

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

**“Productividad y actividad antioxidante de cepas silvestres,
reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor*”**

Tesis para obtener el título de:
M. en C.: Productos Naturales y Alimentos

Presenta

I.A. Magdalena Paz Oropeza Guerrero

Directora

Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza

Co-Directora

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Febrero de 2017

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, UTM, bajo la dirección de la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y la co-dirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez. Se contó con el apoyo de una beca de manutención, número 672314, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en la 12^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, en la modalidad de cartel, organizada por la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales (Amipronat) el 18 de mayo de 2016, llevado a cabo en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México.

Este trabajo lo dedico a mis queridos amores
que son parte de mi vida:

A Guino

A Nando

A Dany

Agradezco a Dios por colocar en mi camino a maravillosas personas...

Guino, Nando y Dany, son los hombres de mi vida que siempre me han dado su amor.

Fide, eres una mujer excepcional y estoy orgullosa de ser tu hija.

Abel, hay mucho de tu esencia en mi misma.

Nash y Ali, mis pequeños hermanos, los quiero mucho.

Dra. Paula Guadarrama, quien más que directora ha sido mi amiga.

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, quien me dio su tiempo y enseñanzas.

Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, Dr. Rogelio Valadez Blanco y Dra. Beatriz Hernández Carlos, quienes hicieron aportaciones valiosas a este trabajo.

Dr. Raúl Salas Coronado, quien me apoyó en esta investigación.

Dra. Edith González y M.C. Alma Salazar, me dieron su tiempo y su amistad.

A mi queridísima banda: Erickcín, Nancy, Karls, Fran Gómez y Tenoch. Por estar siempre conmigo.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios: Dra. Clau, Uli, Tony, Lucecita, Héctor, Dra. May, Yessi, Irmis, Chío, Abi, Eu, Eli, Heri, Fran Santiago, Pablo, Greis, Mary, Dora, Joseoziel y Quique, con quienes compartí momentos emotivos.

Moncha, Paty Guevara, Amparito, Doris, Perlita, Olga y Nubs, quienes me han dado lecciones de vida y amistad.

Sarita, Carmen y Celes, quienes agilizaron diversidad de trámites y lo hicieron más sencillo para mí.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por ser mi Alma Máter.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

¡A todos ustedes muchas gracias por ser parte de esta etapa de mi vida!

RESUMEN

Pleurotus spp. (seta) es un hongo comestible que ocupa el tercer lugar en producción a nivel mundial. En nuestro equipo de trabajo se aislaron previamente cepas silvestres de *P. djamor* (UTMB y UTMR), obteniendo nuevas cepas reconstituidas (BB y RR) e híbridas (H1, H2, H3 y H4) a partir de componentes monocarióticos. La presente investigación evaluó la productividad y la actividad antioxidante (AA) de extractos metanólicos de carpóforos y micelios de las cepas antes mencionadas. La cepa silvestre UTMR y las cepas reconstituidas fueron las que presentaron mejor potencial productivo. Los carpóforos de las cepas híbridas presentaron mejor AA. H3 tuvo un $IC_{50} = 3.26 \pm 0.03$ mg/mL, en el ensayo de reducción del radical DPPH \cdot y H1 un $IC_{50} = 3.52 \pm 0.05$ mg/mL con el método de Poder Reductor (PR). Mientras que los micelios de las cepas híbridas presentaron mejor contenido de fenoles totales (FT), H3 tuvo 1.77 ± 0.03 mg EAG/g ms. Se concluyó que la velocidad de crecimiento micelial no tuvo relación con la productividad de las cepas y que la AA de los extractos metanólicos de carpóforos y micelio no se relacionó con los flavonoides.

CONTENIDO

	Página
Resumen	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. Introducción	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
1.3 Importancia y originalidad de este estudio	4
1.4 Delimitaciones del estudio	5
2. Marco teórico	7
2.1 Características generales de los hongos	7
2.2 El género <i>Pleurotus</i>	9
2.2.1 Morfología	9
2.2.2 Sustratos empleados en la producción de carpóforos de <i>Pleurotus</i> spp.	10
2.2.3 Selección de genotipos	11
2.2.4 Producción de <i>Pleurotus</i> spp.	12
2.2.5 Productividad en el cultivo de los hongos	13
2.2.6 Importancia funcional de <i>Pleurotus</i> spp.	14
2.3 Actividad antioxidante (AA)	15
2.4 Métodos para determinar la actividad antioxidante (AA)	17
3. Estado del Arte	21
3.1 Rescate de germoplasma y obtención de nuevas cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	21
3.2 Productividad en el cultivo de <i>Pleurotus djamor</i>	23
3.3 Importancia del micelio	24
3.4 Actividad antioxidante (AA) en <i>Pleurotus</i> spp.	25
4. Metodología	28
4.1 Material biológico	30
4.2 Equipos y materiales	30
4.3 Reactivos, disolventes, medios de cultivo y sustrato	31
4.4 Preparación de medios de cultivo	32
4.4.1 Medio sólido en agar extracto de malta (AEM) para crecimiento micelial	32
4.4.2 Medio para producción de micelio en cultivo líquido	32
4.5 Caracterización de la morfología y el crecimiento micelial de cepas de <i>P. djamor</i> en medio sólido AEM	33

4.6	Productividad de las cepas de <i>P. djamor</i>	34
4.6.1	Producción del inóculo de grano de las cepas de <i>P. djamor</i>	34
4.6.2	Obtención de los carpóforos de las cepas de <i>P. djamor</i>	35
4.6.3	Determinación de humedad en carpóforos frescos y secos	36
4.7	Actividad antioxidante (AA) en <i>P. djamor</i> de carpóforos y micelio	37
4.7.1	Preparación de la muestra a partir de carpóforos	37
4.7.2	Preparación de la muestra micelial	37
4.7.3	Obtención del extracto metanólico desengrasado de carpóforos	38
4.7.4	Obtención del extracto metanólico hidrolizado y desengrasado de carpóforos	38
4.7.5	Obtención del extracto metanólico crudo de carpóforos y micelio	39
4.7.6	Obtención del extracto metanólico micelial y limpieza por extracción en fase sólida (EFS)	40
4.7.7	Cuantificación de fenoles totales (FT)	40
4.7.8	Cuantificación de flavonoides totales (FVT)	41
4.7.9	Cuantificación de la actividad antirradical por el método del DPPH*	42
4.7.10	Cuantificación del Poder Reductor (PR)	44
4.8	Análisis estadístico	46
5.	Resultados y discusiones	47
5.1	Morfología micelial en medio sólido en agar extracto de malta (AEM) de cepas de <i>P. djamor</i>	47
5.2	Velocidad del crecimiento micelial (Vc) en medio sólido AEM de cepas de <i>P. djamor</i>	49
5.3	Productividad de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas	51
5.4	Determinación de humedad y rendimiento de extractos en carpóforos y micelio de <i>P. djamor</i>	57
5.5	Cuantificación de fenoles totales (FT)	59
5.6	Cuantificación de flavonoides totales (FVT)	63
5.7	Evaluación de la actividad antioxidante (AA)	65
5.7.1	Actividad antioxidante mediante el radical DPPH*	65
5.7.2	Actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)	68
5.8	Correlación de los parámetros miceliales, productivos y de actividad antioxidante (AA)	
6	Conclusiones	72
7	Perspectivas	73
8	Referencias	74
9	Apéndice	80
Apéndice 1	Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales (FT)	80
Apéndice 2	Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales (FVT)	81
Apéndice 3	Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de carpóforos de las cepas de <i>P. djamor</i> para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el método del radical DPPH*	82

	Apéndice 4	Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de micelio de las cepas de <i>P. djamor</i> para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el método del radical DPPH [*]	83
	Apéndice 5	Curva de ácido gálico, BHT y rutina empleadas como control para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el radical DPPH [*]	84
	Apéndice 6	Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de carpóforos de las cepas de <i>P. djamor</i> para cuantificar la actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)	85
	Apéndice 7	Curva de calibración de ácido gálico empleada como control para cuantificar la actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)	86
10	Anexo		87
	Anexo 1	Correlación lineal entre dos variables	87

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Carpóforo de basidiomiceto	8
Figura 2	Carpóforos de a) <i>P. djamor</i> ; b) <i>P. ostreatus</i> ; c) <i>P. sajor-caju</i> ; d) <i>P. eryngii</i>	9
Figura 3	Obtención de cepas reconstituidas e híbridas a partir de cepas silvestres	12
Figura 4	Compuestos fenólicos aislados en el género <i>Pleurotus</i>	16
Figura 5	Reacción de reducción de las sales de molibdato y tungstato por un compuesto fenólico	17
Figura 6	Estructura del complejo tricloruro de aluminio–flavonoide	18
Figura 7	Reacción de reducción de DPPH* por antioxidantes	19
Figura 8	Reacción de reducción de ferricianuro por antioxidantes	20
Figura 9	Carpóforos de a) <i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i> (Rumph. Ex Fr.) Boedijn; b) <i>P. djamor</i> var. <i>roseus</i> Corner	22
Figura 10	Etapas del presente proyecto de investigación	28
Figura 11	Metodología general de la investigación	29
Figura 12	Cepas de <i>Pleurotus</i> utilizadas en esta investigación	30
Figura 13	Morfología micelial de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. a) UTMB; b) RP; c) H3; d) RR y e) H2	48
Figura 14	Carpóforos de <i>Pleurotus</i> : a) UTMR; b) BB; c) RR; d) H1; e) H2; f) H3; g) H4; h) RP; i) UAP9	54

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1	Propiedades funcionales en especies comestibles de <i>Pleurotus</i> 15
Tabla 2	Parámetros de productividad de cepas de <i>P. djamor</i> 23
Tabla 3	Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT), IC ₅₀ y Poder Reductor (PR) de extractos alcohólicos de carpóforos y micelio de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. 27
Tabla 4	Morfología micelial de las cepas de <i>Pleurotus djamor</i> en medio agar extracto de malta (AEM) 47
Tabla 5	Velocidad de crecimiento micelial de cepas de <i>P. djamor</i> 50
Tabla 6	Parámetros de productividad de las cepas de <i>P. djamor</i> 52
Tabla 7	Porcentaje de humedad y rendimiento de los extractos metanólicos de carpóforos y micelio de <i>P. djamor</i> 58
Tabla 8	Contenido de compuestos fenólicos y valores de IC ₅₀ de carpóforos y micelio de <i>P. djamor</i> 61
Tabla 9	Coefficiente de correlación de Pearson lineal (<i>r</i>) entre crecimiento micelial, productividad y actividad antioxidante de cepas de <i>P. djamor</i> 70

ABREVIATURAS

AA	Actividad antioxidante
AEM	Agar extracto de malta
Cma	Crecimiento micelial acumulado
CR	Capacidad reductora
DPPH·	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAT	Equivalente de ácido tánico
EB	Eficiencia biológica
EQ	Equivalente de quercetina
EFS	Extracción en fase sólida
FT	Fenoles totales
FVT	Flavonoides totales
IC ₅₀	Concentración de una muestra requerida para inhibir el 50% de la concentración inicial de un reactivo
ICREAG	Índice de capacidad reductora equivalente de ácido gálico
mf	masa fresca
ms	masa seca
Pm	Peso fresco medio de las fructificaciones
PR	Poder Reductor
Tct	Tiempo de cosecha total
Tfp	Tiempo de inicio para la formación de primordios
TP	Tasa de productividad
Vc	Velocidad de crecimiento micelial

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Pleurotus* tienen importancia comercial y ocupan el tercer lugar a nivel mundial en la producción de hongos comestibles.¹ Estos hongos poseen la ventaja de ser cultivados en diferentes materiales lignocelulósicos para su crecimiento en condiciones rurales e industriales y se adaptan a distintas condiciones de temperatura y humedad.² Además se ha reportado que estos hongos tienen diferentes propiedades funcionales tales como anticancerígenas, antivirales, antibióticas, antiinflamatorias y antioxidantes.³

Específicamente *Pleurotus djamor* es un hongo comestible que crece naturalmente sobre troncos de árboles en descomposición. La especie silvestre tiene un cultivo comercial incipiente en México, y crece en los estados de Chiapas, Tabasco, Quintana Roo y Oaxaca.⁴ En trabajos previos a esta tesis, se aisló germoplasma a partir de cepas silvestres provenientes de la región Mixteca oaxaqueña.⁵ También se realizaron modificaciones genéticas a estas cepas mediante el método de desdicarización química para la obtención de cepas híbridas nuevas con propiedades productivas y morfológicas potencialmente mejoradas.⁵

Por otra parte, la productividad es un término que se utiliza para determinar si la cepa tiene factibilidad comercial. Los parámetros de importancia para evaluar la productividad de hongos son la eficiencia biológica (EB) y la tasa de productividad (TP). Se ha reportado EB en cepas de *P. djamor* en un intervalo de 20 a 147%,^{5,6} y de TP entre 0.30 a 2.80%.^{5,7} Además, entre las propiedades funcionales que exhiben los hongos del género *Pleurotus* se encuentra la actividad antioxidante (AA), que es un mecanismo de inhibición del daño

celular provocado por el estrés oxidativo, principalmente. Esta AA está asociada, en la mayoría de los casos, a la presencia de compuestos fenólicos.⁸ El extracto metanólico de carpóforos de cepas de *P. djamor* muestra valores de fenoles totales (FT) en un intervalo de 2.25 ± 0.04 a 32.55 ± 0.21 mg equivalentes de ácido gálico/g de masa seca (mg EAG/g ms).^{9,10} El contenido de flavonoides totales (FVT) para *P. djamor*, en extractos metanólico y etanólico, se ha reportado de 0.0021 ± 0.0001 y 14.88 ± 2.13 mg equivalentes de quercetina/g de extracto (mg EQ/g ext), respectivamente.^{11,12} Se reportó IC_{50} entre 0.065 y 7.25 mg/mL, por el método de reducción del radical DPPH^{10,12} y un $IC_{50} = 6.30 \pm 0.50$ mg/mL.¹¹ mediante el método de Poder Reductor (PR),

Recientemente, las investigaciones científicas se han enfocado a la parte vegetativa de los hongos (micelio). Esto se debe a que la producción de la biomasa micelar es rápida y ocupa menos espacio que los carpóforos.¹³ Además, el micelio posee propiedades biológicas que pueden compararse con las encontradas en los carpóforos.¹⁴ Las investigaciones en el micelio se han realizado empleando extractos etanólicos. Liang y colaboradores¹⁵ reportaron en *P. eryngii* un contenido de FT de 12.65 ± 0.82 mg EAG/g ms. Vamanu¹⁶ reportó un contenido de FVT de 28.00 ± 5.70 mg EQ/g biomasa. Čilerdžić y col.¹⁷ reportaron un contenido de FVT de 4.42 ± 0.86 mg EQ/g ext s. Por su parte, Liang y col. en *P. eryngii* reportó un $IC_{50} = 2.47$ mg/mL, Čilerdžić y col. en *P. ostreatus* un $IC_{50} = 13.94$ mg/mL, ambos por el método de DPPH. Liang y col. reportaron un $IC_{50} = 9.18 \pm 0.03$ mg/mL por el método de PR. Los datos reportados en el micelio son cercanos a los descritos para los carpóforos de *P. djamor* y son un antecedente a lo encontrado durante esta investigación.

Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la productividad de los carpóforos y cuantificar la AA de extractos metanólicos de micelios y carpóforos de cepas silvestres, reconstituidas e híbridas. Se utilizaron dos cepas comerciales como control para fines comparativos (una *P. djamor* y la otra *Pleurotus* spp.). Para lograr el objetivo anterior, el proyecto se dividió en cuatro etapas: 1) Caracterización del micelio, evaluando la morfología y velocidad de crecimiento de las cepas en medio sólido de agar extracto de malta; 2) Productividad de las cepas, mediante EB y TP, para evaluar su potencial comercial usando paja de trigo como sustrato; 3) Secado y preparación de la muestra para la cuantificación de los compuestos antioxidantes; y 4) Cuantificación de compuestos fenólicos y la AA por métodos espectroscópicos. En la cuantificación de FT se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu y para el contenido de FVT, el tricloruro de aluminio, $AlCl_3$. Así mismo, se determinó la actividad antirradical por el método de reducción del radical de DPPH[•] y el PR empleando ferricianuro de potasio, $K_3Fe(CN)_6$. Estos parámetros permitieron una evaluación y comparación de la productividad de los carpóforos, así como la AA entre carpóforos y micelios de las cepas estudiadas.

1.1 Hipótesis

La productividad de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor* está relacionada directamente con la velocidad de crecimiento micelial.

Los flavonoides presentes en los extractos metanólicos se relacionan directamente con la actividad antioxidante de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la productividad de los carpóforos, así como la actividad antioxidante de carpóforos y micelio de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la velocidad de crecimiento micelial en medio sólido de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *P. djamor*.
- Evaluar la productividad de las diferentes cepas empleando los parámetros de eficiencia biológica (EB) y tasa de productividad (TP), usando paja de trigo como sustrato.
- Cuantificar fenoles totales (FT) con el reactivo de Folin-Ciocalteu; flavonoides totales (FVT) con tricloruro de aluminio; la actividad antirradicalar frente al radical DPPH[•] y la actividad antioxidante (AA) en términos del PR, mediante la reducción de ferricianuro en extractos metanólicos (carpóforos y micelio) de las cepas de *P. djamor*.
- Comparar y correlacionar las características miceliales, productivas y la AA de las cepas estudiadas.

1.3 Importancia y originalidad de este estudio

Los hongos del género *Pleurotus* tienen la ventaja de ser cultivados en sustratos diversos y se adaptan a diferentes condiciones de temperatura y humedad. Además, se han aislado de este género compuestos que exhiben actividad antiinflamatoria, antitumoral y

antioxidante.^{2,18} *P. djamor* es una fuente de agentes antibacterianos y antioxidantes que pueden tener efectos potencialmente benéficos a la salud.¹²

Por otro lado, una de las ventajas de emplear hongos en lugar de plantas como fuente de fitoquímicos es que debido a la facilidad para producir micelio tanto en cultivos líquidos como sólidos, los carpóforos se producen en tiempos relativamente cortos, lo que a su vez puede ayudar a optimizar la producción de productos bioactivos.¹⁹

Para promover el cultivo y consumo de cepas silvestres, reconstituidas o híbridas de *P. djamor* es importante caracterizar su potencial productivo y propiedades funcionales al ser cultivadas en diferentes regiones. Por ello, en este trabajo se evaluó la productividad (EB y TP) de los carpóforos, se cuantificaron los compuestos fenólicos y la AA de carpóforos y micelios de cepas comestibles silvestres, reconstituidas e híbridas *P. djamor*. Se debe mencionar que hasta el momento no se ha realizado un estudio que aborde a la productividad y la cuantificación de compuestos fenólicos y AA de *P. djamor*. Así mismo, no se tiene conocimiento de estudios acerca de AA para micelio y carpóforos de una misma especie del género *Pleurotus*. Estos resultados permiten contribuir al conocimiento básico de los hongos de *P. djamor* de la región Mixteca dando herramientas para su futura investigación y posible aplicación tecnológica.

1.4 Delimitaciones del estudio

La investigación se delimitó a muestras de carpóforos de dos cepas silvestres endémicas de la Mixteca Oaxaqueña (UTMB y UTMR), dos reconstituidas (BB y RR) y cuatro híbridas (H1, H2, H3 y H4) de *P. djamor* (hongo seta); así como a dos cepas control de *P. djamor*

(UAP9) y *Pleurotus* spp. (RP). Para el estudio de la AA del carpóforo se estudiaron las cepas antes mencionadas, omitiendo a la cepa silvestre UTMB debido a su escasa generación de biomasa. El inóculo de cada cepa se sembró en paja de trigo y se cosechó en los laboratorios de Bioprocesos y Ciencia de los Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca entre los meses de junio de 2015 y febrero de 2016, a temperaturas entre 18 a 23 °C y una humedad relativa de 80 a 85%. Los extractos metanólicos de carpóforos y micelio de dichas cepas se obtuvieron por extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido de la biomasa seca.

La cuantificación de los compuestos fenólicos y de la AA, se realizó por métodos espectroscópicos. Para la cuantificación de FT se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu, y para el contenido de FVT se empleó el reactivo de tricloruro de aluminio. Así también, se determinó la actividad antirradical al extracto metanólico por el método de DPPH[•] y el PR empleando ferricianuro de potasio.

2. MARCO TEÓRICO

Esta sección describe información general de los hongos y del género *Pleurotus*, su producción, los sustratos más empleados y los métodos analíticos que se emplearon durante esta investigación.

2.1 Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucarióticos, carentes de clorofila, unicelulares (levaduras) o pluricelulares (filamentosos), su reproducción puede ser sexual o asexual. Se dividen en cuatro filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Dentro de los basidiomicetos las especies que tienen mayor importancia económica pertenecen a los géneros *Agaricus* (champiñón), *Lentinula* (shiitake) y *Pleurotus* (seta).

La mayoría de especies fúngicas están constituidas por filamentos largos y delgados llamados hifas, los cuales están rodeadas por pared celular rígida compuesta de quitina combinada con carbohidratos complejos, como celulosa. De la ramificación y entrelazamiento de las hifas, se forma una estructura filamentosa denominada micelio. Si el micelio tiene un solo núcleo se denomina monocariótico y si tiene dos núcleos se denomina dicariótico.

