



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EFFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES, ASÍ COMO DEL ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL DEL HONGO
COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* Y SU POTENCIAL DE
APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN COMERCIAL**

MARICELA CAYETANO CATARINO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA
2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Maricela Cayetano Catarino**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Porfirio Morales Almora**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Efecto de extractos vegetales, así como del ácido acetilsalicílico en el desarrollo micelial del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* y su potencial de aplicación en la producción comercial**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, agosto de 2015.

Maricela Cayetano Catarino

Firma

Dr. Porfirio Morales Almora

Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Efecto de extractos vegetales, así como del ácido acetilsalicílico en el desarrollo micelial del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* y su potencial de aplicación en la producción comercial**, realizada por la alumna: **Maricela Cayetano Catarino**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

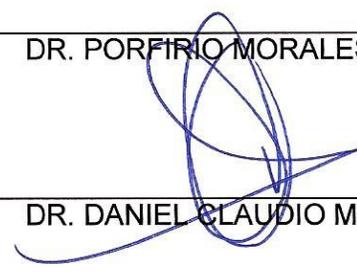
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:



DR. MIGUEL SANCHEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. HERMILO LEAL LARA

Puebla, Puebla, México, agosto de 2015.

EFFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES, ASÍ COMO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL DESARROLLO MICELIAL DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* Y SU POTENCIAL DE APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN COMERCIAL

Maricela Cayetano Catarino, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

En el cultivo de hongos comestibles, diversas especies de *Trichoderma* contaminan el sustrato, el micelio y los basidiocarpos generando pérdidas económicas. Por ello, en este estudio se obtuvieron extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) y se adicionaron al medio papa dextrosa agar (PDA) en proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) para estudiar su efecto sobre el desarrollo micelial de *Trichoderma aggressivum* (CPM-113) en un cultivo dual con la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*. Los extractos vegetales estimularon el crecimiento micelial en ambas cepas. Con base en este resultado, se cultivaron las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en PDA con adición de extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) o con ácido acetilsalicílico (AAS: 100 µM) para evaluar su efecto como inductores del crecimiento micelial, la producción de lacasas y proteínas. En el tratamiento con extractos vegetales el desarrollo micelial fue más lento en comparación con aquel del tratamiento con AAS y el testigo; sin embargo, registró la más alta producción de lacasas con 118.3 ± 12.2 U/mL, seguida por el tratamiento con AAS alcanzando valores entre 41 ± 7.3 U/mL para la cepa CP-753 y entre 54.3 ± 1 U/mL y 83.6 ± 7.1 U/mL para la cepa CP-50, con diferencias estadísticas entre los testigos. El tratamiento con extractos vegetales mostró 98.04 ± 12.05 µg/mL de proteínas que estadísticamente fue mejor que aquellos valores obtenidos en el resto de los tratamientos. Es posible desarrollar una tecnología con la aplicación de extractos vegetales para incrementar la producción de enzimas lacasas y de proteínas, o bien mediante la aplicación del AAS para incrementar mayormente la producción de lacasas y mejorar la producción de hongos comestibles a pequeña y gran escala.

Palabras clave: cultivo de hongos, extractos vegetales, inductores, lacasas.

EFFECT OF PLANT EXTRACTS, AS WELL AS THE ACETYLSALICYLIC ACID ON MYCELIAL DEVELOPMENT OF THE EDIBLE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN COMMERCIAL PRODUCTION

Maricela Cayetano Catarino, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015

In the cultivation of edible mushrooms, *Trichoderma* species pollute the substrate, mycelium and basidiocarps, generating economic losses. Onion extracts (*Allium cepa*) and aloe (*Aloe vera*) were obtained to be added to potato dextrose agar (PDA) in ratios 6:3 (w/w) and 3:6 (w/w) to study its effect on the mycelial growth of *Trichoderma aggressivum* (CPM-113) in a dual culture with the CP-50 strain of *Pleurotus ostreatus*. Plant extracts stimulated the mycelial growth in both strains. On this result, the CP-50 and CP-753 strains of *P. ostreatus* were cultured on PDA with addition of plant extracts or acetylsalicylic acid (ASA: 100 μ M) in order to evaluate its effect as inducers of mycelial growth, laccases and protein production. Mycelial growth on plant extracts was slower than that treatment with ASA and its control; however it reached the highest production of laccases with 118.3 ± 12.2 U/mL, followed by ASA treatment reaching values of 41 ± 7.3 U/mL for the CP-753 strain and between 54.3 ± 1 U/mL and 83.6 ± 7.1 U/mL for CP-50 strain, with statistical differences compared to the+ controls. Protein production on plant extracts showed 98.04 ± 12.05 μ g/mL that was statistically better than those values obtained in other treatments. It is possible to develop a technology with the application of plant extracts to increase production of enzymes laccases or by applying ASA to increase only production of laccase enzyme and improve production of edible mushrooms at small and large scale.

