

Viabilidad de cepas nativas de ambientes áridos de *Ganoderma* spp. bajo diferentes condiciones de conservación

Viability of native strains from arid environments of *Ganoderma* spp. under different conservation conditions

Alfonso Sánchez, Agustín Rascón, Georgina Vargas, Martín Esqueda

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas 46, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Antecedentes: Uno de los principales retos para preservar el germoplasma de macromicetos es conservar la viabilidad de las cepas. Algunas especies de *Ganoderma* son sensibles al frío y al conservarlas a temperatura ambiente envejecen y mueren en un periodo corto.

Objetivo: Evaluar diferentes condiciones de conservación de germoplasma de especies de *Ganoderma*, provenientes de ambientes áridos para mantener la viabilidad de las cepas.

Métodos: El micelio creció en semilla de trigo y se colocó en los siguientes tratamientos: aceite mineral, liofilización, -20 y -80 °C. Para conocer la viabilidad del micelio, después de uno, seis y 22 meses, las semillas de trigo con micelio se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo de agar con extracto de malta (EMA) e incubaron a 25 °C, midiéndose el tiempo y porcentaje de recuperación de la cepa, así como su velocidad de crecimiento.

Resultados y conclusiones: A los seis meses el mejor comportamiento de todas las cepas fue en aceite mineral. Después de 22 meses de almacenamiento a -80 °C, se recuperó el 100 % de las especies evaluadas, en su mayoría con porcentajes de viabilidad entre 70 y 100 %, y velocidad de crecimiento entre 5.9 y 12.7 mm d⁻¹.

Palabras clave: reishi, aceite mineral, liofilización, criopreservación

ABSTRACT

Background: One of the main challenges in preserving macromycetes germplasm is to maintain the viability of the strains. Some *Ganoderma* species are sensitive to cold and when kept at room temperature, they age and die within a short period.

Objective: Evaluate different conditions of conservation of germplasm of *Ganoderma* species, coming from arid environment to maintain the viability of the strains.

Methods: Mycelium was grown in wheat seed and placed in the following treatments: mineral oil, lyophilization, -20 and -80 °C. To know the viability of mycelium, after one, six, and 22 months, wheat seeds with mycelium were placed in Petri dishes with malt extract agar (EMA) culture medium and incubated at 25 °C, measuring the time and percentage of strain recovery, as well as its growth rate.

Results and conclusions: At six months the best performance of all the strains was in mineral oil. After 22 months of storage at -80 °C, 100 % of the evaluated species were recovered, mostly with viability percentages between 70 and 100 %, and growth rate between 5.9 and 12.7 mm d⁻¹.

Keywords: reishi, mineral oil, lyophilization, cryopreservation

ARTICLE HISTORY

Received 05 August 2020 / Accepted 04 November 2020

Published on line: 18 November 2020

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Alfonso Sánchez, asanchez@ciad.mx

ORCID: 0000-0002-0339-3677

INTRODUCCIÓN

El desarrollo biotecnológico permite el aprovechamiento de las propiedades de microorganismos y un paso fundamental es su conservación *ex situ*, con la finalidad de preservar sus características por periodos prolongados de tiempo, para lograr su utilización en procesos como certificación, investigación, docencia, asesoría, transferencia de conocimiento científico y tecnológico al sector público y privado (Gutiérrez et al., 2017). La preservación de la mayoría de los basidiomicetos se dificulta porque no forman estructuras de resistencia en medios de cultivos puros (Linde et al., 2018) y su conservación se realiza comúnmente por transferencia continua del micelio a un medio de cultivo específico para cada especie o mediante criopreservación en nitrógeno líquido (Voyron et al., 2009). Las desventajas del primer método son el procedimiento intensivo, el riesgo de contaminación y la pérdida de las características fisiológicas y morfológicas del germoplasma (Voyron et al., 2009). El segundo método es costoso porque requiere de equipo especializado y el suministro regular de nitrógeno líquido (Maia et al., 2012). Por ello, resulta poco viable para instituciones con bajo presupuesto.

La liofilización se ha utilizado también para la preservación de microorganismos. Sin embargo, esta técnica tiende a ser más costosa porque el proceso además de laborioso, requiere un equipo especializado. La productividad, las características morfológicas y la actividad farmacológica de los basidiomicetos puede reducirse según la técnica de preservación utilizada (Linde et al., 2018). En el caso del género *Ganoderma*, además de los inconvenientes antes mencionados, algunas de sus especies son sensibles al frío, por lo que su conservación debe realizarse a temperatura de laboratorio, por lo cual su micelio envejece y muere en lapsos cortos.

