracteres macroscópicos del hongo GC-3.....	26
Figura 5 Caracteres macroscópicos del hongo GU - 1	29
Figura 6 Vista microscópica de las esporas del hongo GU - 1 (unidades en micras)	29
Figura 7 Caracteres macroscópicos del hongo GU - 2	31
Figura 8 Visión microscópica de las esporas del hongo GU - 2 (unidades en micras)	32
Figura 9 Crecimiento anverso (izquierda) y reverso(derecha) de <i>Ganoderma</i> sp. a los diez días de sembrado en medio GSM modificado por López y Ponce, elaborado en LFDIMZ	35
Figura 10 Crecimiento anverso (izquierda) y reverso (derecha) de <i>Ganoderma</i> sp. en PDA, a los siete días de sembrado.....	36
Figura 11 Comparación del crecimiento de <i>Ganoderma</i> sp. en medio GSM modificado y PDA	36
Figura 12 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno <i>Fusarium</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.	37
Figura 13 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno <i>Rhizopus</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.....	38
Figura 14 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno <i>Pestalotia</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.	40
Figura 15 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno <i>Curvularia</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.....	41
Figura 16 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.	42

Figura 17 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatígeno <i>Penicillium</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.....	44
Figura 18 Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatígeno <i>Aspergillus</i> sp. (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp.....	45
Figura 19 Interacción medida en PICR por parte de los hongos fitopatógenos frente a <i>Ganoderma</i> sp.	46
Figura 20 Antibiógramas realizados para la bacteria <i>E. coli</i>	49
Figura 21 Antibiógramas realizados para la bacteria <i>S. typhimurium</i>	50

Índice de Anexos

Anexo A Seta del hongo del género <i>Ganoderma</i> sp. (GC - 1)	58
Anexo B Seta del hongo del género <i>Ganoderma</i> sp. (GC - 2)	59
Anexo C Setas del hongo del género <i>Ganoderma</i> sp. (GC - 3)	60
Anexo D Seta del hongo del género <i>Ganoderma</i> sp. (GU - 2)	61
Anexo E Micelio en PDA de <i>Ganoderma</i> sp. (GU - 2) encontrado en la Reserva Biológica Uyuca, Honduras.....	62
Anexo F Contaminación por <i>Trichoderma</i> sp. en cultivo de <i>Ganoderma</i> sp.	63
Anexo G Placa control del hongo fitopatógeno <i>Fusarium</i> sp.	64
Anexo H Placa control del hongo fitopatógeno <i>Rhizopus</i> sp.	65
Anexo I Placa control del hongo fitopatógeno <i>Pestalotia</i> sp.....	66
Anexo J Placa control del hongo fitopatógeno <i>Curvularia</i> sp.	67
Anexo K Placa control del hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	68
Anexo L Placa control del hongo fitopatógeno <i>Penicillium</i> sp.....	69
Anexo M Placa control del hongo fitopatógeno <i>Aspergillus</i> sp.	70
Anexo N Variación entre repeticiones de las mediciones de radio (cm) de hongos fitopatógenos en los cultivos duales.....	71
Anexo O Bacterias en medio MacConkey: <i>Escherichia coli</i> (arriba) y <i>Salmonella typhimurium</i> (abajo)	72
Anexo P Bacterias en medio Agar Nutriente: <i>Escherichia coli</i> (arriba) y <i>Salmonella typhimurium</i> (abajo)	73
Anexo Q Variación entre repeticiones de las mediciones del halo de inhibición (cm) al enfrentar <i>Salmonella typhimurium</i> contra extracto etanólico al 50% de <i>Ganoderma</i> sp.	74

Resumen

Una alternativa para disminuir la degradación ecosistémica por actividades antropogénicas es aprovechar el potencial no estudiado de la biodiversidad. Hongos del género *Ganoderma* son de interés comercial debido a sus componentes activos que sugieren cualidades inhibitorias frente a patógenos. El objetivo de la presente investigación es demostrar propiedades antimicrobianas de *Ganoderma* spp. hallados en propiedad de la Escuela Agrícola Panamericana. Se describieron morfológicamente cinco setas, presumiblemente pertenecientes a las especies: *Ganoderma sessile*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. meredithae* y *G. resinaceum*. Se obtuvo micelio de *Ganoderma* sp. usando GSM modificado. Las pruebas de antagonismo se realizaron en medio PDA contra los fitopatógenos: *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pestalotia*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium* y *Aspergillus*. *Rhizopus* tuvo el mayor Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) (67.62%), seguido de *Penicillium* (37%). *Fusarium*, *Curvularia* y *Pestalotia* tuvieron un comportamiento similar en cuanto a los PICR, siendo poco inhibidos por *Ganoderma*. *Aspergillus* y *Lasiodiplodia* lograron invadir al antagonista. Para realizar las pruebas inhibitorias con bacterias, se preparó un extracto del carpóforo de *Ganoderma* sp. que fue evaluado contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, ambas se mostraron resistentes, aunque *Salmonella* fue más susceptible. Los resultados fueron comparados con ampicilina 20 µg y amoxicilina/ácido clavulánico 30 µg. Se concluye que es posible el reconocimiento taxonómico a nivel de género a través de la descripción de caracteres macroscópicos, el GSM modificado es capaz de aislar micelio de *Ganoderma* en estado silvestre y que estos presentan propiedades antibióticas contra algunos hongos, pero solo funcionales contra *S. typhimurium* de las bacterias estudiadas.

Palabras clave: Antagonismo, *Ganoderma*, patógenos, propiedades antimicrobianas.

Abstract

An alternative to reduce ecosystem degradation by anthropogenic activities is to take advantage of the unstudied potential of biodiversity. Fungi of the genus *Ganoderma* are of commercial interest due to chemical components that suggest inhibitory qualities against pathogens. We set out to investigate antimicrobial properties of wild *Ganoderma* spp. found on property of the Pan-American Agricultural School. Five mushrooms were described morphologically, presumably belonging to the species: *Ganoderma sessile*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. meredithae* and *G. resinaceum*. Mycelium of *Ganoderma* sp. was obtained using modified GSM. Antagonism tests were performed on PDA medium against the plant pathogens: *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pestalotia*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium* and *Aspergillus*. *Rhizopus* had the highest Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) (67.62%), followed by *Penicillium* (37%). *Fusarium*, *Curvularia* and *Pestalotia* had similar PICR behavior, being little inhibited by *Ganoderma*. *Aspergillus* and *Lasiodiplodia* were able to invade the antagonist. For inhibitory tests with bacteria, an extract of *Ganoderma* sp. carpophore was prepared and evaluated against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, both were resistant, although *Salmonella* was more susceptible. The results were compared with ampicillin 20 µg and amoxicillin/clavulanic acid 30 µg. We conclude that taxonomic recognition at the genus level is possible through the description of macroscopic characters, the modified GSM permitted us to isolate mycelium of *Ganoderma* from the wild state and we confirm antibiotic properties against some fungi, and against *S. typhimurium* among the bacteria studied.

Keywords: Antagonism, antimicrobial properties, *Ganoderma*, pathogens.

Introducción

En los últimos 50 años, los ecosistemas han sufrido las transformaciones más extensas de la historia, consecuencia de la intervención humana. En la Evaluación de Ecosistemas del Milenio, se encontró que el 60% de los ecosistemas evaluados se están degradando o se usan de manera insostenible (Reid et al., 2005). La alteración de las condiciones naturales causa la pérdida de biodiversidad y produce cambios en los servicios ecosistémicos (Reid et al., 2005). Siendo la utilización desmedida de antibióticos de uso humano y agropecuario una actividad antropogénica que causa impactos en los ecosistemas.

En el ámbito agropecuario, muchos antibióticos son suministrados en la dieta de los animales o asperjados a plantas rutinariamente de forma preventiva para el control de bacterias y hongos. En el área de la fitotecnia, los hongos patógenos de mayor relevancia que requieren la aplicación de pesticidas químicos son los del género *Alternaria* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp., entre otros (Juárez-Becerra et al., 2010). En cuanto a la producción animal, el consumo promedio anual de antibióticos por kilogramo de animal producido es de 45, 148 y 172 mg/kg para ganado bovino, pollos y cerdos, respectivamente (Van Boeckel et al., 2015). Esto presupone un consumo de aproximadamente 65 mil toneladas de antimicrobianos por año (Van Boeckel et al., 2015).

La residualidad de antibióticos crea resistencia antibiótica en los microorganismos del suelo y alteran ecosistemas acuáticos. Constancia de ello, el material genético de resistencia en bacterias que fue encontrado en aguas negras tratadas y agua de la llave en Michigan y Ohio, Estados Unidos (Lubick, 2011). Al igual que, cepas bacterianas de *Escherichia coli* resistentes a fármacos detectadas en desechos de aves migratorias (Lubick, 2011). La evidencia presentada demuestra la importancia en un mejor manejo de recursos naturales para la reducción de impactos al ecosistema y su relación a la mejora en el bienestar humano.

Demostrando el aprovechamiento del potencial natural, una alternativa para la minimización de impactos es replicar la interacción antagónica de microorganismos contra patógenos. La cantidad de especies de hongos en el mundo es inmensa, “Se estima que existen en el planeta entre 500,000 y 10,000,000 de especies de hongos, de las cuáles unas 100,000 están descritas. De estos, más de 3,000 se consideran comestibles, y alrededor de 2,000 son hongos medicinales” (Bidegain, 2017, p. 1). En la región mesoamericana se usan principalmente como alimento aunque en algunas ciudades, desde los altos de Chiapas y Guatemala hasta el Pacífico de El Salvador, se evidencia cierta veneración por los macromicetos en sus esculturas (Marineros et al., 2015). En otras aldeas, sin embargo, se tiene cierta desconfianza o aversión hacia los hongos por posibles propiedades tóxicas (Ruan-Soto y Ordaz-Velázquez, 2016). Situación que podría cambiar a favor de los hongos al demostrarse su utilidad para los intereses humanos.

El género de hongos *Ganoderma* cuenta con alrededor de 70 a 90 especies registradas, siendo que el 80% de estas se desarrollan en regiones templadas y el resto son especies neotropicales (Blanco, 2020). En la EAP Zamorano se cuenta con un registro de varios hongos pertenecientes a este género y algunas especies como: *G. sessile*, *G. lucidum* y *G. applanatum*, según la base de datos de la plataforma “iNaturalist”. El cultivo comercial y los estudios más avanzados sobre hongos del género *Ganoderma* spp. se encuentran en Asia. Específicamente en China y Japón, estos hongos son ampliamente utilizados por sus propiedades nutraceuticas y medicinales. En Corea se ha demostrado que *G. lucidum* tiene propiedades antivirales, incluyendo al virus de la inmunodeficiencia humana (Chen, 2004). Al igual que, el extracto de micelio de *G. sichuanense* tiene un efecto antimicrobiano e inmunoestimulador (Orozco-Barocio et al., 2017). Sin embargo, *Ganoderma* spp. en regiones neotropicales ha sido escasamente investigado, por lo que, el potencial para nuevos descubrimientos es muy grande.

Ganoderma lucidum es el hongo más estudiado y difundido para este género. Se ha demostrado que posee una gran variedad de metabolitos secundarios pertenecientes a grupos

funcionales como terpenoides, flavonoides, cumarinas, aldehídos, cetonas y glucósidos en cualquiera de sus estadios de desarrollo que le permite ser efectivo contra algunas bacterias (Niño, 2010). También, aumenta la producción de proteínas citolíticas como perforina y granulicina para la inducción de células “Natural Killers”, las cuales brindan protección contra infecciones virales y bacterianas, además de limitar células cancerosas (Chang et al., 2014). Sin embargo, son muy escasos los estudios antagónicos contra hongos fitopatógenos; es así como se plantea su evaluación contra este tipo de organismos. Además, la composición de los metabolitos secundarios de la seta en estado silvestre es similar a los hongos cultivados en residuos agroindustriales, mostrando esto un gran potencial para el aprovechamiento de residuos orgánicos (Salgado Ordosgoitia et al., 2016).

Bajo la premisa de las cualidades inhibitorias de este género de hongos, el objetivo general del estudio es demostrar antagonismo de *Ganoderma* sp. contra organismos patógenos a nivel de laboratorio. Con lo cual se pretende cumplir la hipótesis de que *Ganoderma* sp. podría ser una alternativa natural de antibióticos químicos, contribuyendo a la minimización del impacto de la residualidad en el ambiente y la resistencia microbiana que causan. Para el cumplimiento del objetivo propuesto, se identificaron los siguientes objetivos específicos: Describir macroscópicamente los hongos *Ganoderma* spp. recolectados en campo; modificar el Ganoderma Selective Medium (GSM) efectivo para el aislamiento de micelio de *Ganoderma* sp.; enfrentar hongos fitopatógenos contra *Ganoderma* sp. en cultivos duales para la inferencia de propiedades antifúngicas y; evaluar diferentes metodologías para la determinación de propiedades antibacterianas de *Ganoderma* sp.

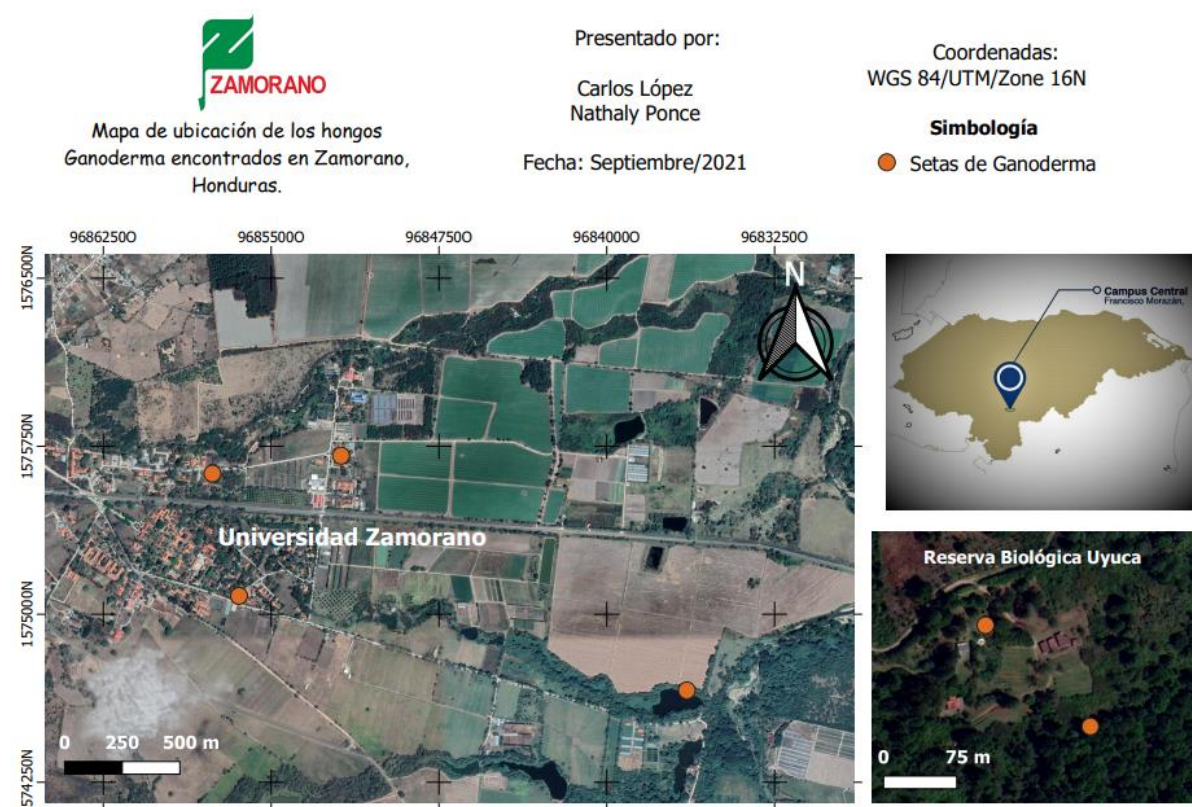
Materiales y Métodos

Recolección de *Ganoderma* spp. Silvestre

La investigación se llevó a cabo en el municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras. Para efectos del estudio, se recolectaron ejemplares de hongos del género *Ganoderma* spp. encontrados en distintas ubicaciones del campus central de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano y de la Reserva Biológica Uyuca (Figura 1). Las muestras se almacenaron en el “freezer” horizontal del Herbario Paul C. Standley de Zamorano a -20 °C para asegurar su preservación.

Figura 1

*Mapa de ubicación de los hongos *Ganoderma* spp.*



Identificación y Caracterización de los Hongos

Se proporcionó un código para cada seta a fin de poder identificar y diferenciar cada una. Cada código contiene la primera letra del género, seguido por la primera letra del lugar donde se recolectó y un número ordinal. De esta manera, GC corresponde a setas de *Ganoderma* spp. encontradas en el campus central de Zamorano. Mientras que GU corresponden a las setas halladas en la Reserva Biológica Uyuca. La numeración ordinal se realizó de manera aleatoria. Dichos códigos se utilizaron con el fin de poder referenciar los resultados obtenidos.

Para la descripción de hábitos de crecimiento y caracteres macroscópicos de las partes del cuerpo fructífero de los hongos *Ganoderma* spp. se usó el manual de Delgado et al. (2005): Glosario ilustrado de caracteres macroscópicos. Dicha descripción abarcó aspectos como forma, margen, color y brillo del píleo. Al igual que, la forma, consistencia y contexto del estípite. También, se agregó la descripción de características organolépticas de los especímenes, tales como olor, color, textura y consistencia.

Se tomaron fotografías con ayuda de una cámara profesional, estereoscopio y microscopio con objetivo 10x para la descripción de otras cualidades que el manual no consideraba. Luego se sugirió la identificación taxonómica a nivel de especie para cada seta, tomando de referencia la información disponible en literatura. En esta investigación se utilizó la abreviatura (cf.) que proviene del latín *conformis* para denotar similitud o parecido a, lo cual ha incrementado su uso en los últimos 20 años (Pedroche y Novelo, 2020).

Elaboración de GSM Modificado

El aislamiento de micelio de *Ganoderma* sp. se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de Zamorano (LFDIMZ). Lugar donde las condiciones ambientales son controladas, con una temperatura de 24 °C y una humedad relativa de 65%. El medio que se utilizó, para evitar la contaminación con hongos de campo como *Trichoderma* sp., fue una

variación del Medio Selectivo *Ganoderma* (GSM) basado en la metodología aplicada por Amanda y Prakoso (2018). Este medio se compone de dos partes: la parte A, en donde se agita y disuelve a una temperatura de 100 °C y la parte B, que requiere la agitación de sus componentes por dos horas y a temperatura ambiente. Luego, se vierte asépticamente el producto de la parte B sobre el producto de la parte A, cuando su temperatura ha disminuido a 45 °C. Sin embargo, a falta de algunos compuestos químicos se ensayó la modificación en los reactivos de la parte B hasta lograr el aislamiento de *Ganoderma* sp.

Para referenciar el desarrollo de *Ganoderma* sp. en medido GSM modificado, también se empleó Papa Dextrosa Agar (PDA) como medio de cultivo. El cual fue seleccionado debido a que *Ganoderma* sp. presenta un buen desarrollo en este (Amanda y Prakoso, 2018) y al ser un medio no selectivo fue ideal para el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados. Otros medios que se utilizaron para la realización de las pruebas fueron: Agar Nutritivo (AN), Agar Mueller Hinton (MH), Agar MacConkey, Luria-Bertani y Trypticase Soya, los cuales se prepararon siguiendo el protocolo sugerido por el LFDIMZ.

Obtención y Aislamiento de Micelio de *Ganoderma* sp.

A partir de las muestras de hongos recolectadas en campo, se sembraron esporas y explantes (tejido vivo) en medio de cultivo. Para obtener esporas, se rompió la estructura de los basidiocarpos ubicadas en el himenio del hongo. Las esporas recolectadas se depositaron en tubos de microcentrífuga, los cuales fueron sellados y guardados en la refrigeradora. La siembra de esporas se realizó en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación de cualquier microorganismo en ambiente. Se depositó una pequeña cantidad de esporas en tres puntos de la placa Petri con GSM y se selló con papel parafinado.