Key words: inducers, laccases, mushrooms cultivation, plant extracts.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos los beneficios que me ha otorgado y por permitirme lograr las metas planteadas en mi vida profesional y como ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado económicamente a través de una beca durante mis estudios de Postgrado.

A las autoridades de la Universidad Autónoma de Guerrero, a las autoridades del PROMEP por las facilidades brindadas para la obtención del doctorado.

Al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera por el apoyo brindado para la realización de las investigaciones.

Al Dr. Porfirio Morales Almora, Dr. Antonio Macías López, Dr. Miguel Sánchez Hernández, Dr. Hermilo Leal Lara, Dr. Juan de Dios Guerrero Rodríguez y Dr. José Sergio Escobedo Garrido, por sus valiosas sugerencias para enriquecer el contenido de la tesis.

A mi compañero de vida Teodoro Bernabé González por su apoyo incondicional en la realización de esta investigación.

Al personal del laboratorio de hongos comestibles del COLPOS, *Campus* Puebla: M.C. Myrna Bonilla Quintero, Biól. Wilfrido Martínez Sánchez, por su apoyo y disponibilidad en la realización de los trabajos de investigación.

A los compañeros Dra. Claudia Katia Reyes Quintanar y M.C. Alan Helios Escudero Uribe, por compartir los buenos momentos. Al Sr. Hugo Martínez por su apoyo en varias actividades relacionadas con la infraestructura de los trabajos de investigación.

A todo el personal administrativo por su apoyo en los todos los trámites y requisitos que son necesarios en el transcurso de los cuatrimestres.

A las familias Aguilar Nájera y Espejel Nájera por brindarme su amistad y apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres Sr. Florencio Cayetano de Jesús por su apoyo incondicional que me ha brindado en todo momento. Sra. Humberta Catarino Hernández por ser una mujer ejemplar que siempre ha mostrado ser un pilar para cada uno de sus hijos.

A mis hermanos: Margarita, Florencio, Rocío, Severo, Francisca, Natividad y Cirino (†).

A mis cuñadas: Leyla, Julieta y Sofía.

A todos los demás familiares.

A mis compañeros de trabajo: Dr. Arturo Contreras Gómez por ser un gran amigo, a los M.C. Adalid Romero Flores, Q.B.P. Gadiel Bernabé Villanueva, Biól. José Mario Arzeta Gómez, M.C. Ma. Divina Ángel Ríos, M.C. Juan Pérez Salgado, M.C. Sandra Quintanilla Ponce y al personal administrativo: María Ricarda Fierro Hipólito y Zitlali Martínez Contreras.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO REFERENCIAL.....	3
2.1. Biotecnología y desarrollo.....	3
2.2. Valor biotecnológico de residuos agroindustriales.....	3
2.3. Biotecnología en el cultivo de hongos.....	5
2.4. Producción de hongos comestibles en México.....	6
2.5. Algunas características de los Basidiomycetes.....	7
2.6. Características del género <i>Pleurotus</i>	9
2.7. Biología de <i>Pleurotus</i>	9
2.8. Propiedades medicinales de <i>Pleurotus</i> spp.....	10
2.9. Características de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
2.10. Valor nutrimental de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
2.11. Especies de <i>Trichoderma</i> en el cultivo de hongos comestibles.....	14
2.12. El sistema enzimático de los hongos comestibles.....	15
2.13. Características y propiedades de las lacasas.....	16
2.14. Inductores o mediadores de lacasas.....	21
2.15. Características y propiedades de extractos vegetales.....	23
2.16. Algunas aplicaciones de extractos vegetales.....	25
2.17. Características de la cebolla (<i>Allium cepa</i>).....	27
2.17.1. Clasificación.....	28
2.17.2. Composición química.....	30
2.17.3. Propiedades medicinales.....	31
2.18. Características de la sábila (<i>Aloe vera</i>).....	34
2.18.1. Clasificación.....	35
2.18.2. Composición química.....	36
2.18.3. Propiedades medicinales.....	37
2.19. Los extractos de cebolla y sábila en el cultivo de hongos.....	37
2.20. El ácido salicílico (AS) y el ácido acetilsalicílico (AAS).....	41
2.20.1. Algunas aplicaciones del ácido salicílico.....	42
2.20.2. Efecto del ácido salicílico en hongos fitopatógenos en el laboratorio.....	44