Ganoderma lucidum s.l. se ha utilizado en la medicina asiática tradicional, debido a sus propiedades medicinales para potenciar el sistema inmune, regular la hipertensión, artritis, asma, anorexia, gastritis, hepatitis, problemas vasculares, cáncer y otros padecimientos (Henricke et al., 2016; Liang et al., 2019). Para este género se han registrado alrededor de 400 compuestos bioactivos; recientemente, Liang et al. (2019) reportaron para *G. lucidum* las estructuras de 83 ácidos ganodéricos y ácidos de lucidimol, provenientes de micelio, esporas y basidiomas. El cultivo de *Ganoderma* genera

a nivel mundial una derrama económica entre cinco y seis billones de dólares (Trigos y Suárez, 2011). Debido a todo lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar diferentes condiciones de conservación para mantener la viabilidad de seis especies de *Ganoderma*, recolectadas en ambientes áridos del estado de Sonora, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies

Se evaluaron seis especies de *Ganoderma*: *G. curtisii* (Berk.) Murrill, *G. oerstedii* (Fr.) Torrend, *G. sessile* Murrill *sensu* Gottlieb and Wright (1999), *G. sessiliforme* Murrill, *G. subincrustatum* Murrill *sensu* Gottlieb and Wright (1999) y *G. weberianum* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert, las cuales se recolectaron en diferentes localidades del estado de Sonora, México (Tabla 1). Los basidiomas están depositados en la Colección de Macromicetos de la Universidad Estatal de Sonora, mientras que las cepas en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., conservándose mediante resiembras continuas en agar con extracto de malta (EMA), las especies resistentes a 4 °C y las sensibles a bajas temperaturas a 25 °C.

Inóculo y tratamientos

El micelio de las cepas creció en cajas Petri con EMA. El inóculo se preparó con semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) de acuerdo con el protocolo de Gaitán-Hernández et al. (2006); posteriormente se inocularon con cuatro discos de EMA de 0.5 cm de diámetro, los cuales se tomaron del crecimiento activo de los micelios de *Ganoderma*. Las bolsas de trigo inoculadas se incubaron a 25 ± 2 °C en oscuridad por 7 a 10 d. Se tomaron 50 semillas completamente colonizadas por el micelio de las cepas y se colocaron en viales de policarbonato de 5 mL previamente esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente se sometieron a los tratamientos de conservación: T1= aceite mineral, los viales con semillas se aforaron con aceite mineral estéril (15 min a 121 °C); T2= liofilización, T3= -20 °C y T4= -80 °C; como testigo se utilizó el micelio sin congelar, conservado a 4 y 25 °C, con resiembras continuas. Los tratamientos T2, T3 y T4 se congelaron previamente con nitrógeno líquido, sin ningún agente crioprotector. Los tratamientos T1 y T2 se mantuvieron a temperatura del laboratorio (25 ± 2 °C).

TABLA 1. Origen, hospedero, número de herbario y cepario de *Ganoderma* spp. recolectadas en Sonora

Especies	Origen	No. de herbario UES	No. del cepario
<i>Ganoderma curtisii</i> *	Sierra San Javier; raíz de <i>Quercus</i> sp.	10402	BH-22
<i>G. oerstedii</i> *	Pueblo de Álamos; en la base de pitaya: <i>Stenocereus thurberi</i>	10419	BH-17
<i>G. sessile</i>	Sierra Mazatán (Ures); base del tallo de <i>Quercus</i> sp.	10405	BH-14
<i>G. sessiliforme</i>	Sierra Mazatán (Ures); base del tallo de <i>Quercus</i> sp.	10408	BH-12
<i>G. subincrustatum</i> *	La Costa de Hermosillo; base del tallo de <i>Prunus persica</i>	10501, 10502, 10503	BH-1
<i>G. weberianum</i>	Sierra Mazatán (Ures); base del tallo de <i>Quercus</i> sp.	10415, 10417	BH-21

Todas las especies se recolectaron entre agosto y septiembre de 2012. * Especies sensibles a bajas temperaturas.