En cuanto a la obtención de explantes, se utilizó un bisturí estéril para la extracción de seis muestras del himenio del hongo. Los explantes se colocaron en un “beaker” y se trasladó a la cámara

de flujo laminar para su desinfección. Con ayuda de una pinza previamente esterilizada, cada explante se sumergió en una solución de 40 mL de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos. Luego, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, por 2 minutos cada uno. Transcurrido ese tiempo, se colocaron los explantes en GSM modificado y se selló. Las placas Petri, inoculadas tanto con esporas y explantes, se almacenaron en la incubadora a 28 °C.

Una vez se comprobó que no se presentara contaminación en GSM por algún otro microorganismo (aproximadamente transcurridos cinco días), se transfirió una porción a PDA para un desarrollo apropiado de micelio. Para ello, se cortó una muestra de 5 x 5 mm de medio con micelio y se depositó en el centro de una placa Petri. Se realizaron réplicas de este procedimiento en GSM modificado y PDA con el objetivo de cuantificar el crecimiento micelial en ambos medios. Se monitoreó y verificó diariamente la ausencia de contaminación de otros microorganismos como *Trichoderma* sp. En caso contrario, se repitió el procedimiento de aislamiento de una porción sin contaminación a un PDA nuevo.

Antagonismo de *Ganoderma* contra Hongos Fitopatógenos

Las pruebas de antagonismo se realizaron por el método de siembra dual (Astorga-Quirós et al., 2014). Para la determinación de propiedades antifúngicas se utilizaron cepas de *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Pestalotia* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. obtenidas e identificadas previamente por el LFDIMZ. Para la siembra dual se colocó un cuadro de 5 x 5 mm de *Ganoderma* sp. y del fitopatógeno en una placa Petri con PDA, en extremos opuestos a un cm del borde. Adicional, se utilizó un control, el cual fue un inóculo de cada fitopatógeno al centro de una placa con PDA. Las placas se incubaron a 28 °C y se definió un tiempo de una semana para la evaluación. Los resultados del monitoreo diario del crecimiento radial de patógenos se usaron para evaluar su interacción con el antagonista. Para la determinación de una posible actividad antagónica

de *Ganoderma* sp., se utilizó la Ecuación 1 para estimar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) aplicada por Suárez et al. (2008):

$$\text{PICR} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100 \quad [1]$$

R1: Radio del patógeno en placa control

R2: Radio del patógeno en enfrentamiento (cultivo dual).

Por lo que, se llevó registro de los radios diarios de la colonia patógena en cultivo dual y en placa control. Otra manera de evaluar la capacidad antagónica de *Ganoderma* fue por medio del análisis de micoparasitismo (MICMO) contra los fitopatógenos. De esta manera, en el día ocho, con ayuda de un estereoscopio, se observó la interacción entre los hongos en cultivos duales a nivel macroscópico tomando de referencia la invasión de una colonia sobre otra. Para referenciar dichas evaluaciones, se utilizó la escala realizada por Bell et al. (1982) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Escala para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo con la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Nota. Tomado de Bell et al. (1982).

Antagonismo de *Ganoderma* contra Bacterias Entéricas

Para la determinación de propiedades antibacterianas, se emplearon cepas liofilizadas de *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028™ y *Escherichia coli* ATCC® 51813™. Para la obtención de las colonias, se extrajo uno de los gránulos liofilizados de la cepa con ayuda de una pinza estéril. Se colocó el gránulo en un tubo de microcentrífuga y se aplicó presión con un hisopo estéril hasta deshacerlo.

El material se resuspendió en caldo tripticasa soya para hidratar y diluir la concentración. Para determinar la efectividad de la inoculación, se sembraron las bacterias por el método de “Frobisher” en Agar MacConkey con ayuda de un asa de inoculación esterilizada. Pasado un día, se tomó con un palillo de dientes estéril una colonia aislada de las bacterias y se depositó en tubos de ensayo con 15 mL de caldo Luria Bertani. Transcurridos 2 días en la incubadora a 37 °C los tubos mostraron turbidez, indicando el crecimiento de las bacterias.

Una de las metodologías empleadas para la determinación de actividad antibiótica fue por medio de cultivos duales. Para lo cual se dispuso agar con crecimiento micelial de *Ganoderma* sp. al centro de una placa con medio apropiado para el crecimiento de hongos y bacterias. En dicha placa se enfrentaron hongos con colonias de bacterias creciendo en dos líneas paralelas en los extremos (Bivi et al., 2009) o se sembraron para crecer formando un círculo que rodee al hongo (Slama et al., 2019).

Otra manera por la cual se evaluó la interacción fue por medio de antibiogramas para lo cual se usó el método de extensión en placa utilizando un asa de “Drigalsky” y se colocaron discos de papel filtro con extracto de *Ganoderma* sp. en el centro de la placa. Para la obtención del extracto, se licuó 3 g del cuerpo fructífero (2 horas luego de recolectado) previamente lavado junto con alcohol etílico al 70% en una proporción de 5 mL por cada 0.5 g de hongo (Pérez-Silva, 1959). Una vez obtenida la solución, con la ayuda de un “vortex” se separó la porción líquida y se dejó reposar por 48 horas. Con esta última, se realizaron dos pruebas: remojando discos de papel filtro y colocándolos en la siembra con bacterias; realizando pozos de 5 mm en el centro de las placas sembradas con bacteria y depositando allí 70 µL del extracto. Ambas realizadas en medio Agar Nutriente (AN) por triplicado.

Por otra parte, se empleó una metodología en la que se requería dejar en reposo extracto de *Ganoderma* con alcohol y luego eliminar el solvente para probarlo en distintas concentraciones (Segovia, 2017). De esta manera, el extracto obtenido con alcohol etílico fue puesto en un horno microondas con el fin de eliminar el solvente y posteriormente se le depositaron 15 mL de etanol al

50%, ya que esta fue la concentración en la que se obtuvieron mejores resultados. En este medio se dejaron discos de papel filtro sumergidos durante 24 horas a una temperatura de 4 °C. Para evaluar la actividad antimicrobiana, se realizó el método de difusión con discos por quintuplicado. Como placa testigo se dispuso de un disco remojado sólo con etanol al 50% para corroborar el efecto del hongo.

Para la comparación del efecto del extracto elaborado con respecto a antibióticos comerciales, se evaluó la acción de sensidiscos de ampicilina a 20 µg de concentración en AN y amoxicilina con ácido clavulánico a 30 µg de concentración en medio Agar MH contra las bacterias. Adicional, se inocularon placas sólo con la bacteria para referenciar el comportamiento como control (Anexo P). Finalmente, cada una de las pruebas antimicrobianas se incubó al menos 24 horas a 37 °C, para luego medir los halos de inhibición en cada placa o en su defecto observar la no presencia de los mismos.

Resultados y Discusión

Caracterización e Identificación de las Setas Recolectadas

Aunque la descripción macroscópica puede ayudar a la identificación de *Ganoderma* spp., dicha caracterización está sujeta a imprecisiones, por lo que, no puede ser determinante de la especie. Este género presenta un carácter pleomórfico y plasticidad fenotípica, es decir, sus características pueden variar dependiendo de la localización geográfica, condiciones climáticas o genética del individuo (Wachtel-Galor et al., 2011). Algunas de las características utilizadas para la identificación como forma del basidiocarpo, el color del contexto, tamaño y forma de las basidiosporas dependen de las condiciones ambientales en las que crece la seta (Suárez-Medellín et al., 2012). En el Cuadro 2 se detalla la caracterización macroscópica de las tres setas del género *Ganoderma* spp. que fueron encontradas en el campus central de Zamorano, pese al grado de intervención humana que presenta la propiedad (Anexos A, B, C).

Cuadro 2

Características macroscópicas de setas de Ganoderma spp. encontradas en el campus central de Zamorano

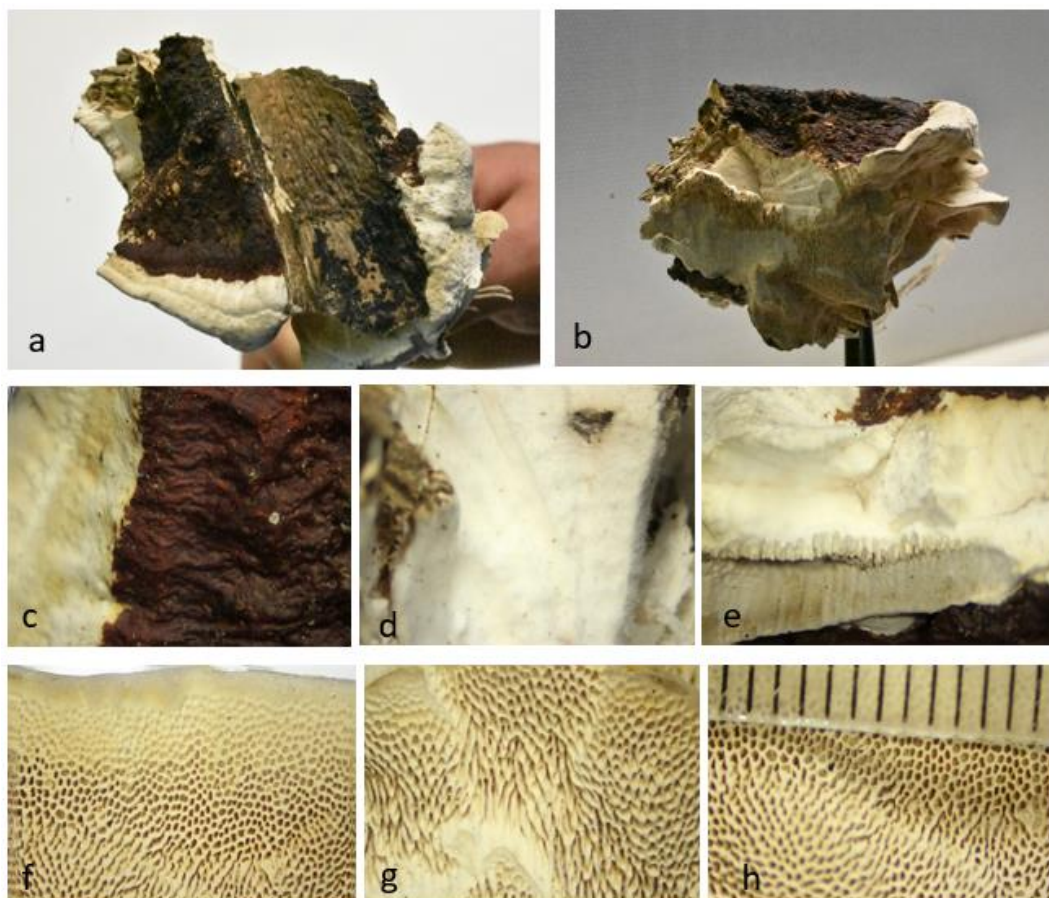
Parámetros	GC - 1	GC - 2	GC - 3
Procedencia de la muestra	(14°00'46.8"N 87°00'12.9"W)	(14°00'44.3"N 87°00'31.4"W)	(14°00'27.0"N 87°00'26.6"W)
Hábitat	Tronco de caducifolio	Tronco muerto	Raíz de conífera
Hábito de crecimiento	Solitario	Gregario	Disperso
Unión del cuerpo fructífero al sustrato	Sésil	Sésil	Estipitado
Sustrato en el hábitat	Lignícola	Lignícola	Lignícola
Forma del píleo (lateral)	Plano-convexo	Convexo	Giboso
Forma del píleo (central)	Deprimido	Obtuso	Globoso
Forma del píleo (apical)	Semicircular	Semicircular	Orbicular
Margen del píleo (longitudinal)	Recurvado	Recto	Recurvado
Borde del píleo	Lobulado	Ondulado	Ondulado
Superficie en el margen	Tuberculado	Tuberculado	Tuberculado
Humedad de superficie	Seco	Seco	Seco
Brillo	Mate opaco	Mate opaco	Lustroso
Superficie del himenio	Poroso/tubular	Poroso	Poroso
Unión con estípite	Adherida	Adherida	Decurrente

Parámetros	GC - 1	GC - 2	GC - 3
Borde laminar	Aserrado	Dentado	Liso
Contexto	Sólido	Sólido	Sólido

Nota. GC: *Ganoderma* en Campus Central de Zamorano.

El hongo GC - 1 presenta un píleo semicircular de margen recurvado y crecimiento sésil, con ausencia de estípites. El color del píleo es rojizo oscuro con los bordes en color blanco cremoso, con brillo mate opaco (Figura 2). Además, presenta consistencia dura y textura rugosa al tacto. El color del himenio es blanco amarillento cremoso y presenta una forma muy irregular, razón por la cual los poros se deforman adquiriendo una apariencia tubular mientras más se alejan del margen. El contexto de la seta, apreciado al realizar un corte longitudinal, presenta un color blanco de consistencia ligeramente blanda y textura algodonosa. La capa de tubos del basidiocarpo es muy fina, con un grosor de 0.1 - 0.25 mm. Se contabilizó un promedio de tres a cuatro poros de forma angular por milímetro. Adicional, la seta presentó un olor intenso a rancidez.

En primera instancia este hongo fue reconocido como *G. sessile* acorde a la similitud visual en la plataforma de “iNaturalist”, pero luego se sugirió *G. polychromum* por David Tripp (mayor identificador de *G. sessile* en esta plataforma). Durante la observación, se notó que este hongo tenía zonas de crecimiento concéntricas, pero no bandas melanoides. También, el píleo estaba radialmente arrugado, presentaba hasta cuatro poros circulares por milímetro y había ausencia de estípites. Además, superficie superior rojiza y textura flexible, no leñosa, todo lo anterior coincidiendo con los caracteres que lo hacen diferente de otras especies según Loyd et al. (2018). Con base en las características anteriores se considera que el hongo GC - 1 podría categorizarse como *Ganoderma* cf. *sessile*.

Figura 2*Caracteres macroscópicos del hongo GC - 1*

Nota. a) vista apical. b) vista frontal. c) superficie del píleo. d) contexto. e) capa tubular. f) poros en el margen. g) poros deformados en zona central. h) referencia de tamaño para los poros.

El cuerpo fructífero del hongo GC - 2 analizado pertenece a un ejemplar juvenil en desarrollo que crecía en un tronco en descomposición. Este presenta forma semicircular, crecimiento sésil, margen recurvado y superficie con ligeras ondulaciones o tuberculado. La consistencia del píleo es dura con una sensación al tacto ligeramente aterciopelada. El color del píleo e himenio es predominantemente blanco amarillento con algunas zonas en castaño claro, de brillo mate (Figura 3). Cabe aclarar, que el color de la seta se tornó más amarillento en comparación al color más blancuzco que presentó al momento de su recolección (Anexo B). Los ejemplares maduros presentaron un píleo en coloración pardo rojizo de superficie plano-convexa y regular, además de himenio en color blanco (Anexo B), aunque por su estado de deterioro no fueron considerados en este estudio.

En el corte longitudinal de GC - 2 se muestra un contexto estratificado con variaciones en color castaño que se vuelve más claro conforme se acerca a la superficie. Así mismo, este presenta un grosor máximo de 3.5 cm. Se observó con claridad una capa tubular de 0.3 - 0.6 cm. de grosor correspondiente al basidiocarpio. El himenio de la seta GC - 2 es poroso y de consistencia sólida. Se contabilizó un promedio de 4 - 5 poros por milímetro. Adicional, presenta un olor ligero a rancidez.

Al contrastar la descripción mencionada, se coincide al mencionar que el píleo es de superficie superior dura y marrón, de margen suave redondeado y concoloreado con el resto del píleo; además de contabilizar 4 - 5 poros por milímetro (Hapuarachchi et al., 2019). En cuanto al contexto se menciona que puede tener hasta 3 cm de espesor (Hapuarachchi et al., 2019), siendo que el espesor medido en GC - 2 fue mayor. El hábitat de la especie *G. applanatum* incluye troncos de madera en descomposición acompañados de un suelo rico en humus con un exceso de podredumbre. Este hongo es principalmente un parásito de heridas que ingresa particularmente a través de tallos o raíces y causa la pudrición de la raíz. En América, *G. applanatum* se registra comúnmente en árboles de hoja caduca (Hapuarachchi et al., 2019). Además, en “iNaturalist” fue identificado como Hongo del Artista (*G. applanatum*), lo cual coincide con la identificación de un experto; por tanto, el hongo GC - 2 se podría plantear como *Ganoderma* cf. *applanatum*.

Figura 3*Caracteres macroscópicos del hongo GC - 2*

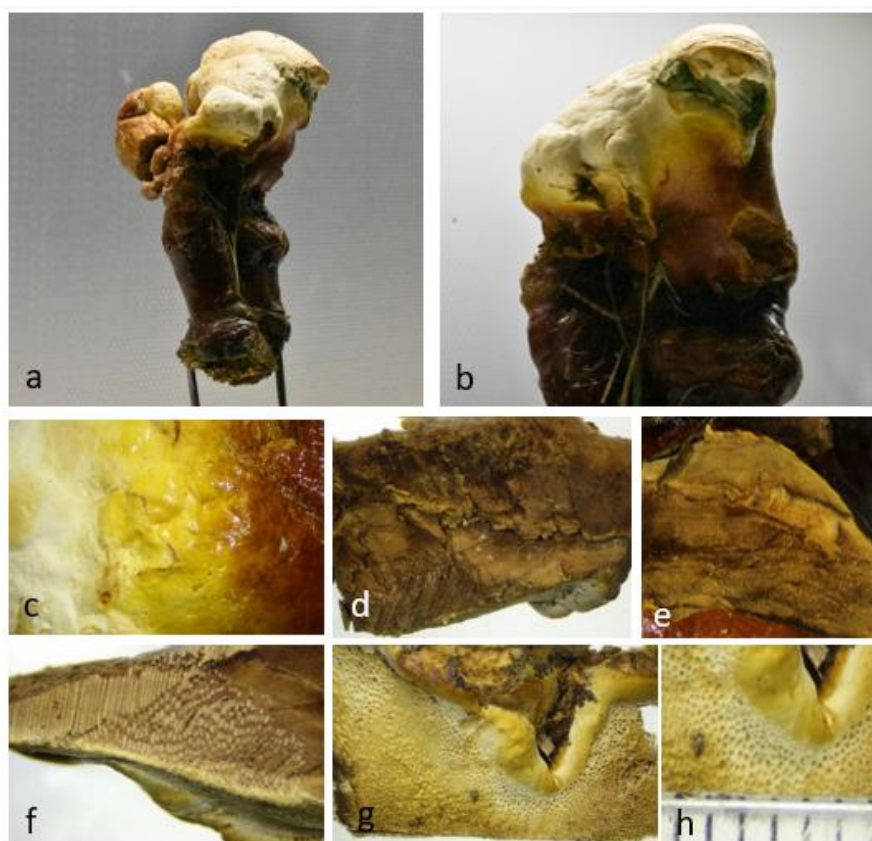
Nota. a) vista apical. b) vista frontal. c) superficie del píleo en el margen. d) superficie del píleo en zona central. e) contexto estratificado. f) capa tubular. g) poros del himenio. h) referencia de tamaño para los poros.

La seta GC - 3, posteriormente utilizada para la obtención de extractos, presentó dos notables diferencias con relación a los otros dos ejemplares hallados, esta tiene un brillo lustroso y un estípite, el cual es marrón oscuro, de unión excentrica y forma ventricosa (Figura 4). El color del cuerpo fructífero es marrón oscuro en la base del estípite, pasando por tonalidades amarillas en el borde y blanco en el píleo, lo que evidencia que el ejemplar hallado se encuentra en un desarrollo juvenil. La consistencia del cuerpo fructífero es dura, la textura de la superficie del píleo es ligeramente aterciopelada y la del estípite es lisa.