2.20.3.	Efecto del ácido acetilsalicílico en los hongos.....	45
3.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	46
4.	HIPÓTESIS.....	48
5.	OBJETIVOS.....	49
5.1.	Objetivo general.....	49
5.2.	Objetivos particulares.....	49
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
6.1.	Material biológico.....	51
6.2.	Medios de cultivo.....	51
6.2.1.	Medios para inóculos.....	51
6.3.	Variables evaluadas.....	52
6.3.1.	Descripción de las colonias.....	52
6.3.2.	Área de crecimiento micelial.....	52
6.3.3.	pH.....	52
6.4.	Obtención de sobrenadantes del micelio en desarrollo.....	52
6.5.	Actividad volumétrica de lacasas.....	52
6.6.	Producción de proteínas.....	55
6.7.	Análisis estadístico.....	55
7.	RESULTADOS.....	56
7.1.	FASE I: Materiales vegetales y proceso para la obtención de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i> var. "matahari") y sábila (<i>Aloe vera</i>).....	56
7.1.1.	Resumen.....	56
7.1.2.	Introducción.....	57
7.1.3.	Obtención de la cebolla morada (<i>Allium cepa</i> var. "matahari").....	57
7.1.4.	Obtención de las plantas de sábila (<i>Aloe vera</i>).....	58
7.1.5.	Módulo para la deshidratación de la cebolla y la sábila.....	59
7.1.6.	Deshidratación de la cebolla morada.....	60
7.1.7.	Deshidratación de la sábila.....	62
7.1.8.	Macerados de cebolla y sábila.....	63
7.1.9.	Concentración de extractos de cebolla y sábila.....	64
7.1.10.	Rendimiento de la cebolla.....	65
7.1.11.	Rendimiento de la sábila.....	67

7.1.12.	Resuspensión y esterilización de los extractos.....	68
7.2.	FASE II: Efecto de los extractos de cebolla y sábila en el cultivo dual de las cepas CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i>	69
7.2.1.	Resumen.....	69
7.2.2.	Introducción.....	69
7.2.3.	Materiales y métodos.....	71
7.2.4.	Preparación de testigo y tratamientos.....	71
7.2.5.	Inoculación de testigo y tratamientos.....	71
7.2.6.	VARIABLES A EVALUAR.....	72
7.2.7.	Resultados.....	72
7.2.8.	VARIABLES EVALUADAS.....	72
7.2.9.	Discusión.....	76
7.3.	FASE III: Efecto de los extractos de cebolla y sábila o del AAS en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas en las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i>	78
7.3.1.	Resumen.....	78
7.3.2.	Introducción.....	78
7.3.3.	Materiales y métodos.....	80
7.3.4.	Preparación de medios de cultivo.....	80
7.3.5.	Inoculación e incubación de las cepas CP-50 y CP-753.....	81
7.3.6.	VARIABLES A EVALUAR.....	82
7.3.7.	Resultados.....	83
7.3.8.	VARIABLES EVALUADAS EN TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS VEGETALES Y AAS.....	83
7.3.9.	VARIABLES EVALUADAS EN TRATAMIENTOS CON AAS EN LAS CEPAS CP-50 Y CP-753.....	91
7.3.10.	Discusión.....	99
8.	DISCUSIÓN GENERAL.....	102
9.	CONCLUSIONES.....	106
10.	ESTRATEGIA PROPUESTA.....	107
10.1.	Algunas consideraciones y acciones a realizar.....	107
10.2.	Producción de inóculos con extractos vegetales y/o con AAS.....	108