En los basidiomicetos el esporóforo está formado por un pie o estípite, que sostiene al píleo o sombrero, que en ocasiones emerge de una cazoleta basal (volva), Figura 1. El estípite y el píleo están conformados por micelio ramificado. En la parte inferior del sombrero se encuentra el himenio o laminillas que son estructuras foliáceas dispuestas de forma radial

desde el margen hacia el estípite, cubiertas de basidios en ambas caras. En el himenio se generan y liberan las esporas cuando el carpóforo ha madurado. Algunos basidiomicetos poseen un anillo o velo alrededor del estípite por debajo del margen del píleo.²⁰

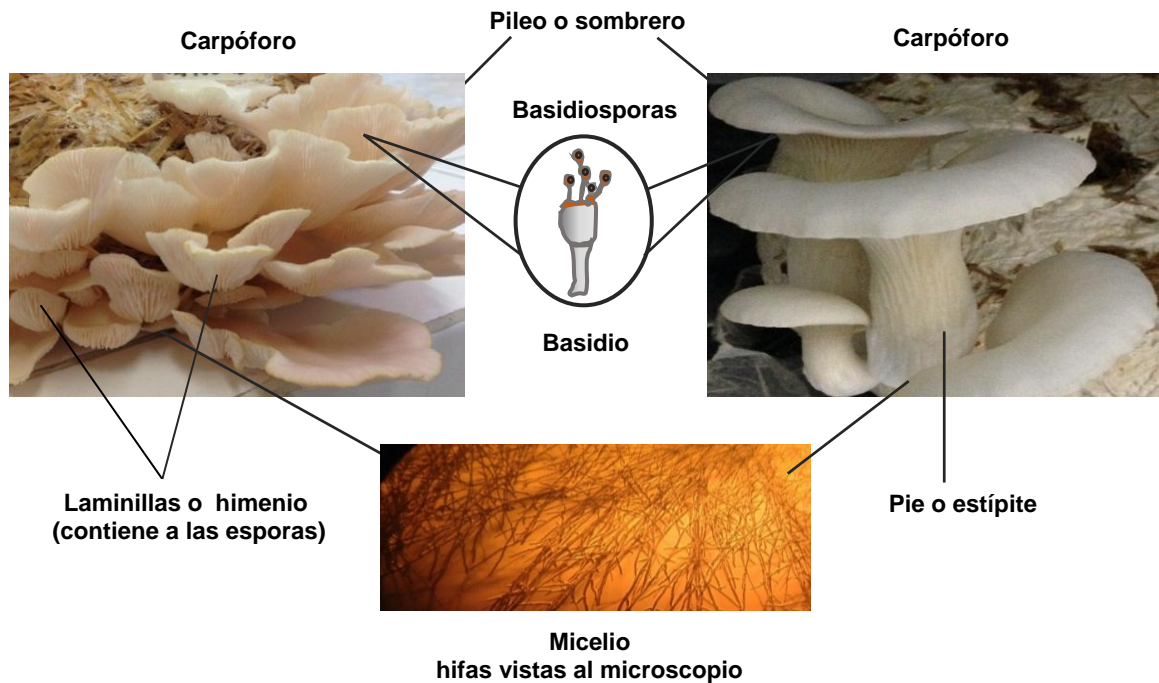


Figura 1. Carpóforo de basidiomiceto

Los hongos se consideran quimioheterótrofos estrictos y requieren de sustratos proveedores de energía para la biosíntesis. Debido a la pared rígida que tienen, los hongos no pueden fagocitar moléculas más complejas; sin embargo, cuentan con enzimas extracelulares complejas que les permite degradar sustratos diversos. La glucosa, maltosa, sacarosa, quitina, lignina, hemicelulosa y celulosa constituyen la fuente de energía más importante para la mayoría de los hongos lignocelulolíticos.²

2.2 El género *Pleurotus*

2.2.1 Morfología. El género *Pleurotus* pertenece al reino Fungi, phylum Basidiomycota, clase Basidiomycetes, orden Agaricales y familia *Pleurotaceae*. Las especies de *Pleurotus* reciben nombres como: seta, hongo ostra, orejón, oreja (blanca, de palo, de patancán, de cazahuate o de izote) o seta de chopo. Estas especies poseen cuerpos fructíferos (carpóforos) con forma redondeada y abombada que se ensancha. El píleo es poco convexo y se aplana hasta presentar forma de embudo, pétalo de flor o concha de ostra, con textura lisa o escamosa hacia el centro. El color varía y puede ser blanco, gris, café o rosa, Figura 2. El estípote de los carpóforos es lateral, corto y está recubierto de vellosidades blancas. Las láminillas pueden estar o no unidas entre sí en su base. El tamaño depende de la especie, edad y condiciones de cultivo, pueden medir desde 5 a 20 cm. Crecen formando repisas o racimos naturales, poseen consistencia blanda y correosa con aroma y sabor agradables.²⁰

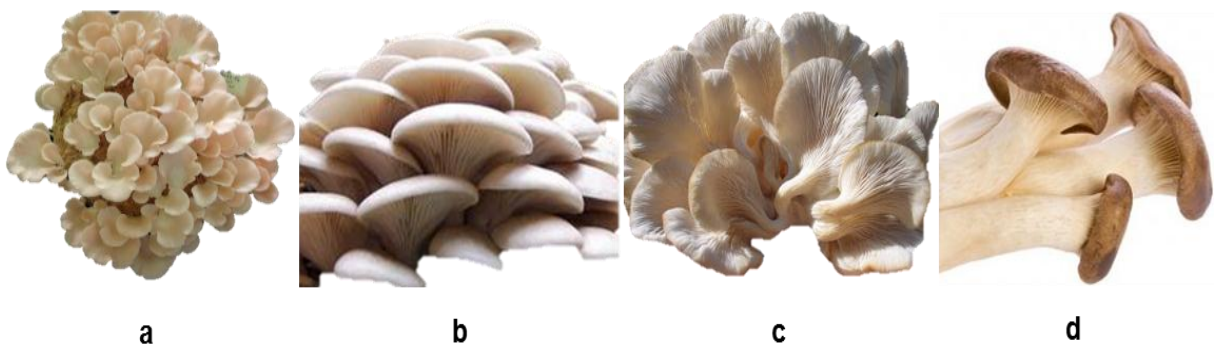


Figura 2. Carpóforos de a) *P. djamor*; b) *P. ostreatus*;²¹ c) *P. sajor-caju*;²² d) *P. eryngii*²³

Para dar impulso a la producción de hongos comestibles a nivel industrial se utilizan diversas estrategias, entre las que destacan el desarrollo de formulaciones y tipos de sustrato, modificaciones en las condiciones de cultivo y selección de genotipos.⁵

2.2.2 Sustratos empleados en la producción de carpóforos de *Pleurotus* spp. El carpóforo del género *Pleurotus* crece de forma natural sobre troncos caídos en descomposición y de manera artificial, sobre residuos agroindustriales.² Los nutrientes que se requieren en un sustrato artificial son: celulosa, hemicelulosa y lignina quienes funcionan como fuentes principales de carbono. Los sustratos artificiales pueden ser clasificados en seis categorías.⁷

- Pajas: Ajonjolí, arroz, cártamo, cebada, sorgo, trigo, avena, zacate
- Rastrojos: Maíz, mijo, garbanzo, frijol
- Pulpas: Café, cardamomo
- Bagazos: Caña de azúcar, maguey tequilero, henequén, uva
- Forestales: Aserrín, viruta, troncos, ramas
- Otros: Papel, olote, hojas de piña, fibra de coco, lirio acuático, tallos de plátano, desechos de la industria textil

Los sustratos deben tener una capacidad de retención de humedad entre el 70 y 80% para un crecimiento óptimo de los hongos. El tamaño de partícula puede afectar el crecimiento y fructificación.²⁴ Ciertos estudios indican que la composición de nutrientes es un factor que limita la colonización de las setas cultivadas y que distintas especies de un mismo género pueden tener diferentes requerimientos de nutrientes. En este trabajo se utilizó paja de trigo debido a que posee material lignocelulósico (aproximadamente 90%) que es degradado y utilizado por los hongos para su crecimiento.⁷

2.2.3 Selección de genotipos

Para realizar una selección adecuada de los genotipos, es necesario conocer los aspectos biológicos de la especie a mejorar.⁵ En los hongos comestibles, la hibridación es un medio por el cual algunas características genéticas deseadas y presentes en diferentes cepas, pueden ser combinadas para obtener nuevas cepas y variedades que posiblemente desarrollen características mejoradas. Para ello se requiere la disponibilidad de organismos con diversidad genética.²⁵

En especies de *Pleurotus* el mejoramiento genético se ha logrado empleando métodos de hibridación, destacando los siguientes: apareamientos entre monospóricos provenientes de la progenie meiótica recuperada de las esporas,⁷ apareamiento entre dicarion-monocarion también llamado fenómeno Buller y apareamiento de neohaplontes compatibles utilizando los métodos de desdicarionización.⁵

El método de apareamiento de neohaplontes, consiste en desdicarionizar (separar artificialmente los componentes de un dicariote) a una cepa con características deseadas, obteniéndose así sus componentes monocarióticos denominados neohaplontes. La desdicarionización puede efectuarse por métodos mecánicos y químicos. Este método tiene la ventaja de garantizar que la información genética de una cepa se encuentre intacta, y los neohaplontes corresponden al micelio monocariótico que deriva de un dicarion sin la intervención de la cariogamia o meiosis. Obtenidos los neohaplontes de cada cepa, pueden volver a restituirse conformando a las cepas reconstituidas. Por otro lado, los distintos neohaplontes de cada cepa dicariótica se cruzan entre sí para determinar los patrones de compatibilidad obteniendo los híbridos, Figura 3.

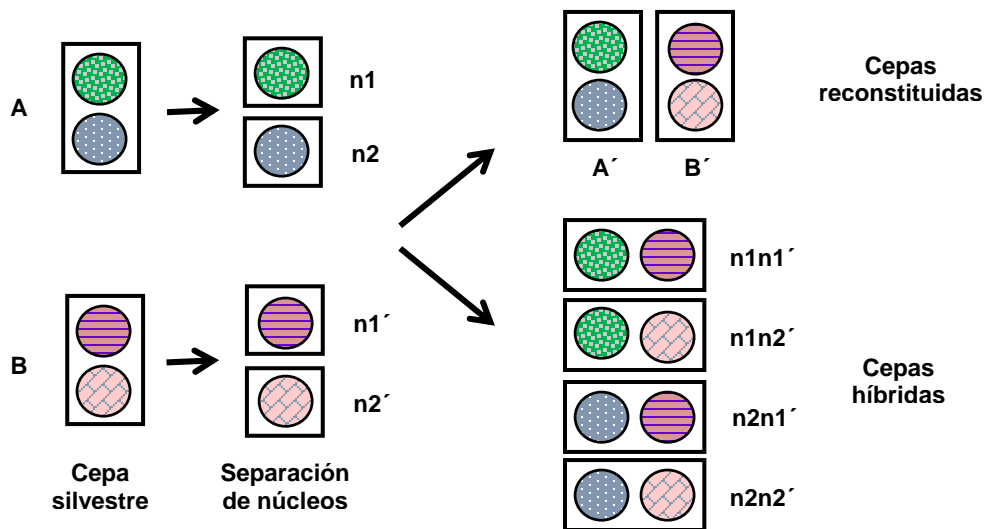


Figura 3. Obtención de cepas reconstituidas e híbridas a partir de cepas silvestres

2.2.4 Producción de *Pleurotus* spp. Los hongos del género *Pleurotus* ocupan la tercera posición en la producción de hongos comestibles después de las especies *Agaricus bisporus* (champiñón) y *Lentinula edodes* (Shiitake).¹ Las principales especies que se han comercializado por sus características sensoriales y nutricionales son: *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*. Según datos de la FAO,²⁶ la producción mundial de hongos comestibles en el 2009 alcanzó 6.4 millones de toneladas, de las cuales 20 mil ton aproximadamente correspondieron a *P. ostreatus*. En México, en el 2010, se cultivaron 3,031 ton de *Pleurotus* spp. que representó cerca del 5% de la producción total de hongos comestibles en el país. Lo anterior, tiene un impacto económico positivo, ya que el monto anual de operaciones comerciales ha superado los 150 millones de dólares y los volúmenes de exportación han aportado divisas al país por más de 4 millones de dólares anuales, generando aproximadamente 20 mil empleos directos e indirectos.²⁷

El incremento en el cultivo de las especies de *Pleurotus* spp. en los últimos años radica en que estos hongos tienen capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales enriquecidos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de cereales, papel, residuos vegetales y desechos ligninocelulósicos de la industria alimenticia¹ así como a su habilidad para crecer en un intervalo de temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, de 22 a 28 °C.

2.2.5 Productividad en el cultivo de los hongos. La productividad se considera una característica importante en el cultivo de hongos y se utiliza para determinar si el cultivo de la cepa es económicamente factible y también para determinar el sustrato más adecuado. Los parámetros que se consideran en la productividad son: tiempo de incubación, aparición de primordios, tiempo transcurrido en la obtención de las cosechas, eficiencia biológica (EB) y tasa de productividad (TP). Para establecer si una producción puede ser rentable, los parámetros EB y TP permiten caracterizar si una cepa puede ser productora de setas.²⁸ La producción de hongos se valora en kg por sustrato y se expresa en porcentaje, este porcentaje es la EB. La calidad productiva de un sustrato con valor mayor al 50% se considera aceptable y valores cercanos o mayores a 100 indican que el sustrato es idóneo para el crecimiento de las cepas.²⁹ TP es el porcentaje diario de producción, y se cuantifica regularmente como un porcentaje. Estos parámetros presentan valores en un intervalo amplio que puede deberse a las condiciones utilizadas durante su cultivo. Los factores que influyen en la productividad de las setas son: 1) Sustrato. Es el material sobre el que los hongos crecen y debe contener principalmente lignina, celulosa, hemicelulosa y proteína. El sustrato es fuente de carbono y nitrógeno.²⁸ Para aumentar la productividad a través de la EB es suplementar el sustrato mediante la mezcla de residuos.³⁰ 2) Humedad relativa

(HR). Es necesario un balance entre la humedad ambiental y el contenido de la seta. Para evitar la deshidratación del hongo, se requiere una HR entre el 80 - 90%. 3) Luz. Es un factor modulador durante la agregación de hifas y la maduración de los carpóforos. También evita la formación de nudos en las hifas. Dependiendo de la función requerida, se necesita mayor o menor exposición de energía. 4) Temperatura. Hay una temperatura óptima para cada etapa de crecimiento del hongo. La incubación del micelio se lleva a 25° C. La formación de primordios se lleva entre 15 a 25° C y la producción de carpóforos entre 20 a 30° C. 5) Aireación. Es necesario el oxígeno porque los basidiomicetos son organismos aerobios. El CO₂ estimula la colonización del micelio en el sustrato, pero no se requiere para el desarrollo de carpóforos. Niveles altos de CO₂ pueden producir hongos de baja calidad. 6) Plagas. Durante el cultivo de las setas, las principales plagas son: mosquitos, roedores, algunas bacterias y hongos como *Trychoderma*, *Penicilium* y *Arpergillus*.^{7,28,31}

2.2.6 Importancia funcional de *Pleurotus* spp. Estudios realizados con diferentes cepas del género *Pleurotus* spp. muestran un valor promedio de 98% de digestibilidad proteica, y se puede considerar que las proteínas de estos hongos (19 a 35% bs), son de alta calidad por contener todos los aminoácidos esenciales.³² Los carpóforos contienen carbohidratos que incluyen fibra dietética. Además se caracterizan por tener cantidades bajas de grasa (2 a 6% bs), que se concentra mayoritariamente en el estípite. Poseen un contenido de ácido linoleico entre un 70 y 80% del total de los lípidos presentes.³³

En los últimos años ha aumentado el interés por conocer las propiedades funcionales de cepas de *Pleurotus* mediante la cuantificación y caracterización de compuestos bioactivos con beneficios potenciales a la salud. Se ha reportado que estos hongos tienen propiedades

tales como antiviral, antimutagénica, antiinflamatoria,^{3,10} hepatoprotectora, antitumoral, antioxidante,³⁴ entre otras. Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades funcionales en especies comestibles de *Pleurotus*³⁴

Especie	Actividad
<i>P. eryngii</i>	Antiinflamatoria Hepatoprotector
<i>P. ostreatus</i>	Antioxidante Antitumoral Antiviral contra VIH
<i>P. pulmonarius</i>	Antioxidante Antiviral contra VIH
<i>P. sajor-caju</i>	Antibacterial Antitumoral
<i>P. tuber-regium</i>	Antiviral contra herpes
<i>P. djamor</i>	Antibacterial ¹⁸ Anticancerígeno ³⁵ Antioxidante ³⁶

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

2.3 Actividad antioxidante (AA)

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo.³⁷ Los organismos vivos poseen propiedades antioxidantes que los protegen contra el daño oxidativo, pero hay casos donde las especies oxidativas están en mayor proporción que las especies antioxidantes y pueden reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, u otras moléculas. Esto puede promover la mutagénesis y carcinogénesis, arteriosclerosis, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso, entre otros padecimientos.^{16,38}

En la actualidad, los hongos comestibles son reconocidos como un alimento funcional y como fuente de componentes bioactivos. Presentan actividad protectora que ayuda al organismo humano a reducir el estrés oxidativo. Se ha reportado que los compuestos fenólicos de los hongos pueden ser antioxidantes o sinergistas.³ Se ha podido aislar e identificar ácidos fenólicos, flavonoides y taninos en diez hongos silvestres comestibles entre los que figuran *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *P. ostreatus* y *P. djamor*.¹⁸

De los principales compuestos fenólicos encontrados en el género *Pleurotus* destacan los derivados de ácido benzoico (ácido gálico y sirínigico) y del ácido cinámico (ácido ferúlico y cafeico), Figura 4.^{3,18}

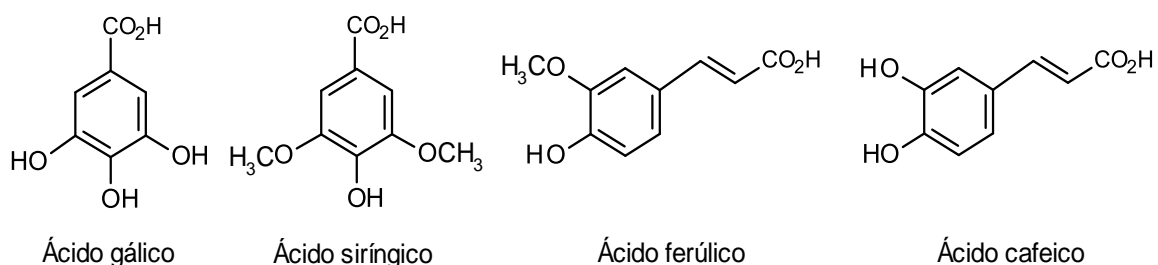


Figura 4. Compuestos fenólicos aislados en el género *Pleurotus*^{3,18}

Por otra parte, algunos métodos espectroscópicos colorimétricos utilizados para evaluar la AA incluyen la inhibición de la peroxidación del ácido linoléico, el secuestro de radicales libres, la transferencia de electrones y la quelación metálica. Los métodos que se mencionan a continuación se utilizaron en este trabajo para la evaluación antioxidante de extractos metanólicos de carpóforos y micelio de *P. djamor*.

2.4 Métodos para determinar la actividad antioxidante (AA)

El método usado comúnmente para cuantificar fenoles totales (FT) en alimentos y extractos vegetales se emplea el reactivo Folin-Ciocalteu. Este método, está basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes de molibdato y tungstato sódico, formando el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico,³⁹ Figura 5. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, que son cromógenos de color azul intenso caracterizado con una banda de absorción de $\lambda_{\text{máx}} = 750$ nm. Se conoce que la intensidad del color es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula.⁴⁰

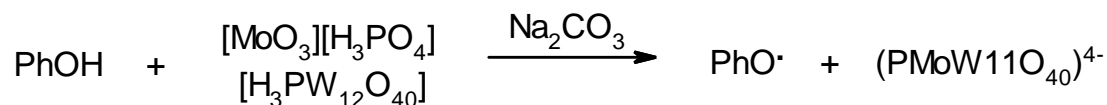


Figura 5. Reacción de reducción de las sales de molibdato y tungstato por un compuesto fenólico

Por otra parte, los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos que también pueden ser cuantificados por métodos colorimétricos. Uno de los métodos para cuantificar flavonoides totales (FVT) emplea tricloruro de aluminio. Este método se basa en la reacción entre los iones aluminio y los flavonoides en medio alcalino y en presencia de nitrito de sodio; formando un complejo de color rosa,⁴¹ caracterizado por una banda de absorción con un valor de $\lambda_{\text{máx}} = 515$ nm, Figura 6.

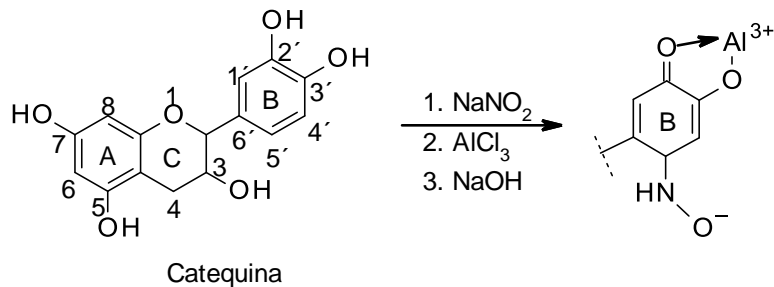


Figura 6. Estructura del complejo tricloruro de aluminio–flavonoide⁴²

Además, los compuestos antioxidantes pueden desactivar radicales libres por dos mecanismos principales. Uno de ellos implica la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés), el otro se refiere a la transferencia de un solo electrón (SET, por sus siglas en inglés). Además de eso, ambas transferencias pueden suceder al mismo tiempo. En este caso, el mecanismo dominante estará determinado por la estructura antioxidante, las propiedades de solubilidad del compuesto, el disolvente y el coeficiente de reparto, principalmente.⁴³

Así mismo, un método muy usado para determinar la HAT se basa en evaluar la capacidad del analito para estabilizar al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]), Figura 7. La estabilidad relativa de este radical se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización produce una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción a un valor de $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ en disolución etanólica. Cuando una disolución de DPPH[•] está en contacto con una sustancia donadora de un átomo de hidrógeno, o con otra especie radical (R[•]), se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R, respectivamente con la consecuente pérdida del color original del radical. Para la interpretación del método se emplea comúnmente el parámetro IC₅₀, que indica la

concentración necesaria de la muestra evaluada para obtener un 50% de reducción del radical DPPH[•]:

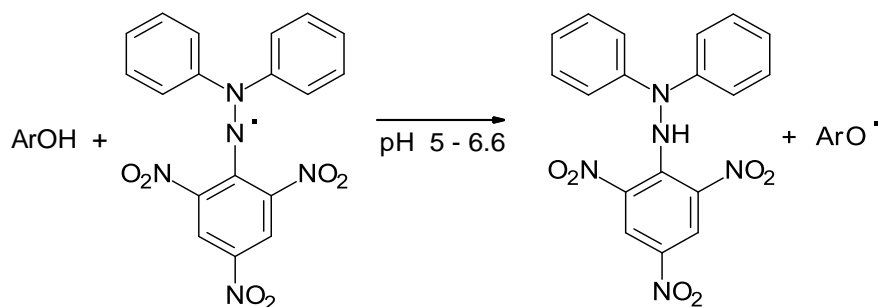


Figura 7. Reacción de reducción de DPPH[•] por antioxidantes

Para determinar la AA mediante un mecanismo de transferencia predominantemente de electrones se emplea el método del Poder Reductor (PR) desarrollado por Oyaizu.⁴⁴ En esta técnica, la sustancia antioxidante (por ejemplo el ascorbato), reduce el anión ferricianuro de potasio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. El $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ al combinarse con el catión Fe^{+3} forma ferrocianuro férrico, denominado azul de Prusia, Figura 8. La intensidad del color depende de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra, y tiene una banda de absorción a un valor de $\lambda_{\text{máx}} = 700 \text{ nm}$. El valor puede expresarse como mg equivalentes de ácido gálico (EAG/g ms), IC_{50} (mg/mL), capacidad reductora CR (%) e índice de capacidad reductora en mg equivalentes de ácido gálico (ICREAG).