El contexto en la parte central del cuerpo fructífero de GC - 3 es de consistencia ligeramente blanda, con una coloración pardo al centro pero más amarillenta llegando al borde externo. La capa de tubos observada en GC - 3 tiene 0.4 - 0.5 cm de grosor. Cuenta con un promedio de cuatro poros circulares por mm en el himenio. Además de un olor frutal, agradable en comparación a las otras setas halladas en el campus central de Zamorano. Cabe resaltar que la seta fue hallada creciendo en la raíz de una conífera, lugar donde también se observó otro ejemplar cuyo píleo era marrón rojizo oscuro con forma convexa, obtusa y flabeliforme (Anexo C). Lo que supone era una seta madura a diferencia del ejemplar juvenil analizado que tenía forma globosa y colores variantes. Sin embargo, esta seta no fue considerada para la caracterización debido a que presentaba daño mecánico.

Figura 4

Caracteres macroscópicos del hongo GC-3



Nota. a) vista apical. b) vista frontal. c) superficie del píleo. d) contexto en zona madura. e) contexto en zona en desarrollo. f) capa tubular. g) poros del himenio. h) referencia de tamaño para los poros.

El hongo GC - 3 se asemeja con las características de *G. tsugae* en cuanto a la forma y color del estípite y el margen amarillo. Además, cumple con una de las aparentes preferencias de esta especie, los árboles de conífera *Juniperus* (Hapuarachchi et al., 2019). Esta última distinción sirve mucho para diferenciarlo de *G. lucidum*, el cual prefiere árboles caducifolios (Haddow y Haddow, 1931). Coincidentemente, GC - 3 fue reportado como *G. tsugae* en la plataforma “iNaturalist”, lo cual fue corroborado por tres identificadores. Por consiguiente, se lo plantea como *Ganoderma* cf. *tsugae*.

Además, se encontró una seta madura en ecosendero de Zamorano (Anexo C) presumiblemente de la misma especie (*G. tsugae*). El cual fue visto en una raíz de carbón seco (género *Mimosa*). Sin embargo, el espécimen también muestra características de otras especies. Al momento de la recolección, había una larva de polilla del género *Metalectra* comiendo del himenio.

En cuanto a las setas encontradas en la Reserva Biológica Uyuca, son dos: GU - 1, el cual fue utilizado para la obtención de micelio y GU - 2. Las características descritas de ambos ejemplares se encuentran detalladas en el Cuadro 3. Cabe destacar que dichos caracteres fueron descritos en la etapa de senescencia del hongo, por lo cual también se incluye la descripción de las esporas obtenidas.

Cuadro 3

Caracterización de setas de Ganoderma spp. encontrados en la Reserva Biológica Uyuca

Parámetros	GU - 1	GU - 2
Procedencia de la muestra	(14°01'59.1"N 87°04'08.1"W)	(14°02'96.82"N 87°04'29.45"W)
Hábitat	Tronco pino	Tronco roble
Hábito de crecimiento	Solitario	Solitario
Unión del cuerpo fructífero al sustrato	Estipitado	Sésil
Sustrato en el hábitat	Lignícola	Lignícola
Forma del píleo (lateral)	Plano-convexo	Convexo
Forma del píleo (central)	Deprimido	Obtuso
Forma del píleo (apical)	Flabeliforme	Semicircular
Margen del píleo (longitudinal)	Recto	Decurvado
Borde del píleo	Lobulado	Crenulado
Superficie en el margen	Tuberculado	Tuberculado
Humedad de superficie	Seco	Seco
Brillo	Lustroso	Mate opaco
Superficie del himenio	Poroso	Poroso

Parámetros	GU - 1	GU - 2
Unión con estípite	Adherido	Decurrente
Borde laminar	Liso	Liso
Contexto	Cavernoso	Cavernoso

Nota. GU: *Ganoderma* en Reserva Biológica Uyuca.

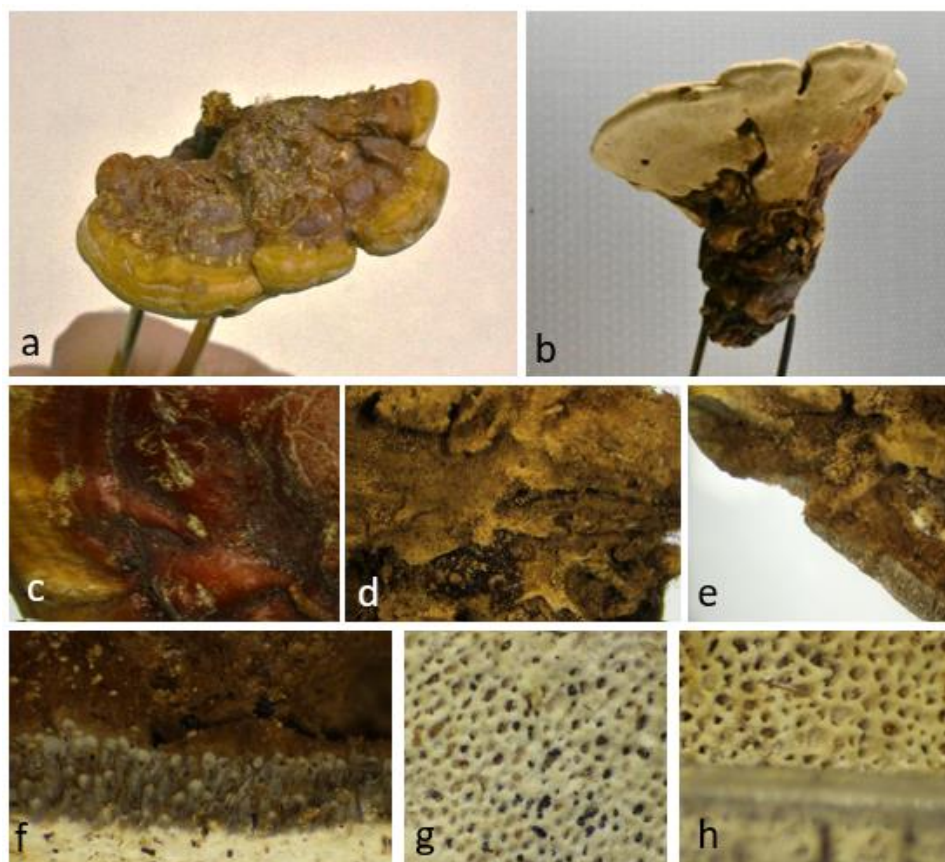
Al igual que GC - 3, el cuerpo fructífero de GU - 1 presenta un estípite y un brillo lustroso (Figura 5). El estípite tiene una unión excéntrica con el píleo, forma ventricosa y color marrón oscuro. El píleo es color castaño claro y se torna más amarillento conforme llega al borde, mientras que el himenio es de color blanco cremoso. La consistencia del cuerpo fructífero en general es dura y lisa. Padece de un olor identificado como maderable, intenso y agradable.

El basidiocarpo consta de una estructura tubular irregular de 0.2 - 0.3 cm de grosor, en color blanco y pardo claro. El contexto es de color pardo y de estructura cavernosa, fácilmente rompible. En el himenio se contabilizó un promedio de 5 - 6 poros de forma irregular por milímetro. Las esporas presentan una forma ovoide con una dimensión promedio de $10.5 \times 7 \mu\text{m}$, similar a las de *G. lucidum* (Hapuarachchi et al., 2019). En estas también se observa la aparición de hifas septadas (Figura 6). El basidiocarpo consta de una estructura tubular irregular de 0.2 - 0.3 cm de grosor, en color blanco y pardo claro. El contexto es de color pardo y de estructura cavernosa, fácilmente rompible. En el himenio se contabilizó un promedio de 5 - 6 poros de forma irregular por milímetro.

A pesar de que GU - 1 cuenta con varias características similares a *G. lucidum*, se categorizó como *Ganoderma* cf. *meredithae* por su superficie cremosa y hábito de crecimiento plumoso en PDA (Adaskaveg y Gilbertson, 1988). También se menciona que el número de poros por mm de *G. meredithae* es de cuatro a seis (Adaskaveg y Gilbertson, 1988), mientras que para las especies *G. lingzhi* y *G. lucidum* el número de poros es menor (Hapuarachchi et al., 2019). Además, las especies de *G. curtisii* y *G. meredithae* han reportado distribución en países de la región como Costa Rica (Salazar, 2014).

Figura 5

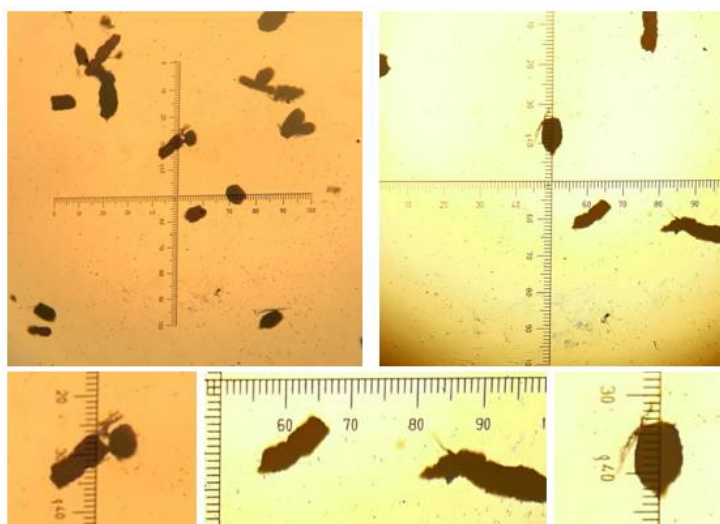
Caracteres macroscópicos del hongo GU - 1



Nota. a) vista apical. b) vista frontal. c) superficie del píleo. d) contexto. e) capa tubular en zona madura. f) capa tubular en zona de desarrollo. g) poros del himenio. h) referencia de tamaño para los poros.

Figura 6

Vista microscópica de las esporas del hongo GU - 1 (unidades en micras)

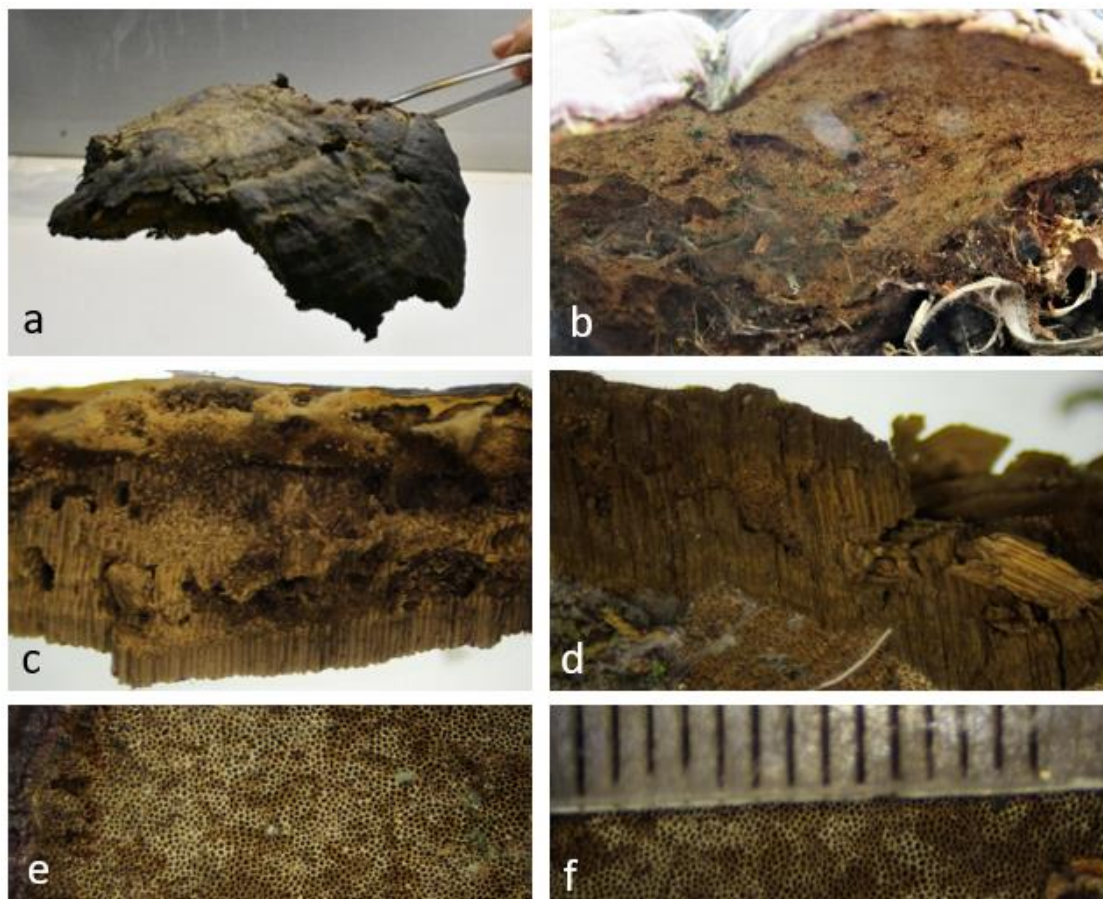


El hongo GU - 2 es un ejemplar maduro de crecimiento sésil, de forma semicircular y margen decurvado, fue hallado creciendo en el tallo de un árbol de roble (*Quercus* sp.). Presenta un color vino tinto oscuro de brillo mate en el píleo y pardo claro en el himenio (Figura 7). La consistencia dura y la superficie se siente rugosa al tacto. El contexto es color castaño, con estructuras cavernosas y fácilmente rompibles. El basidiocarpio de GU - 2 tuvo un grosor de 0.6 - 1.1 cm, abarcando la mayoría de la estructura interna del píleo. Se contabilizó un promedio de 4 - 6 poros por mm. Las esporas presentan forma ovalada alargada con una dimensión promedio de $27 \times 11 \mu\text{m}$ (Figura 8). El olor de esta seta es ligeramente maderable pero desagradable.

La seta GU - 2 coincide en características relacionadas a *G. resinaceum* por la superficie cóncava del píleo, margen redondeado, poros circulares (2 - 6 por mm) y contexto marrón claro (Mohanty et al., 2011). También, se sembraron esporas de este hongo en PDA, de donde se obtuvo micelio que al principio era blanco y luego adquirió un color más cremoso (Anexo D); similar a lo reportado por Mohanty et al. (2011). Es preciso señalar que, aunque *G. resinaceum* difiere de GU - 1 en que este último no tiene superficie lacada, este género de hongos puede perder el brillo en especímenes maduros. Cabe mencionar que cinco meses después se encontró una seta con características de *G. curtisii*, pero la resina observada debajo del espécimen y el margen delgado (Anexo D) denotan que podría tratarse de *G. resinaceum*. En especies lacadas del género, esta capa externa se denomina cutícula y está compuesta por células terminales claviformes o cilíndricas responsables de secretar la sustancia que les da brillo, sin embargo, esta cutícula puede llegar a ser más delgada según la madurez y así llegar a desprenderse (Torres-Torres y Guzmán-Dávalos, 2005). Por tanto, este hongo se catalogó como *Ganoderma* cf. *resinaceum*. Este tipo de hongos tiene presencia en América y también puede ser conocido como *G. orstedii* (Salazar, 2014).

Figura 7

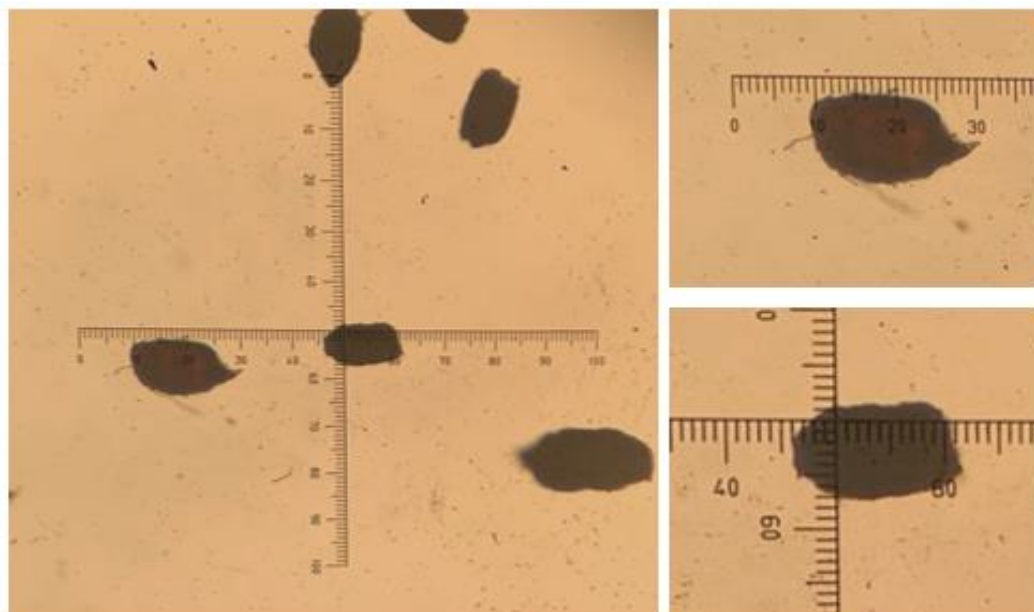
Caracteres macroscópicos del hongo GU - 2



Nota. a) vista apical. b) vista desde abajo. c) contexto. d) capa tubular. e) poros del himenio. f) referencia de tamaño para los poros.

Figura 8

Visión microscópica de las esporas del hongo GU - 2 (unidades en micras)



Tras analizar y clasificar individualmente a cada ejemplar, se pudo reconocer algunas características frecuentes, que pueden ser pauta para el reconocimiento del género. Las características que coincidieron en todas las setas son las referentes al crecimiento en sustrato lignícola; superficie del himenio porosa en colores blanco cremoso, amarillento o pardo; margen del píleo tuberculado; forma del píleo convexo o plano-convexo y cuerpo fructífero seco en humedad. *Ganoderma* spp. es un género de hongos heterótrofos que cuentan con enzimas degradantes de lignina, por lo cual, se desarrollan en árboles de los cuales obtienen los nutrientes del floema y xilema (Du et al., 2019). Estos hongos presentan una superficie de poros inicialmente blanca o crema que se vuelve marrón conforme madura (Du et al., 2019).

En cuanto a color, se coincide en que el píleo puede ser blanco amarillento, marrón claro, amarillento o rojizo, marrón rojizo oscuro y negro (Du et al., 2019). Adicional, puede tener surcos radiales o zonas concéntricas, además de una forma flabeliforme, semicircular u otras formas irregulares (Du et al., 2019), tal como el de los ejemplares hallados. El brillo, que fue mate opaco para

tres especies y lustroso para las otras dos, se relaciona a las dos subclasificaciones del género: *Ganoderma* y *Elfvigia*, los cuales se reconocen por presentar una cubierta lacada y no lacada, respectivamente (Suárez-Medellín et al., 2012). También, se menciona que el píleo puede tener surcos radiales o zonas concéntricas, además de una forma flabeliforme, semicircular u otras formas irregulares (Du et al., 2019), lo cual coincide con la de los ejemplares.

El contexto fue sólido para ejemplares encontrados en el campus central y cavernoso para los de Uyuca, lo cual podría estar relacionado al estado de madurez. El color de este fue predominantemente pardo, castaño y blanco para GC - 1, lo cual es igual a lo reportado por Du et al. (2019). En donde también se menciona que el contexto puede tener una o varias capas o líneas de quitina. Adicional, estos autores refieren que el género puede constar o no de un estípite, siendo que la fijación del estípite puede variar de lateral a casi central.

Preparación de Medio GSM Modificado en LFDIMZ

Para el aislamiento del micelio de hongos *Ganoderma* spp. se modificó la composición química del medio GSM preparado en el LFDIMZ (Cuadro 4). Este medio fue adaptado a los recursos y necesidades del estudio. Siendo así que no se utilizó sulfato de estreptomicina, el cual es un bactericida, tampoco se aplicó ridomil o benlate, que se utilizan como fungicidas. En su lugar, se agregó 1.5 mL de gentamicina para la preparación de 1 L de medio GSM modificado.