10.3.	La estrategia.....	108
10.4.	Paquete tecnológico.....	108
10.5.	Actores de la estrategia.....	109
11.	LITERATURA CITADA.....	111
12.	ANEXOS.....	128
12.1.	ANEXO 1: Cultivo de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio PDA en tres marcas comerciales.....	128
12.1.1.	Resumen.....	128
12.1.2.	Introducción.....	128
12.1.3.	Materiales y métodos.....	129
12.1.4.	Variables a evaluar.....	130
12.1.5.	Resultados y discusión.....	130
12.2.	ANEXO 2: Producción de lacasas por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en PDA (Difco).....	133
12.2.1.	Resumen.....	133
12.2.2.	Introducción.....	133
12.2.3.	Materiales y métodos.....	133
12.2.4.	Variables a evaluar.....	134
12.2.5.	Obtención de muestras y determinación de lacasas.....	134
12.2.6.	Resultados y discusión.....	134
12.3.	ANEXO 3: Coeficientes de correlación entre las variables de estudio en las cepas CP-50 y CP-753.....	139
12.3.1.	Cepa CP-50 con extractos vegetales y AAS.....	139
12.3.2.	Cepas CP-50 y CP-753, con adición de AAS.....	143

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Ciclo biológico de los hongos Basidiomycetes. Fuente: Fazenda et al. (2008).....	8
Figura 2.	Representación esquemática de una molécula de lacasa mostrando los tipos de cobre y la coordinación de los centros de cobre, incluyendo las distancias interatómicas entre las uniones relevantes. Fuente: Dwivedi et al. (2011).....	20
Figura 3.	Fases desarrolladas en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> en el medio PDA para determinar el efecto de los extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>), y del ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas.....	50
Figura 4.	Metodología para obtener la muestra a partir de la caja Petri con PDA (Difco) que contiene el micelio en desarrollo de las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , para determinar la actividad volumétrica de lacasas y proteínas. Todo el proceso el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.....	54
Figura 5.	Obtención de la cebolla morada (<i>Allium cepa</i> var. "matahari") en la tierra de cultivo. A: recolección de los bulbos de cebolla y B: llenado de arpillera.....	58
Figura 6.	A: plantas de sábila (<i>Aloe vera</i>) en el vivero. B: planta mostrando el escapo ramificado con las flores amarillas.....	59
Figura 7.	Construcción del módulo de deshidratación. A: parte externa con paredes de policarbonato y ventanas con malla plástica. B: colocación del extractor de aire eléctrico en lo alto de una pared del módulo.....	60
Figura 8.	Cortador de vegetales para fragmentar los bulbos de la cebolla (<i>Allium cepa</i>). A: forma y tamaño de la cuchilla de acero inoxidable. B: colocación del bulbo de cebolla sobre la cuchilla. C: recipiente colector de los fragmentos de cebolla.....	61
Figura 9.	Estantes con entrepaños de malla plástica en los que se colocaron los fragmentos de la cebolla (<i>Allium cepa</i>) para su deshidratación.....	61

Figura 10.	Plantas y hojas de la sábila (<i>Aloe vera</i>). A: corte de una hoja inferior, al ras de la inserción con el tallo. B: medidas de ancho de la base de la hoja y C: medidas de longitud de las hojas.....	62
Figura 11.	Proceso del corte y deshidratación de las hojas de la sábila (<i>Aloe vera</i>). A: cuchilla de acero inoxidable en forma de “V” con la que se hicieron los cortes transversales de la hoja. B: fragmentos de 2 mm de grosor, extendidos sobre el vidrio.....	63
Figura 12.	Macerados y concentración de extractos. 1: macerado de la sábila (<i>Aloe vera</i>) en etanol, grado reactivo. 2 y 3: sobrenadante del macerado de sábila y cebolla (<i>Allium cepa</i>), respectivamente. 4: concentración de extractos en el rotavapor (HAHN VAPOR, HANN SHIN). 5 y 6: concentrado de extractos de sábila y cebolla en cajas Petri, respectivamente.....	65
Figura 13.	Resuspensión en agua y esterilización de extractos. 1: matraces Erlenmeyer con extracto de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>), respectivamente. 2: esterilización y mezcla de los extractos con el sistema aséptico sterifil Millipore.....	68
Figura 14.	Efecto de los extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en cultivo dual de las cepas CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> incubadas entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad, durante cinco días.....	70
Figura 15.	Cultivo dual de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> en medio PDA con adición de extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en 5 días de incubación. Núm. 1 y 2: proporción 6:3 (p/p); núm. 3 y 4: testigo; núm. 5 y 6: proporción 3:6 (p/p).....	73
Figura 16.	Efecto del extracto de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en el desarrollo del área micelial (cm ²) de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en cultivo dual en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Análisis de los	