Viabilidad

Después de 1, 6 y 22 meses de almacenamiento, los viales fueron removidos de sus tratamientos. Las semillas de T1 se colocaron sobre papel estéril para remover el exceso de aceite mineral, las semillas de T2 se utilizaron directamente, mientras que los viales de los tratamientos T3 y T4 se colocaron por 10 min en baño maría a 30 °C para su descongelación (Mata y Savoie, 2013). Posteriormente, se colocaron por duplicado, 20 semillas en una caja de Petri de 8 cm de diámetro con medio de cultivo EMA y se incubaron a 25 ± 2 °C en oscuridad. Se consideró como viable, cuando bajo el microscopio estereoscópico, se observó crecimiento micelial sobre la semilla (Gutiérrez et al., 2017); se cuantificó el tiempo de recuperación (TR) en d y el porcentaje de recuperación (PR) de las especies, la cual se determinó multiplicando × 100 los taxones recuperados entre el número total. El porcentaje de viabilidad (PV) se cuantificó multiplicando × 100 las semillas que mostraron crecimiento micelial entre el número total de semillas. Se consideraron viables los tratamientos con un crecimiento ≥ 70 % y la velocidad de crecimiento del micelio (VC), se calculó con el tiempo requerido para llenar la caja Petri de 80 mm de diámetro (Mata y Savoie, 2013).

Crecimiento micelial

El crecimiento micelial por especie evaluada, se determinó colocando una semilla de cada tratamiento en el centro de la caja Petri con EMA, incubada en la oscuridad a 25 ± 2 °C. Se midió diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares con un vernier digital Truper Modelo CALDI-6MP, por un periodo de 15 d.

Análisis descriptivo

Los resultados del comportamiento de las seis especies de *Ganoderma* en los cuatro tratamientos y tres periodos de conservación se describen para cada una de las variables analizadas con base en los estudios de Voyron et al. (2009) y Eichlerová y Homolka (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de recuperación

En el tratamiento control, el tiempo de recuperación (TR) en la mayoría de las especies rescatadas fue de dos días (Tabla 2); *G. oerstedii* y *G. sessiliforme* resultaron las más precoces, necesitaron sólo un día para recuperarse. Después de un mes en almacenamiento, el TR varió entre especies y tratamientos. Los TR más cortos se lograron a -80 °C (T4) y en aceite mineral (T1) con 1.6 y 2.2 d, respectivamente; mientras que los más prolongados, liofilización (T2) y -20 °C (T3) con 3.7 y 4.6 d, respectivamente.

Después de seis meses de almacenamiento, los TR se prolongaron con respecto a los 30 d de almacenamiento. En T1 y T4, los TR micelial se incrementaron 0.4 y 1.0 d, respectivamente. En T2 y T3 se observó un comportamiento disímil, recuperándose la totalidad de las especies, lo cual no ocurrió a los 30 d. El TR en T2 demoró 0.1 d más y en T3, el TR fue 1.4 d más rápido con respecto a 30 d de almacenamiento. En todos los tratamientos a los 22 meses de preservación se incrementó el TR comparado con seis meses. El TR a los 22 meses fue de 3.3 (T4), 4 (T3), 3 (T1) y 5 d (T2). El TR del micelio se incrementó conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento en todas las especies y tratamientos evaluados. Probablemente sea inherente a la especie, tiempo de almacenamiento, calidad

del micelio y método de conservación. Mata y Savoie (2013) reportaron que el TR de 20 cepas de *Agaricus* osciló entre 2 y 3 d, cuando utilizaron sorgo como medio para crioconservación. Colauto et al. (2012) registraron nueve días en TR de micelio de *Agaricus blazei* con arroz integral en la criopreservación. El ADN del micelio de *Ganoderma* multiplicado en semilla de trigo y crioconservado se observó más estable, comparado con medios sintéticos (Singh et al., 2004; Veena y Meera, 2010).

Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación (PR) de las especies, después de 30 d de almacenamiento fue de 100 % en los tratamientos de T4 y T1; en T3 el 83.3 %, sin recuperación de *G. subincrustatum*, y en T2 el 50 %, con pérdida de *G. curtisii*, *G. sessiliforme* y *G. subincrustatum*. El PR no se afectó después de seis meses de almacenamiento en los tratamientos de T4 y T1 (100 %), mientras que en T2 y T3 su comportamiento no fue claro, ya que se recuperó el 100 % de las especies, pero no a los 30 d. A los 22 meses en los tratamientos de T3 y T4, la recuperación de las especies fue del 100 %, mientras que en T1 y T2 del 33.3 %. En T1 se recuperó *G. curtisii* y *G. oerstedii*, mientras que en T2, *G. curtisii* y *G. sessile*. El porcentaje de viabilidad varió entre los cuatro tratamientos. La pérdida del 66.6 % de las especies en T1, probablemente se debió a que después de 22 meses, la semilla de trigo perdió el cotiledón y la estructura, haciéndose blanda y con alto grado de hidratación.

Para solventar este inconveniente se propone el uso de perlita (Sato et al., 2012; Eichlerová y Homolka, 2014), material volcánico e inerte formado de aluminosilicatos, que capta y retiene grandes cantidades de agua. Este material protege a la hifa del hongo, durante el proceso de crioconservación. Palacio et al. (2014) reportaron que a -20 °C sólo recuperaron cepas a los 30 d de almacenamiento, lo cual se debió al daño celular por la cantidad de cristales de hielo formado durante el congelamiento y descongelamiento del micelio de *A. blazei*, *G. lucidum*, *Grifola frondosa* y *Pleurotus pulmonarius*. En el presente estudio se recuperó el 100 % de las especies evaluadas a los seis y 22 meses de almacenamiento. Esto probablemente se deba a la concentración del citoplasma y composición de la pared celular de *Ganoderma*, ya que la cantidad de agua libre en la célula y rigidez-elasticidad de la

pared celular, la cual está dada por la concentración de quitina y glucanos, permite la adaptación del micelio a la congelación (Colauto et al., 2012).

Palacio et al. (2014) no recuperaron cepas liofilizadas después de 12 meses de almacenamiento. Estos autores citan que la liofilización es una técnica en la que se deben seguir varias condiciones específicas y largos procesos de estandarización, para lograr buenos resultados en la recuperación del micelio y sin efectos colaterales. En el presente estudio se recuperó el 33.3 % de las especies evaluadas después de 22 meses de almacenamiento.

Porcentaje de viabilidad

En la Tabla 2, se puede observar el porcentaje de viabilidad (PV) del micelio. Después de un mes de almacenamiento el PV fue de 100 % en todas las especies en los tratamientos de T4 y T1. En T2 fue de 100 % en *G. oerstedii* y *G. sessile*; sin embargo, esta variable se redujo al 12.5 % en *G. weberianum* y 0 % en el resto de las especies. El tratamiento T3 logró buenos resultados en *G. oerstedii* y *G. sessile*, con 100 y 95 % de viabilidad respectivamente; sin embargo, el PV fue bajo en *G. weberianum* (12.5 %) y *G. sessiliforme* (7.5 %), y nulo en *G. curtisii* y *G. subincrustatum*.

Después de seis meses de conservación, el PV no sufrió cambios en ninguna de las especies evaluadas en los tratamientos de T4 y T1, con un 100 %. Para T2, el PV fluctuó entre 20 y 55 % en *G. oerstedii* y *G. subincrustatum* respectivamente; sin embargo, se recuperó el 100 % de las especies evaluadas. Estos valores indican el potencial del método para la conservación de estas especies. En T3 se comportaron mejor *G. oerstedii* y *G. sessile*, con 100 y 85 % de viabilidad respectivamente, mientras que el resto osciló entre 25 (*G. curtisii* y *G. sessiliforme*) y 55.5 % (*G. subincrustatum*).

A los 22 meses de almacenamiento en T1, el PV se mantuvo en 100 % en las especies *G. curtisii* y *G. oerstedii*, mientras que las otras especies perdieron viabilidad. El tratamiento T4 presentó los mejores resultados de PV, con 100 % en *G. oerstedii*, *G. sessile* y *G. weberianum*, 85 % en *G. subincrustatum*, 70 % en *G. sessiliforme* y 28.3 % en *G. curtisii*. En T2, únicamente se recuperaron *G. curtisii* y *G. sessile* con 10.7 y 2.5 % de viabilidad respectivamente.