Cuadro 4

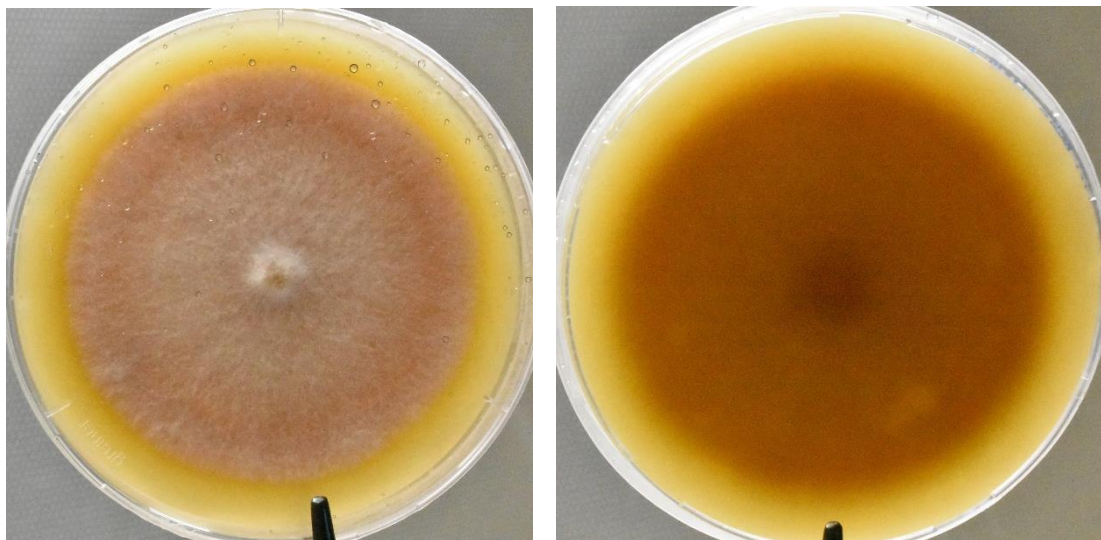
Composición química de GSM modificado por López y Ponce

Ingredientes	Cantidad
Parte A	
Bacto-Pectona (g)	5
Agar (g)	20
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄) (g)	0.5
Agua destilada (mL)	874.5
Parte B	
Cloranfenicol (g)	0.1
Etanol 95% (mL)	20
Ácido láctico al 50% (mL)	2
Ácido tánico (g)	1.25
Gentamicina (mL)	1.5
Agua destilada (mL)	75.15

Con el medio GSM elaborado se obtuvo un crecimiento micelial de *Ganoderma* sp. libre de contaminación provocada por *Trichoderma* sp., siendo este hongo el mayor causante de contaminación de *Ganoderma* en ensayos previos (Anexo F). *Trichoderma* spp. habita suelos agrícolas y naturales, es muy resistente y capaz de colonizar rápidamente los sustratos disponibles (Samaniego-Fernández et al., 2018). Al sembrar *Ganoderma* sp. en GSM modificado se apreció un halo marrón (provocado por la reacción específica con ácido tánico) alrededor del explante o espora (Figura 9), lo que indica un buen aislamiento del hongo en el medio selectivo preparado (Amanda y Prakoso, 2018). Estos mismos autores demuestran que el micelio no crece de forma normal sobre el GSM por el contenido de componentes antifúngicos y antibacteriales que este posee.

Figura 9

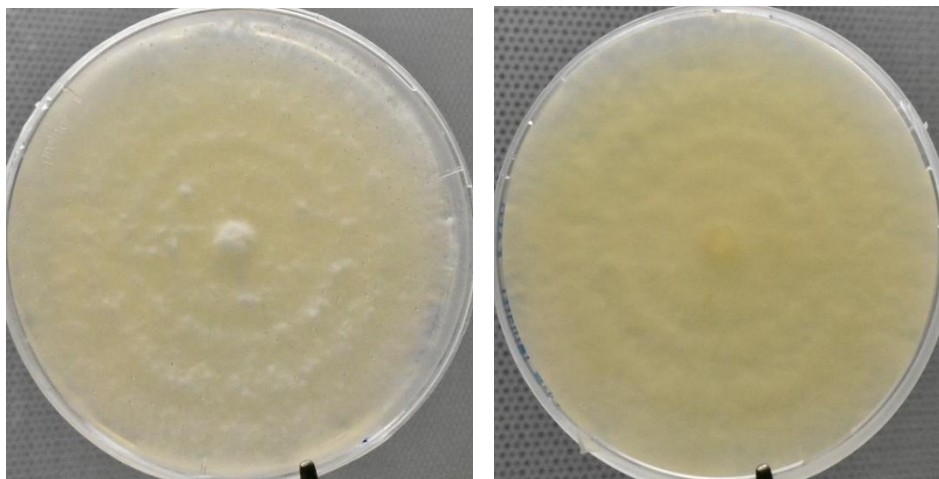
Crecimiento anverso (izquierda) y reverso(derecha) de Ganoderma sp. a los diez días de sembrado en medio GSM modificado por López y Ponce, elaborado en LFDIMZ



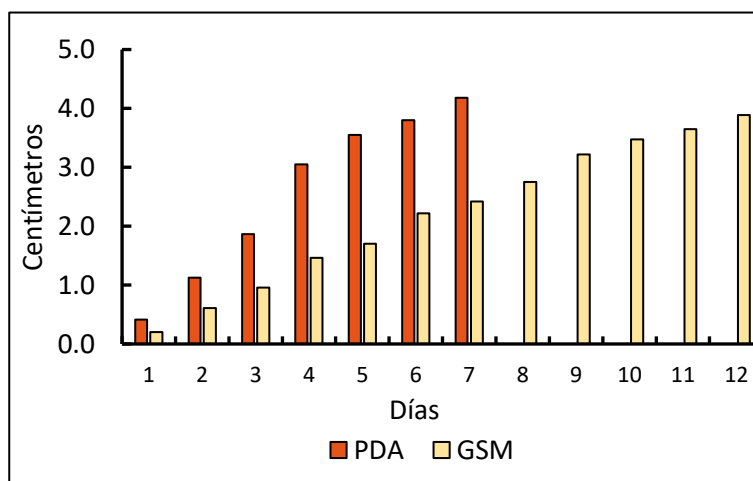
Al transferir un inóculo de *Ganoderma* sp. del medio GSM modificado al medio PDA, se observó un crecimiento más rápido de las hifas. Al cabo de siete días, se alcanzó su desarrollo micelial en toda el área disponible de la placa Petri (Figura 10). Tras realizar las repeticiones de siembras de *Ganoderma* sp. en ambos medios, se determinó que las hifas en GSM modificado casi duplican el tiempo de crecimiento en comparación al tiempo que le toma desarrollarse en PDA (Figura 11).

Figura 10

Crecimiento anverso (izquierda) y reverso (derecha) de Ganoderma sp. en PDA, a los siete días de sembrado

**Figura 11**

Comparación del crecimiento de Ganoderma sp. en medio GSM modificado y PDA



Pruebas de Antagonismo con Hongos Fitopatógenos

Al realizar las pruebas de antagonismo, se obtuvieron los valores de PICR para cada enfrentamiento referenciando los resultados de la interacción en cultivo dual (Anexo N) y en cultivos control de fitopatógenos (Anexo G-M). Al confrontarse *Fusarium* sp. con el aislamiento de *Ganoderma* sp. (Figura 12), se obtuvo un valor medio de PICR del 28% al octavo día (Cuadro 5) que indica un bajo

efecto de antibiosis sobre el fitopatógeno. Siendo similar a lo reportado por Niño (2010), en donde *Ganoderma* sp. no presentó ninguna inhibición hacia aislamientos de *Fusarium* sp. Esto puede deberse a que este último posee metabolitos secundarios de gran resistencia como tricotecenos, fumonisinas y micotoxinas que son muy difíciles de inhibir por parte de los metabolitos producidos por el hongo *Ganoderma* sp.

Cuadro 5

Interacción diaria entre el Ganoderma sp. y Fusarium sp.

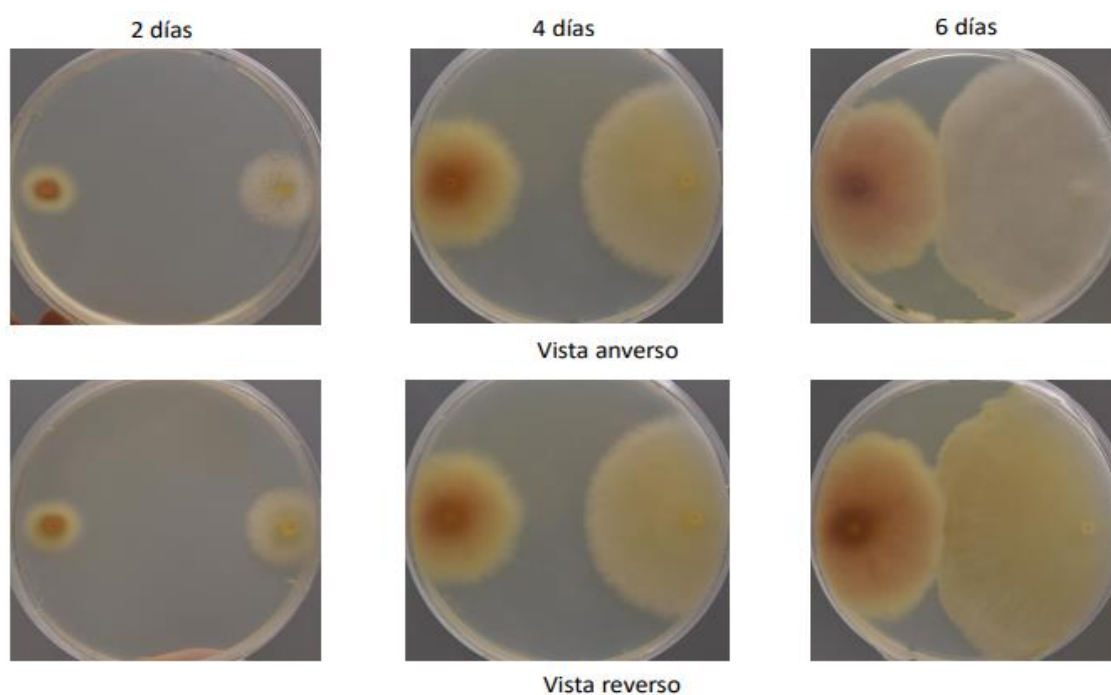
Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.40	0.85	1.45	2.10	2.60	3.05	3.50	3.75
R2 (cm)	0.35	0.83	1.50	1.90	2.25	2.33	2.62	2.70
PICR	13%	2%	-3%	10%	13%	23%	25%	28%

Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 12

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno Fusarium sp. (izquierda) y Ganoderma sp.



Los resultados obtenidos en el antagonismo contra *Rhizopus* sp. (Figura 13) presentaron un PICR del 68% a los ocho días de establecer el cultivo dual con *Ganoderma* sp. (Cuadro 6). No se encontraron pruebas del antagonismo entre estos hongos, sin embargo, se menciona que *Rhizopus stolonifer* puede afectar cultivos de *G. lucidum* (Jiang, 2000). También, se sugiere que bacterias aisladas del tejido foliar y fruto de *Duchesnea indica* son capaces de servir como controlador de *R. stolonifer*, con PICR entre 45.5% y 73.2% (Plascencia-Tenorio et al., 2012).

Cuadro 6

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Rhizopus sp.

Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.35	0.65	0.90	1.10	1.30	1.60	1.75	1.75
R2 (cm)	0.32	0.67	0.90	1.07	1.27	1.42	1.07	0.57
PICR	10%	-3%	0%	3%	3%	11%	39%	68%

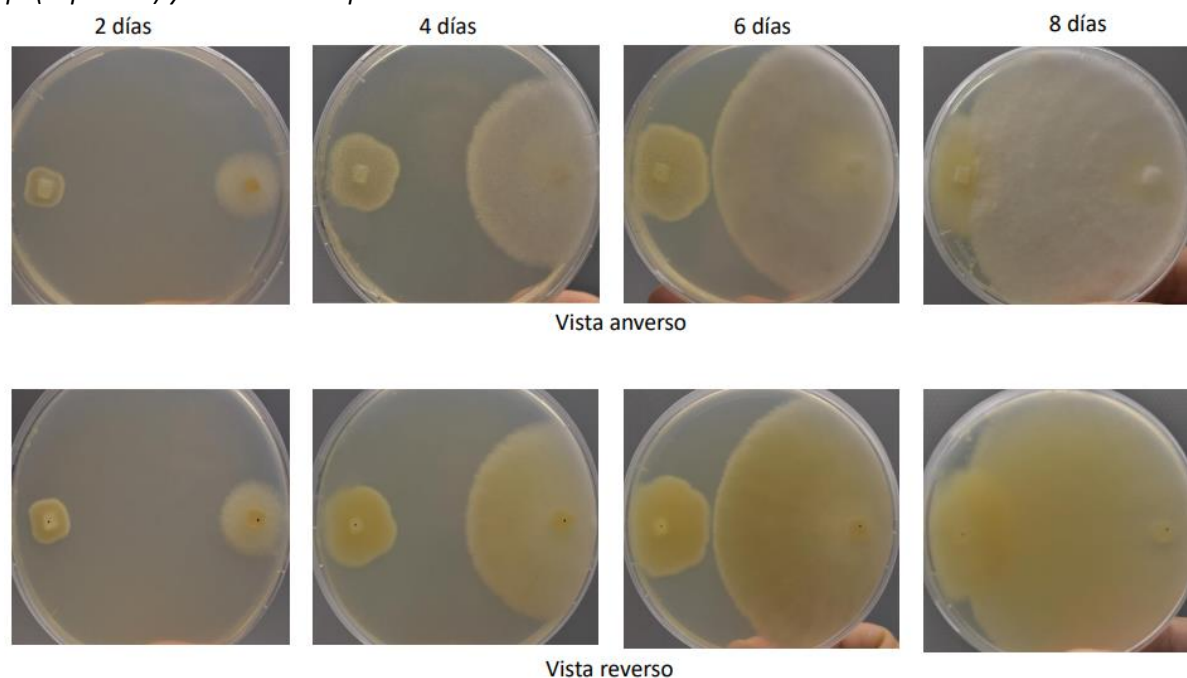
Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 13

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno Rhizopus

sp. (izquierda) y Ganoderma sp.



En la confrontación entre *Pestalotia* sp. con el aislamiento de *Ganoderma* sp. (Figura 14), se obtuvo un valor medio de PICR del 26% al octavo día (Cuadro 7). Esto indica un bajo efecto inhibitorio sobre el hongo fitopatógeno. Aunque no se han reportado estudios del antagonismo con *Ganoderma* spp., se ha evaluado el antagonismos de *Trichoderma* sp. contra *Pestalotia palmari* reportando un PICR de 50% (Montoya, 2019). Lo cual deja abierto la posibilidad de seguir realizando estudios antibióticos contra este patógeno, ya que, las cepas encontradas de *Ganoderma* spp. contenían esporas de *Trichoderma* sp. en su medio natural.

Cuadro 7

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Pestalotia sp.

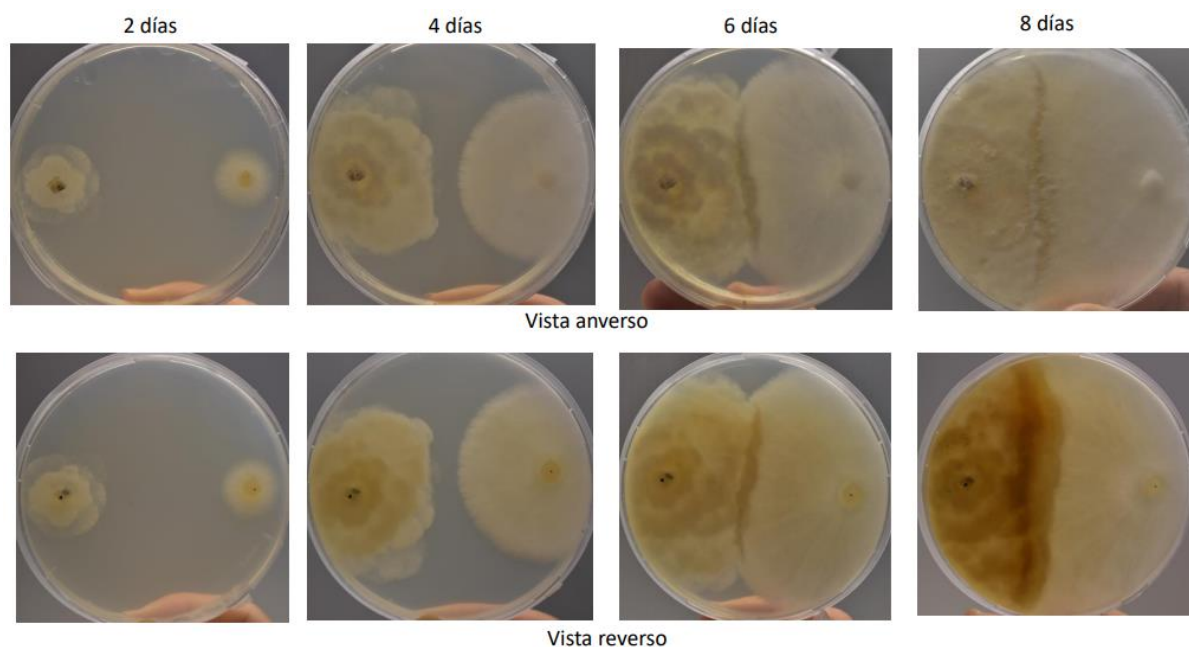
Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.50	1.50	2.10	2.60	3.15	3.50	3.80	4.10
R2 (cm)	0.45	1.30	1.97	2.40	2.82	2.95	3.02	3.02
PICR	10%	13%	6%	8%	11%	16%	21%	26%

Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 14

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno Pestalotia sp. (izquierda) y Ganoderma sp.



Al octavo día de enfrentamiento se obtuvo un valor medio de PICR del 24% para el hongo fitopatógeno *Curvularia* sp. (Cuadro 8). Siendo poca la inhibición provocada por *Ganoderma* sp., pero observando micoparasitismo por parte de este último (Figura 15). Lo que coincide con el registro de inhibición del 48.8% (prueba con filtrado líquido) y 10.9% (prueba con biomasa) de *Ganoderma* sp. contra *Curvularia clavata* (Palacios et al., 2011).

Cuadro 8

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Curvularia sp.

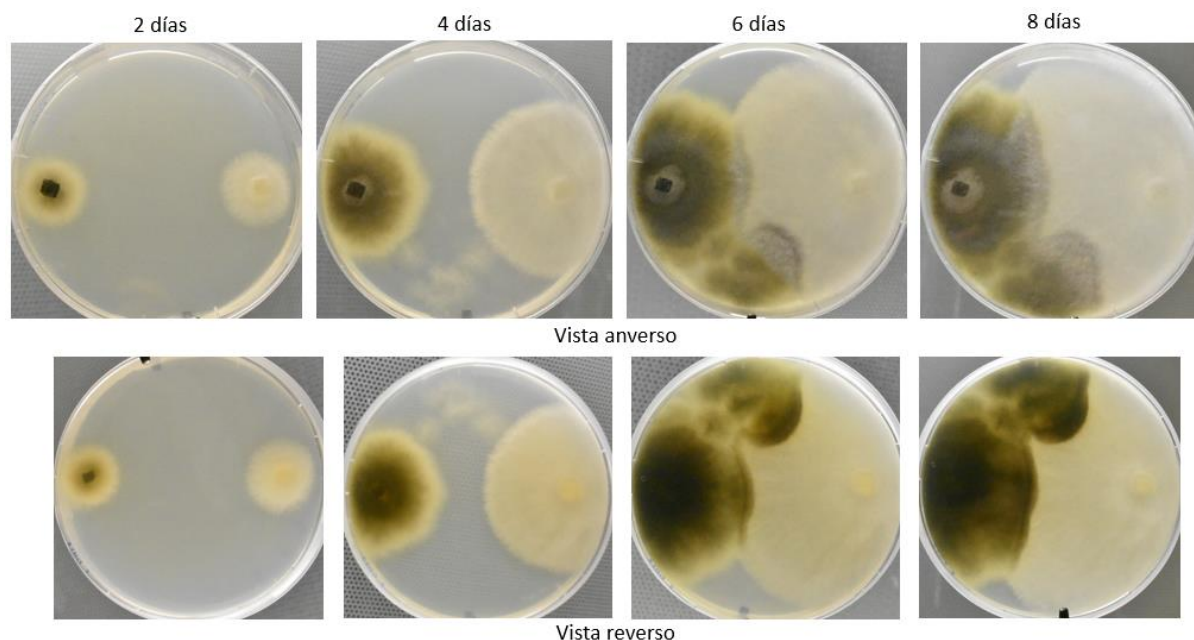
Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.55	1.10	1.75	2.30	2.80	3.30	3.40	3.60
R2 (cm)	0.42	1.03	1.73	2.10	2.50	2.72	2.73	2.75
PICR	24%	6%	1%	9%	11%	18%	20%	24%

Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 15

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno Curvularia sp. (izquierda) y Ganoderma sp.