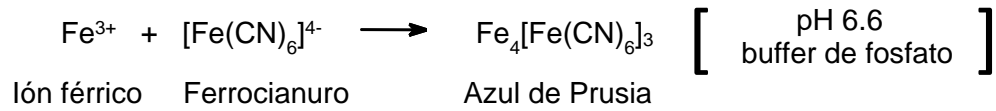
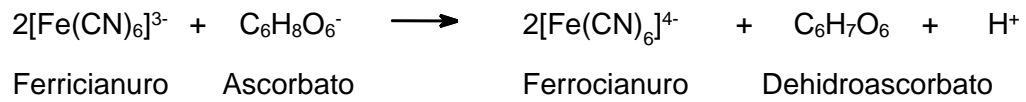


Figura 8. Reacción de reducción de ferricianuro por antioxidantes⁴⁵

3. ESTADO DEL ARTE

En esta sección se da información sobre la obtención de las cepas objeto de estudio en este trabajo y la importancia del micelio, así como los valores de fenoles y flavonoides totales y la AA descritos en la literatura para el género *Pleurotus*.

3.1. Rescate de germoplasma y obtención de nuevas cepas de *Pleurotus* spp.

El cultivo de las especies de *Pleurotus* ha sido una de las alternativas que pretende ayudar a contrarrestar la carencia de alimento de calidad sobre todo en el sector rural de México. También como alternativa de alimentos para personas que consumen poca proteína de carne. Por tal motivo, en los últimos años han surgido grupos productores en las distintas regiones del país. Sin embargo, para extender el cultivo de *Pleurotus* hacia otras regiones es necesaria la producción de cepas capaces de crecer y fructificar bajo condiciones climáticas distintas a las de su hábitat natural, así como de nuevas cepas con características mejoradas. Una de las alternativas para obtener nuevas cepas, consiste en el rescate de germoplasma nativo mediante el mejoramiento genético utilizando sistemas de hibridación, como es el método del acoplamiento de neohaplontes compatibles.

En trabajos previos, en el grupo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos,⁵ se recuperó el germoplasma de cepas silvestres de *Pleurotus* spp. (denominadas UTMB y UTMR) de Huajuapán de León, Oaxaca, México (altitud 1785 m, latitud norte 17°49'40" y longitud oeste 97°48'23"). Después de desdicarotizar las cepas y recuperar sus respectivos neohaplontes, se obtuvieron nuevas cepas reconstituidas e híbridas, para evaluar su potencial productivo y funcional. Las cepas que se seleccionaron como objeto de estudio

en el presente trabajo fueron diez: dos cepas silvestres (UTMB y UTMR), dos reconstituidas (BB y RR), cuatro híbridas (H1-4), y dos cepas usadas como control (RP, *Pleurotus djamor*, y UAP, *Pleurotus* spp.).

Con base en la morfología de las cepas silvestres en el trabajo previo, se realizó la identificación taxonómica en la Colección de Macromicetos del Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) de la UNAM, la cepa UTMB de color blanco se identificó como *Pleurotus djamor* var. *djamor* (Rumph. Ex Fr.) Boedijn (número de registro 26234), y la cepa UTMR de color rosa, como *Pleurotus djamor* var. *roseus* Corner (número de registro 26233).⁵ Los carpóforos de estas cepas tienen forma de pétalo de flor, píleo liso, así como consistencia firme y correosa, Figura 9. El diámetro en el sombrero oscila de 3 a 5 cm y el estípite es menor a 1 cm.



a

b

Figura 9. Carpóforos de a) *P. djamor* var. *djamor* (Rumph. Ex Fr.) Boedijn; b) *P. djamor* var. *roseus* Corner⁵

3.2 Productividad en el cultivo de *Pleurotus djamor*

La productividad de diferentes cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor* se han estudiado en nuestro país, así como en otros países. Los sustratos empleados en su cultivo son pajas de cebada, sorgo y trigo,^{6,46} El tiempo de inicio para la formación de primordios (Tfp) está en el intervalo de 10 a 37 días y un tiempo de cosecha total (Tct) entre 29 a 108 días. El peso medio (Pm) oscila entre 0.50 a 8.80 g, la eficiencia biológica (EB), de 12 a 147% y la tasa de productividad (TP), entre 0.20 a 2.85%, Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de productividad de cepas de *P. djamor*

Cepa	Sustrato	Tfp (d)	Tct (d)	Peso medio (g)	Eficiencia biológica (%)	Tasa de productividad (%)	País
Nativa ⁶	Pa	--	--	--	20 - 56	0.36 - 1.00	Panamá
Nativa ⁶	Maíz	--	--	--	23 - 53	0.40 - 1.00	Panamá
Parental ⁷	Pc	--	--	--	53 - 86	0.90 - 1.40	México
Parental ³¹	Pc	10 - 13	35 - 108	--	55 - 73	1-10 -1.70	México
Parental ³⁸	Pt	18	33	5.11	58	1.76	México
Parental ⁴⁷	Pts	13	--	2.17	--	--	India
Silvestre UTMB ⁵	Pt	31	58	0.50	12	0.2	México
Silvestre UTMR ⁵	Pt	16	48	2.60	147	2.80	México
Silvestre var <i>djamor</i> ⁴⁸	Pt	27 - 37	--	--	62 - 112	--	Argentina
Silvestre var <i>roseus</i> ⁴⁸	Pt	27 - 31	--	--	89 - 107	--	Argentina
Híbrida ⁷	Pc	--	--	--	74 - 115	1.20 - 1.90	México
Híbrida ³¹	Pc	--	--	--	19 - 85	0.35 - 1.50	México
Híbrida ³⁸	Pt	16	29	8.80	81	2.85	México

Tfp: tiempo de formación de primordios. Tct: tiempo de cosecha total. Pa: paja de arroz. Pc: paja de cebada. Pts: paja de trigo suplementado. Pt: paja de trigo.

Como se aprecia en la Tabla 2, las investigaciones enfocadas a la productividad de *P. djamor* son países del continente americano, principalmente México. Todas las cepas sin importar su procedencia, muestran un amplio intervalo para EB y TP. Esto puede deberse a las distintas condiciones del cultivo empleadas. Cabe mencionar que los valores de EB

no necesariamente se ven reflejados en TP, ya que este último parámetro involucra la variación del tiempo del ciclo productivo. El Pm es otro parámetro que muestra un amplio intervalo de valores tanto en cepas silvestres como las híbridas. Una razón probable sean los sustratos utilizados, ya que contienen diferente composición y biodisponibilidad. Otro aspecto que puede influir en la productividad es el factor genético. Hasta el momento, se tiene escasa información de la productividad de cepas híbridas y reconstituidas. Los pocos datos con los que se cuenta, muestran que no todas las cepas híbridas logran mejorar sus características. Así también, no hay una tendencia clara que muestre que las cepas híbridas mejoran sus características con respecto a las silvestres.

3.3 Importancia del micelio

Investigaciones recientes cuantifican la AA en extractos orgánicos de micelio. Esto se debe a que, al igual que los carpóforos, es fuente de proteínas, vitaminas, minerales y presenta diversos compuestos bioactivos tales como polisacáridos, complejos péptido-polisacáridos, lectinas, triterpenos, fenoles, flavonoides. La producción de la biomasa micelar es continua, rápida y ocupa menos espacio que el carpóforo.¹³ Por otra parte, el crecimiento del carpóforo es un proceso complejo que implica el uso de compostas sólidas, períodos de cultivo largos y un control estricto en las condiciones de cultivo si se compara con la obtención de micelios. Los micelios se producen principalmente en cultivos sumergidos con nutrientes definidos con lo cual se puede producir biomasa de forma rápida.⁴⁹ Durante la obtención de micelio se controlan parámetros como temperatura, luz, humedad y pH. Las investigaciones más recientes se han enfocado a optimizar el proceso de obtención del micelio porque la cantidad y características fisicoquímicas de los metabolitos secundarios dependen de la composición y condiciones del medio de cultivo.¹⁷ La biomasa micelial

posee propiedades biológicas comparables a las encontradas en los carpóforos de los hongos. Actualmente dicha biomasa se ha empleado como saborizante, como alimento funcional y como parte de formulaciones nutraceuticas.⁸

3.4 Actividad antioxidante (AA) en *Pleurotus* spp.

Existen algunos reportes del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (AA) para la especie *P. djamor*. La mayor parte de ellos provienen de países asiáticos, donde también es común su consumo, Tabla 3. Los extractos provenientes de carpóforos más empleados para la cuantificación de estos metabolitos y su AA, son los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos debido a que los compuestos antioxidantes de interés son polares. Se puede observar que el contenido de fenoles totales (FT) se encuentra en un intervalo de 2.25 ± 0.04 a 32.55 ± 0.21 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de masa seca (mg EAG/g ms),^{9,10} y 27.00 ± 4.89 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g ext s). El contenido de flavonoides totales (FVT) de 0.002 ± 0.0001 a 14.88 ± 2.13 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g ext s) en extractos metanólico y etanólico, respectivamente de esta especie.^{11,12} En relación a la actividad antioxidante determinada por el método de reducción del radical DPPH^{*} se han reportado IC₅₀ entre 0.065 y 7.25 mg/mL^{10,12} y determinada mediante Poder Reductor (PR), un IC₅₀ = 6.30 ± 0.50 mg/mL.¹¹ El Poder Reductor (PR) también se ha expresado como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de masa seca (mg EAG/g ms), capacidad reductora (CR) expresado como porcentaje, e índice de capacidad reductora equivalente de quercetina (ICREQ).

Las investigaciones realizadas para cuantificar compuestos fenólicos y AA en extractos de micelio de *P. djamor* hasta el momento son nulas. Liang y colaboradores¹⁵ reportaron en *P. eryngii* un contenido de FT de 12.65 ± 0.82 mg EAG/g ms, un $IC_{50} = 2.47$ mg/mL por el método del radical de DPPH[•] y un $IC_{50} = 9.18 \pm 0.03$ mg/mL con el método de PR. Vamanu¹⁶ en *P. ostreatus* reportó 35.40 ± 6.75 mg/g biomasa y un contenido de FVT de 28.00 ± 5.70 mg EQ/g biomasa. Mientras que para *P. ostreatus* Čilerdžić y col.¹⁷ reportaron un contenido de FT de 14.41 ± 1.68 mg EAG/g ext s, FVT de 4.42 ± 0.86 mg EQ/g ext s, y AA con el radical de DPPH[•] un IC_{50} de 13.94 mg/mL.

La AA de los carpóforos por el método radical DPPH[•] y expresada como $IC_{50} = 1.46$ mg/mL es aproximadamente diez veces menor al obtenido a partir de micelio, $IC_{50} = 13.94$ mg/mL. El primer valor de IC_{50} corresponde a *P. djamor* y el segundo a *P. ostreatus*. Esto podría sugerir que la AA es mejor en los extractos provenientes de los carpóforos. Sin embargo, la escasa información y la comparación de valores en especies diferentes no valida esta suposición y se requiere más investigaciones.

Por otro parte, no hay mención respecto al origen de las cepas a las cuales se evaluó la AA, si proceden de cepas silvestres o híbridas. Los valores de FT, FVT y PR se han reportado en diferentes unidades. Así también, las cepas empleadas para la obtención de los extractos miceliales no pertenecen a *P. djamor*. Estas diferencias influyen en la variación de los valores.

Tabla 3. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT), IC₅₀ y Poder Reductor (PR) de extractos alcohólicos de carpóforos y micelio del género *Pleurotus* spp.

Especie	Extracto	FT (mg EAG/g ms)	FVT (mg EQ/g ext s)	IC ₅₀ (mg/mL) (DPPH')	PR			País
					(mg EAG/g ms)	IC ₅₀ (mg/mL)	ICREQ	
Carpóforos								
<i>P. djamor</i> ³	Metanólico	3.6	ND	1.90 ± 0.31	1.9 ± 0.20	ND	ND	India
<i>P. djamor</i> ⁹	Metanólico remanente	2.25 ± 0.04	ND	2.87 ± 0.29	ND	ND	ND	India
<i>P. djamor</i> ¹⁰	Metanólico	32.55 ± 0.21	1.53 ± 0.11	0.065	ND	ND	ND	India
<i>P. djamor</i> ¹¹	Metanólico	27.00 ± 4.89 ^a	2.1E ⁻³ ± 0.10	1.46 ± 0.04	ND	6.3 ± 0.50	ND	India
<i>P. djamor</i> var <i>djamor</i> ¹²	Etanólico	51.94 ± 0.67 ^b	14.88 ± 2.13	7.25	ND	ND	0.771	Malasia
<i>P. djamor</i> var <i>roseus</i> ¹²	Etanólico	43.89 ± 0.99 ^b	5.66 ± 1.92	6.50	ND	ND	0.874	Malasia
<i>P. djamor</i> ⁵⁰	Etanólico	ND	ND	0.12	ND	ND	ND	Colombia
Micelio								
<i>P. eryngii</i> ¹⁵	Etanólico	12.65 ± 0.82	ND	2.47 ± 0.03	ND	9.18 ± 0.03	ND	China
<i>P. ostreatus</i> ¹⁶	Etanólico	35.40 ± 6.75 ^c	28.00 ± 5.70 ^c	ND	ND	ND	ND	Rumania
<i>P. ostreatus</i> ¹⁷	Etanólico	14.41 ± 1.68 ^a	4.42 ± 0.86	13.94	ND	ND	ND	Serbia

EAG: Equivalentes de ácido gálico. ms: masa seca. EQ: Equivalente de quercetina. ^aext s. ^bmg equivalentes de ácido tánico (EAT)/g ext. ^cmg EQ/g biomasa. ICREQ: Índice de capacidad reductora equivalente de quercetina. ND: No determinado.

4. METODOLOGÍA

La metodología que se realizó en esta tesis se dividió en cuatro etapas: 1) Caracterización del micelio, 2) Productividad de las cepas de *Pleurotus*, 3) Secado y preparación de la muestra y 4) Cuantificación de compuestos fenólicos y la AA, Figura 10.

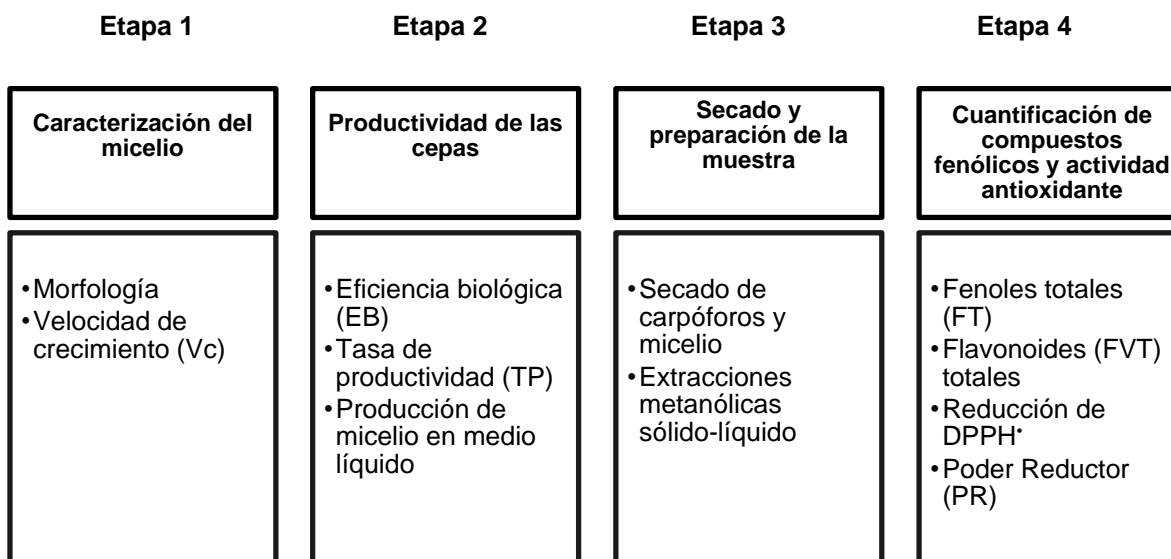


Figura 10. Etapas del presente proyecto de investigación

La metodología general que se empleó en este trabajo se muestra en la Figura 11. Esta incluye la obtención de micelio y carpóforos, obtención de los extractos metanólicos de las diez cepas de *Pleurotus*, y la cuantificación espectroscópica de FT, FVT y AA.

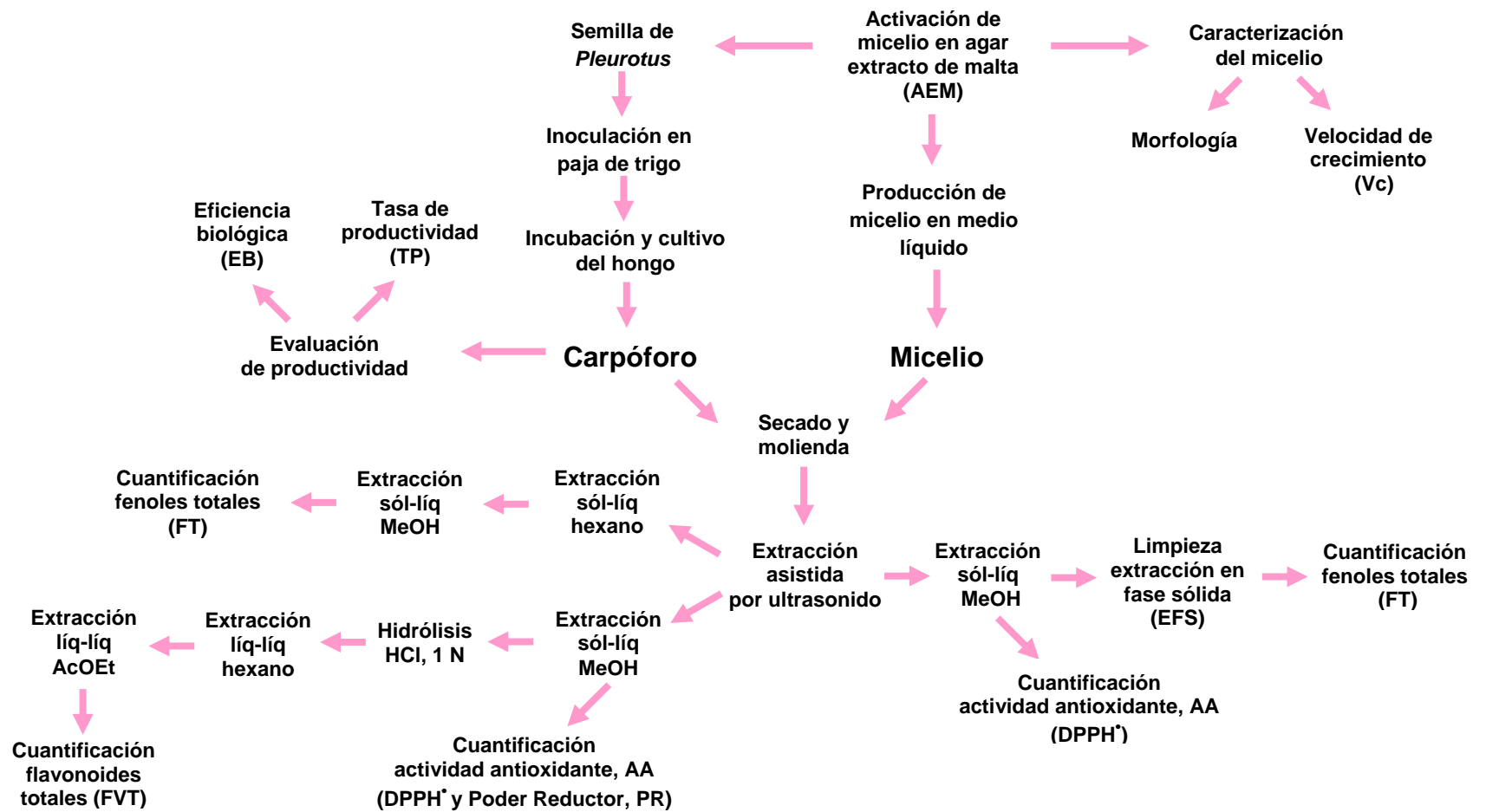


Figura 11. Metodología general de la investigación

4.1 Material biológico

Se usaron cepas del género *P. djamor* provenientes del cepario de la UTM, las cuales, fueron aisladas, identificadas y caracterizadas previamente por el grupo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos.⁵ Las cepas son las siguientes: cepas silvestres (UTMB y UTMR), cepas reconstituidas (BB y RR), cepas híbridas (H1, H2, H3 y H4) y cepas control que fueron donadas por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), (RP, *Pleurotus djamor* y UAP9, *Pleurotus* spp.), Figura 12.

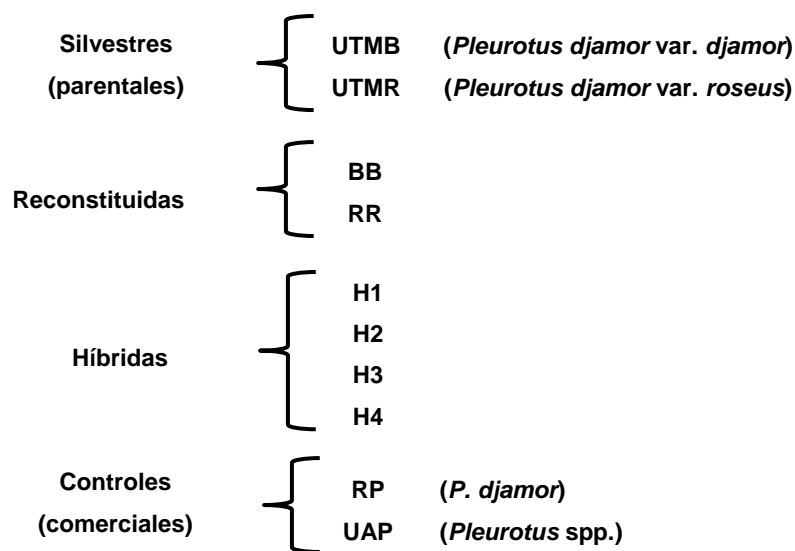


Figura 12. Cepas de *Pleurotus* utilizadas en esta investigación

4.2 Equipos y materiales

En la parte experimental relativo a la productividad, se empleó lo siguiente: Campana de flujo laminar Labconco Clean Bench 36125-00, incubadora Riossa, incubadora de agitación orbital VWR®, microscopio Iroscope MG-11P1, centrífuga Eppendorf 5810 R, refrigerador General Electric Smart RG19X1MA, congelador Torrey CVPS21, autoclave Presto,

licuadora Osterizer dos velocidades, mechero Fisher, balanza granataria OHAUS Triple Beam TJ2611, vernier MetroMex Scala, termohigrómetro TFA Dostmann Wertheim, cronómetro Cole-Parmer®, cajas Petri.