A -20 °C se recuperó el 100 % de las especies; sin embargo, todas presentaron un PV bajo de 6.3 (*G.*

subincrustatum) hasta 40 % (*G. oerstedii*). No obstante, estos valores son superiores a los reportados por Linde et al. (2018), quienes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ obtuvieron una recuperación baja de los basidiomicetos, con una viabilidad micelial promedio del 7.5 % y concluyeron que la criopreservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, no es una técnica viable para mantener el germoplasma de macromicetos. Varios factores afectan a la criopreservación de los basidiomicetos a esta temperatura como son la especie, la fase de crecimiento, el sustrato, las condiciones de cultivo, el crioprotector, entre otros (Linde et al., 2018).

La liofilización es la manera más utilizada de conservación de hongos después de la criopreservación; sin embargo, no funciona en la mayoría de los basidiomicetos que no esporulan. El micelio constituido básicamente de agua y sensible a las condiciones ambientales, en la mayoría de los casos no sobrevive al proceso de rehidratación (Homolka, 2014). La conservación en aceite mineral se recomienda para especies que resisten la liofilización, lo cual no es viable en la mayoría de los basidiomicetos. La principal desventaja de este método es que el hongo continúa su crecimiento aún bajo condiciones adversas, lo que podría ocasionar mutaciones (Homolka, 2014).

Con respecto a la pérdida de viabilidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el presente estudio, probablemente se deba a la expansión y ruptura de los organelos durante la formación de cristales de hielo en el proceso de ganancia de calor, al pasar la temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al respecto, Homolka (2014) cita que de manera general la temperatura de conservación de cultivos fúngicos entre -15 y $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, no se recomienda. El análisis de la viabilidad micelial en basidiomicetos criopreservados, continúa siendo la principal y más importante forma de verificar la eficacia de los métodos de preservación.

Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento (VC) del micelio estuvo influenciada por las especies y los tratamientos (Tabla 3). En el control, la mayor VC se registró en *G. subincrustatum* con 11.6 mm d^{-1} , seguida de *G. oerstedii* con 9.6 mm d^{-1} , el resto de las especies mostraron una VC menor y similar entre ellas; *G. weberianum*, *G. curtisii*, *G. sessile* y *G. sessiliforme* con 8.9, 8.8, 8.6 y 8.4 mm d^{-1} , respectivamente. Después de un mes de almacenamiento, aunque la mayoría de las especies redujeron

su VC, *G. curtisii* en T1, *G. oerstedii* a -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y *G. sessile* en T1, -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, presentaron una VC más alta.

Después de seis meses de almacenamiento disminuyó la VC, según la especie y tratamiento. En T1, la VC se redujo entre 9.1 y 44.7 % en *G. subincrustatum* y *G. curtisii* respectivamente, mientras que en T4 entre 1.3 en *G. oerstedii* y 50 % en *G. sessiliforme*. La reducción de VC en T2 y T3 no se determinaron debido a que el PV resultó $<70\%$. Después de 22 meses de almacenamiento en T1, *G. curtisii* fue la única especie que se recuperó con una VC de 10.5 mm d^{-1} . En T4 se recuperaron cinco de las seis especies evaluadas (83 %) y de éstas, todas experimentaron una VC mayor a la registrada a los seis meses de almacenamiento. *Ganoderma sessiliforme* y *G. sessile* mostraron el mayor incremento en VC con 39.2 y 33.7 %, valores intermedios en *G. subincrustatum* (26 %) y *G. weberianum* (20 %), y el menor en *G. oerstedii* con 12.5 %. Eichlerová y Homolka (2014), establecieron que uno de los criterios principales para definir el éxito de un método de conservación en hongos, es la habilidad de mantener el crecimiento micelial original. Estos mismos autores recomendaron para los basidiomicetos, el tratamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un precongelado lento.

Después de un año a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, Eichlerová y Homolka (2014) obtuvieron crecimientos de 3.6 y 4.6 mm d^{-1} para *Ganoderma carnosum* y *G. lucidum* respectivamente, al utilizar perlita como inóculo. En el presente estudio se obtuvo una mayor VC comparada con la de estos autores, entre 5.9 y 12.7 mm d^{-1} con un congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Estas diferencias en la VC, probablemente sean inherentes a la especie, así como a los nutrientes de la semilla de trigo vs. perlita. En general, el crecimiento del micelio es más lento después de la criopreservación (Homolka et al., 2010).