Al confrontar *Ganoderma* sp. contra *Lasiodiplodia* sp., se encontraron valores muy bajos del 2% indicando la casi nula inhibición del fitopatógeno (Cuadro 9). Cabe mencionar que, *Lasiodiplodia* sp. tuvo un crecimiento micelial muy rápido, siendo que a los cuatro días alcanzó el micelio de *Ganoderma* (Figura 16). Otro estudio demuestra que *Lasiodiplodia pseudotheobromae* puede ser invasivo en PDA, en donde los porcentajes de inhibición por parte de bacterias quitinolíticas fueron bajos (< 22%) (Bahar et al., 2021). Un buen antagonista contra *Lasiodiplodia theobromae* pueden ser ciertas cepas de actinomicetos, las cuales muestran porcentajes de inhibición arriba del 84% (Polanco-Florián et al., 2020). No se encontró ningún estudio en donde se investigue el antagonismo de este fitopatógeno con respecto a *Ganoderma*.

Cuadro 9

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Lasiodiplodia sp.

Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	1.90	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20
R2 (cm)	1.30	1.75	3.85	3.97	4.00	4.02	4.07	4.10
PICR	32%	58%	8%	6%	5%	4%	3%	2%

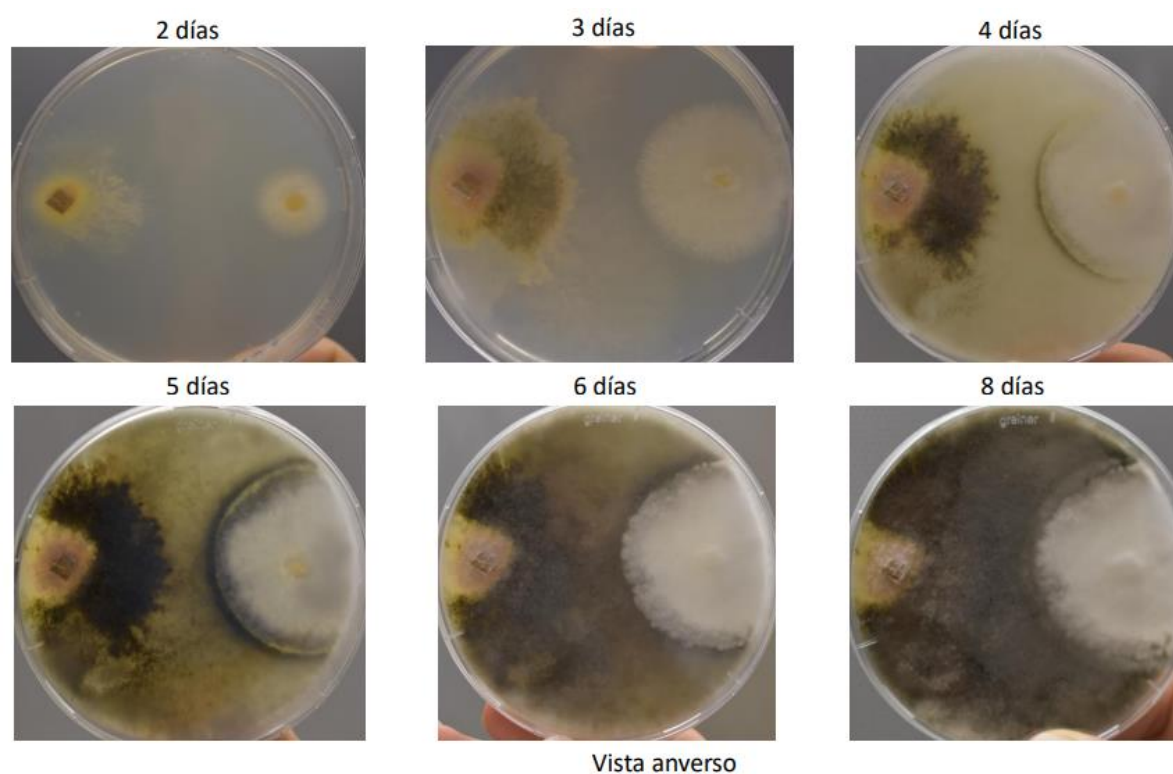
Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

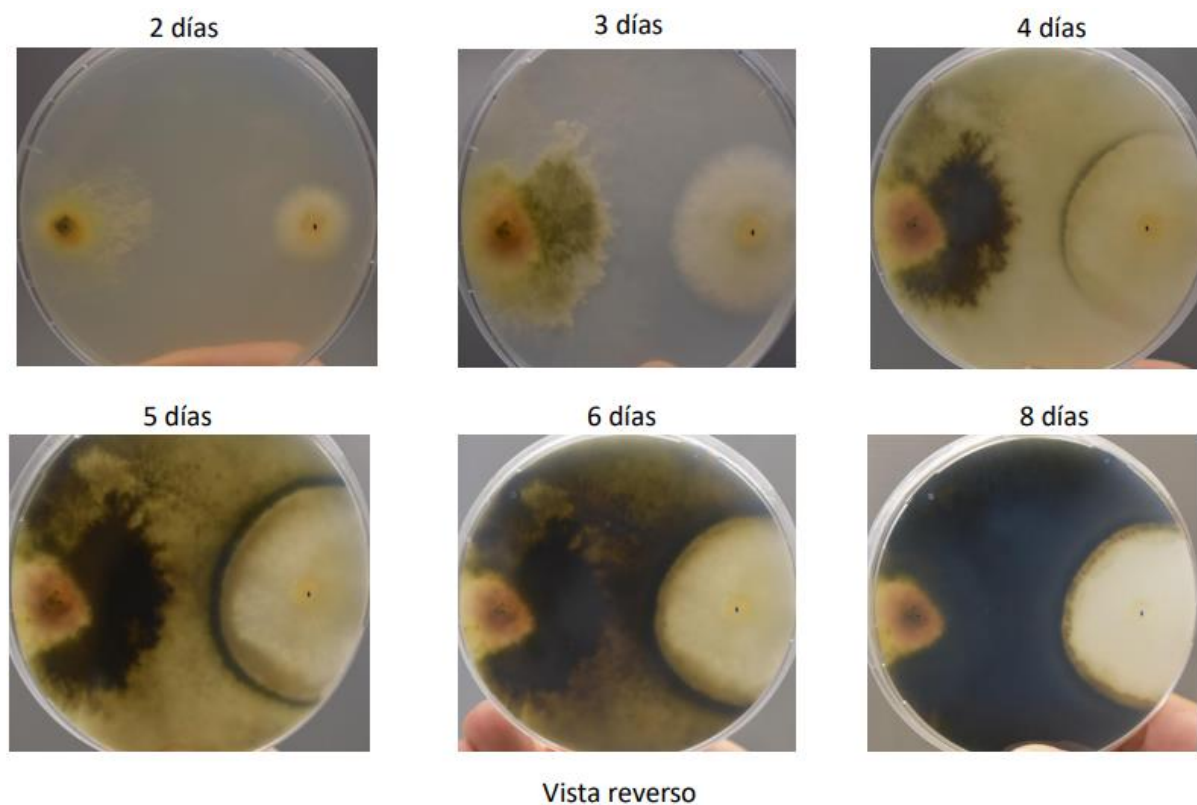
Radial

Figura 16

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno

Lasiodiplodia sp. (izquierda) y Ganoderma sp.





En la confrontación con *Penicillium* sp., se registró un PICR de 37.2% al octavo día del cultivo (Cuadro 10). Además, se muestra micoparasitismo por parte de *Ganoderma* sp. (Figura 17). No se reportan estudios de pruebas antagónicas entre estos dos hongos. Sin embargo, se han realizado confrontaciones entre *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. En donde, con un PICR > 40% y grado cuatro en la escala de Bell et al. (1982), se determina que *Trichoderma* sp. puede ser utilizado como biocontrol de este patógeno (Astorga-Quirós et al., 2014).

Cuadro 10

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Penicillium sp.

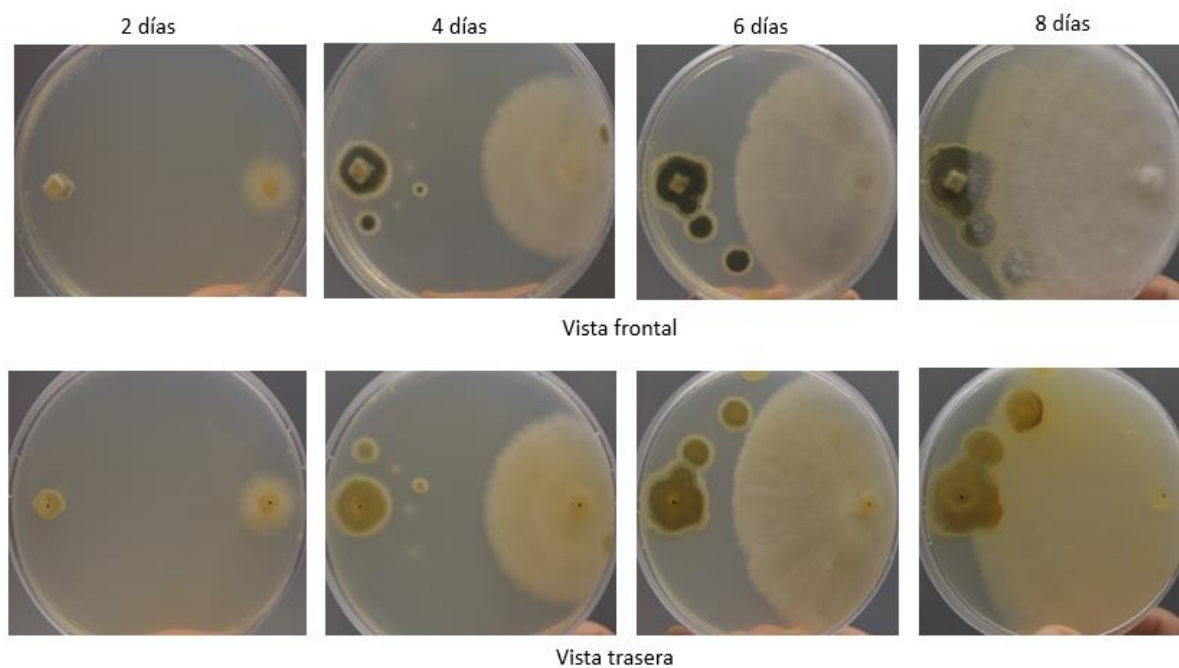
Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.20	0.48	0.58	0.68	0.98	1.15	1.28	1.38
R2 (cm)	0.28	0.45	0.77	0.78	0.90	0.93	0.93	0.87
PICR	-42%	5%	-33%	-16%	8%	19%	27%	37.20%

Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 17

*Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno *Penicillium* sp. (izquierda) y *Ganoderma* sp.*



De las pruebas antagónicas entre *Ganoderma* sp. y el hongo fitopatógeno *Aspergillus* sp., se obtuvo un porcentaje de 34% de inhibición al quinto día, pero a medida que *Aspergillus* sp. fue creciendo el PICR fue disminuyendo hasta llegar a 27% el octavo día (Cuadro 11). Además, el patógeno mostró capacidad invasiva sobre *Ganoderma* sp. (Figura 18), dejando en evidencia la poca capacidad antibiótica contra esta cepa. En *Aspergillus* sp. de origen animal y humano se han reportado PICR de 23.78 y > 10%, respectivamente, por parte de *G. lucidum* (Rodríguez, 2010). Sin embargo, las concentraciones inhibitorias mínimas contra diferentes especies de *Aspergillus* (*A. fumigates*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*) fueron más bajas en los extractos de *Ganoderma* sp., en comparación con tres fungicidas comerciales (Chandrasekaran et al., 2018).

Cuadro 11

Interacción diaria entre Ganoderma sp. y Aspergillus sp.

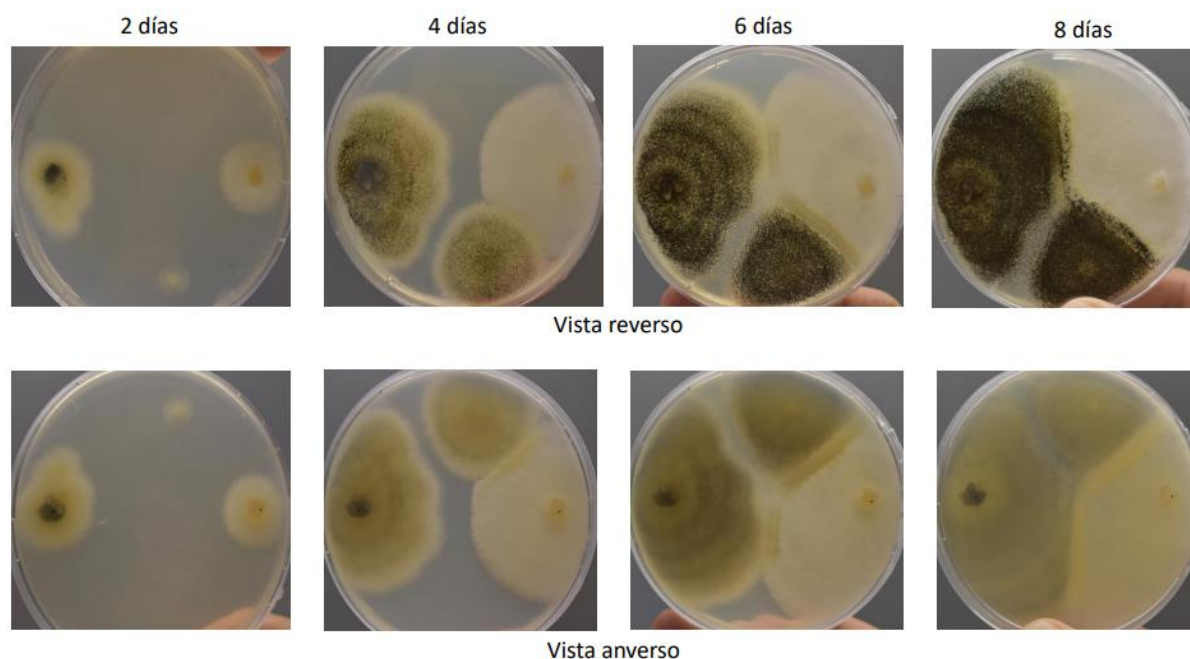
Medición	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (cm)	0.50	1.40	2.20	3.00	4.10	4.20	4.20	4.20
R2 (cm)	0.37	1.28	1.93	2.20	2.72	2.83	2.98	3.07
PICR	27%	8%	12%	27%	34%	33%	29%	27%

Nota. R1: Radio del patógeno en placa control, R2: Radio del patógeno en enfrentamiento, PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial

Figura 18

Secuencia del cultivo de confrontación directa en medio PDA entre el hongo fitopatógeno Aspergillus sp. (izquierda) y Ganoderma sp.

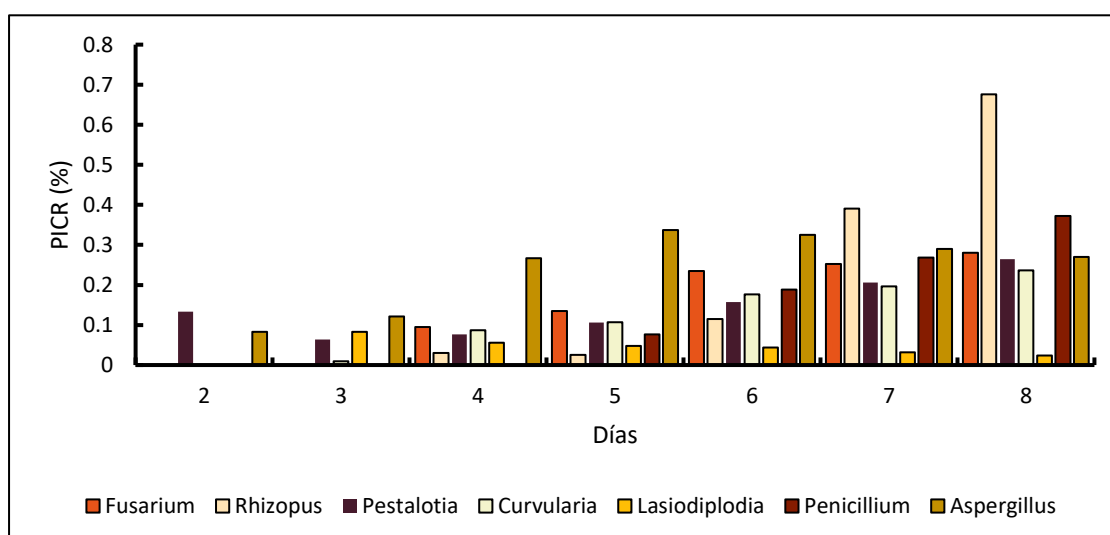


Se pudo notar la variación en el PICR diario al evaluar la interacción en el comportamiento de los hongos fitopatógenos frente a *Ganoderma* sp. en las placas de cultivos duales (Figura 19). Con *Rhizopus* sp. se tuvo el mayor PICR (67.62%), seguido de *Penicillium* sp. (37%); en ambos hubo un crecimiento mucho más rápido por parte del antagonista en comparación con el patógeno. Esta cualidad es de beneficio en el tratamiento preventivo de enfermedades fitopatógenas (Fernández y

Suárez, 2009). *Fusarium* sp. (23%), *Curvularia* sp. (18%) y *Pestalotia* sp. (26%) tuvieron un comportamiento similar. La mayoría de los hongos fitopatógenos presentó su pico máximo de inhibición a los 8 días, siendo las excepciones *Lasiodiplodia* sp. al cuarto día y *Aspergillus* sp. al quinto día. Sin embargo, para el caso de esto dos últimos hubo una disminución en la inhibición hasta el octavo día. Con *Lasiodiplodia* sp. se obtuvo un máximo de 8% y un 2% al estabilizarse, debido a que el fitopatógeno cubrió la placa en cuatro días deteniendo el crecimiento de *Ganoderma* sp. Finalmente, *Aspergillus* sp. logró un 34% de PICR en su pico y luego retornó a 27%, pudiendo deberse a que desde el quinto día ya presentaba micoparasitismo sobre *Ganoderma* sp.

Figura 19

Interacción medida en PICR por parte de los hongos fitopatógenos frente a Ganoderma sp.



De las pruebas de antagonismo realizadas contra hongos fitopatógenos, los resultados de MICMO fueron notorios al octavo día, periodo en el cual ya se estabilizaron ambas colonias (Cuadro 12). En cultivos contra *Lasiodiplodia* sp. y *Aspergillus* sp., se registró un grado de cero, evidenciando que no hubo invasión de *Ganoderma* sp., sino del fitopatógeno contra el antagonista. La razón de dicho comportamiento puede deberse al acelerado crecimiento de *Lasiodiplodia* sp. y rápida esporulación de *Aspergillus* sp. El mayor antagonismo de *Ganoderma* sp. fue sobre las colonias de *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., en las que se obtuvo un grado de tres, lo que demuestra la invasión total

de una colonia sobre otra. Sin embargo, no se registró ninguna valoración de cuatro debido a que no se observó esporulación de *Ganoderma* sp. en ningún enfrentamiento. De hecho, *Ganoderma* sp. no presentó esporulación en ninguna de los montajes realizados en el estudio. Esto se puede deber a que algunos hongos requieren una combinación de luz, temperatura y pH óptimo para esporular distinto al empleado para el crecimiento del micelio (Curvelo y Rojas, 2010).