En la parte experimental que involucró a la AA: Molino ciclónico Foss™ Cyclotec 1093, ultrasonicador-degasificador cleaner SB-3200 DTN, rotavapor Heidolph Laborota 4000, campana de extracción Manufacturera metálica Argos, efficient, bomba de vacío Vacuubrand MZ2C, lector de microplacas Synergy HTX BioTek®, balanza analítica Ohaus Pioneer PA214, termobalanza Sartorius™ MA45, C18 de Burdick & Jakson, vórtex Barnstead International type 16700 Mixer e IKA®, placas de 96 pozos Costar de media área de fondo plano de poliestireno, micropipetas de volumen ajustable, micropipeta multicanal Accumax. El secado de las muestras se realizó en un deshidratador de charolas giratorias, construido en el Instituto de Agroindustrias de la UTM.⁵¹ En toda la parte experimental se empleó: material de vidrio, parrillas de calentamiento Barnstead Thermolyne CIMAREC®, micropipetas de volumen ajustable,

4.3 Reactivos, disolventes, medios de cultivo y sustrato

Ácido gálico monohidratado 98%, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH'), KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico) 99%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado) 98%, (\pm) ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) 97%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (hexacianoferrato (III) de potasio) 98.5-102.0%, y quercetina $\geq 95\%$, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), rutina $\geq 94\%$, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich®. AlCl_3 (cloruro de aluminio) en cristales 97.8%, fue comprado en J.T. Baker®. FeCl_3 (cloruro férrico) en trozos 97% adquirido en Analytyka Reactivos. $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (hexacianoferrato de potasio (II)

trihidratado) 99.7%, CCl_3COOH (ácido tricloroacético) 99%, fueron de Reactivos Química Meyer; reactivo Folin-Ciocalteu 2 M fue de la marca Fluka; Na_2CO_3 (carbonato de sodio) anhidro en polvo 99%, NaNO_2 (nitrito de sodio) granular 97% y $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (glucosa) anhidra fueron de la marca Productos Químicos Monterrey; NaOH (hidróxido de sodio), K_2HPO_4 (fosfato dibásico de sodio) anhidro fue obtenido de Wako Pure Chemical Industries; MeOH (metanol) 99.8%, EtOH (etanol) 99.9% y cloruro de benzalconio 50% fueron comprados de Reasol. Agar extracto de malta (AEM) fue de la marca Dibico; agar bacteriológico, extracto de levadura y peptona fueron de la marca Bioxon. Hipoclorito de sodio comercial de la marca Cloralex. Grano y paja de trigo. Los disolventes, incluido el agua, se destilaron y degasificaron antes de ser usados.

4.4 Preparación de medios de cultivo

4.4.1 Medio sólido en agar extracto de malta (AEM) para crecimiento micelial. Se disolvieron 20.0 g de agar bacteriológico y 15.0 g de AEM en 1 L de agua pasada por ósmosis inversa. La disolución se esterilizó en autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$, 15.65 psi por 20 min. Esterilizada la disolución, se colocó 10 mL de medio AEM en cajas Petri e incubaron a $28\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h para comprobar su esterilidad. Las cajas con agar, libres de contaminación, se almacenaron en la incubadora hasta su empleo posterior.

4.4.2 Medio para producción de micelio en cultivo líquido.⁵² Se disolvieron 20 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura, 1 g de peptona, 0.6 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 y 0.5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada. En matraces Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 330 mL de medio. A cada matraz se le colocó un tapón de algodón. Se esterilizó

a 121 °C, 15.65 psi por 20 min. Una vez estériles, se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 24 h para asegurar su esterilidad.

4.5 Caracterización de la morfología y el crecimiento micelial de cepas de *P. djamor* en medio sólido AEM⁵³

Se utilizó AEM como medio de cultivo sólido para realizar el crecimiento micelial de las cepas. El micelio de las cepas se mantuvo activo realizando resiembras en AEM cada 21 días y se incubó en la oscuridad a 28 ± 2 °C. Para confirmar que los micelios resebrados pertenecían a las cepas de interés se hicieron observaciones en el microscopio de las fíbulas (estructuras formadas durante la etapa de crecimiento celular en células dicarióticas) presentes en las hifas septadas. Una vez que el micelio invadió por completo el medio sólido de AEM contenido en la caja Petri se hizo la caracterización visual de la morfología micelial. Las características que se evaluaron fueron textura (algodonosa o floculosa), densidad (alta, regular o baja), color (transparente, blanco o rosa pálido) y forma de crecimiento (escaso, regular o abundante).

Para la caracterización del crecimiento micelial de las cepas en medio AEM, se determinó la velocidad de crecimiento micelial (V_c). Para ello se transfirieron fragmentos de 8 mm de diámetro de micelio de cada cepa a cajas Petri (90 x 15 mm) con 10 mL de AEM y se incubaron en oscuridad a 28 °C. El crecimiento micelial acumulado (C_{ma}) fue determinado midiendo diariamente con un calibrador vernier el diámetro de la colonia hasta completar la invasión de la caja.³¹ Se evaluó el crecimiento micelial en medio sólido desde el inicio de la inoculación hasta la invasión total de la caja (10 días aproximadamente). De este crecimiento se realizó una gráfica del diámetro de la biomasa en el medio de cultivo contra

el tiempo (d), y se obtuvo un ajuste lineal correspondiente a la ecuación (ejemplo: $y = 0.8877x - 0.6933$ con $R^2 = 0.981$). Por lo tanto, la velocidad de crecimiento se estimó calculando la pendiente (m) de la ecuación de la curva:

$$y_1 = mx_1 + b$$

Donde y_1 es el diámetro de Cma expresado en cm, x_1 es el tiempo expresado en días (d) y m es la velocidad promedio de crecimiento micelial (V_c) expresado en cm/d.⁵ Las velocidades de crecimiento micelial promedio se obtuvieron a partir del promedio de cinco repeticiones por cada cepa \pm desviación estándar.

4.6 Productividad de las cepas de *P. djamor*

4.6.1 Producción del inóculo de grano de las cepas de *P. djamor*. La preparación de la semilla (grano de trigo) se realizó de la manera siguiente: se limpió el trigo eliminando impurezas y se remojó en agua por 24 h a temperatura ambiente. El trigo se lavó varias veces para eliminar azúcares fermentados, se pesaron 150 g del grano hidratado y se colocaron en bolsas de polipapel (20 x 30 cm). Se esterilizaron a 121 °C, 15.65 psi durante 40 min. El grano de trigo contenido en las bolsas fue inoculado en condiciones estériles y combinado con el contenido de la mitad de una caja invadida con micelio a temperatura ambiente. Se eliminó todo el aire posible y la bolsa se amoldó para formar un cilindro de 3 cm de diámetro x 10 cm de altura aproximadamente. Las bolsas inoculadas fueron selladas, etiquetadas e incubadas en la oscuridad a 28 ± 2 °C y posteriormente se esperó hasta que el micelio invadiera al grano en su totalidad. Para cada cepa se realizaron ocho réplicas \pm la desviación estándar.

4.6.2 Obtención de los carpóforos de las cepas de *P. djamor*. Para preparar el sustrato de paja se picaron fragmentos de 3 a 5 cm de largo, se remojaron en agua por 24 h, se pasteurizaron con vapor de agua durante 3 h, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, en condiciones estériles se inoculó por el sistema de capas un kg de paja pasteurizada con 150 g de inóculo de grano de trigo y se llenaron las bolsas de 50 x 60 cm. Las bolsas inoculadas se comprimieron para eliminar todo el aire posible, se sellaron y etiquetaron. Las bolsas se incubaron en oscuridad a 23 ± 3 °C hasta la completa colonización del sustrato. Al cuarto día después de la inoculación, se perforaron las bolsas con una aguja estéril para favorecer el intercambio gaseoso y crecimiento micelial. Se hicieron constantes revisiones visuales durante el período de incubación para observar el crecimiento del micelio, detectar primero las posibles contaminaciones y la aparición de primordios. Cuando los primordios aparecieron, las bolsas se traspasaron a un cuarto de fructificación con una humedad constante entre 80 - 85%, temperatura entre 18 - 20 °C, 9 h de luz y 15 h de oscuridad, para ayudar a la formación de los carpóforos.⁵ Se registró el tiempo correspondiente de esta aparición.

Una vez que el hongo alcanzó su tamaño y forma característicos, se realizó la cosecha (se realizaron dos cortes durante el ciclo productivo) y se registró la masa húmeda del hongo para obtener el rendimiento.⁵ Para cada cepa se realizaron ocho réplicas \pm la desviación estándar. La productividad se evaluó con los parámetros siguientes:

- Eficiencia biológica (EB), es la relación entre la masa fresca de los hongos cosechados y la masa del sustrato seco expresado como porcentaje.

$$EB = \frac{\text{masa fresca del hongo}}{\text{masa seca del sustrato}} * 100$$

- Tiempo de inicio de la formación de primordios (Tfp), son los días transcurridos desde el traslado de la paja inoculada al cuarto de fructificación, hasta el inicio de formación de primordios. Se expresa en días (d).
- Tiempo de cosecha total (Tct), los días transcurridos desde el traslado de la paja inoculada al cuarto de fructificación, hasta el último corte. Se expresa en días (d).
- Tasa de productividad (TP), es la relación entre EB y el número de días del ciclo productivo (desde el traslado de la paja inoculada al cuarto de fructificación, hasta que se realiza el último corte) se expresa como porcentaje.

$$TP = \frac{EB}{\text{número de días del ciclo productivo}} * 100$$

- Peso medio de las fructificaciones (Pm), se calculó con el promedio de la masa fresca media de la primera y segunda cosechas. El Pm de cada cosecha se calculó dividiendo la masa total de los carpóforos frescos cosechados entre el número total de carpóforos cosechados.²⁶

$$Pm = \frac{\text{masa total de los carpóforos frescos cosechados}}{\text{número total de carpóforos cosechados}}$$

4.6.3 Determinación de humedad en carpóforos frescos y secos. Para determinar la humedad se empleó el método 925.09 de AOAC. Se pesó 2 g de carpóforos frescos, se cortaron y se colocaron en crisoles a 105 °C por 5 h. Posteriormente se determinó el porcentaje de humedad. Para la muestra seca se repitió el mismo procedimiento que para la muestra fresca. Los datos fueron usados para el cálculo de las determinaciones de los compuestos fenólicos y AA en base húmeda y seca, respectivamente. Todas las

determinaciones se realizaron por triplicado y los valores se expresaron como la media de una medición \pm la desviación estándar.

4.7 Actividad antioxidante (AA) en *P. djamor* de carpóforos y micelio

4.7.1 Preparación de la muestra a partir de carpóforos. Los carpóforos frescos, se cortaron en trozos de 2 a 3 mm y se secaron en un horno de charolas giratorias a 40 °C hasta alcanzar menos del 10% de humedad. Posteriormente, se molieron en molino ciclónico y los polvos obtenidos se almacenaron a -4 °C hasta su uso posterior.

4.7.2 Preparación de la muestra micelial. El cultivo madre se mantuvo en placas de agar extracto de malta con sub-cultivos periódicos. De media placa invadida por micelio se hicieron cortes (1 cm²) con un cortador estéril y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 330 mL de medio líquido. Se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 150 rpm, 28 °C por 12 \pm 1 días. Pasado ese tiempo, a la biomasa de cada cepa se le hicieron tres lavados con agua pasada por ósmosis, la cual se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. El micelio lavado y centrifugado se deshidrató a 40 °C en el secador de charolas giratorias. Una vez deshidratado el micelio, se molió en licuadora por 10 s y posteriormente se terminó de moler en un mortero. Se almacenó a -4 °C hasta su empleo posterior para la obtención del extracto orgánico.

4.7.3 Obtención del extracto metanólico desengrasado de carpóforos. Se pesaron 0.30 g de los carpóforos secos y se adicionaron 10 mL de hexano. Se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido por 10 min a 25 °C. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y el sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman #1. Se repitió el procedimiento una vez más. Al residuo desengrasado se agregaron 10 mL de MeOH, se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido por 10 min a 25 °C. El extracto se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se filtró a través de papel filtro Whatman #1. Se repitió la extracción sólido-líquido dos veces más para asegurar la extracción de los componentes polares. Los sobrenadantes filtrados se combinaron y evaporaron a sequedad a 40 °C en un rotavapor. El residuo se pesó para obtener el rendimiento y se redisolvió en 10 mL de MeOH. Este extracto se empleó para la cuantificación de FT (Ver Sección 4.7.7). Las extracciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones \pm la desviación estándar.

4.7.4 Obtención del extracto metanólico hidrolizado y desengrasado de carpóforos. Se pesaron 5.0 g de polvo de carpóforos secos a los cuales se adicionaron 25 mL de MeOH. Posteriormente, se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido por 10 min a 25 °C. Se llevó a centrifugación a 5000 rpm por 5 min, el sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman #1. El procedimiento se repitió dos veces más. Los sobrenadantes se combinaron y evaporaron a 40 °C en un rotavapor a vacío. El residuo se pesó para obtener el rendimiento y se adicionaron 30 mL de HCl 1 N. El hidrolizado se calentó por 1 h, a 80 °C en un baño de agua. Pasado ese tiempo, el hidrolizado se llevó a temperatura ambiente, y se realizó la extracción líquido-líquido con hexano (40 mL x 3). A la fase acuosa remanente se le realizaron extracciones líquido-líquido con AcOEt (40 mL x 3). Los extractos de AcOEt se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron a través de algodón y se

evaporaron a 40 °C en un rotavapor al vacío. Antes de completar la evaporación, a la disolución se le adicionó una alícuota de carbón activado. Posteriormente, se filtró a través de papel filtro Whatman #1, se lavó el papel filtro con AcOEt y se evaporó a sequedad. El residuo se pesó para obtener el rendimiento y se redisolvió en MeOH para alcanzar la concentración de 25 mg/mL. Este extracto se empleó para cuantificar el contenido de FVT (Ver sección 4.7.8). Las extracciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones \pm la desviación estándar.

4.7.5 Obtención del extracto metanólico crudo de carpóforos y micelio.⁵⁴ Se pesaron las siguientes cantidades de polvo seco de carpóforo y micelio:

Método	Masa (g)	
	Carpóforo	Micelio
DPPH*	0.30	0.20
PR	0.35	--

Al polvo seco se le agregaron 10 mL de MeOH, y se realizó la extracción asistida por ultrasonido a 25 °C por 10 min. El extracto obtenido se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman #1 y se repitió la extracción dos veces más. Los sobrenadantes se combinaron y evaporaron a sequedad a 40 °C en un rotavapor. El residuo se pesó para obtener el rendimiento y se redisolvió en 10 mL MeOH. Este extracto se obtuvo para cuantificar la AA mediante el método del radical DPPH* para carpóforos y micelio, y por el método de PR para carpóforos (Ver secciones 4.7.9 y 4.7.10). Las extracciones se realizaron por triplicado con una medición para el método del DPPH*, y dos mediciones para el método de PR \pm la desviación estándar, respectivamente.

4.7.6 Obtención del extracto metanólico micelial y limpieza por extracción en fase sólida (EFS). Se pesaron 0.20 g de polvo de micelio seco y se agregaron 10 mL de MeOH. Se realizó la extracción mediante ultrasonido a 25 °C por 10 min. El extracto obtenido se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman #1. Se repitió la extracción una vez más. Los sobrenadantes se combinaron y evaporaron a sequedad a 40 °C en un rotavapor. Se pesó el extracto seco para obtener el rendimiento y se disolvió en 5 mL de una mezcla de MeOH:H₂O (2:3). Se acondicionó un cartucho con C-18 con agua y la disolución del extracto se hizo pasar por la fase estacionaria. La disolución obtenida de esta extracción en fase sólida se evaporó a sequedad a 40 °C en un rotavapor. Se aforó con MeOH a 10 mL. Las extracciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones \pm la desviación estándar. Este extracto se usó para la cuantificación de FT (Ver sección 4.7.7).

4.7.7 Cuantificación de fenoles totales (FT). *Preparación de disoluciones.* Na₂CO₃ al 0.5% (p/v): 50 mg de Na₂CO₃ se pesaron, y después se llevaron a un volumen de 10 mL con agua. Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M: 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M se midieron, y se disolvieron en agua hasta alcanzar un volumen de 10 mL en ausencia de luz. Ácido gálico 1000 µg/mL: 10 mg de ácido gálico se pesaron, se disolvieron en MeOH y se llevaron a un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon los estándares de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL.

Cuantificación. Se empleó el método colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu⁵⁵ con modificaciones. 40 µL de extracto o de estándar se combinaron con 40 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M en una microplaca. La mezcla se dejó en reposo por 3 min a

temperatura ambiente en el lector de microplacas, y se agitó por 15 s a baja velocidad. Pasado este tiempo, a la mezcla anterior se adicionaron 40 μL de Na_2CO_3 al 0.5% que se incorporaron mediante succión (tres veces). La mezcla se dejó reposar 30 min a 40 $^\circ\text{C}$, y después se agitó por 1 min a velocidad media en el lector de microplacas. La absorbancia de la muestra o del estándar se leyó a 750 nm. Al blanco de la muestra o del estándar se adicionó agua en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu. Para realizar la cuantificación de los fenoles totales se construyó una curva de calibración de ácido gálico. El contenido de FT se expresó en mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto (mg EAG/g ext) o mg equivalentes de ácido gálico/g de masa seca (mg EAG/g ms). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones y los valores se expresaron como la media de tres mediciones \pm la desviación estándar.

4.7.8 Cuantificación de flavonoides totales (FVT). *Preparación de las disoluciones.*

NaNO_2 al 1.5% (p/v): 375 mg de NaNO_2 se pesaron y llevaron a un volumen de 25 mL con agua. AlCl_3 al 3% (p/v): 300 mg de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se pesaron y se llevaron a un volumen de 10 mL con agua. NaOH 1 N: 400 mg de NaOH se pesaron y disolvieron en agua hasta alcanzar un volumen de 10 mL. Estándares de quercetina: 10 mg de quercetina se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL en ausencia de luz. A partir de ese stock se preparó un estándar de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de esta última disolución se obtuvieron los estándares a concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Cuantificación. Se realizó según lo descrito por Julián-Loeza⁵⁵ con modificaciones. A 1 mL del extracto o del estándar se le agregó 1 mL de NaNO_2 al 1.5% y se agitó en un vórtex por 5 min a temperatura ambiente. De esta mezcla se tomó una alícuota de 50 μL que se colocó

en una microplaca. Se agregaron 50 μL de AlCl_3 al 3% y se agitó por 1 min a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. Transcurrido este tiempo, a la mezcla anterior se le adicionaron 50 μL de NaOH 1 N que se incorporaron mediante succión (tres veces). La mezcla se agitó por 1 min a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. La absorbancia de la muestra o del estándar se leyó a 490 nm. Para preparar el blanco de la muestra o del estándar se adicionó agua en lugar del reactivo de AlCl_3 . Para construir la curva de calibración se utilizó quercetina y a partir de la ecuación correspondiente se obtuvo el contenido de FVT expresados como mg equivalentes de quercetina/g extracto (mg EQ/g ext) ó mg equivalentes de quercetina/g de masa seca (mg EQ/g ms). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones y los valores se expresaron como la media de tres mediciones \pm la desviación estándar.

4.7.9 Cuantificación de la actividad antirradical por el método del DPPH'. Preparación de disoluciones. Disolución stock de DPPH' al 0.1% (p/v). 10 mg de DPPH' se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL en ausencia de luz. De esta disolución se preparó una disolución al 0.004%, que fue resguardada de la luz. Estándares de ácido gálico: 10 mg de ácido gálico se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL para obtener una disolución stock de 1,000 mg/mL. A partir de esta disolución se preparó un estándar de 20 $\mu\text{g/mL}$ y de él se obtuvieron estándares de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Estándares de rutina: 12.20 mg de rutina hidratada se pesaron y se llevaron a un volumen de 10 mL con MeOH para obtener una disolución stock de 1,220 mg/mL. A partir de esta disolución se prepararon estándares de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$. Estándares de BHT. 11 mg de BHT se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL para obtener una solución stock de 5,000 $\mu\text{g/mL}$. Partiendo de esta

disolución se preparó el estándar de 500 µg/mL y a partir de ésta última se prepararon los estándares de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL. Disoluciones de extractos metanólicos de carpóforos y micelio de las cepas de *P. djamor*: se prepararon cinco disoluciones a concentraciones entre 1 y 17 mg/mL.

Cuantificación. Se realizó de acuerdo a lo descrito por Julián-Loaeza⁵⁵ con modificaciones. A 70 µL del extracto o del estándar se agregaron 70 µL de DPPH• al 0.004% en una microplaca. La muestra o el estándar se dejaron en reposo por 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz y posteriormente se mezclaron a velocidad media por 1 minuto en el lector de microplacas. El porcentaje de disminución de la absorbancia se graficó para cada concentración y el porcentaje del DPPH• consumido se calculó con base en el decremento observado en la absorbancia de la disolución con el radical DPPH•. Los cambios en la absorbancia de las muestras se leyeron a 515 nm en el lector de microplacas. La disolución de DPPH• al 0.004% en MeOH se usó para obtener el valor de absorbancia de DPPH• (blanco de DPPH•). Para preparar el blanco de las muestras o del control se agregó MeOH en lugar de DPPH•. La actividad antirradical se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}^\bullet} - A_{\text{EXT}}}{A_{\text{DPPH}^\bullet}} \right]$$

donde:

A_{DPPH^\bullet} = valor de la absorbancia del blanco con DPPH• a 515 nm

A_{EXT} = valor de la absorbancia del extracto o control a evaluar

El valor IC_{50} se expresó en mg/mL,⁵⁶ y corresponde a la concentración de compuestos antioxidantes capaz de inhibir el 50% del radical DPPH[•]. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores se expresaron como la media de tres mediciones \pm la desviación estándar.