	datos por ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 15.....	75
Figura 17.	Efecto del extracto de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en el desarrollo del área micelial (cm ²) de la cepa CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> en cultivo dual en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Análisis de los datos por ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 15.....	76
Figura 18.	Efecto de los extractos de la cebolla (<i>Allium cepa</i>) y de la sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) y del ácido acetilsalicílico (AAS 100 μ M) en el desarrollo micelial y en la actividad volumétrica de lacasas y producción de proteínas en las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i>	79
Figura 19.	Adición de extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) esterilizados y vaciado en caja Petri. A: toma de 4 mL de la mezcla de extractos vegetales 6:3 (p/p) y agregados a los tubos de ensayo que contienen 26 mL de medio PDA estéril. B: vaciado del tubo con medio PDA que ya contiene los extractos vegetales.....	81
Figura 20.	Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , cultivada en PDA (Difco) durante 11 días de incubación a temperatura ambiental entre 21 °C y 24 °C y en obscuridad, con adición de AAS 100 μ M o con extracto de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p).....	85
Figura 21.	Efecto del AAS 100 μ M y de los extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) en el área micelial (cm ²) en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.....	86
Figura 22.	Efecto del AAS 100 μ M y de los extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se	

	realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	88
Figura 23.	Efecto del AAS 100 μM y de los extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) en la producción de proteínas en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	90
Figura 24	Desarrollo micelial de las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , cultivadas en PDA (Difco) durante 10 días de incubación a temperatura ambiental entre 25 °C y 27 °C y en obscuridad, con adición de AAS 100 μM	92
Figura 25.	Efecto del AAS 100 μM en el área micelial (cm^2) de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	94
Figura 26.	Efecto del AAS 100 μM en el área micelial (cm^2) de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	95
Figura 27.	Efecto del AAS 100 μM en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	96
Figura 28.	Efecto del AAS 100 μM en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$	97

Figura 29.	Efecto del AAS 100 μ M en la producción de proteínas en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.....	98
Figura 30.	Efecto del AAS 100 μ M en la producción de proteínas en la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.....	99
Figura 31.	Etapas para implementar la estrategia y el paquete tecnológico para la producción de “semilla” y el cultivo de cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	110
Figura 32.	Evaluación del desarrollo micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivada en PDA de tres marcas comerciales.....	129
Figura 33.	Desarrollo del micelio de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> inoculado en tres medios de cultivo sintéticos con diez días de incubación en temperatura ambiental entre 21 °C y 22 °C en obscuridad. Análisis de los datos con ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 5.....	131
Figura 34.	Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en tres marcas comerciales del medio de cultivo sintético PDA a nueve días de incubación. A, B y C: cara superior; D, E y F: cara inferior, con el micelio de las marcas Difco, Merck y Bioxon, respectivamente.....	132
Figura 35.	Morfología colonial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollada en PDA (Difco) entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad con nueve días de incubación. A: cara superior. B: cara inferior.....	135
Figura 36.	Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivada en PDA Difco con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.....	136

Figura 37.	Desarrollo del área micelial (cm ²) de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivada en PDA (Difco) con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.....	136
Figura 38.	Producción volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivada en PDA (Difco) con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.....	137
Figura 39.	Coeficiente de correlación 0.9846. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	139
Figura 40.	Coeficiente de correlación 0.9917. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μ M.....	139
Figura 41.	Coeficiente de correlación 0.9667. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).....	140
Figura 42.	Coeficiente de correlación 0.9032. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	140
Figura 43.	Coeficiente de correlación 0.9473. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μ M.....	141
Figura 44.	Coeficiente de correlación 0.9475. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).....	141
Figura 45.	Coeficiente de correlación 0.8788. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	142
Figura 46.	Coeficiente de correlación 0.9385. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μ M.....	142