Cuadro 12

Evaluación de MICMO entre Ganoderma sp. y hongos fitopatógenos usando la escala de Bell

Grado	Fitopatógeno enfrentado
1	<i>Fusarium</i> sp.
3	<i>Rhizopus</i> sp.
1	<i>Pestalotia</i> sp.
2	<i>Curvularia</i> sp.
0	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
3	<i>Penicillium</i> sp.
0	<i>Aspergillus</i> sp.

Nota. Escala tomada de Bell et al. (1982).

Pruebas de Antagonismo con Bacterias Entéricas

En los ensayos para determinar el medio de cultivo apto para el desarrollo de bacterias entéricas y el hongo *Ganoderma* sp., se encontró que el medio AN permite el desarrollo de ambos. El medio Agar MacConckey fue ideal para el desarrollo de las bacterias, mostrando un color rosa intenso al aislar *E. coli* y color beige o ámbar traslucido con *S. typhimurium* (Anexo O), corroborando la efectividad de la inoculación (Microgen Ltda, 2021). Sin embargo, *Ganoderma* sp. no se desarrolló en este debido a que el medio contiene cristal violeta que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias grampositivas (Barrero, 2016).

Las metodologías aplicadas por Bivi et al. (2009) y Slama et al. (2019) no fueron consideradas para el reporte de resultados puesto que los hallazgos no fueron concluyentes. En ambos casos se encontró que el micelio de *Ganoderma* sp. se extendía por debajo de las colonias de bacterias sembradas, por lo que, no fue posible evaluar algún grado de interacción entre los microorganismos.

En cuanto a la determinación de antibiosis con el extracto de *Ganoderma* sp., tanto en las metodologías donde sólo se impregnó el disco y donde se realizaron los pozos con sacabocado, los resultados obtenidos no fueron consistentes en las repeticiones, mostrando nula formación de halos o habiendo una mínima inhibición de manera muy irregular.

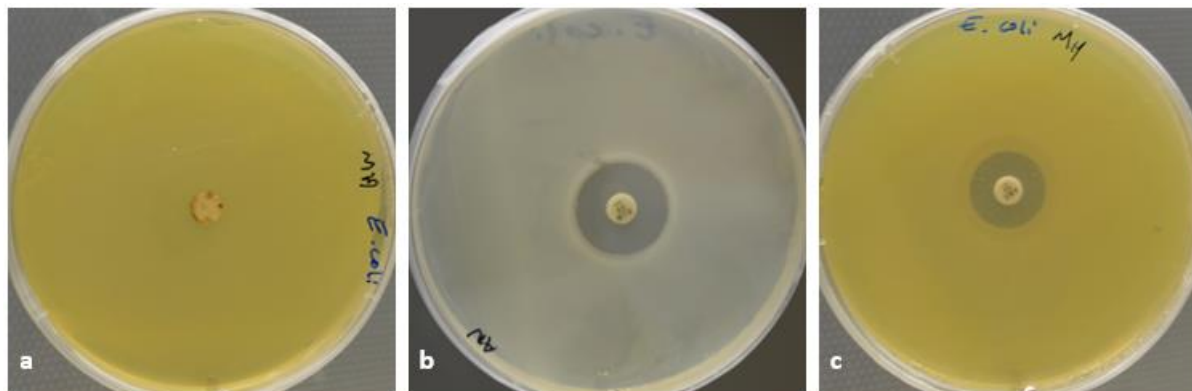
Por otra parte, en la metodología donde se aplicó calor para eliminar el solvente y se dejaron sumergidos los discos por 24 horas, se obtuvieron resultados consistentes. En ambos casos, las placas testigo produjeron halos de 10 mm de diámetro, siendo mucho más clara para *S. typhimurium* que *E. coli*. Los resultados obtenidos en esta metodología se deben a que el etanol, solvente utilizado, es capaz de liberar la sustancia antagónica del hongo (triterpenos), mientras que el agua de la solución es necesaria para que los metabolitos solubles puedan trabajar en sinergismo con la sustancia inhibitoria (Segovia, 2017). Sin embargo, a este nivel de concentración, los compuestos activos de *Ganoderma* sp. tienen un efecto intermedio sobre la enterobacteria por lo que los halos podrían ser irregulares.

Otra forma en la que se pudiera ver el efecto antimicrobiano de *Ganoderma* sp. es mediante pruebas con extracto del micelio, como lo realizado por Kamble et al. (2011) donde se probaron solventes como metanol, acetona, cloroformo y medio acuoso para elaborar extracto de *G. lucidum*. También, se han elaborado estudios *in vivo* donde se evaluó extracto de *G. lucidum* a base de agua caliente y etanol sobre ratones a una concentración de 2 mg/ratón, protegiéndolos de la infección letal de *E. coli*, previamente inoculado en los animales (Ohno et al., 1998).

Al evaluarse la actividad antibacteriana del extracto de *Ganoderma* sp. contra *E. coli* no hubo formación de halos de inhibición (Figura 20). Por lo que, la cepa de *E. coli* ATCC® 51813 muestra resistencia de acuerdo con la metodología empleada. Por el contrario, mostró sensibilidad ante los antibióticos ampicilina 20 µg y amoxicilina con ácido clavulánico 30 µg al formar un halo de 20 y 18 mm respectivamente. Este resultado compatible a la cepa de *E. coli* ATCC® 25922 que se reporta sensible ante ampicilina 10 µg y amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg con diámetros en los halos de inhibición mayores a 17 y 18 mm respectivamente (Rodríguez et al., 2000).

Figura 20

Antibiogramas realizados para la bacteria E. coli



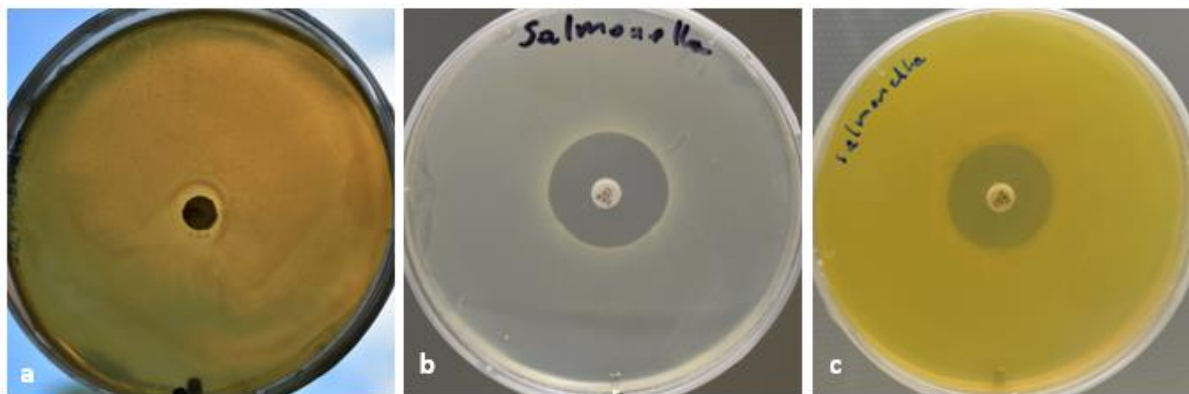
Nota. a) Resultado con extracto de *Ganoderma* con 24 horas de reposo. b) Sensidisco de ampicilina 20 µg en AN. c) Sensidisco de amoxicilina con ácido clavulánico 30 µg en MH.

Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Segovia (2017), en donde se probaron extractos etanólicos con concentraciones de 50, 75 y 100% contra *Escherichia coli* ATCC® 9637. En este, la concentración con mayor efecto antimicrobiano fue extracto etanólico 50% de *G. lucidum* (16.76 mm). La diferencia a lo obtenido puede ser causada por un menor tiempo de reposo con el solvente. También, se encontró que el extracto acuoso de *G. lucidum* puede ser más potente que un extracto a base de metanol, al ser evaluado contra *E. coli* y otras bacterias (Ofodile y Bikomo, 2008). Siendo que *G. lucidum* contiene triterpenoides y polisacáridos que son los principales compuestos farmacológicamente activos que ejecutan propiedades antimicrobianas sobre *E. coli* (Segovia, 2017).

Al enfrentar *S. typhimurium* con el extracto de *Ganoderma* sp. por el método de difusión con disco se encontró un halo de inhibición promedio de 12.6 mm (Anexo Q), pudiéndose catalogar como de alta resistencia al observar los valores mostrados para otras cepas en Rodríguez et al. (2000). El resultado obtenido fue 1.9 veces menor a los halos observados con los antibióticos comerciales (Figura 21). Los resultados con ampicilina 20 µg y amoxicilina con ácido clavulánico 30 µg mostraron inhibición a través de halos de 24 y 23 mm respectivamente, pudiéndose catalogar la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028 como sensible a estos antibióticos considerando los valores para esta categoría en otras cepas (Rodríguez et al., 2000).

Figura 21

Antibiogramas realizados para la bacteria S. typhimurium



Nota. a) Resultado con extracto de *Ganoderma* con 24 horas de reposo. b) Sensidisco de ampicilina 20 µg en AN. c) Sensidisco de amoxicilina con ácido clavulánico 30 µg en MH.

Ganoderma lucidum es la única especie del género con la cual se encontró que han realizado evaluaciones contra *S. typhimurium*. El extracto metanólico de *G. lucidum* mostró actividad antimutagénica significativa ($P < 0.001$) contra mutantes de histidina de las cepas de *S. typhimurium*, TA98, TA100 y TA102 (Lakshmi et al., 2006). Se ha mostrado que caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* a partir de una concentración de 50 µL (5% del volumen total en el medio de cultivo bacteriano) tiene efectividad sobre cepas de *Salmonella* resistentes a Estreptomicina (Barajas, 2015). El extracto de *G. lucidum* en acetona con concentración de 40 µg/mL puede resultar inhibitorio contra *S. typhi*, presentando una zona de inhibición de 20.60 mm (Sadaf et al., 2010).

Asimismo, se demostró que *G. lucidum* puede ser consumido como fuente antimicrobiana, luego de realizarse pruebas inhibitorias contra *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, entre otras bacterias en medio Muller Hinton Broth, comparando los resultados con los antibióticos Amikacina, Ampicilina y Ciprofloxacina (Bal, 2019). Otra especie que mostró tener compuestos bioactivos contra *E. coli* y *S. aureus* es *G. applanatum*, el cual fue evaluado mediante un método de agar de difusión en disco (Muhsin et al., 2011).

Conclusiones

Se reconoce en las setas encontradas en la EAP Zamorano características típicas del género *Ganoderma*: sustrato, humedad, himenio, brillo y gama de colores. Sin embargo, debido a la plasticidad fenotípica y naturaleza pleomórfica del género, el reconocimiento taxonómico a través de la descripción de sus caracteres macroscópicos solo será tentativo. Aun así, es posible sugerir la especie para setas encontradas que coincidan con las características morfológicas reportadas en literatura, haciendo uso de la abreviatura cf. para indicar la similitud.

El medio GSM modificado preparado en el LFDIMZ permite aislar micelio de *Ganoderma* sp. recolectado en estado silvestre. El medio es eficaz en la inhibición de *Trichoderma* sp., sin embargo, permite el desarrollo de otros microorganismos no identificados, quedando susceptible a contaminación si no se toman las medidas asépticas adecuadas.

Ganoderma sp. contiene propiedades antifúngicas contra *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. conforme al análisis de PICR y escala para MICMO. Con otros hongos fitopatógenos, este género de hongos puede convivir en competencia por espacio y nutrientes, siendo *Lasiodiplodia* sp. y *Aspergillus* sp. los hongos por los cuales podría llegar a ser invadido.

La metodología que se seleccionó para la determinación de propiedades antibacterianas interfiere en los resultados alcanzados. El uso de extractos de *Ganoderma* sp. es adecuado para realizar dichas pruebas debido a la diferencia en requerimientos para el crecimiento entre bacterias y hongos. Sin embargo, los resultados varían según el método de extracción, solvente utilizado y concentración. Por medio de la metodología aplicada, *Ganoderma* sp. contiene propiedades antibióticas contra *S. typhimurium* pero no contra *E. coli*.

Recomendaciones

Aplicar técnicas de reconocimiento molecular y caracterización de estructuras microscópicas para la identificación de *Ganoderma* spp. a nivel de especie. Misma que no se incluyó en el estudio por quedar fuera de su alcance.

Ensayar la adición y remoción de componentes y sus cantidades para lograr la eficiencia y eficacia de GSM en el aislamiento de otras especies de *Ganoderma* spp. Asegurando así que el medio resultante sirva para otros estudios de análisis y experimentación con este tipo de hongos de interés al área de biotecnología vegetal y animal.

Realizar estudios moleculares para la identificación de metabolitos presentes en *Ganoderma* sp. para la identificación de cuáles son los componentes activos que inhiben a los fitopatógenos. Esto resulta útil para futuras aplicaciones de bioprospección tal como el planteamiento de un sustituto natural a la industria de los antifúngicos.

Emplear metodologías para la extracción de sustancias activas presentes en *Ganoderma* sp. y utilizarlo en el montaje de antibiogramas contra bacterias entéricas para la determinación de propiedades antibacterianas.

Demostradas las cualidades de este género de hongos, desarrollar productos antibióticos a base de *Ganoderma* sp. para la implementación en dietas de granjas pecuarias como alternativa a los antibióticos comerciales.

Referencias

- Adaskaveg, J. E. y Gilbertson, R. L. (1988). *Ganoderma Meredithae*, a new species on pines in the southeastern United States. *Mycotaxon*, 31(1), 251–257. <https://bit.ly/3n4ON10>
- Amanda, W. y Prakoso, H. T. (2018). Modified *Ganoderma* Selective Medium to meet Indonesia's government regulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 183, 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/183/1/012020>
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. y Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(2), 82. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- Bahar, A. K. F., Patandjengi, B., Nasruddin, A. y Membalik, V. (2021). Isolation and antagonism of chitinolytic bacteria from *Ipomea pes caprae* against *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022089>
- Bal, C. (2019). Antioxidant and antimicrobial capacities of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 7(1), 5–7. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2019.07.00232>
- Barajas, L. A. (2015). *Efecto Antibacterial del Caldo de Cultivo Sumergido de Ganoderma lucidum en Bacterias Susceptibles y Resistentes a Estreptomicina* [Tesis de pregrado]. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. <https://bit.ly/2YVVVsDv>
- Barrero, L. (2016). *Microbiología clínica*. Síntesis.
- Bell, D. K., Wells, H. D. y Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379–382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Bidegain, M. A. (2017). *Optimización del cultivo de Ganoderma lucidum: evaluación de actividad y desarrollo de nutraceuticos* [Tesis doctoral]. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. <https://bit.ly/2YXhDZs>
- Bivi, M. R., Farhana, M. S. N., Khairulmazmi, A. y Idris, A. (2009). Control of *Ganoderma boninense*: A Causal Agent of Basal Stem Rot Disease in Oil Palm with Endophyte Bacteria *In Vitro*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(6), 833–839. <https://bit.ly/3AUNFma>
- Blanco, L. (2020). *Ganoderma: características, hábitat, usos y especies*. <https://www.lifeder.com/ganoderma/>
- Chandrasekaran, N., Kumar, R. S., Swathi, S., Reddy, P. y Chidambaram, R. (2018). Role of *Ganoderma lucidum* against triazole drugs resistant *Aspergillus* species. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 94(4), 1189–1195. <https://bit.ly/30AJ4Jw>

- Chang, C.-J., Chen, Y.-Y. M., Lu, C.-C., Lin, C.-S., Martel, J., Tsai, S.-H., Ko, Y.-F., Huang, T.-T., Ojcius, D. M., Young, J. D. y Lai, H.-C. (2014). *Ganoderma lucidum* stimulates NK cell cytotoxicity by inducing NKG2D/NCR activation and secretion of perforin and granulysin. *Innate Immunity*, 20(3), 301–311. <https://doi.org/10.1177/1753425913491789>
- Curvelo, L. y Rojas, J. A. (2010). *Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas* [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. <https://bit.ly/3lR91fY>
- Delgado, A., Villegas, M. y Cifuentes, J. (2005). *Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar* (Vol. 1).
- Du, Z., Dong, C.-H., Wang, K. y Yao, Y.-J. (2019). Classification, Biological Characteristics and Cultivations of *Ganoderma*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1181, 15–58. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9867-4_2
- Fernández, R. J. y Suárez, C. L. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín*, 62(1), 4743–4748. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>
- Haddow, W. R. y Haddow, W. H. (1931). Studies in *Ganoderma*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 12(1), 25–46. <https://www.jstor.org/stable/43780579>
- Hapuarachchi, K. K., Karunarathna, S. C., Phengsintham, P., Yang, H. D., Kakumyan, P., Hyde, K. D. y Wen, T. C. (2019). Ganodermataceae (Polyporales): Diversity in Greater Mekong Subregion countries (China, Laos, Myanmar, Thailand and Vietnam). *Mycosphere*, 10(1), 221–309. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/6>
- Jiang, D. (2000). The effects of three fungicides on four types of fungal growth in *Ganoderma lucidum* cultivation. *Acta Phytopylacica Sinica*, 27(3), 287–288. <https://www.cabi.org/ISC/abstract/20003002108>
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E. y López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 4(2), 14–23. <https://bit.ly/3jivxNi>
- Kamble, R., Venkata, S. y Gupte, A. M. (2011). Antimicrobial Activity of *Ganoderma lucidum* Mycelia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 5(2), 1–4. <https://bit.ly/3vnwHvF>
- Lakshmi, B., Ajith, T. A., Jose, N. y Janardhanan, K. 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(2), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.027>

- Loyd, A. L., Barnes, C. W., Held, B. W., Schink, M. J., Smith, M. E., Smith, J. A. y Blanchette, R. A. (2018). Elucidating "lucidum": Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. *PLoS One*, 13(7), e0199738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199738>
- Lubick, N. (2011). Contaminación ambiental - herramientas para rastrear la resistencia a los antibióticos. *Salud Pública De México*, 35(2), 270–276. <https://bit.ly/3DNSq2P>
- Marineros, L., Vega, H. y Bejarano, L. (2015). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en las regiones lenca y chortí del occidente de Honduras. *Bioma*, 35(3), 35–47. <https://bit.ly/3n6SRi3>
- Microgen Ltda. (2021). *Agar Mac Conkey*. Colombia. <https://bit.ly/3aMI7kd>
- Mohanty, P., Harsh, N. y Pnadey, A. (2011). First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from north India based on ITS sequence analysis and micromorphology. *Mycosphere*, 2(4), 469–474. <https://bit.ly/3BQP3r7>
- Montoya, S. (2019). *Evaluación in vitro de la capacidad antagónica de hongos endófitos aislados de Moringa oleífera (L) en el control de Pestalotia palmarum (Q)* [Tesis de pregrado]. Universidad de Santander UDES, Bucaramanga, Colombia. <https://bit.ly/2Z2BGGk>
- Muhsin, T. M., Al-Duboon, A.-H. A. y Kawther, K. T. (2011). Bioactive Compounds from a Polypore Fungus *Ganoderma applanatum* (Per s. ex Wallr.) Pat. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 205–212. <https://bit.ly/2YVW4Jj>
- Niño, F. C. (2010). *Evaluación de metabolitos secundarios del hongo Ganoderma lucidum con actividad antifúngica frente a Fusarium spp. de interés clínico* [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. <https://bit.ly/3jaRv4O>
- Ofodile, L. N. y Bikomo, E. O. (2008). Antibacterial activity of *Ganoderma lucidum* from Nigeria. *Hamdard Medicus*, 51(1), 14–17. <https://bit.ly/3FStg4W>
- Ohno, N., Miura, N. N., Sugawara, N., Tokunaka, K., Kirigaya, N. y Yadomae, T. (1998). Inmunomodulación por extractos de agua caliente y etanol de *Ganoderma lucidum*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 8(4), 174–177. <https://bit.ly/3IRJbIW>
- Orozco-Barocio, A., Islas-Rodriguez, A., Peregrina-Sandoval, J. y Velazquez-Magaña, S. (2017). Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. *Revista De Ciencias De La Salud*, 4(10), 1–12. <https://bit.ly/3BT1G55>
- Palacios, J., Romeu, C., Ramírez, R. y Ortiz, J. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Navisporus floccosus* y *Ganoderma* sp. contra hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 15(2), 123–128. <https://bit.ly/3vplavY>