4.7.10 Cuantificación del Poder Reductor (PR). *Preparación de disoluciones.* Buffer de fosfato 0.2 M, pH 6.6: 70 mg de K_2HPO_4 y 217 mg KH_2PO_4 se pesaron y se disolvieron en agua y se aforó a 10 mL. $K_3Fe(CN)_6$ al 1%: 190 mg de hexacianoferrato de potasio (III) trihidratado se pesaron y disolvieron en agua hasta alcanza un volumen de 10 mL. La disolución se preparó momentos antes de su empleo. $K_4Fe(CN)_6$, 1 mM: 43 mg de hexacianoferrato de potasio (III) trihidratado se pesaron y disolvieron en agua hasta alcanzar un volumen de 100 mL. La disolución anterior recién preparada se utilizó para obtener una disolución de $K_4Fe(CN)_6$ 100 μ M. CCl_3COOH 10%: 1.63 g de ácido tricloroacético se pesaron y disolvieron en agua hasta alcanzar un volumen de 10 mL. $FeCl_3$ al 0.1%: 28 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ se pesaron y disolvieron en agua hasta un volumen de 10 mL. Disolución stock de ácido gálico 1 mg/mL: 10 mg de ácido gálico se pesaron y disolvieron en MeOH hasta un volumen de 10 mL. A partir de esta disolución se prepararon los estándares de 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/mL. Disoluciones de extractos metanólicos de cepas de *P. djamor*. se prepararon disoluciones de concentraciones entre 0.5 a 9 mg/mL.

Cuantificación. La cuantificación se realizó según lo descrito por Oyaizu⁴² con modificaciones. A 125 μ L del extracto o estándar, se agregaron 125 μ L de buffer de fosfato y 125 μ L de ferricianuro de potasio. La mezcla se mantuvo en un baño de agua a 50 °C por 20 min. Pasado ese tiempo se agregaron 125 μ L de ácido tricloroacético al 10% y se agitó

en un vortex por 10 seg. Se colocaron 70 μL del sobrenadante y 70 μL de agua en una microplaca, se adicionaron 14 μL de FeCl_3 mediante succión (3 veces) y se leyó la absorbancia a 700 nm en un lector de microplacas. Para preparar el blanco de las muestras y del estándar se adicionó agua en lugar de la disolución de ferricianuro de potasio. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico y a partir de la ecuación de dicha curva se obtuvo el PR expresado en mg equivalentes de ácido gálico/g de masa seca (mg EAG/g ms). Así también, se obtuvo el IC_{50} expresado en mg/mL a partir de la ecuación de la curva obtenida por graficar concentración de la muestra (mg/mL) contra porcentaje de inhibición. Las determinaciones se realizaron por triplicado con dos repeticiones y los valores se expresaron como la media de tres mediciones \pm la desviación estándar. De igual manera, la capacidad reductora (CR) se expresó como porcentaje de acuerdo a Canabady-Rochelle y col.⁴⁵ y se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{CR (\%)} = 100 - \left[\frac{A_o - A_s}{A_o} * 100 \right]$$

donde:

A_o = valor de la absorbancia de la disolución de ferrocianuro de potasio medida en la misma reacción libre de extracto o estándar a 700 nm

A_s = valor de la absorbancia del extracto o control a evaluar a 700 nm

Usando la relación entre la pendiente obtenida de los extractos de cada cepa y la pendiente obtenida del ácido gálico se determinó el índice de capacidad reductora expresado como mg equivalentes de ácido gálico (ICREAG) de acuerdo a la fórmula siguiente:⁴⁵

$$\text{ICREAG} = \frac{a_o}{a_s}$$

donde:

a_s = pendiente de la capacidad reductora del extracto de cada muestra

a_o = pendiente de la capacidad reductora del ácido gálico

4.8 Análisis estadístico

Los valores presentados en el presente trabajo son un promedio \pm la desviación estándar del número de réplicas obtenidas con el programa Microsoft Excel 2013. Por otro lado, se aplicó un análisis de varianza de un solo factor mediante el paquete estadístico SAS System for Windows 9.0, 2004 para evaluar si existían diferencias significativas entre la velocidad de crecimiento micelial (V_c), los datos de productividad (EB, Tfp, Tct, Pm y TP), el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante de los carpóforos y el micelio de las diferentes cepas de *Pleurotus*. Se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$), para clasificar los resultados obtenidos.

Se empleó un análisis de varianza de dos factores y se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$) para encontrar diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos y las determinaciones del PR y la AA entre carpóforos y micelio.

Se utilizaron correlaciones de Pearson para determinar la correlación entre los parámetros evaluados. Se usó el paquete estadístico SAS System for Windows 9.0, 2004 para estas determinaciones.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Morfología micelial en medio sólido en agar extracto de malta (AEM) de cepas de *P. djamor*.

Las características de morfología micelial de las diez cepas de *Pleurotus* (dos cepas parentales-silvestres: UTMB y UMTR; dos cepas reconstituidas: BB y RR; cuatro cepas híbridas: H1, H2, H3 y H4; y dos cepas control: RP y UAP9) cultivadas en medio sólido de agar extracto de malta (AEM), se enlistan en la Tabla 4. La textura que presentaron todas las cepas fue algodonosa. La forma de crecimiento que mostraron fue abundante con excepción de la cepa silvestre UTMB y la híbrida H2, que presentaron forma de crecimiento regular y escaso, respectivamente. Hubo variaciones en la densidad del micelio (alta y regular) y en el color (blanco y rosa). La morfología que presentaron las cepas silvestres (UTMB y UTMR), es parecida a lo encontrado por Guadarrama.⁵ Este resultado se esperaba, ya que las cepas de este trabajo provienen de dicha investigación.

Tabla 4. Morfología micelial de las cepas de *Pleurotus djamor* en medio agar extracto de malta (AEM)

Cepa		Forma de crecimiento	Densidad	Color
Parental-silvestre	UTMB	Regular	Regular	Blanco
	UTMR	Abundante	Regular	Rosa
Reconstituida	BB	Abundante	Regular	Blanco
	RR	Abundante	Alta	Rosa pálido
Híbrida	H1	Abundante	Alta	Blanco
	H2	Escaso	Baja	Rosa pálido
	H3	Abundante	Alta	Rosa pálido
	H4	Abundante	Alta	Rosa pálido
Control	RP*	Abundante	Regular	Rosa
	UAP9**	Abundante	Alta	Blanco

Todas las cepas presentaron textura algodonosa. Criterio según Sobal *et. al.*, 2007.⁵³ **P. djamor*. ***Pleurotus* spp.

No se había reportado la morfología de las cepas reconstituidas e híbridas. Además, la morfología de las cepas control (RP Y UAP9) concuerda con lo descrito por Guadarrama⁵ y Valencia del Toro.³²

A pesar de que la mayoría de las cepas pertenecen a la especie *djamor*, se puede observar diversidad en su morfología micelial. En el caso de la cepa silvestre UTMB y su reconstituida BB, la diferencia se observó en la forma de crecimiento. La cepa UTMB presentó una forma de crecimiento regular y la cepa BB, abundante. Así también, la cepa silvestre UTMR y la reconstituida RR, fueron diferentes en densidad. La cepa UTMR presentó una densidad regular y la cepa RR, alta. Las cepas híbridas al ser una combinación de núcleos de las cepas UTMB y UTMR mostraron morfologías muy parecidas a sus cepas de origen. La cepa H3 presentó una forma de crecimiento escaso y densidad baja mientras que la cepa H1 fue la única que presentó coloración blanca. Esto concuerda con el trabajo de Guadarrama y col.,⁵⁷ en el que menciona que la cepa de color rosa contiene probablemente el gen con alelo dominante y la cepa de color blanco el gen con alelo recesivo.

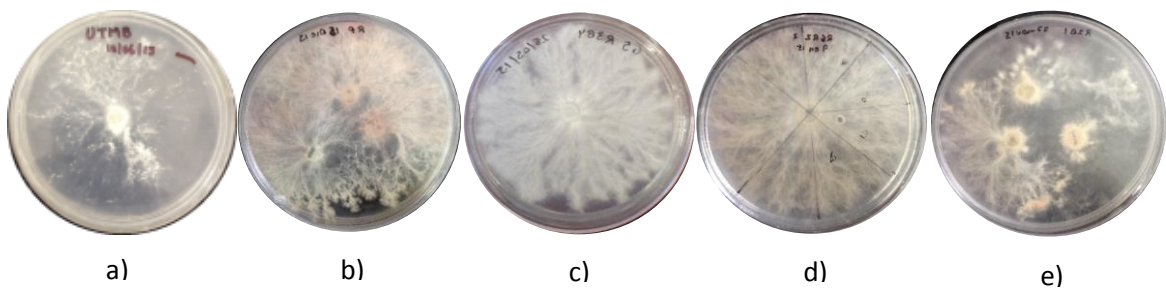


Figura 13. Morfología micelial de cepas de *Pleurotus* spp. a) UTMB; b) RP; c) H3; d) RR; e) H2

Por otra parte, la cepa control RP, tuvo una morfología muy parecida a la cepa UTMR y la cepa control UAP9 fue semejante a la cepa UTMB, salvo en su densidad, Figura 13. De esta forma se observa para estas cepas una diversidad de rasgos fenotípicos, la cual puede deberse a factores intrínsecos como el genotipo de la cepa, mutaciones, coadaptación y recombinación somática de los componentes, o factores extrínsecos tales como la influencia de la luz, la vejez del cultivo y el tipo de medio de cultivo.⁵⁸

5.2 Velocidad de crecimiento micelial (Vc) en medio sólido AEM de cepas de *P. djamor*

La velocidad de crecimiento micelial (Vc) indica la rapidez con la que invade el micelio el medio de cultivo y es un parámetro que sirve como criterio de caracterización de cada una de las cepas. Los resultados obtenidos en este trabajo se enlistan en la Tabla 5. De las cepas de estudio, la cepa reconstituida RP presentó el valor más alto de Vc (0.94 ± 0.07 cm/d), y la cepa híbrida H2 el valor de Vc más bajo (0.25 ± 0.02 cm/d). También se puede apreciar que en general, las cepas reconstituidas e híbridas presentaron velocidades de invasión más rápidas respecto a las cepas silvestres con excepción de la cepa híbrida H2. Estos resultados concuerdan con lo que otros autores han reportado, en donde la mejora en la velocidad de crecimiento micelial de las cepas reconstituidas e híbridas, se deba a la reactivación de ciertas características genotípicas que estaban en latencia en las cepas de origen y que se reactivan durante el proceso de desdicarriotización y acoplamiento de neohaplontes mejorándose las propiedades de las cepas respecto a las originales.⁵⁹

La cepa control RP, tuvo un crecimiento más rápido que las cepas objeto de estudio. A su vez, la cepa reconstituida RR fue más rápida incluso que la cepa control UAP9. De acuerdo con Guadarrama, se ha visto en reportes anteriores que cada cepa tiene un potencial de

velocidad de crecimiento micelial característico. Esto puede deberse al tipo de enzimas (celulasas, hemicelulasas y lacasas) que las setas tienen para asimilar el sustrato y crecer a velocidades diferentes en un medio de cultivo específico.

Tabla 5. Velocidad de crecimiento micelial de cepas de *P. djamor*

Cepa		Vc (cm/d)	Coefficiente de correlación lineal (R ²)
Parental-silvestre	UTMB	0.42 ± 0.04 ^e	0.955
	UTMR	0.41 ± 0.18 ^e	0.994
Reconstituida	BB	0.74 ± 0.08 ^c	0.978
	RR	0.83 ± 0.04 ^b	0.987
Híbrida	H1	0.71 ± 0.02 ^c	0.985
	H2	0.25 ± 0.01 ^f	0.963
	H3	0.54 ± 0.03 ^d	0.993
	H4	0.50 ± 0.01 ^d	0.997
Control	RP	0.94 ± 0.07 ^a	0.988
	UAP9	0.71 ± 0.07 ^c	0.990

Valores reportados corresponden a la media de cinco repeticiones ± SD. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas entre muestras, prueba de Duncan (p<0.05).

En la literatura se ha descrito para cepas de *P. djamor*, lo siguiente: Ahmad y col.⁶⁰ reportaron una Vc = 0.20 cm/d. Sihuanca⁶¹ obtuvo una Vc = 0.72 cm/d. León-Avenidaño⁶² y col. reportaron una Vc = 0.76 cm/d. La Vc de la cepa reconstituida RR (0.83 cm/d) fue mayor a la Vc reportada por León-Avenidaño y col. En general, los valores de este trabajo son cercanos a lo que otros autores han reportado. En la producción de hongos comestibles, se prefiere seleccionar aquellas cepas con velocidades de crecimiento rápidos, porque se disminuye la posibilidad de que el micelio sea invadido por otros microorganismos competidores (hongos y bacterias) y se reduce el tiempo de producción de semilla y cultivo.⁶² En este trabajo, se observó que las velocidades de crecimiento micelial rápido no tuvieron relación directa con una mayor producción de carpóforos. Estos

resultados se asemejan a lo reportado por Salmenes y col.,³¹ quienes no encontraron correlación entre las velocidades de crecimiento micelial y el desarrollo de las fructificaciones para diferentes cepas de *Pleurotus* spp.

5.3 Productividad de las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas

De las diez cepas de *Pleurotus* que se estudiaron todas lograron fructificar, excepto la cepa silvestre UTMB; la cual sólo desarrolló micelio vegetativo en la paja, sin formar primordios y carpóforos. Posiblemente, la cepa perdió su potencial productivo debido a cambios en su información genética, afectando los mecanismos enzimáticos necesarios para favorecer la transición de micelio vegetativo a micelio reproductivo.⁵ Hasta el momento no hay estudios que expliquen cómo se regula y transmite la capacidad de formar estructuras reproductivas en esta especie. Sería interesante realizar investigaciones para esclarecer lo que sucede en el ciclo de vida del hongo y así garantizar que la propiedad de fructificación se conserve y no se pierda en el transcurso del tiempo.

El tiempo de formación de primordios (Tfp) es un criterio importante a considerar durante el cultivo de hongos del género *Pleurotus*, así como el tiempo de cosecha total (Tct) que involucra la primera y segunda cosechas. Existe una ventaja comercial si las cepas que producen fructificaciones con altos rendimientos lo hacen en tiempos cortos de cultivo. Como se aprecia en la Tabla 6, la cepa silvestre UTMR presentó el mejor Tfp (13 ± 2 d) y los más altos Tfp fueron presentados por las cepas híbridas H3 y H4 (22 ± 3 y 23 ± 3 , respectivamente). Los valores obtenidos se asemejan a lo que han reportado otros autores para la obtención de primordios en cepas de este mismo género. Por ejemplo, Salmenes y

col.³¹ reportaron Tfp de 7 a 13 d. Shukla and Jaitly⁴⁶ tuvieron Tfp de 27 a 37 d. Selvakumar y col.⁴⁸ reportaron Tfp de 15 a 25 d.

Para el tiempo de cosecha total (Tct), se consideraron los dos primeros ciclos de cosecha por ser los más productivos. Por lo general, en la primera cosecha se puede obtener hasta tres cuartas partes de la producción,⁶³ ya que los nutrientes del sustrato van disminuyendo conforme se van recolectando los cuerpos fructíferos.³⁸

Tabla 6. Parámetros de productividad de las cepas de *P. djamor*

Cepa		Tfp (d)	Tiempo de cosecha total (Tct, d)	Peso medio (Pm, g)	Eficiencia biológica (EB, %)	Tasa de productividad (TP, %)
Parental-silvestre	UTMR	13 ± 2 ^a	67 ± 11 ^b	1.4 ± 0.2 ^a	120.5 ± 21.6 ^b	2.1 ± 0.3 ^b
	BB	19 ± 3 ^c	25 ± 1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	89.1 ± 12.1 ^c	3.0 ± 0.5 ^a
Reconstituida	RR	18 ± 1 ^b	64 ± 6 ^b	0.8 ± 0.1 ^b	127.9 ± 18.9 ^b	2.0 ± 0.3 ^b
	H1	18 ± 1 ^b	60 ± 8 ^b	0.3 ± 0.1 ^c	25.5 ± 4.2 ^e	0.6 ± 0.1 ^d
Híbrida	H2	20 ± 1 ^c	30 ± 5 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	49.1 ± 3.5 ^d	1.3 ± 0.2 ^c
	H3	22 ± 3 ^d	66 ± 4 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	53.7 ± 8.8 ^d	0.7 ± 0.1 ^d
	H4	23 ± 3 ^d	64 ± 9 ^b	1.5 ± 0.2 ^a	75.8 ± 9.3 ^c	1.2 ± 0.3 ^c
Control	RP	19 ± 2 ^c	78 ± 12 ^c	1.5 ± 0.1 ^a	150.6 ± 17.8 ^a	1.8 ± 0.5 ^b
	UAP9	18 ± 3 ^b	60 ± 7 ^b	1.7 ± 0.2 ^a	124.3 ± 23.4 ^b	2.9 ± 0.6 ^a

Valores reportados corresponden a la media de 8 repeticiones ± SD. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas entre muestras, prueba de Duncan ($p < 0.05$). Tfp: tiempo de formación de primordios.

La cepa reconstituida BB y la híbrida H2, presentaron un ciclo de cosecha, el cual tardó 25 ± 1 y 30 ± 5 d, respectivamente. Sin embargo, para el resto de las cepas la segunda oleada de cosecha se alcanzó en un intervalo de tiempo de los 60 a 67 d. siendo estadísticamente semejantes entre ellas. La cepa control RP tardó más en alcanzar los dos ciclos de cosecha, extendiéndose el cultivo hasta los 78 d. Salmones y col.³¹ reportaron valores de 38 a 56 d para cepas de *P. djamor* al ser cultivadas en paja de trigo. Por lo tanto, las cepas probadas resultaron ser más lentas para la producción de los carpóforos. Sin embargo, es importante

recordar que las diferencias encontradas pueden deberse a las condiciones de cultivo (temperatura, humedad, ventilación y luminosidad), así como, a los factores genéticos de cada cepa.

Otro de los criterios que se evalúan en la calidad de la producción del hongo es el peso medio (Pm), ya que relaciona el peso de los carpóforos frescos por unidad de carpóforo, Generalmente lo que el consumidor busca son carpóforos de gran tamaño y buen peso, es decir, se prefieren fructificaciones con Pm superiores a la unidad. Como se aprecia en la Tabla 6, la mayoría de las cepas alcanzaron valores de Pm superiores a la unidad, siendo las cepas híbridas H3 y H4, así como la silvestre UTMR presentaron los Pm más altos (1.6 ± 0.1 , 1.5 ± 0.2 y 1.4 ± 0.2 g, respectivamente). La cepa híbrida H1 reportó el Pm más bajo, 0.3 ± 0.007 g, careacterizándose por presentar fructificaciones de poco peso y tamaño (inferior a 5 cm de diámetro). En la Figura 14, se muestran fotos de las características de los carpóforos obtenidos para las diferentes cepas estudiadas.

Shukla y Jaitly,⁴⁶ reportaron para *P. sajor caju*, *P. djamor* y *P. florida*, Pm de 1.61, 2.17 y 4.05 g, respectivamente. Maldonado³⁸ empleó cepas silvestres e híbridas de *Pleurotus* spp. y obtuvo Pm en el intervalo de 5.11 a 8.77 g. Por lo tanto, al comparar las características morfológicas de Pm de las cepas mixtecas se observa que son inferiores a otras especies, lo que pudiera ser un factor desfavorable para la aceptación por parte del consumidor.

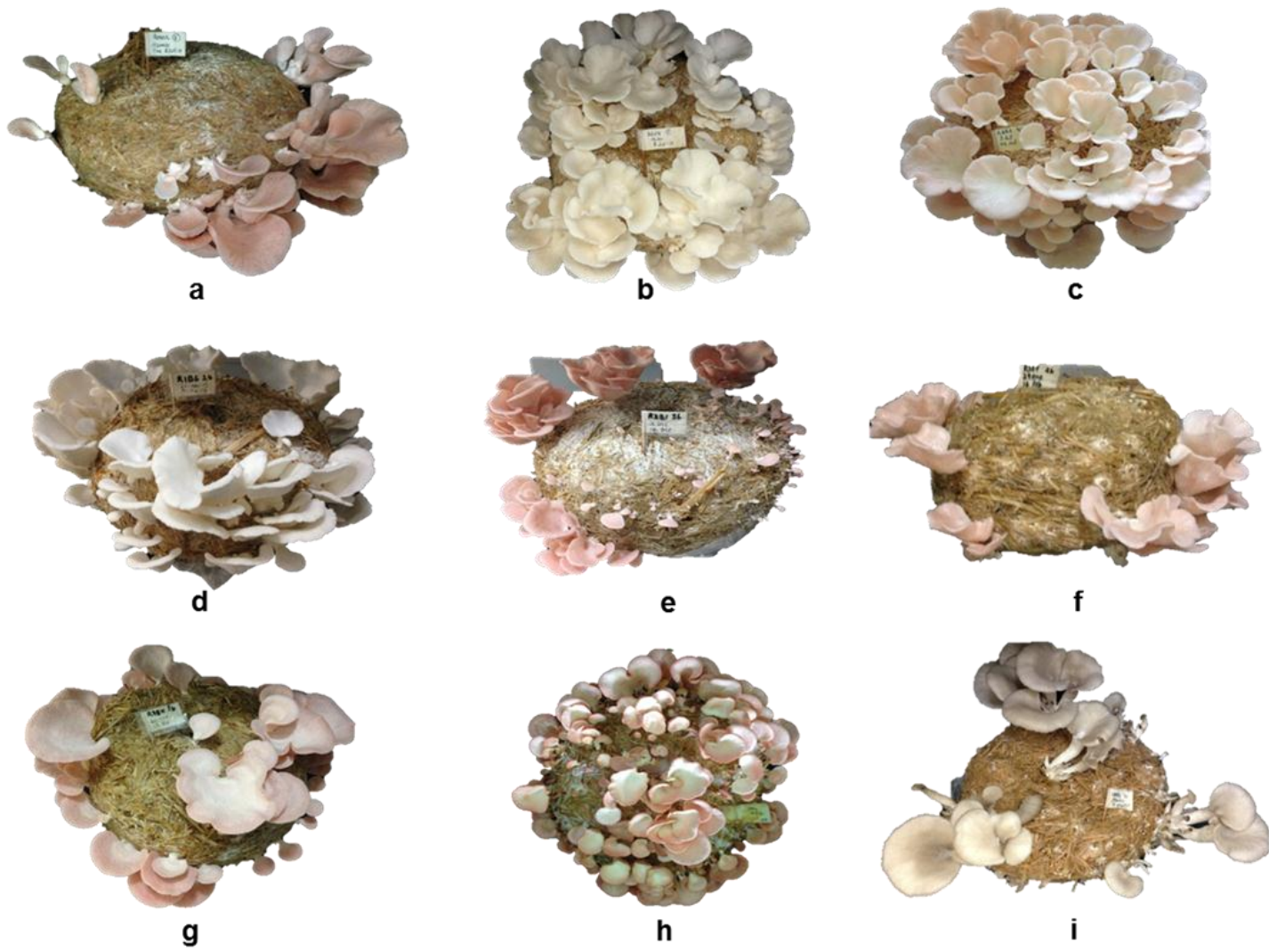


Figura 14. Carpóforos de *Pleurotus*: a) UTMR; b) BB; c) RR; d) H1; e) H2; f) H3; g) H4); h) RP; i) UAP9

Uno de los parámetros básicos que se utilizan para evaluar la productividad de las cepas es la eficiencia biológica (EB), que es una relación entre la masa fresca del hongo y la masa del sustrato seco expresado en porcentaje. Desde el punto de vista comercial, los productores recomiendan el uso de cepas que tengan valores de EB superiores al 100%. Como se aprecia en la tabla 6, las cepas que tuvieron productividades altas con el sustrato de paja fueron: la cepa RP ($150.6 \pm 17.8\%$), la reconstituida RR ($127.9 \pm 18.9\%$), la control UAP9 ($124.3 \pm 23.9\%$) y la silvestre UTMR ($120.5 \pm 21.6\%$), mientras que la cepa híbrida H1 mostró el valor más bajo ($25.5 \pm 4.2\%$).