Figura 47.	Coeficiente de correlación 0.9684. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).....	143
Figura 48.	Coeficiente de correlación 0.9704. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	143
Figura 49.	Coeficiente de correlación 0.9846. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM	144
Figura 50.	Coeficiente de correlación 0.7544. Positiva, no significativa entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	144
Figura 51.	Coeficiente de correlación 0.8222. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM	145
Figura 52.	Coeficiente de correlación 0.5824. Positiva, no significativa entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.....	145
Figura 53.	Coeficiente de correlación 0.7304. Positiva, no significativa entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM	146
Figura 54.	Coeficiente de correlación 0.9443. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.....	146
Figura 55.	Coeficiente de correlación 0.9191. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM	147
Figura 56.	Coeficiente de correlación 0.8521. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.....	147
Figura 57.	Coeficiente de correlación 0.8558. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM	148
Figura 58.	Coeficiente de correlación 0.9658. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.....	148

Figura 59. Coeficiente de correlación 0.9772. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM

149

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Porcentaje de los componentes lignocelulósicos de varios residuos agrícolas y forestales.....	6
Tabla 2.	Efectos medicinales de especies de <i>Pleurotus</i> y algunas de las sustancias identificadas.....	11
Tabla 3.	Aminoácidos, minerales y vitaminas en basidiocarpos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , cultivados en residuos de granos en la producción de cerveza en proporción 50:50 con paja de trigo.....	12
Tabla 4.	Valor nutrimental de <i>Pleurotus ostreatus</i> en comparación con el champiñón (<i>Agaricus bisporus</i>) y el shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	12
Tabla 5.	Composición en azúcares, ácidos grasos y tocoferoles en <i>Pleurotus ostreatus</i> , en comparación con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Lentinula edodes</i>	13
Tabla 6.	Diversos compuestos o sustancias químicas, utilizados como inductores para incrementar la producción de lacasas en los hongos.....	22
Tabla 7.	Solventes utilizados en la extracción de los principios activos de algunas plantas y su aplicación.....	26
Tabla 8.	Análisis proximal, vitaminas y minerales en 100 g de cebolla cruda (<i>Allium cepa</i>).....	32
Tabla 9.	Lípidos y aminoácidos presentes en 100 g frescos de cebolla (<i>Allium cepa</i>).....	32
Tabla 10.	Diversas actividades de algunos compuestos de la cebolla (<i>Allium cepa</i>) en varias enfermedades del hombre, así como alguna actividad antagónica para otros organismos.....	33
Tabla 11.	Compuestos aislados de la pulpa y de los exudados de la sábila (<i>Aloe vera</i>).....	39
Tabla 12.	Algunas propiedades o actividades de los compuestos de la sábila (<i>Aloe vera</i>).....	40
Tabla 13.	Diversas aplicaciones del ácido salicílico en diferentes plantas de importancia económica.....	43
Tabla 14.	Número de cortes y fragmentación de la cebolla (<i>Allium cepa</i>), cantidad de cebolla fresca y peso de la cebolla deshidratada en los meses de octubre y noviembre de 2012.....	66

Tabla 15.	Temperaturas y humedad relativa en los meses de octubre y noviembre de 2012 en el interior del módulo en la etapa de deshidratación de la cebolla (<i>Allium cepa</i>).....	66
Tabla 16.	Número de macerados de cebolla (<i>Allium cepa</i>) a partir de diciembre 2012 a octubre de 2013. Rendimiento (g) del extracto de cebolla obtenido en cada macerado relacionado con 100 g deshidratados que proceden de 1000 g frescos.....	66
Tabla 17.	Cortes a partir de noviembre 2012 a octubre de 2013, y condiciones ambientales en el interior del módulo, durante la deshidratación de los fragmentos de las hojas de sábila (<i>Aloe vera</i>).....	67
Tabla 18.	Número de cortes y macerados, peso fresco y peso deshidratado, y rendimiento del extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) relacionado con aproximadamente 50 g deshidratados que provienen de 1000 g frescos.....	67
Tabla 19.	Valores de pH inicial y final, y temperatura durante el crecimiento micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivada en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad, durante cinco días de incubación, con adición de extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p).....	74
Tabla 20.	Valores de pH de los extractos de la cebolla (<i>Allium cepa</i>) y de la sábila (<i>Aloe vera</i>) de manera individual y mezclados en proporción 6:3 (p/p).....	84
Tabla 21.	Valores de pH obtenidos en el cultivo de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio PDA (Difco), adicionado con AAS 100 µM o con extractos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en proporción 6:3 (p/p) durante el inicio de la siembra (0), día 5 y día 11.....	84
Tabla 22.	Valores de pH obtenidos en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio PDA (Difco), adicionado con AAS 100 µM durante el inicio de la siembra (día 0), día 6 y día 10 de incubación.....	93