Finalmente, por medio de una resiembra se realizó una reactivación de las especies recuperadas del tratamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, después de 22 meses en almacenamiento. El micelio se inoculó nuevamente en cajas Petri con EMA y se midió su VC. Contrario a lo esperado, la mayoría de las especies llenaron la caja Petri en menor tiempo vs. testigos; opuestamente, *G. sessiliforme* y *G. subincrustatum* requirieron 4.5 y 1.1 d más que sus testigos, respectivamente. Homolka et al. (2010) observaron también estas diferencias entre los micelios recién descongelados y los reactivados.

TABLA 2. Tiempo de recuperación y porcentaje de viabilidad de *Ganoderma* spp. bajo diferentes tratamientos de conservación

Especie/ Tratamiento	Tiempo de recuperación (días)			Porcentaje de viabilidad		
	1m **	6m	22m	1m	6m	22m
<i>G. curtisii</i> *						
Control	2	2	2	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	2	3	4	100.0	100.0	100.0
Liofilizado	NR	3	5	NR	32.5	10.7
- 20 °C	8	3	5	7.5	25.0	9.3
- 80 °C	2	5	5	100.0	100.0	28.3
<i>G. oerstedii</i> *						
Control	1	1	1	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	4	2	2	100.0	100.0	100.0
Liofilizado	2	5	NR	100.0	20.0	NR
- 20 °C	1	3	3	100.0	100.0	40.0
- 80 °C	1	1	1	100.0	100.0	100.0
<i>G. sessile</i>						
Control	2	2	2	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	1	4	NR	100.0	100.0	NR
Liofilizado	4	3	5	100.0	42.5	2.5
- 20 °C	4	4	5	100.0	85.0	10.0
- 80 °C	1	2	2	100.0	100.0	100.0
<i>G. sessiliforme</i>						
Control	1	1	1	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	2	4	NR	100.0	100.0	NR
Liofilizado	NR	4	NR	NR	30.0	NR
- 20 °C	8	3	4	12.5	25.0	18.0
- 80 °C	1	2	5	100.0	100.0	70.0
<i>G. subincrustatum</i> *						
Control	2	2	2	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	2	2	NR	100.0	100.0	NR
Liofilizado	NR	5	NR	NR	55.0	NR
- 20 °C	NR	3	4	NR	52.5	6.3
- 80 °C	3	3	4	100.0	100.0	85.0
<i>G. weberianum</i>						
Control	2	2	2	100.0	100.0	100.0
Aceite mineral	2	2	NR	100.0	100.0	NR
Liofilizado	5	3	NR	12.5	35.0	NR
- 20 °C	2	3	3	95.0	42.5	15.0
- 80 °C	2	3	3	100.0	100.0	100.0

* Especies sensibles a bajas temperaturas; ** Meses de almacenamiento; NR= No recuperado.

TABLA 3. Velocidad de crecimiento de *Ganoderma* spp. bajo diferentes tratamientos de preservación

Especie/ Tratamiento	Velocidad de crecimiento (mm d-1)		
	1m**	6m	22m
<i>G. curtisii</i> *			
Control	8.8	8.8	8.8
Aceite mineral	9.4	6.5	10.5
Liofilizado	NR	ND	ND
- 20 °C	ND	ND	ND
- 80 °C	6.6	5.8	ND
<i>G. oerstedii</i> *			
Control	9.6	9.6	9.6
Aceite mineral	9.5	10.0	11.4
Liofilizado	9.0	ND	ND
- 20 °C	10.1	9.6	ND
- 80 °C	10.1	10.0	11.4
<i>G. sessile</i>			
Control	8.6	8.6	8.6
Aceite mineral	10.4	7.8	ND
Liofilizado	8.1	ND	ND
- 20 °C	8.7	5.8	ND
- 80 °C	10.1	8.4	12.7
<i>G. sessiliforme</i>			
Control	8.4	8.4	8.4
Aceite mineral	5.5	3.9	ND
Liofilizado	NR	ND	ND
- 20 °C	ND	ND	ND
- 80 °C	5.4	3.6	5.9
<i>G. subincrustatum</i> *			
Control	11.6	11.6	11.6
Aceite mineral	9.1	8.3	ND
Liofilizado	NR	ND	ND
- 20 °C	DR	ND	ND
- 80 °C	7.8	5.2	7.1
<i>G. weberianum</i>			
Control	8.9	8.9	8.9
Aceite mineral	9.5	11.0	ND
Liofilizado	6.7	ND	ND
- 20 °C	6.3	ND	5.3
- 80 °C	8.4	8.7	11.0

* Especies sensibles a bajas temperaturas; ** Meses de almacenamiento: NR= No recuperado; ND= No Determinado.