- Pedroche, F. y Novelo, E. (2020). Pertinencia de la nomenclatura abierta en ficología. *Cymbella*, 6(2), 99–105. <https://bit.ly/3DUwe7j>
- Pérez-Silva, A. (1959). Acción antimicrobiana de algunos antibióticos extraídos de hongos superiores. *Botanical Sciences*(24), 1–13. <https://doi.org/10.17129/botsci.1057>
- Plascencia-Tenorio, R., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H., Ceja-Torres, L., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G. y Angoa-Pérez, V. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre VS. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai*, 8(3), 103–110. <https://bit.ly/3n1NkJE>
- Polanco-Florián, L. G., Alvarado-Gómez, O. G., Olivares-Sáenz, E., González-Garza, R. y Pérez-González, O. (2020). Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 11(5), 1069–1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Reid, W., Mooney, H., Cropper, A., Capistrano, D., Carpenter, S., Chopra, K., Dasgupta, P., Dietz, T., Duraipah, A., Rashid, H., Kaspersen, R., Leemans, R., May, R., McMichael, T., Pingali, P., Samper, C., Scholes, R., Watson, R., Zakri, A. H., . . . Zurek, M. (2005). *Evaluación de los Ecosistemas del Milenio: Informe de Síntesis*. <https://bit.ly/2XmuYtT>
- Rodriguez, K. (2010). *Evaluación de metabolitos de Ganoderma lucidum con actividad antifúngica frente a aislamientos humanos y animales de Aspergillus spp. y dermatófitos* [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. <https://bit.ly/3DTgnGa>
- Rodríguez, J. A., Cantón, R., García, J. E., Gómez-Lus, M. L., Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., Vila, J. y Picazo, J. J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://bit.ly/30uUXAt>
- Ruan-Soto, F. y Ordaz-Velázquez, M. (2016). Aproximaciones a la etnomicología Maya. *Revista Pueblos Y Fronteras Digital*, 10(20), 44–69. <https://doi.org/10.22201/cimsur.18704115e.2015.20.32>
- Sadaf, K., Pandey, A. K. y Sandhu, S. S. (2010). Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. *People's Journal of Scientific Research*, 3(1), 9–14. <https://bit.ly/3FQ7xux>
- Salazar, W. (2014). *Diversidad de los géneros Ganoderma y Amauroderma en el Ecuador* [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. <https://bit.ly/3vpOORx>
- Salgado Ordosgoitia, R. D., Arias Martínez, J. M., Del Acosta Chavez, A. C., Rodríguez-Manrique, J. A. y Pérez Pérez, M. F. (2016). Estudio químico de la fracción de acetato de etilo del hongo *Ganoderma lucidum* cultivado en desechos agroindustriales. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 40(157), 600. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.391>

- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J. y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista De Protección Vegetal*, 33(3), 1–11. <https://bit.ly/2Z62eGL>
- Segovia, L. A. (2017). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico obtenido de Ganoderma lucidum frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Proteus mirabilis* [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. <https://bit.ly/3DPC2iq>
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. E. y Belbahri, L. (2019). Screening for Fusarium Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte Bacillus halotolerans as Plant Warden Against Fusarium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 32–36. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Suárez, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R. y Páez, A. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 10(2), 35–43. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Suárez-Medellín, J., Luna-Rodríguez, M., Mendoza, G., Salinas, A., Suárez, M. y Trigos, Á. (2012). Caracterización morfológica y molecular de una cepa silvestre mexicana perteneciente al género *Ganoderma*. *Revista Mexicana De Micología*, 36, 33–39. <https://bit.ly/3jcdsJM>
- Torres-Torres, M. y Guzmán-Dávalos, L. (2005). Notas sobre la variación morfológica de *Ganoderma curtisii* (Ganodermatales, Ganodermataceae) en México. *Revista Mexicana De Micología*(21), 39–47. <https://bit.ly/3vkzOV7>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. y Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. y Benzie, I. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). En S. Wachtel-Galor y I. Benzie (Eds.), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* (2ª ed.). CRC Press/Taylor & Francis.

Anexos**Anexo A**

Seta del hongo del género Ganoderma sp. (GC - 1)



Encontrado en campus central de Zamorano, 14°00'46.8"N 87°00'12.9"W.

Anexo B

Seta del hongo del género Ganoderma sp. (GC - 2)



Encontrado en campus central de Zamorano, 14°00'44.3"N 87°00'31.4"W:

a) seta en desarrollo.

b) seta madura.

Anexo C

Setas del hongo del género Ganoderma sp. (GC - 3)



Encontrados en campus central de Zamorano:

- ✓ a) seta madura. b) seta en desarrollo (14°00'27.0"N 87°00'26.6")
- ✓ c) seta madura (14°00'14.1"N 86°59'23.4"W)

Anexo D

Seta del hongo del género Ganoderma sp. (GU - 2)

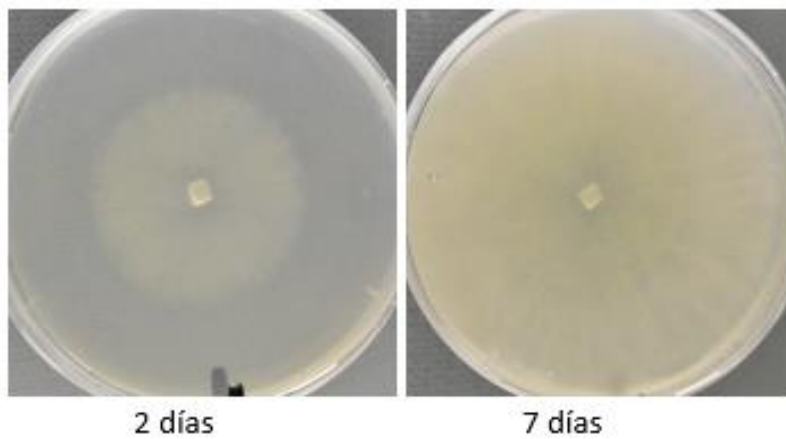


Encontrado en la Reserva Biológica Uyuca, Honduras:

- ✓ Seta madura (2 fotos de arriba).
- ✓ Seta encontrada 5 meses después en el mismo árbol de roble (fotos abajo).

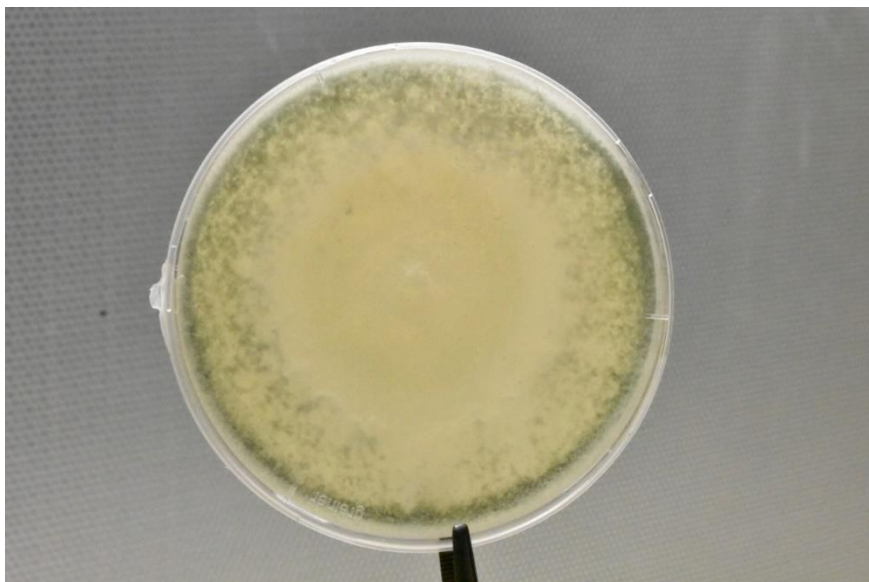
Anexo E

Micelio en PDA de Ganoderma sp. (GU - 2) encontrado en la Reserva Biológica Uyuca, Honduras



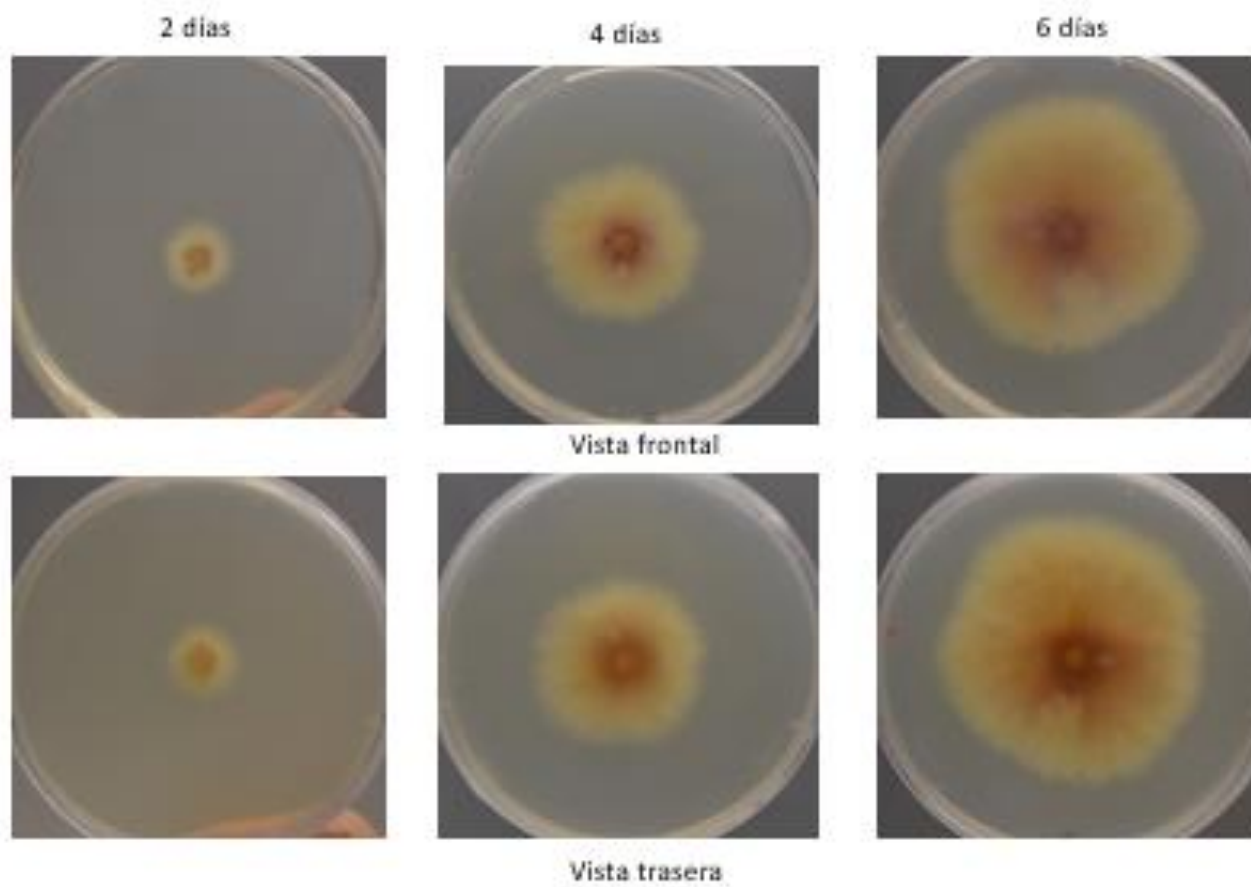
Anexo F

Contaminación por Trichoderma sp. en cultivo de Ganoderma sp.



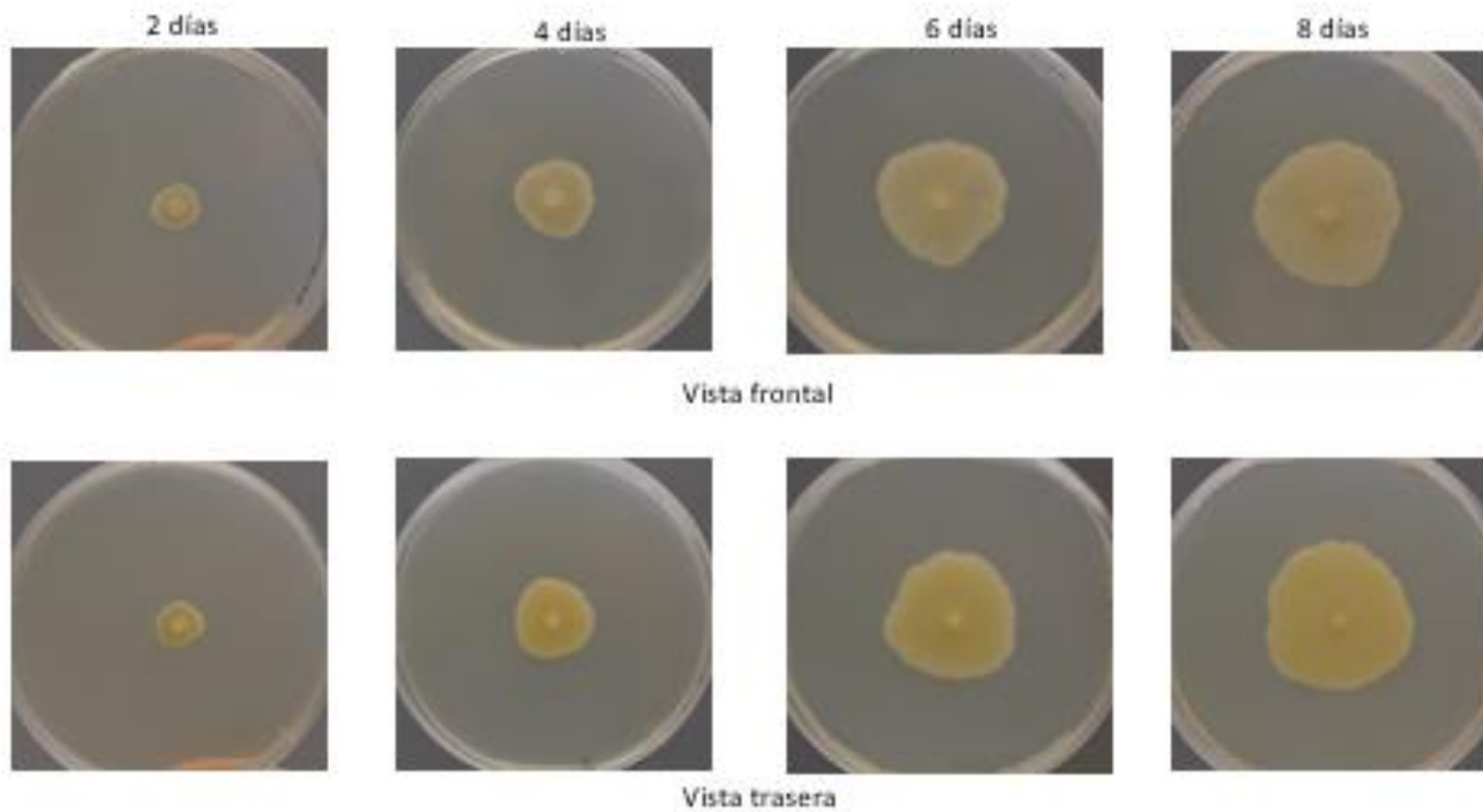
Anexo G

Placa control del hongo fitopatógeno Fusarium sp.



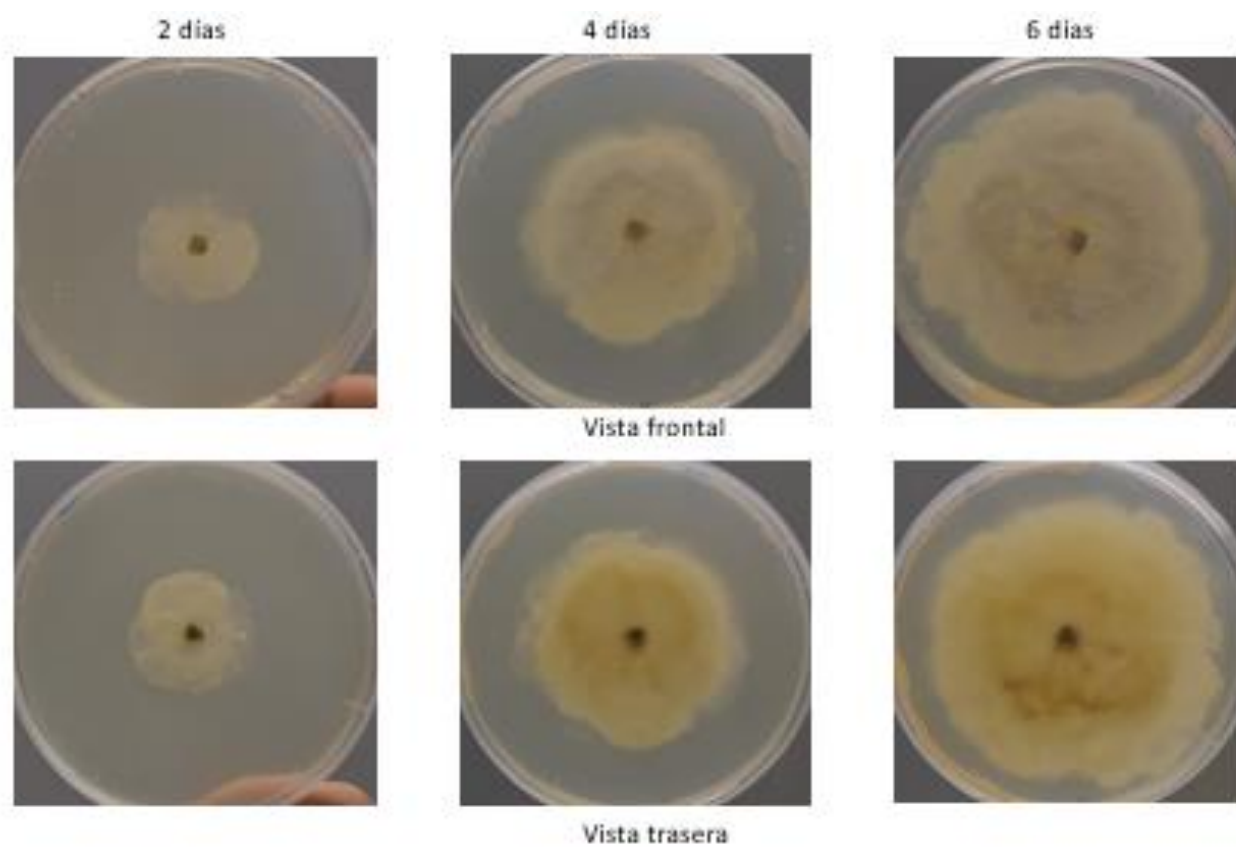
Anexo H

Placa control del hongo fitopatógono Rhizopus sp.