1. INTRODUCCIÓN

Breve exposición de la temática

Para la realización de las investigaciones, en primer lugar, se obtuvieron los bulbos de la cebolla morada (*Allium cepa* L. var. "matahari") y plantas de sábila [*Aloe vera* (L.) Burm. F.] que se fragmentaron y deshidrataron para que después por medio de macerados en alcohol etílico se obtuvieron los extractos concentrados.

En una segunda etapa, se realizó el cultivo dual de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. y la cepa CP-113 de *Trichoderma aggressivum* Samuels & W. Gams (moho contaminante de *P. ostreatus*) en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), con la adición de los extractos de cebolla morada y sábila en las proporciones 6:3 y 3:6 (peso/peso) para evaluar su efecto en el desarrollo micelial de estas cepas. Los extractos vegetales estimularon el desarrollo micelial de ambas cepas; por lo cual, se decidió continuar los estudios con el cultivo de la cepa CP-50, dejando a un lado la cepa CPM-113.

En una tercera etapa, se hizo el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* en el medio PDA Difco con adición de extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p), en comparación con un tratamiento que consistió en adicionar ácido acetilsalicílico (AAS) en concentración 100 μ M, en donde se evaluó la producción de enzimas lacasas y proteínas.

Como problema de investigación, se planteó que los hongos comestibles producen exoenzimas capaces de degradar compuestos lignocelulósicos y su efectividad está relacionada con la cantidad que produce el micelio para que sea capaz de degradar ya sea celulosas, hemicelulosas y ligninas que los conforman.

El sistema enzimático de las enzimas lacasas es el que más se ha estudiado y para estimular su producción, se han adicionado a los medios de cultivo, compuestos que actúan como inductores tales como el sulfato de cobre, cicloheximida, amonio, entre otros. En esta investigación se evaluó el efecto que ejercen los extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p), y del AAS en concentración 100 μ M como inductores en

el desarrollo micelial y en el incremento de la producción de las enzimas lacasas y proteínas en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 en el medio PDA (Difco).

Una hipótesis fue que los extractos de cebolla y sábila tienen efecto sobre el desarrollo micelial de *T. aggressivum* en cultivo dual con *P. ostreatus*.

Otra hipótesis fue que una mezcla de extractos de cebolla y sábila, así como el ácido acetilsalicílico, son inductores que estimulan el desarrollo micelial de cepas de *P. ostreatus* e incrementan la producción de enzimas lacasas y de proteínas.

El objetivo general fue determinar el efecto de los extractos de cebolla y de sábila sobre el desarrollo micelial del moho verde *Trichoderma aggressivum* y del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*; además, evaluar una mezcla de extractos, así como del ácido acetilsalicílico, determinando su efecto inductor en el desarrollo del micelio, la producción de enzimas lacasas y proteínas en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y generando la posibilidad de una aplicación tecnológica.

Los resultados indicaron que los extractos de cebolla y de sábila estimularon el crecimiento micelial de las cepas CP-50 y CPM-113.