CONCLUSIONES

El micelio de todas las especies de *Ganoderma* evaluadas en el presente estudio e inoculadas en semilla de trigo, son capaces de resistir el choque de temperatura producido por el nitrógeno líquido, así como los cambios subsecuentes de temperatura de -196 a -20 y -80 °C. El método de conservación del micelio con la liofilización y el aceite mineral son factibles durante seis meses, mientras que la criopreservación a -80 °C es más eficiente a los 22 meses con altos porcentajes de viabilidad. Este es el primer reporte de criopreservación de cepas nativas sonorenses de *Ganoderma*, en las cuales será importante evaluar su estabilidad genética mediante marcadores moleculares cuando se preservan por periodos prolongados a -80 °C.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Aldo Gutiérrez por el formateo del manuscrito y el proyecto de Ciencia Básica CONACyT A1-S-34237 por el financiamiento de nuestros estudios sobre cepas nativas de *Ganoderma* spp.

LITERATURA CITADA

- Colauto, N.B., F.A. Cordeiro, KV Navarro, T. Gomes de Lima, A.D. Lopes, R.A. Ribeiro, F. de Brito Roratto, H.S. Tanaka, L.L. Zaghi Jr., G.A. Linde. 2012. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. *Annals of Microbiology* 62: 871-876. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0368-5>
- Eichlerová, I., L. Homolka, 2014. Preservation of basidiomycete strains on perlite using different protocols. *Mycoscience* 55: 439-448. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.01.006>
- Gaitán-Hernández, R., M. Esqueda, A. Gutiérrez, A. Sánchez, M. Beltrán-García, G. Mata, 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 432-439. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0241-1>
- Gottlieb, A.M., J.E. Wright, 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103: 661-673. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007941>
- Gutiérrez, A.C., J. Tornesello-Galván, R.G. Manfrino, M. Hipperdingler, M. Falvo, C. D'Alessandro, C.C. López, 2017. Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.007>
- Hennicke, F., Z. Cheikh-Ali, T. Liebisch, J.G. Maciá-Vicente, H.B. Bode, M. Piepenbring, 2016. Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and

- triterpenic acid profiles. *Phytochemistry* 127: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.03.012>
- Homolka, L., 2014. Preservation of live culture of basidiomycetes - recent methods. *Fungal Biology* 118: 107-125. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Homolka, L., L. Lisá, I. Eichlerová, V. Valásková, P. Baldrian, 2010. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal Biology* 114: 929-935. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.009>
- Liang, C., D Tian, Y. Liu, H. Li, J. Zhu, M. Li, M. Xin, J. Xia, 2019. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *European Journal of Medicinal Chemistry* 174: 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.039>
- Linde, G.A., A. Luciani, A.D. Lopes, J.S.D. Valle, N.B. Colauto, 2018. Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.004>
- Maia, S.C., R.C.C. Toledo, A.P.M.M., Almeida, R. da Silva, D.L. Rinker, E.S. Dias, 2012. Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 2411-2416. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1050-1>
- Mata, G., J.M. Savoie, 2013. Preservation of *Agaricus subrufescens* strains at low temperature by using cultures on sorghum grains. *Revista Iberoamericana de Micología* 30: 96-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2012.10.002>
- Palacio, A., Y. Gutiérrez, D. Rojas, L. Atehortúa, P. Zapata, 2014. Viability of basidiomycete fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. *Actualidades Biológicas* 36(100): 13-21.
- Sato, M., J. Sukenobe, A. Nakagiri, 2012. Cryopreservation of cryo-sensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *Cryo Letters* 33: 86-94.
- Singh, S.K., R.C. Upadhyay, S. Kamal, M. Tiwari, 2004. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *Cryo Letters* 25: 23-32.
- Trigos, Á., J. Suárez, 2011. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología* 34: 63-83.
- Veena, S.S., P. Meera, 2010. A simple method for culture conservation of some commercial mushrooms. *Mycosphere* 1: 191-194.
- Voyron, S., S. Roussel, F. Munaut, G.C. Varese, M. Ginepro, S. Declerck, V.F. Marchisio, 2009. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research* 113: 1027-1038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>