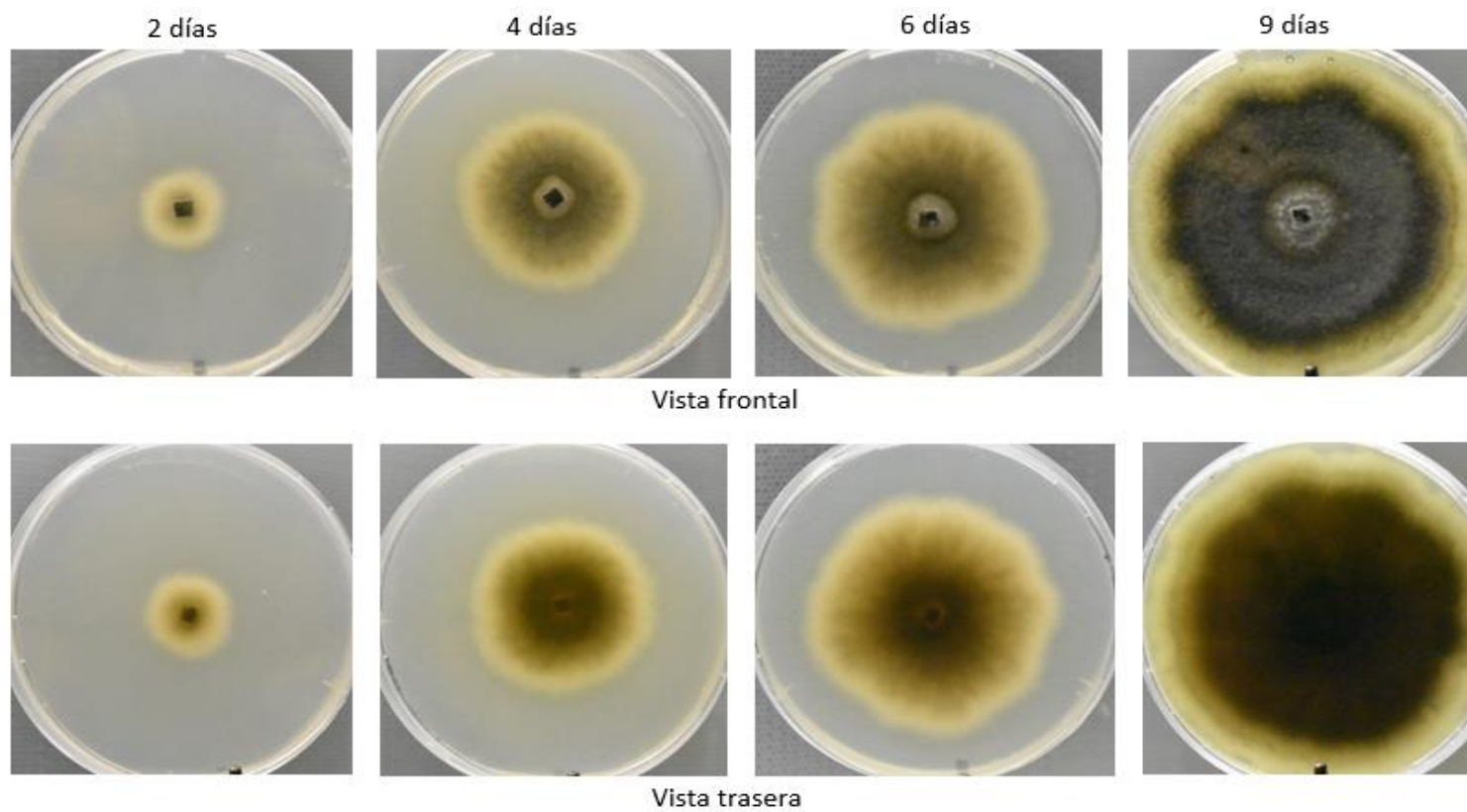
Anexo I

Placa control del hongo fitopatógeno Pestalotia sp.



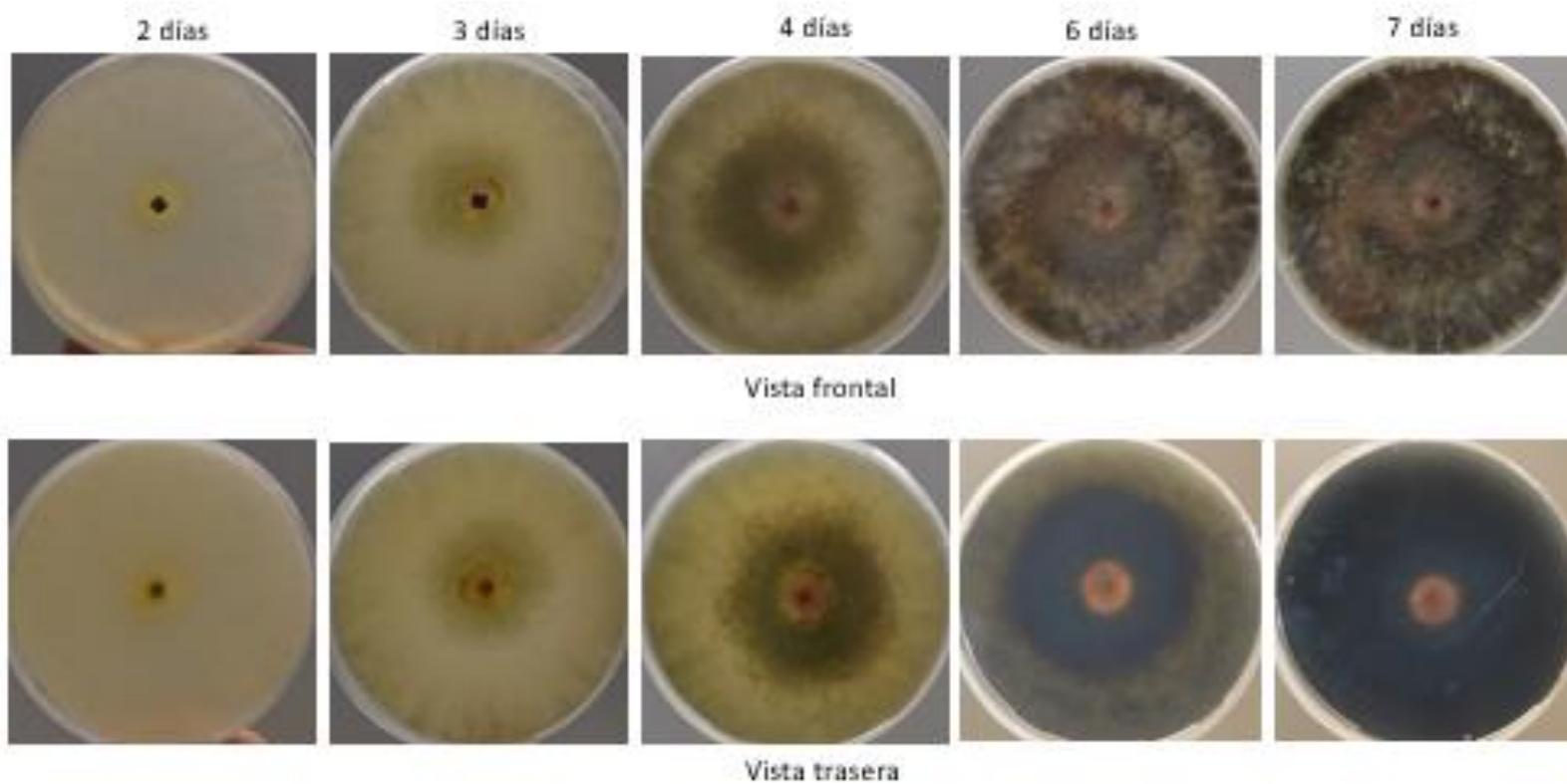
Anexo J

Placa control del hongo fitopatógeno Curvularia sp.



Anexo K

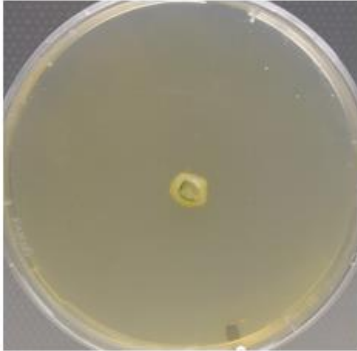
Placa control del hongo fitopatógeno Lasiodiplodia sp.



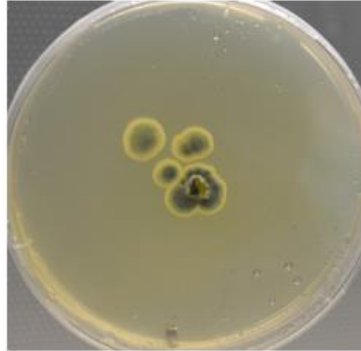
Anexo L

Placa control del hongo fitopatógeno Penicillium sp.

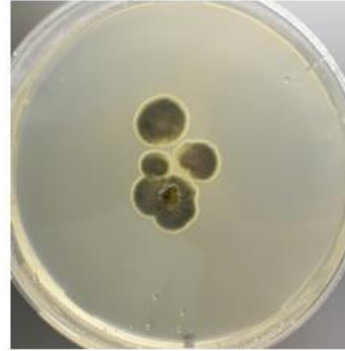
2 días



4 días



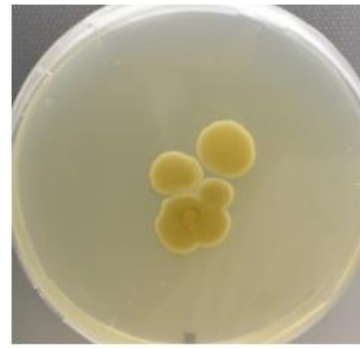
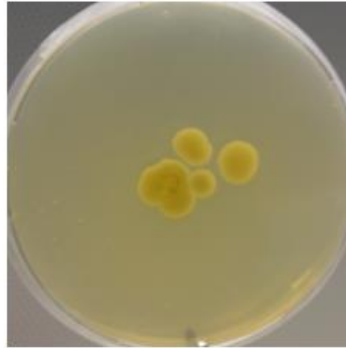
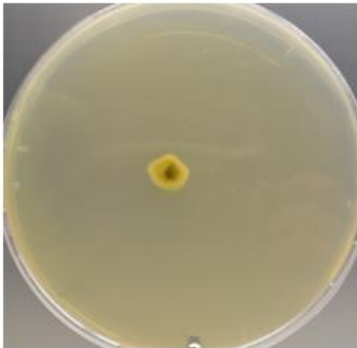
6 días



8 días



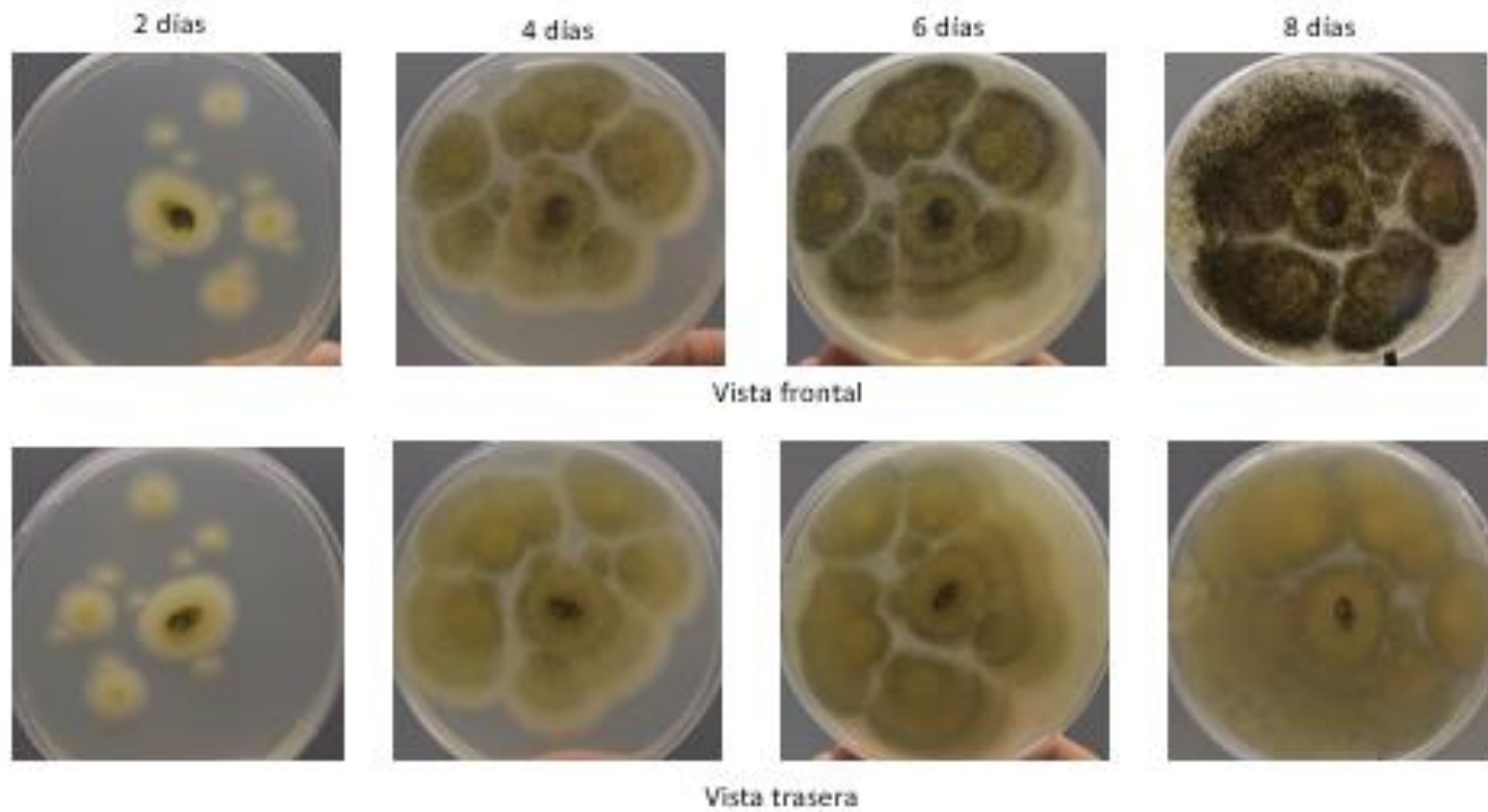
Vista frontal



Vista trasera

Anexo M

Placa control del hongo fitopatógeno Aspergillus sp.



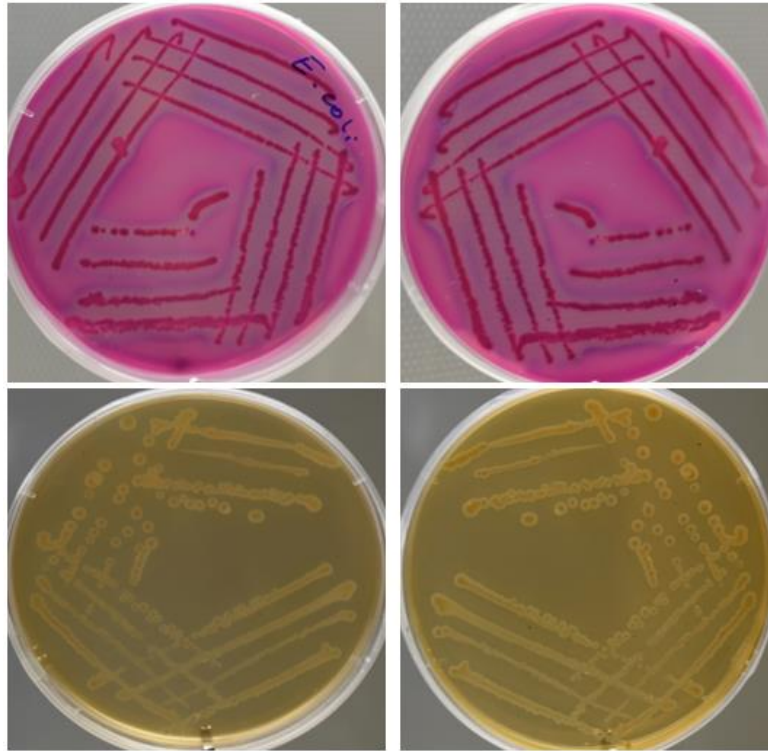
Anexo N

*Variación entre repeticiones de las mediciones de radio (cm) de hongos fitopatógenos en los cultivos
duales*

Fitopatógenos	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Fusarium</i> sp. 1	0.4	0.7	0.9	1.1	1.3	1.4	1	0.5
<i>Fusarium</i> sp. 2	0.3	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.2	0.6
<i>Fusarium</i> sp. 3	0.3	0.7	0.9	1	1.2	1.4	1	0.6
<i>Rhizopus</i> sp. 1	0.4	0.7	0.9	1.1	1.3	1.4	1	0.5
<i>Rhizopus</i> sp. 2	0.3	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.2	0.6
<i>Rhizopus</i> sp. 3	0.3	0.7	0.9	1	1.2	1.4	1	0.6
<i>Pestalotia</i> sp. 1	0.5	1.3	1.8	2.3	2.8	3	3	3
<i>Pestalotia</i> sp. 2	0.5	1.4	2	2.5	2.8	2.9	2.9	2.9
<i>Pestalotia</i> sp. 3	0.4	1.2	2.1	2.4	2.9	3	3.2	3.2
<i>Curvularia</i> sp. 1	0.4	1.1	1.7	2.3	2.5	2.8	2.9	2.9
<i>Curvularia</i> sp. 2	0.4	0.9	1.6	1.9	2.5	2.6	2.6	2.6
<i>Curvularia</i> sp. 3	0.5	1.1	1.9	2.1	2.5	2.8	2.8	2.8
<i>Lasioidiplodia</i> sp. 1	1.4	1.8	3.8	4.1	4.1	4.1	4.1	4.2
<i>Lasioidiplodia</i> sp. 2	1.3	1.7	3.9	3.8	3.9	3.9	4	4
<i>Lasioidiplodia</i> sp. 3	1.3	1.8	3.9	4	4.1	4.1	4.1	4.1
<i>Penicillium</i> sp. 1	0.3	0.4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6
<i>Penicillium</i> sp. 2	0.3	0.5	0.8	0.8	0.9	1.1	1.1	0.9
<i>Penicillium</i> sp. 3	0.3	0.5	0.8	0.9	1.1	1.1	1.1	1.1
<i>Aspergillus</i> sp. 1	0.4	1.3	1.7	1.7	2	2.2	2.2	2.3
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0.4	1.3	2	2.5	3.1	3.1	3.3	3.4
<i>Aspergillus</i> sp. 3	0.4	1.3	2.1	2.4	3.1	3.2	3.5	3.5

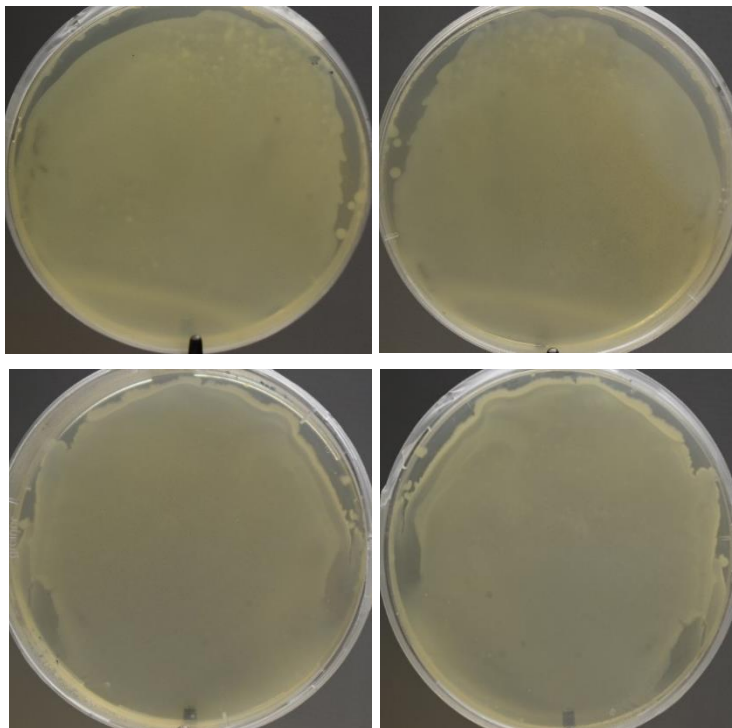
Anexo O

Bacterias en medio MacConkey: Escherichia coli (arriba) y Salmonella typhimurium (abajo)



Anexo P

Bacterias en medio Agar Nutriente: Escherichia coli (arriba) y Salmonella typhimurium (abajo)



Anexo Q

Variación entre repeticiones de las mediciones del halo de inhibición (cm) al enfrentar Salmonella typhimurium contra extracto etanólico al 50% de Ganoderma sp.

Bacteria	Halo de inhibición (cm)
<i>S. typhimurium</i> 1	1.6
<i>S. typhimurium</i> 2	1.2
<i>S. typhimurium</i> 3	1.3
<i>S. typhimurium</i> 4	1.3
<i>S. typhimurium</i> 5	0.9