Es importante resaltar que los valores encontrados de EB se asemejan a lo reportado para esta especie empleando diferentes tipos de sustrato. Por ejemplo, Selvakumar y col.⁴⁸ reportaron EB de 110.47% usando paja de trigo; Salmones y col.⁷ obtuvieron EB entre 18 a 73% con paja de cebada y Sihuanca⁶¹ obtuvo EB entre 47 a 52% usando bagazo de caña.

Al comparar los valores de EB de la cepa reconstituida RR y la cepa silvestre UTMR se observó que no existe una diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, la cepa reconstituida BB a partir de la cepa UTMB, logró producir fructificaciones con un valor de EB cercano a 90%. Estos resultados se asemejan a los datos previos obtenidos por Guadarrama,⁵ quien propone que el acloplamiento de los componentes monocarióticos (neohaplontes) provenientes del proceso de desdicarionización de las cepas silvestres, posiblemente activa genes que estaban silenciados y que después de este proceso se vuelven a expresar, regenerándose así su potencial productivo.

Por otro lado, al contrastar los valores de EB de las cepas híbridas respecto a las parentales, no se observó una mejoría en cuanto a la productividad siendo significativamente inferiores sus valores de EB en comparación con la cepa UTMR. Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que no siempre la hibridación de cepas descicariotizadas involucra forzosamente el mejoramiento genético de las cepas. Por lo tanto, es de vital importancia evaluar las características productivas de cada una de las nuevas cepas híbridas que se logran obtener con este método.

La TP es un parámetro importante de productividad en el cultivo del hongo. Relaciona la cantidad de carpóforos (expresado como EB) en un tiempo determinado (número de días del ciclo). Por lo tanto, valores elevados de TP se relacionan con cepas que producen buena cantidad de carpóforos en tiempos cortos de cultivo. Como se aprecia en la Tabla 6, la cepa reconstituida BB y la control UAP9 exhibieron las TP más altas (3.0 ± 0.5 y $2.9 \pm 0.6\%$ respectivamente) y las cepas híbridas H1 y H3, las más bajas (0.6 ± 0.1 y $0.7 \pm 0.1\%$, respectivamente), Tabla 6. Nuevamente se observó que las cepas híbridas no mejoraron las características reproductivas respecto a la cepa silvestre UTMR. En la literatura se han descrito estudios en cepas de *P. djamor*, donde Salmones y col.^{7,31} utilizaron paja de cebada y reportaron una TP entre 0.35 y 1.90%. Vega y Franco⁶ emplearon paja de arroz y maíz, y reportaron una TP entre 0.98 a 1.03 y 0.36 a 0.40%, respectivamente.

Con base en lo anterior, desde el punto de vista productivo, las cepas que podrían tener potencial a nivel comercial son: la cepa silvestre UTMR y las reconstituidas BB y RR, Respecto a la hibridación se sugiere caracterizar otras cepas híbridas y conocer más acerca de la conveniencia de este método para obtener nuevas cepas mejoradas.

5.4 Determinación de humedad y rendimiento de extractos en carpóforos y micelio de *P. djamor*

El contenido de humedad en las muestras de estudio (carpóforos y micelio) permite expresar los resultados de composición química y actividad de las muestras en base seca, Tabla 7. Los carpóforos frescos de la cepa híbrida H1, presentaron mayor contenido de humedad (90.77%) y los carpóforos de la cepa reconstituida RR el contenido más bajo (81.02%). Estas diferencias pueden atribuirse a variaciones en las condiciones de cultivo. Por otra parte, la obtención del micelio se realizó en medio líquido. En otras investigaciones de carpóforos frescos de *P. djamor var. roseus* y *var. djamor* reportan porcentajes de humedad entre 78 a 92%, respectivamente,^{12,64} La humedad del micelio fresco está en el intervalo de 90 a 93%. En la literatura no hay datos para micelio.

La cuantificación de los fenoles y flavonoides, así como la evaluación de la AA requiere de extractos provenientes de carpóforos y micelios. Por ello, en el presente trabajo se implementaron métodos de extracción específicos para las determinaciones espectrofotométricas considerando los compuestos que suelen interferir en ellas, por ejemplo: terpenos, ácidos grasos, triacilglicéridos, polisacáridos entre otros. Esto llevó a la obtención de tres tipos de extractos metanólicos provenientes de carpóforos de las cepas de *P. djamor*, (1) crudo, (2) desengrasado y (3) hidrolizado y desengrasado.

El rendimiento de los extractos metanólicos crudos utilizados para la cuantificación de AA, se encontró en un intervalo de 10.0 a 16.0%, Tabla 7. Puttaraju y col.³ reportaron un rendimiento para el extracto metanólico de *P. djamor* en masa seca de 21.0%. En el caso de los extractos metanólicos desengrasados (cuantificación de FT), se obtuvo rendimientos

entre 8.5 y 15.0%. A su vez, los extractos metanólicos hidrolizados y desengrasados (cuantificación de FVT) exhibieron un rendimiento entre 12.5 y 14.0%.

Tabla 7. Porcentaje de humedad y rendimiento de los extractos metanólicos de carpóforos y micelio de *P. djamor*

Cepa		Humedad (%)		Rendimiento de extracto metanólico seco (%)		
		Fresco	Seco	Crudo	Desengrasado	Hidrolizado-d
Carpóforos						
Parental-silvestre	UTMR	83.90 ± 3.56	9.95 ± 0.35	14.97 ± 0.33	14.04 ± 0.36	13.67 ± 0.33
Reconstituida	BB	86.63 ± 1.65	10.56 ± 0.31	9.62 ± 0.23	8.50 ± 0.38	11.60 ± 0.98
	RR	81.02 ± 0.77	10.03 ± 0.19	15.15 ± 0.36	13.28 ± 0.41	13.31 ± 0.07
Híbrida	H1	90.77 ± 0.62	9.23 ± 0.22	15.84 ± 0.53	15.20 ± 0.57	12.14 ± 0.59
	H2	88.88 ± 2.55	9.12 ± 0.09	15.52 ± 0.43	14.50 ± 0.43	13.85 ± 0.06
	H3	84.65 ± 1.02	10.35 ± 0.50	16.34 ± 0.92	15.55 ± 0.91	11.96 ± 0.22
	H4	88.66 ± 0.60	9.34 ± 0.77	13.61 ± 0.09	11.75 ± 0.45	12.81 ± 0.24
Control	RP	85.20 ± 0.85	10.08 ± 0.38	13.19 ± 0.66	11.80 ± 0.58	13.70 ± 6.85
	UAP9	83.01 ± 1.61	9.93 ± 0.16	9.31 ± 0.41	8.50 ± 0.38	16.50 ± 0.06
Cepa		Humedad (%)		Rendimiento de extracto metanólico seco (%)		
		Fresco	Seco	Crudo	EFS*	
Micelio						
Parental-silvestre	UTMB	92.74 ± 1.94	9.25 ± 0.22	21.49 ± 0.48	23.97 ± 1.15	
	UTMR	91.68 ± 0.48	9.40 ± 0.72	31.24 ± 2.01	18.31 ± 0.75	
Reconstituida	BB	92.24 ± 1.74	9.41 ± 0.11	23.45 ± 0.75	19.06 ± 0.84	
	RR	93.18 ± 1.02	9.47 ± 0.02	29.90 ± 0.92	24.59 ± 0.42	
Híbrida	H1	91.74 ± 3.02	9.51 ± 0.20	26.81 ± 0.42	20.71 ± 0.82	
	H2	90.85 ± 1.42	9.39 ± 0.06	30.21 ± 0.49	21.17 ± 1.29	
	H3	90.66 ± 1.26	9.29 ± 0.33	25.47 ± 1.17	19.54 ± 8.04	
	H4	92.82 ± 0.44	9.84 ± 0.21	30.50 ± 1.31	25.20 ± 0.50	
Control	RP	92.69 ± 1.01	9.93 ± 0.22	18.11 ± 1.00	15.31 ± 0.64	
	UAP9	90.49 ± 1.23	9.42 ± 0.05	16.30 ± 0.72	11.75 ± 0.69	

Hidrolizado-d: hidrolizado y desengrasado *EFS: extracción en fase sólida

Por otra parte, se obtuvieron dos tipos de extractos metanólicos provenientes de micelios de las diferentes cepas de *P. djamor*: crudo y otro limpio a partir de una extracción en fase sólida (EFS), fase reversa C18. Se empleó esta última técnica debido a que el extracto metanólico desengrasado, al estar en contacto con el reactivo de Folin formaba un

precipitado, interfiriendo en la cuantificación de FT. El sorbente de la fase reversa retuvo los compuestos que causaban la interferencia. Los extractos metanólicos crudos obtuvieron rendimientos entre 21.0 y 31.0%, mientras que los extractos metanólicos extraídos en fase sólida se obtuvieron con rendimientos de 18.0 a 25.0%. En general, los extractos metanólicos crudos de micelio obtuvieron rendimientos entre dos y tres veces más altos que los obtenidos a partir de extractos de carpóforos. Esto puede atribuirse a que en el micelio puede existir una concentración mayor de compuestos solubles en MeOH (cumarinas, flavonoides, ácidos grasos y triterpenos son los más comunes)⁶⁵ que en los carpóforos.

5.5 Cuantificación de fenoles totales (FT)

Los carpóforos del *Pleurotus*, en general, contienen una baja cantidad de lípidos que oscila de 2 a 5% bs.³⁸ Tarnopol'skaya y col,⁶⁶ reportaron en el micelio de este género un contenido de 8.1% bs de lípidos. Al preparar los extractos de carpóforos y micelio de las cepas estudiadas, la porción hidrofóbica causó interferencias en la determinación de FT al estar en contacto con el reactivo de Folin. Por ello, para carpóforos se obtuvo un extracto metanólico desengrasado; mientras que para micelio se obtuvo un extracto metanólico con limpieza mediante extracción en fase sólida (EFS).

En los extractos provenientes de carpóforos, la cepa híbrida H3 presentó el mayor contenido de FT con un valor de 0.95 ± 0.02 mg EAG/g ms, mientras que el extracto de la cepa silvestre UTMR tuvo el menor contenido 0.36 ± 0.01 mg EAG/g ms, Tabla 8. Se observó que las cepas híbridas tuvieron un mayor contenido de FT en comparación con la cepa silvestre UTMR, lo que podría sugerir un posible robustamiento del sistema de defensa

de estas nuevas cepas, ya que se ha asociado el mejoramiento del sistema de defensa de los organismos con la biosíntesis de compuestos fenólicos.^{11,67} Otros compuestos que también se han relacionado con esta función son los ácidos grasos, el ácido ascórbico y los β -glucanos.⁶⁸ Cabe señalar que al momento, no se ha reportado el efecto de la hibridación de cepas de *Pleurotus* sobre el contenido de FT. Por lo tanto, sería interesante realizar estudios sobre la expresión y síntesis de sustancias que estimulen el mecanismo de defensa cuando se someten a diferentes condiciones (temperatura, humedad, presencia de competidores, etc).

Estudios de extractos metanólicos procedentes de carpóforos de *P. djamor* reportaron un contenido de FT de 27 mg EAG/g (Babu y col.¹¹), que es cuatro veces el valor exhibido por la cepa híbrida H4 (6.63 mg EAG/g de extracto); mientras que Jegadeesh y col.⁹ reportaron un contenido de FT de 2.25 mg EAG/g ms, que es el doble del valor de la cepa híbrida H3 (0.95 mg EAG/g de ms). Por lo tanto, existe un intervalo amplio en el contenido de FT de los extractos de los carpóforos de este género, los cuales, pueden variar debido a las características genéticas de cada cepa, a las condiciones de cultivo o incluso a las condiciones de preparación del extracto.^{3,67}

Por otro lado, Puttaraju y col.³ en la India, clasificaron 23 hongos silvestres en tres grupos: bajo, moderado y elevado, de acuerdo a la concentración de FT en extractos acuosos y metanólicos. *P. djamor* fue clasificado como de bajo contenido (extracto metanólico 3.6 mg EAG/ g ms). Con base a los datos obtenidos en este trabajo, con las cantidades de FT para carpóforo (0.36 ± 0.01 a 0.95 ± 0.02 mg EAG/g ms) y de micelio (0.94 ± 0.04 a 1.77 ± 0.03 mg EAG/g ms), las cepas de estudio se clasificarían de contenido bajo en FT.

Tabla 8. Contenido de compuestos fenólicos y valores de IC₅₀ de carpóforos y micelio de *P. djamor*

Cepa		FT*		FVT*		IC ₅₀ ** (mg/mL) (DPPH [•])	Poder Reductor (PR)***			
		(mg EAG/ g ext)	(mg EAG/g ms)	(mg EQ/g ext)	(µg EQ/g ms)		(µg EAG/g ms)	IC ₅₀ (mg/mL)	CR (%)	ICREAG
Cárpoforos										
Parental-silvestre	UTMR	2.36 ± 0.09 ^g	0.36 ± 0.01 ^f	5.36 ± 0.20 ^f	28.22 ± 0.44 ^e	6.30 ± 0.02 ^e	55.81 ± 1.44 ^f	8.18 ± 0.16 ^e	53.37	0.10
Reconstituida	BB	5.94 ± 0.29 ^b	0.56 ± 0.01 ^d	3.95 ± 0.04 ^h	46.55 ± 0.44 ^d	11.30 ± 0.12 ^h	45.45 ± 0.82 ^g	7.62 ± 0.24 ^d	56.11	0.10
	RR	2.92 ± 0.14 ^f	0.43 ± 0.01 ^e	4.44 ± 0.11 ^g	22.20 ± 1.10 ^f	10.02 ± 0.04 ^g	66.13 ± 2.01 ^e	7.49 ± 0.52 ^d	54.21	0.09
Híbrida	H1	4.92 ± 0.24 ^d	0.82 ± 0.02 ^b	5.78 ± 0.18 ^e	27.24 ± 0.82 ^e	3.78 ± 0.01 ^b	171.24 ± 7.97 ^c	3.52 ± 0.05 ^b	54.40	0.22
	H2	4.47 ± 0.08 ^e	0.70 ± 0.01 ^c	8.14 ± 0.18 ^c	57.83 ± 0.44 ^c	3.26 ± 0.03 ^a	171.66 ± 4.95 ^c	4.90 ± 0.01 ^c	50.66	0.24
	H3	5.51 ± 0.28 ^c	0.95 ± 0.02 ^a	7.10 ± 0.35 ^d	56.53 ± 0.38 ^c	4.35 ± 0.01 ^c	125.00 ± 2.47 ^d	4.69 ± 0.01 ^c	51.08	0.18
	H4	6.63 ± 0.33 ^a	0.86 ± 0.01 ^b	3.93 ± 0.07 ^h	23.11 ± 0.65 ^f	3.69 ± 0.07 ^b	124.04 ± 5.10 ^d	4.86 ± 0.09 ^c	51.76	0.19
Control	RP	3.24 ± 0.11 ^e	0.42 ± 0.01 ^e	10.44 ± 0.47 ^a	68.89 ± 3.10 ^b	4.78 ± 0.06 ^d	181.23 ± 8.11 ^b	3.98 ± 0.09 ^b	46.43	0.21
	UAP9	2.32 ± 0.08 ^g	0.45 ± 0.01 ^e	9.25 ± 0.19 ^b	88.05 ± 3.63 ^a	7.56 ± 0.09 ^f	200.02 ± 10.05 ^a	2.80 ± 0.04 ^a	52.68	0.18
Micelio										
Parental-silvestre	UTMB	4.98 ± 0.21 ^e	1.44 ± 0.04 ^b	--	--	8.05 ± 0.09 ^d	--	--	--	--
	UTMR	5.27 ± 0.21 ^d	1.18 ± 0.03 ^d	--	--	7.38 ± 0.12 ^c	--	--	--	--
Reconstituida	BB	4.97 ± 0.21 ^e	1.19 ± 0.03 ^d	--	--	8.14 ± 0.15 ^d	--	--	--	--
	RR	3.85 ± 0.17 ^g	1.13 ± 0.04 ^d	--	--	10.56 ± 0.11 ^e	--	--	--	--
	H1	4.28 ± 0.21 ^f	1.04 ± 0.03 ^e	--	--	5.98 ± 0.12 ^b	--	--	--	--
	H2	3.96 ± 0.20 ^g	0.94 ± 0.04 ^f	--	--	8.40 ± 0.20 ^d	--	--	--	--
Híbrida	H3	3.99 ± 0.16 ^g	0.95 ± 0.04 ^f	--	--	5.11 ± 0.08 ^a	--	--	--	--
	H4	5.98 ± 0.25 ^c	1.77 ± 0.03 ^a	--	--	7.58 ± 0.18 ^c	--	--	--	--
Control	RP	6.33 ± 0.32 ^b	1.45 ± 0.03 ^b	--	--	10.76 ± 0.27 ^a	--	--	--	--
	UAP9	7.85 ± 0.39 ^a	1.25 ± 0.04 ^c	--	--	10.39 ± 0.16 ^e	--	--	--	--

EAG: Equivalentes de ácido gálico. g ext: gramos de extracto seco. g ms: gramos de masa seca. *Valores reportados corresponden a la media de 9 repeticiones ± SD. **Valores reportados corresponden a la media de 3 repeticiones ± SD. ***Valores reportados corresponden a la media de 6 repeticiones ± SD. IC₅₀ de ácido gálico = 0.001 ± 4E⁻⁴. IC₅₀ de BHT = 0.027 ± 3E⁻⁴. IC₅₀ de rutina = 0.011 ± 3E⁻⁴. Método del radical DPPH[•]. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas entre muestras, prueba de Duncan (p<0.05).

Respecto a los extractos metanólicos del micelio, la cepa híbrida H4 tuvo el valor más alto de FT (1.77 ± 0.03 mg EAG/g ms), que es aproximadamente el doble de cantidad de FT reportado en las cepas híbridas H2 y H3 (0.94 ± 0.04 y 0.95 ± 0.04 mg EAG/g ms, respectivamente), que tuvieron los valores más bajos, Tabla 8. Algo importante de resaltar es que para la cepa parental UTMB sí se pudo evaluar el contenido de FT en el micelio, el cual, alcanzó un valor de 1.44 ± 0.04 mg EAG/g ms. Comparando este valor respecto al contenido en el micelio de su cepa reconstituida BB se observó que fue superior significativamente.

Por lo tanto, surgen algunas interrogantes relacionadas con la pérdida de la capacidad de fructificación de la cepa parental. Si bien la síntesis de los compuestos fenólicos se ha asociado con los mecanismos de defensa de los organismos, ¿porqué el mayor contenido de FT que tuvo el micelio de la cepa parental UTMB respecto a su cepa reconstituida BB, no le confirió una ventaja para que se lograra alcanzar la fructificación? Otras de las dudas que surgen son: ¿qué mecanismo inhibió el desarrollo de los carpóforos?, ¿el mecanismo de defensa asociado a los compuestos fenólicos del micelio no fue suficiente para evitar esta inhibición?, ¿la reconstitución de núcleos en la cepa BB evitó la inhibición? Para tratar de resolver todos estos cuestionamientos, se requieren hacer estudios más profundos de biología molecular que ayuden a esclarecer cómo se da la activación y el silenciamiento de los genes en cada una de las etapas del ciclo de vida del hongo, así como, los cambios que se observan cuando se aplican métodos de desdicarización química para la obtención de las respectivas cepas reconstituidas o nuevas cepas híbridas.

No existen reportes en la literatura del contenido de FT en extractos metanólicos para cepas del género *P. djamor*. Sin embargo, Čilerdžić y col.,¹⁷ reportaron un contenido de FT de 14.41 ± 1.68 mg EAG/g ext¹⁷ en extractos etanólicos de *P. ostreatus*. En este estudio, la cepa híbrida H4 tuvo un valor de 5.98 ± 0.25 mg EAG/g ext (cepa con el mayor contenido de FT), que es casi tres veces más bajo respecto al micelio de la especie *ostreatus*. Las diferencias encontradas en el contenido de FT pueden deberse a factores genéticos (tipo de especie y variedad del hongo) o al método de extracción de los compuestos fenólicos (tipo de solvente y condiciones de extracción).¹⁶

Al realizar un análisis comparativo del contenido de FT en el micelio respecto al de carpóforos, para la mayoría de las cepas se observó un valor significativamente más elevado para el micelio. Las diferencias encontradas pueden deberse ya sea a los métodos de preparación de los extractos o por cambios en el metabolismo del hongo en cada una de las etapas de desarrollo (Ferreira y col.¹⁹).

5.6 Cuantificación de flavonoides totales (FVT)

Los flavonoides se consideran un grupo especial dentro de los compuestos fenólicos por presentar propiedades con actividad biológica.¹² Por ello, se hizo la cuantificación de FVT para las muestras de carpóforos de las nueve cepas que fructificaron. En la matriz del extracto hubo compuestos que causaron interferencia en la determinación, Por ello al extracto metanólico se le realizó una hidrólisis ácida. Posiblemente los compuestos contenidos en el precipitado eran β -glucanos insolubles, que son constituyentes naturales que forman parte de la pared celular de los hongos.⁶⁸

Como puede apreciarse en la Tabla 8, la cepa que tuvo el mayor contenido de FVT fue la cepa UAP9 ($88.05 \pm 3.63 \mu\text{g EQ/g ms}$), mientras que la cepa reconstituida RR y la híbrida H4 tuvieron los valores más bajos (22.20 ± 1.10 y $23.11 \pm 0.65 \mu\text{g EQ/g ms}$, respectivamente). Al evaluar el efecto del proceso de hibridación, se observa que dos cepas híbridas (H2 y H3) presentaron valores superiores que la parental UTMR, pero las otras dos cepas híbridas (H1 y H4) no lo hicieron. Como se ha mencionado anteriormente, las nuevas cepas que se obtienen con el método de desdicarotización no siempre superan las características de las cepas progenitoras, por lo que es necesario evaluar sus propiedades.⁵

Por otro lado, se observó que los extractos de carpóforos con un alto contenido de FT no tuvieron un alto contenido de FVT. Por ejemplo, las cepas control RP y UAP9 presentaron el menor contenido de FT, pero fueron las que tuvieron mayor contenido de FVT. Estos resultados no son contradictorios, ya que la determinación de FT incluye la cuantificación de diferentes compuestos como son fenoles simples (como el ácido gálico), flavonoides, fenilpropanoides o cumarinas.

En un estudio de cuantificación de flavonoides totales realizado por Babu y col.¹¹ con cepas de *P. djamor*, estos autores encontraron un contenido de FVT de $2.1 \pm 0.10 \mu\text{g EQ/g extracto metanólico}$. Mientras que Arbayaah and Umi,¹² reportaron un contenido de FVT de $14.88 \pm 2.13 \text{ mg EQ/g extracto etanólico}$. Este último valor es casi el doble en comparación con el valor más alto reportado en este trabajo para FVT (H2, $8.14 \pm 0.18 \text{ mg EQ/g ext}$). Las condiciones de cultivo, las características genotípicas de las cepas y la preparación de la muestra, son factores que pueden influir en el contenido de FVT.^{3,67}

5.7 Evaluación de la actividad antioxidante (AA)

Durante este trabajo se emplearon métodos de tipo indirecto para obtener la AA. Se utilizó el método de reducción del radical de DPPH[•] para determinar la capacidad de secuestro de radicales libres y el método de Poder Reductor (PR) para determinar la transferencia de electrones, respectivamente.

5.7.1 Actividad antioxidante mediante el radical DPPH[•]

El extracto metanólico crudo de carpóforos de la cepa híbrida H2 mostró la mejor AA un IC₅₀ de 3.26 ± 0.03 mg/mL, mientras que la cepa reconstituida BB la AA menor, IC₅₀ = 11.30 ± 0.12 mg/mL, Tabla 8. Por otra parte, las cepas híbridas mostraron mayor cantidad de FT y FVT (excepto H4 para FVT), y las mejores AA empleando el radical DPPH[•]:

En la literatura, se ha asociado la AA con la presencia de compuestos fenólicos y como los compuestos principales, a los flavonoides.⁶⁹ Entre otros compuestos que poseen AA se encuentran los ácidos grasos, terpenos, carotenoides y β-glucanos insolubles.^{3,68} De acuerdo a los datos obtenidos en extractos provenientes de carpóforos, posiblemente la AA se deba a la acción sinérgica de todos ellos, ya que para esta determinación se empleó un extracto metanólico crudo. Por ejemplo, se puede observar en la cepa híbrida H4, presentó un contenido de FT de 0.86 ± 0.01 mg EAG/g ms, de FVT de 2.31 ± 0.09 µg EQ/g ms y una IC₅₀ de 3.69 ± 0.07 mg/mL; mientras que la cepa H2 presentó un contenido de FT de 0.70 ± 0.01 mg EAG/g ms, de FVT de 5.78 ± 0.19 µg EQ/g ms y una IC₅₀ de 3.26 ± 0.03 mg/mL. Estas cepas híbridas presentaron valores cercanos de FT e IC₅₀; sin embargo, la concentración de FVT en la cepa H4, fue aproximadamente 2.5 veces mayor que la encontrada en la cepa H2. Esto podría ser un indicativo de que la AA presentada por la

cepa H4 se deba principalmente a los flavonoides; mientras que la AA de la cepa H2 sea deba a efectos sinérgicos de diversos compuestos que potencian la AA del extracto.

Sasidhara and Thirunalasundari,¹⁰ en un extracto metanólico de carpóforos de *P. djamor*, reportaron un $IC_{50} = 0.065$ mg/mL. Por su parte, Arbaayah and Umi,¹² en un extracto etanólico reportaron un $IC_{50} = 7.25$ mg/mL. Este último valor es aproximadamente el doble de los IC_{50} obtenidos en las cepas híbridas de este trabajo.

En los extractos metanólicos miceliales la cepa híbrida H3 presentó la mayor AA ($IC_{50} = 5.11 \pm 0.08$ mg/mL), y la cepa reconstituida RR, la menor AA ($IC_{50} = 10.56 \pm 0.11$ mg/mL). Las cepas híbridas H1 y H3 presentaron un contenido menor de FT y AA más alta comparada con las cepas silvestres, siendo posible que la AA de los extractos miceliales sea debida principalmente a compuestos no fenólicos. Por otra parte, la AA de la cepa silvestre UTMB y su cepa reconstituida BB, fue igual estadísticamente. En la cepa UTMR la AA fue mayor que en su cepa reconstituida RR.

Al momento no se tienen reportes en la literatura para AA en extractos procedentes de micelio de cepas de *P. djamor*. Liang y col.¹⁵ reportaron en un extracto etanólico de *P. eryngii* un $IC_{50} = 2.47 \pm 0.03$ mg/mL. A su vez, Čilerdžić y col.¹⁷ en un extracto etanólico de *P. ostreatus* reportaron un $IC_{50} = 13.94$ mg/mL. La AA del extracto estudiado por Liang y col. expresada como IC_{50} es aproximadamente el doble de la AA encontrada por la cepa híbrida H3 ($IC_{50} = 5.11 \pm 0.08$ mg/mL). De acuerdo con Arbayaah and Umi, cada especie tiene su propia y única estrategia de síntesis de compuestos antioxidantes.

Haciendo un comparativo de la AA por el mecanismo del radical DPPH[•] de los extractos metanólicos de carpóforos y micelio, puede verse que las cepas híbridas de los carpóforos mostraron mayores AA que las cepas híbridas de micelio y el resto de las cepas. La IC₅₀ de los carpóforos de la cepa híbrida H2 fue de 3.26 ± 0.03 mg/mL. Los carpóforos de la cepa reconstituida BB, presentaron la menor AA, una IC₅₀ de 11.30 mg/mL.

Por otra parte, los extractos miceliales de las cepas híbridas tuvieron hasta dos veces el contenido de FT con respecto a los extractos de carpóforos de esas cepas. Los extractos tanto de carpóforos como de micelio para cuantificar FT estuvieron libres de compuestos no polares. La cuantificación de la AA mediante la reducción de DPPH[•] se realizó con extractos metanólicos crudos, es decir, con un contenido de compuestos polares y no polares. A partir de ello, es posible decir que la AA que se reporta para los carpóforos y micelios se debe a efectos sinérgicos entre compuestos polares como no polares, tales como compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides), ácidos grasos, terpenos, carotenoides y β-glucanos insolubles. Además de esto, pueden existir interacciones tanto antagonistas como sinérgicas entre fenoles y otros compuestos, como algunos carbohidratos, que afectan la AA de las cepas.¹⁰ A pesar de ello, las setas son reconocidas como un alimento complejo que contiene diversos compuestos que en sinergia le confieren AA^{3,10,17} de importancia.

Por lo tanto, debido a la AA que las cepas objeto de estudio presentan, pueden considerarse como un alimento con propiedades antioxidantes. Por eso, sería interesante hacer más investigación para monitorear en qué momento se alcanza la máxima producción de estos constituyentes.

5.7.2 Actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)

Para la determinación de PR se empleó un extracto metanólico crudo proveniente de los carpóforos. En este ensayo se cuantifica la AA con base en la capacidad para reducir el ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), a través de la donación de un electrón. Donde un antioxidante dona electrones a especies de radicales libres reactivos, y se promueve la terminación de las reacciones en cadena de radicales libres.⁷⁰

La cepa híbrida H1 mostró la mejor capacidad reductora ($\text{IC}_{50} = 3.52 \pm 0.05$ mg/mL), y la cepa silvestre UTMR la menor ($\text{IC}_{50} = 8.18 \pm 0.16$ mg/mL). De acuerdo con los datos, las cepas híbridas tuvieron concentración de FT entre 0.70 ± 0.01 a 0.95 ± 0.02 mg EAG/g ms y una capacidad reductora expresada como IC_{50} entre 3.52 ± 0.05 y 4.90 ± 0.01 mg/mL. Smith y col. señalan que entre los compuestos asociados con capacidad de transferencia de electrones o componentes donadores de H, se encuentran los compuestos fenólicos. Es posible que los fenoles determinados mediante FT sean donadores de electrones.

En un estudio realizado por Puttaraju y col.³, se clasificó a los hongos de *P. djamor* como de bajo PR ya que obtuvieron un valor de 1.90 ± 0.20 mg EAG/g ms para el extracto metanólico. Por lo tanto, las cepas que se evaluaron se considerarían como de bajo PR, por presentar valores entre 45.45 ± 0.82 a 171.66 ± 4.95 μg EAG/g ms. Por otro lado, Babu y col.¹¹ trabajaron con un extracto metanólico procedente de *P. djamor* y reportaron un PR expresado como IC_{50} de 6.30 ± 0.50 mg/mL, que es mayor al exhibido por las cepas híbridas de este trabajo, cuyo intervalo de IC_{50} se encontró entre 3.52 ± 0.05 y 4.90 ± 01 mg/mL. Se aprecia que los intervalos reportados de PR para esta especie son amplios con la variación de las condiciones de cultivo, así como la preparación de la muestra y del extracto.

5.8 Correlación de los parámetros miceliales, productivos y de actividad antioxidante (AA)

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar la relación que existía entre los diferentes parámetros evaluados (crecimiento micelial, productividad y AA).

La primera correlación que se hizo fue la velocidad de crecimiento micelial (V_c) con la eficiencia biológica (EB), se obtuvo un valor de $r = 0.483$ (Tabla 9). Esto significa que un rápido crecimiento micelial no forzosamente produce altos rendimientos de carpóforos. Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores, en donde, la V_c no tuvo relación con la productividad, pero afirman que un rápido crecimiento micelial favorece el desarrollo de los primordios en menor tiempo y ayuda a disminuir el tiempo de cultivo.^{5,31}

Lo ideal desde el punto de vista productivo es que existiera una relación directa positiva de la tasa de productividad (TP) y la EB. Esto significaría que las cepas que producen alta cantidad de carpóforos, lo hacen en tiempos cortos de cultivo. Sin embargo, las cepas probadas tuvieron una correlación moderada ($r = 0.591$, Anexo 1). Lo que indicó que las cepas que fueron buenas productoras de hongos (EB superiores al 100%), no presentaron valores de TP elevados por tener tiempos del cultivo prolongados (superiores a los 55 días para los dos ciclos de cosecha).

Por otro lado, la correlación entre el contenido de FT e IC_{50} evaluado con el método de reducción del radical DPPH^{*} fue negativa moderada ($r = -0.556$), es decir, a mayor contenido de FT el valor de IC_{50} se reduce. Al no tener una relación negativa fuerte, se puede decir que los compuestos fenólicos presentes en los extractos no fueron los únicos componentes

encargados de conferirle la AA. Posiblemente estos compuestos fenólicos se encuentran actuando de manera sinérgica con otros compuestos, tales como ácidos grasos, triterpenos y β -glucanos, a los cuales también se les ha asociado una AA.⁶⁸ Este mismo fenómeno se repitió cuando se hizo la correlación de el contenido de FT con el PR, obteniendo un valor aún más débil de relación entre estos parámetros.

Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson lineal (r) entre crecimiento micelial, productividad y actividad antioxidante de cepas de *P. djamor*

								IC ₅₀	
		Vc	EB	TP	FT	FVT	DPPH'	PR	
Vc		1							
EB		0.483	1						
TP		0.268	0.591	1					
FT		-0.329	-0.833	-0.705	1				
FVT		0.056	0.027	0.019	0.041	1			
IC ₅₀	DPPH'	0.441	0.450	0.811	-0.556	-0.199	1		
	PR	-0.186	0.291	0.636	-0.437	-0.437	0.703	1	

Vc: velocidad de crecimiento micelial. EB: eficiencia biológica. TP: tasa de productividad. FT: fenoles totales. FVT: flavonoides totales. PR: Poder Reductor.

La correlación entre flavonoides totales (FVT) e IC₅₀ por el método del radical DPPH' fue débil ($r = -0.199$), al igual que la correlación entre FVT e IC₅₀ mediante el método de PR ($r = -0.437$). Estas correlaciones reafirman la idea de que los flavonoides contribuyen poco a la AA de las cepas de estudio. Así también, la correlación entre FT y FVT fue débil ($r = 0.041$), reforzando que el contenido de FT posiblemente se deba a otros compuestos fenólicos tales como fenoles simples, cumarinas, xantonas o lignanos.

La correlación entre el IC₅₀ por el método del DPPH' e IC₅₀ por el método PR ($r = 0.703$) fue moderada. Esto puede significar que de alguna forma los mecanismos de AA se

complementan, pudiendo ser tanto por transferencia de radicales hidrógeno como por transferencia de electrones.

Por otra parte, la correlación entre la EB y el contenido de fenoles totales (FT) fue alta ($r = -0.833$) y la correlación entre TP y FT fue moderada ($r = -0.705$). Esto sugiere que a mayor productividad, hay menor contenido de FT. Esto concuerda con las correlaciones obtenidas entre TP e IC_{50} por el método del DPPH' ($r = 0.811$) y TP e IC_{50} por el método de Poder Reductor, PR ($r = 0.636$). Dado que aumenta la productividad, se requiere mayor cantidad de extracto para inhibir al 50% ya sea al radical DPPH' o el ferricianuro de potasio, es decir, disminuye la actividad antioxidante (AA). Esto podría ser explicado porque las cepas estudiadas dirigen su actividad metabólica principalmente al desarrollo del carpóforo, mientras que el metabolismo de síntesis de antioxidantes es reducido.

Por último, se realizó una correlación entre los contenidos de FT e a partir de carpóforos y de micelio, y otra para la AA expresada como IC_{50} por el método del radical DPPH' de carpóforos y micelio. Ambas correlaciones resultaron débiles ($r = -0.095$ y 0.405 , respectivamente). Esto indica que los compuestos fenólicos sintetizados durante la fase vegetativa no son los mismos de la fase reproductiva, y que los compuestos sinérgicos que confieren la AA proveniente de las dos fases son diferentes. Esto coincide con lo descrito por Ferreira y col.¹⁹ quienes mencionan que la síntesis de compuestos involucrados en el mecanismo de defensa varía en las diferentes etapas de crecimiento de los hongos.

6. CONCLUSIONES

Las cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor* se caracterizaron por desarrollar micelio de textura algodonosa con diferencias en la densidad y color al crecer en medio sólido de agar extracto de malta. La cepa reconstituida RR tuvo la mayor velocidad de crecimiento micelial.

La cepa silvestre UTMR y las reconstituidas BB y RR tuvieron valores de eficiencia biológica y tasa de productividad aceptables y pueden considerarse como cepas con potencial productivo.

Los extractos metanólicos de carpóforos de las cepas híbridas mostraron mayor contenido de fenoles totales y mejor actividad antioxidante.

Se confirmó que no existe una relación entre la velocidad de crecimiento micelial y su capacidad para producir altos rendimientos de fructificaciones.

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las cepas parentales, reconstituidas e híbridas no se relaciona con el contenido de flavonoides.

7. PERSPECTIVAS

Entre las recomendaciones para dar seguimiento a esta investigación se propone:

Realizar cuantificaciones de flavonoides totales y actividad antioxidante mediante el Poder Reductor en extractos metanólicos miceliales de las cepas de *Pleurotus djamor*.

Aislar, identificar y evaluar el potencial antioxidante de otros posibles compuestos presentes en extractos metanólicos de carpóforos y micelio.

Realizar estudios de biología molecular para esclarecer la activación y silenciamiento de los genes responsables de la síntesis de los metabolitos secundarios en las diferentes etapas del ciclo de vida del hongo.

Escalar la producción a nivel industrial de las mejores cepas productivas y con mejor potencial antioxidante.

8. REFERENCIAS

1 Cardoso J. C. P., Demenjour P. L. M. M., Paz M. F. **2013**. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de bociuva e de cana-de-açúcar pela técnica jun-caó. *Evidência, Joaçaba*. 13 (1), 31-40.

2 Pokhrel C. P., Kalyan N., Budathoki U., Yadav R. K. P. **2013**. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* using different agricultural residues. *International Journal of Agricultural Policy and Research*. 1 (2), 19-23.

3 Puttaraju N. G., Venkateshaiah S. U., Dharmesh S. M., Urs S. M., Somasundaram R. **2006**. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (26), 9764-9772.

4 Guzmán G. **2003**. Los hongos de El Edén Quintana Roo: Introducción a la microbiota tropical de México. 316. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

5 Guadarrama M. P. C. **2013**. Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de *Pleurotus* spp. de la región Mixteca. Tesis de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

6 Vega A., Franco H. **2013**. Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. *Información Tecnológica*. 24 (1), 69-78.

7 Salmones D., Mestizo V. L., Gaitán-Hernández R. **2004**. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin. *Revista Mexicana de Micología*. 18, 21-26.

8 Kalyoncu F., Oskay M., Kayalar H. **2010**. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*. 1 (3), 195-199.

9 Jegadeesh R., Hariprasath L., Kumaresan K., Raaman N. **2014**. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of fractionized extracts of edible mushroom *Pleurotus djamor* var. *roseus*. *Journal of Academia and Industrial Research*. 3 (5), 202-208.

10 Sasidhara R., Thirunalasundari T. **2014**. Phytochemicals and antioxidant potentials of *Pleurotus djamor*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6 (4), 950-953.

11 Babu D. R., Pandey M., Rao G. N. J. **2012**. Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. and their sporeless/low sporing mutants. *Journal Food Science Technology*. 51 (11), 3317-3324. doi 10.1007/s13197-012-0822-9.

12 Arbaayah H. H., Umi K. Y. **2013**. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere*. 4 (4), 661-673.

13 Lin E-S., Sung S.-C. **2006**. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *International Journal of Food Microbiology*. 108 (2), 182-187.

14 Asatiani M. D., Elisashvili V. I., Wasser S. P., Reznick A. Z., Nevo E. **2007**. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 71 (12), 3090-3092.

15 Liang C. H., Ho K. J., Huang L. Y., Tsai C. H., Lin S. Y., Mau J. L. **2013**. Antioxidant properties of fruiting bodies, mycelia, and fermented products of the culinary-medicinal king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* (higher basidiomycetes), with high ergothioneine content. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 15 (3), 267-275.

16 Vamanu E. **2014**. Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. *BioMed Research International*. doi.org/10.1155/2014/974804.

17 Čilerdžić J., Stajić M., Vukojević J., Milovanović I., Muzgonja N. **2015**. Antioxidant and antifungal potential of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* basidiocarps and mycelia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 16 (2), 179-186.

18 Alves M. J., Ferreira I. C. F. R., Froufe H. J. C., Abreu R. M. V., Martins A., Pintado M. **2013**. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*. 115 (2), 346-357.

19 Ferreira I. C. F. R., Barros L., Abreu R. M. V. **2009**. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 16 (12), 1543-1560.

20 Zadrazil F. **1974**. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Canadian Journal of Botany*. 71, 113-128.

21 http://www.medicinalmushroomshop.com/Image.aspx?strFileName=p104_1.jpg&strItemType=p&numMaxHeight=220&numMaxWidth=220&numItem=104&strParent= Accesado el 19 de noviembre de 2016.

22 http://1.bp.blogspot.com/zlFjY2H3mRw/TxaPuaWA4XI/AAAAAAAAAMU/CzgJuy7Lef0/s1600/190230_169805956404121_160900977294619_410213_4885341_n.jpg. Accesado el 19 de noviembre de 2016.

23 <https://gluckspilze.com/bilder/produkte/gross/Kraeuterseitling-Pleurotus-eryngii-Pilzbeet-fuer-die-biologische-Pilzzucht-gem-EU-VO-834-2007-und-889-2008-AT-BIO-701.jpg>. Accesado el 19 de noviembre de 2016.

24 Royse D. **2003**. Cultivation of oyster mushrooms. Pennsylvania State University. *Information and Communication Technologies in the College of Agricultural Sciences*. 12. Pennsylvania, U.S.

25 Sonnenberg A. S. M., Baars J. J. P. Hendrickx P. M., Kerrigan R. W. **2005**. Breeding and mushroom: state of the art. *Acta Edulis Fungi* (Suppl.): 12, 163-173.

26 FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). **2009**. Los hongos silvestres comestibles por Eric Boa. Anuario Productos Forestales no Madereros.

27 Martínez-Carrera D., López-Martínez L. A. **2010**. Historia del cultivo comercial de hongos en México: Éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. En: Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, Morales, P. & Mora, V. M. (Eds). Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAPEP-IMINAP, Puebla, México. Capítulo 28.

28 Flores R. G. **2012**. Aprovechamiento del bagazo residual de *Yucca* spp. como sustrato para la producción de *Pleurotus* spp. Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

29 Gupta A., Sharma S., Saha S., Walia S. **2013**. Yield and nutritional content of *Pleurotus sajor caju* on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake. *Food Chemistry*. 141 (4), 4231-4239.

30 Moda E. M., Horii J., Spoto. M. H. F. **2005**. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. *Science and Agricultural*, 62 (2), 127-132.

31 Salmones D., Gaitán-Hernández R., Pérez R., Guzmán G. **1997**. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14, 173-176.

32 Valencia del Toro G. **2002**. Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. (Tesis inédita de doctorado). UNAM, México, D.F.

33 Sumner J. L. **1973**. The fatty acid composition of basidiomycetes. *New Zealand Journal of Botany*. 11 (3), 435-442. doi: 10.1080/0028825X.1973.10430293.

34 Patel Y., Naraiian R., Singh V. K. **2012**. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): A review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*. 3 (1), 01-12.

35 Borges G. M., De Barba F. F., Schiebelbein A. P., Pereira B. P., Chaves M. B., Silveira M. L., Pinho M. S., Furlan S. A., Wisbeck E. **2014**. Extracellular polysaccharide production

by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (4), 1059-1065.

36 Wang J., Wang H. X., Ng T. B. **2007**. A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom. *Russula paludosa*. *Peptides*. 28 (3), 560-565.

37 Miller J. K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F. C. **1993**. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*. 76 (9), 2812-2823.

38 Maldonado A. Y. I. **2007**. Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles. Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

39 Peterson, G. L. **1979**. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*. 100 (2), 201-220.

40 Julkunen-Tiitto R. **1985**. Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 324, 129-139.

41 Lee K. W., Kim. Y. J., Lee H. J., Lee C. Y. **2003**. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51 (25), 7292-7295.

42 Zhu H., Wang Y., Liu Y., Xia Y., Tang T. **2010**. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*. 3 (2), 90-97.

43 Wright J. S., Johnson E. R., DiLabio G. A. **2001**. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 123 (6), 1173-1183.

44 Oyaizu M. **1986**. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307-315.

45 Canabady-Rochelle L. L. S., Harscoat-Schiavo C., Kessler V., Aymes A., Fournier F., Girardet J.-M. **2015**. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*. 183, 129-135.

46 Lechner B. E., Albertó E. **2011**. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(4), 148-154.

47 Shukla S., Jaitly A. K. **2011**. Morphological and biochemical characterization of different oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Journal of Phytology*. 3(8), 18-20.

48 Selvakumar P., Rajasekar S., Babu A. G., Karuppanan P., Raaman N., Reddy S. M. **2015**. Improving biological efficiency of *Pleurotus* strain through protoplast fusion between

P. ostreatus var. *florida* and *P. djamor* var. *roseus*. *Food Science. Biotechnology*. 24(5), 1741-1748.

49 Zhong J.-J., Tang Y.-J. **2004**. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 87, 25-59.

50 Guzmán M., Zúñiga N., SantaFé G. G., Torres O., Angulo A. **2009**. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. F3-Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de Córdoba. 7 (2), 63-69.

51 Santos-Sánchez N. F., Valadez-Blanco, R., Gómez-Gómez M. S. Pérez-Herrera A. Salas-Coronado R. **2012**. Effect of rotating tray drying on antioxidant components, color and rehydration ratio of tomato saladette slices. *LWT - Food Science and Technology*. 46, 298-304.

52 Kim S. W., Hwang H. J., Park J. P., Cho Y. J., Song C. H., Yun J. W. **2002**. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*. 34 (1), 56-61.

53 Sobal M., Martínez-Carrera D., Morales P., Roussos S. **2007**. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional*. 19(1), 15-23.

54 Álvarez-Parrilla E., de la Rosa L. A., Martínez N. R., Aguilar González G. A. **2007**. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5 (5), 329-334.

55 Julián-Loaeza A. P., Santos-Sánchez N. F., Valadez-Blanco R., Sánchez-Guzmán B. S., Salas-Coronado R. **2011**. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. 34 (2), 1262-1268.

56 Gramza A., Pawlak-Lemańska K., Korczak J., Wasowicz E., Rudzinska M. **2005**. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*. 14 (6), 861-67.

57 Guadarrama-Mendoza P. C., Valencia del Toro G., Ramírez-Carrillo R., Robles-Martínez F., Yáñez-Fernández J., Garín-Aguilar M. E., Hernández C. G., Bravo-Villa G. **2014**. Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 (3), 861-872.

58 Clark T. A., Anderson J. B. **2004**. Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *Genetics*. 167 (4), 1663-1675.

59 Morales B. V. **2011**. Determinación de patrones genéticos de cepas parentales e híbridadas de *Pleurotus* spp. Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. México.

60 Ahmad I., Fuad I., Khan Z. K. **2015**. Mycelia growth of pink oyster (*Pleurotus djmour*) mushroom in different culture media & environmental factors. *Agriculture and Food Sciences Research*. 2 (1), 6-11.

61 Sihuanca M. D. **2011**. Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de variedades especiales de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Hypsizygos*), empleando bagazo de caña de azúcar y otros subproductos agrícolas y forestales como sustrato de cultivo. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

62 León-Avendaño H., Martínez-García R., Caballero Gutiérrez P., Martínez-Carrera D. **2013**. Caracterización de dos cepas de *Pleurotus djamor* nativas de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp.* 6, 1285-1291.

63 Andrino A., Morte M. A., Honrubia M. **2011**. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología*. 33, 53-66.

64 Nile S. H., Park S. W. **2014**. Total soluble, and insoluble dietary fibre contents of wild growing edible mushrooms. *Czech Journal of Food Sciences*. 32 (3), 302-307.

65 Smith H., Doyle S., Murphy R. **2015**. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*. 185, 389-397.

66 Tarnopol'skaya V. V., Kiseleva O. V. Alaudinova E. V., Mironov P. V. **2015**. Fatty acids of xylophilic basidiomycetes the genus *Pleurotus* in submerged culture. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. 51 (2), 328-329.

67 Rajurkar N. S., Gaikwad K. **2012**. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and elemental content of *Adiantum capillus veneris* leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4 (1), 365-374.

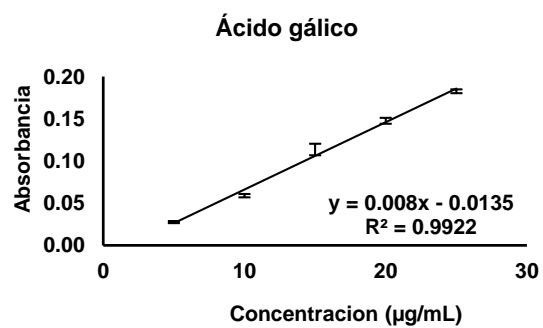
68 Rop O., Mlcek J., Jurikova T. **2009**. Beta-glucans in higher fungi and their health effect. *Nutrition Reviews*. 67(11), 624-63. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00230.x

69 Vamanu E. **2012**. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules*. 17 (4), 3653-3671.

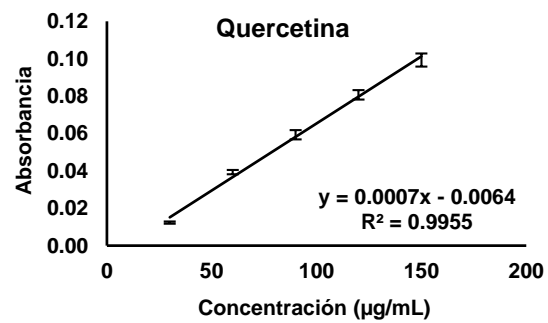
70 Sudha G., Vadivukkarasi S., Shree R.B.I., Lakshmanan P. **2012**. Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. *Food Science Biotechnology*. 21(3), 661-668.

9. APÉNDICE

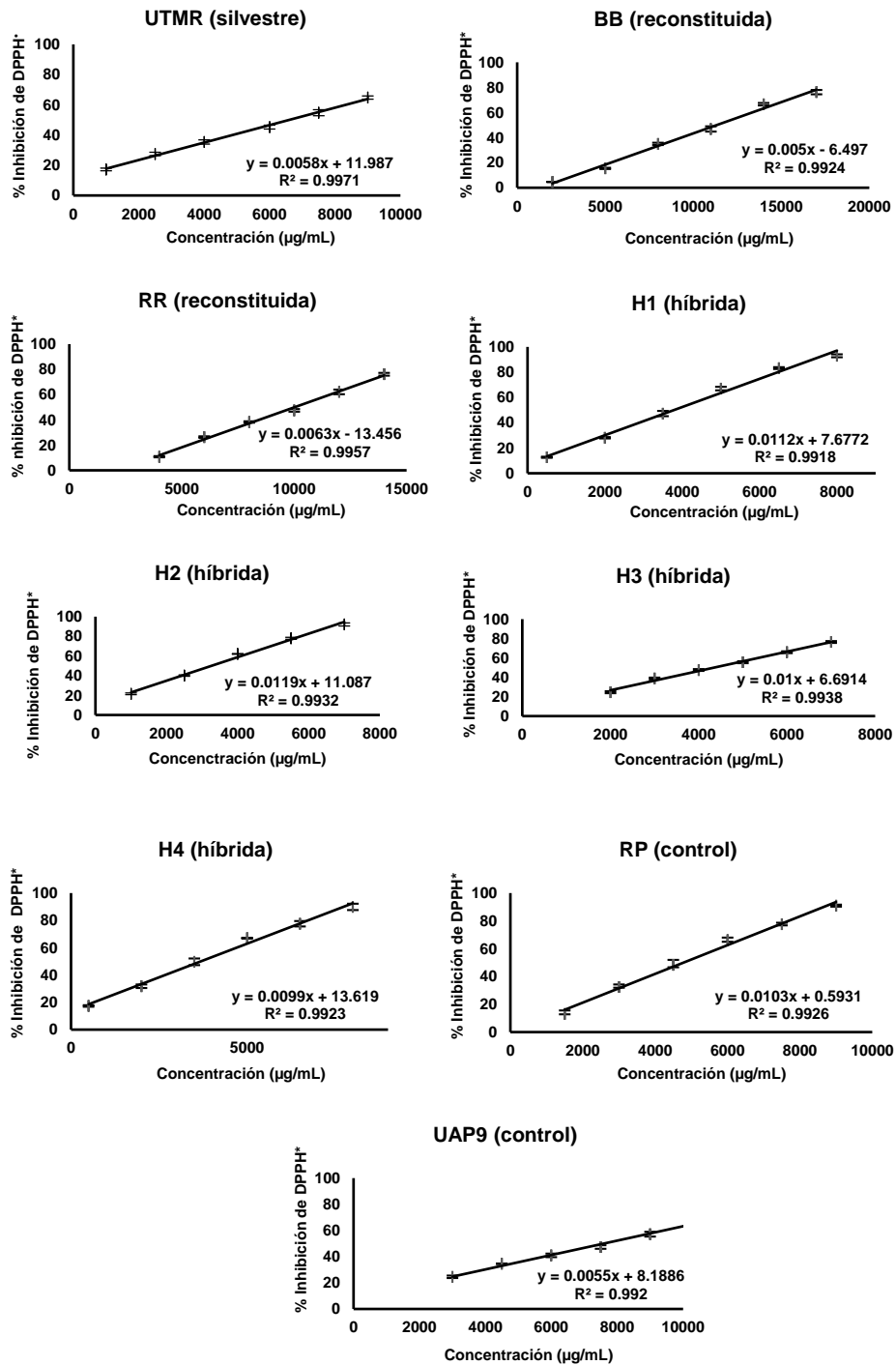
Apéndice 1. Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales (FT)



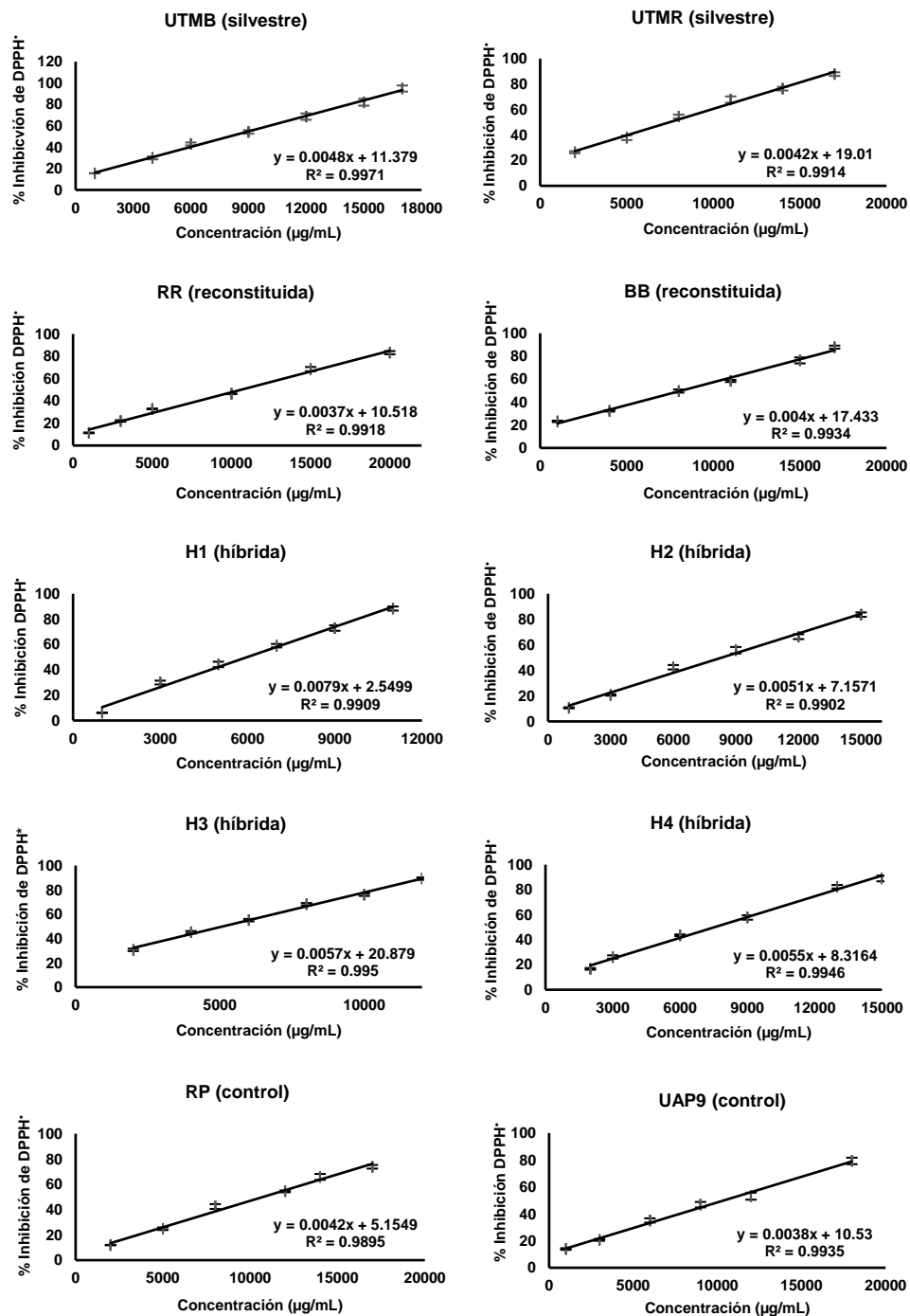
Apéndice 2. Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales (FVT)



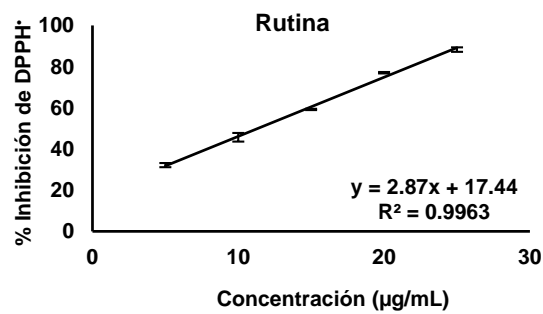
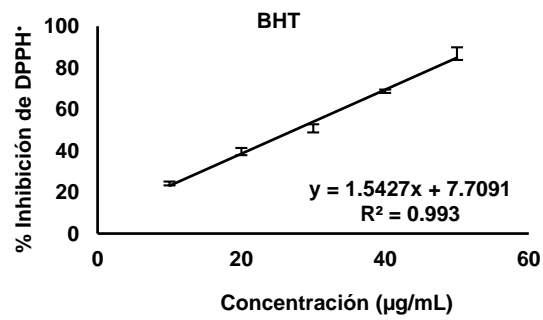
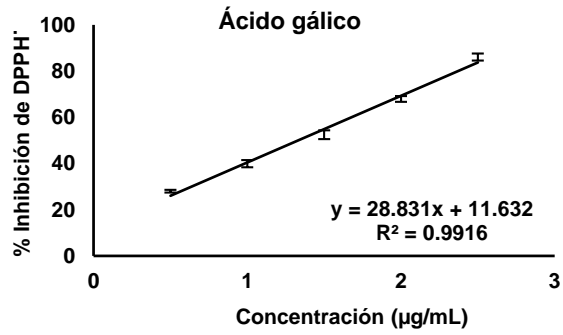
Apéndice 3. Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de carpóforos de las cepas de *P. djamor* para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el método del radical DPPH[•]



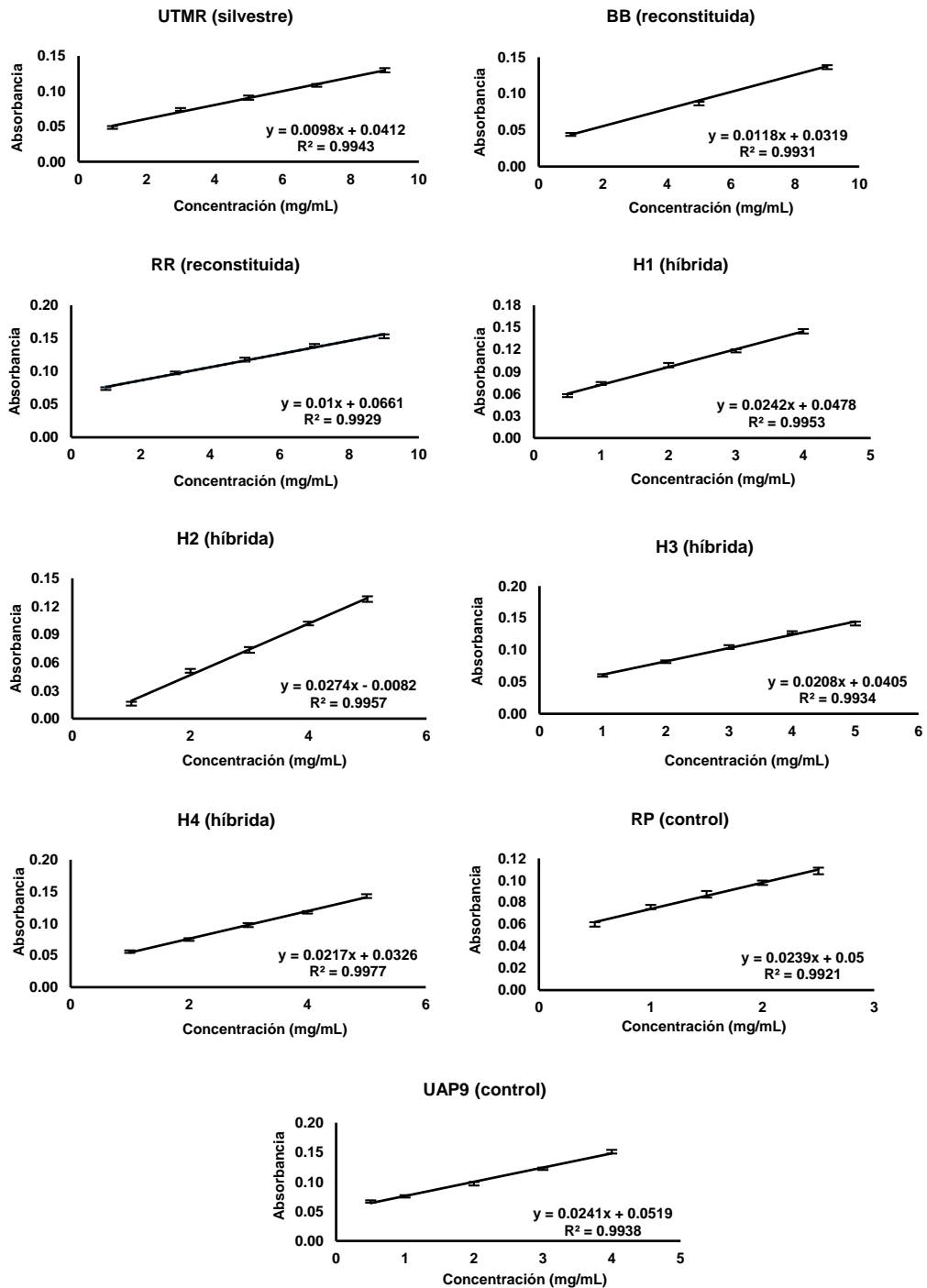
Apéndice 4. Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de micelio de las cepas de *P. djamor* para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el método del radical DPPH[•]



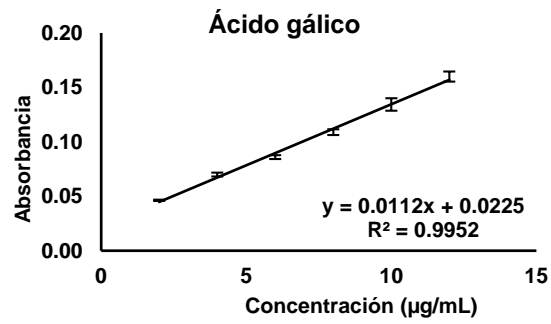
Apéndice 5. Curva de ácido gálico, BHT y rutina empleadas como control para cuantificar la actividad antioxidante (AA) por el radical DPPH·



Apéndice 6. Curva de muestras provenientes de extractos metanólicos de carpóforos de las cepas de *P. djamor* para cuantificar la actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)



Apéndice 7. Curva de calibración de ácido gálico empleada como control para cuantificar la actividad antioxidante mediante el Poder Reductor (PR)



10. ANEXO

Anexo 1. Correlación lineal entre dos variables

Valores de r	Tipo y grado de correlación
-1	Negativa perfecta
$-1 < r \leq -0.8$	Negativa fuerte
$-0.8 < r < -0.5$	Negativa moderada
$-0.5 \leq r < 0$	Negativa débil
0	No existe
$0 < r \leq 0.5$	Positiva débil
$0.5 < r < 0.8$	Positiva moderada
$0.8 \leq r < 1$	Positiva fuerte
1	Positiva perfecta

ortogan la presente

Constancia

Magdalena Paz Oropeza-Guerrero, Paula Cecilia Guadarrama-Mendoza, Norma Francenia Santos-Sánchez

a:

Por la presentación del cartel titulado:

PRODUCTIVIDAD Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN CEPAS PARENTALES, HÍBRIDAS Y RECONSTITUIDAS DE Pleurotus djamor

En la 12ª Reunion Internacional de Investigación en Productos naturales,
celebrada en la ciudad de Xalapa, Veracruz los dias
18, 19 y 20 de Mayo del 2016.

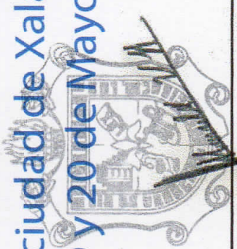


12a
Reunión
Internacional
de Investigación
en Productos
Naturales
Xalapa, Veracruz 2016
Homonajeado

**Dr. Miguel Ángel
Domínguez Ortiz**



Dra. Noemí Waksman de Torres
Presidenta AMIPRONAT



Dra. Marijel Vázquez Hernández
Coordinadora de la unidad SARA



Dr. Alberto Sánchez Medina
Coordinador del Comité Organizador

Amipronat
Asociación Mexicana de Investigación
en Productos Naturales

SARA
Unidad de Servicios de Apoyo en
Resolución Analítica



Universidad Veracruzana