En los tratamientos con los extractos de cebolla y sábila (6:3), y con AAS, hubo un efecto positivo mayormente en la producción de enzimas lacasas. Estos resultados muestran que una aplicación tecnológica puede desarrollarse para incrementar la producción de hongos a pequeña y gran escala al incrementar la producción de enzimas y la degradación de los substratos.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Biotecnología y desarrollo

La biotecnología ha estado presente desde tiempos inmemorables en la solución de muchos problemas importantes, no sólo en el campo de la salud, permitiendo la producción de vacunas y antibióticos, sino también en el de la producción de alimentos a través de procesos de fermentación, tales como el pan o la cerveza. Sin embargo, ya no se remite de manera exclusiva a procesos ligados a la producción de alimentos y bebidas. Con la biología molecular, en los años cincuenta, se descifra la estructura del material genético y los mecanismos celulares que permiten traducir en proteínas esa información genética. En los años setenta surgen las técnicas de la ingeniería genética y con ello la posibilidad de aislar, editar y manipular el material genético, lográndose incluso el trasplante de genes entre especies, creándose así los organismos transgénicos. Este conjunto de conocimientos constituye una de las plataformas de despegue de la biotecnología moderna.

La biotecnología moderna se puede definir como una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, la biología molecular, la ingeniería bioquímica, la microbiología, la genómica y la inmunología), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales). A partir de dicho estudio y de la manipulación de los sistemas biológicos, la biotecnología moderna busca hacer un uso inteligente, respetuoso y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva, para facilitar la solución de problemas importantes en sectores tales como el de la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente (Bolívar, 2004).

2.2. Valor biotecnológico de residuos agroindustriales

El permanente e intensivo desarrollo de la agricultura y de la industria produce en grandes cantidades residuos de plantas, así como la presencia de pesticidas, residuos xenobióticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, clorofenoles, metaloides y otros compuestos difíciles de degradar (Knežević *et al.*, 2013). En nuestro planeta, alrededor

de 200 billones de toneladas por año de materia orgánica son producidas por el proceso de la fotosíntesis (Zhang, 2008). A pesar de ello, la gran mayoría de esta materia orgánica no está totalmente disponible como alimento para los humanos y animales y por otra parte, en muchas ocasiones dichos residuos vienen a ser un problema para el medio ambiente ya que su acumulación provoca contaminación.

Por lo anterior, hay un énfasis para reciclar los residuos generados en la agroindustria y los subproductos del sector forestal. Al reutilizar los subproductos por procesos biológicos o químicos, es posible obtener otros productos útiles con alto valor (Lal, 2005; Webb *et al.*, 2004). Las propiedades químicas de los residuos lignocelulósicos, los convierte en un substrato de enorme valor biotecnológico. Pueden ser convertidos por medio de una fermentación sólida en productos con valor agregado, como puede ser la producción de hongos, alimento para animales enriquecido con biomasa microbial, compost para utilizarse como biofertilizante o biopesticida, enzimas, ácidos orgánicos, etanol, metabolitos secundarios y además de utilizarse en la biorremediación (micorremediación) de compuestos peligrosos, detoxificación de residuos agroindustriales, entre otros (Kim y Dale, 2004; Manpreet *et al.*, 2005; Krishna, 2005; Sains, 2009; Kulshreshtha *et al.*, 2014).

La cantidad de residuos de las cosechas por año en el mundo, que provienen del cultivo de 27 plantas utilizadas como alimento humano, es alrededor de 4×10^9 ton anuales, de las cuales, 3 billones (75%) son generadas por los residuos lignocelulósicos de cereales (Lal, 2005; 2008). En la Unión Europea los subproductos agrícolas del trigo generan 70 millones de ton, los residuos de maíz 11 millones de ton, los de la molienda de aceitunas 5 millones de ton y los de la uva 4 millones de ton (Koutrotsios *et al.*, 2014).

Para América Central y Sudamérica, los residuos lignocelulósicos se estimaron alrededor de 140 millones de ton provenientes del cultivo del trigo, rastrojos de maíz y bagazo de caña de azúcar, sin considerar los residuos del café, plátano y de otros cultivos (Kim y Dale, 2004). Particularmente en México, se generan más de 474,000 ton anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

2.3. Biotecnología en el cultivo de hongos

Solamente el 3% de la producción anual de los residuos agrícolas se utiliza directamente y el resto viene a ser un lastre para el medio ambiente. La resistencia a la biodegradación de la biomasa de la planta, está relacionada directamente a la presencia de lignina, uno de los compuestos más recalcitrantes en la naturaleza (Knežević *et al.*, 2013). En la **Tabla 1**, se muestra la composición que tienen algunos subproductos agrícolas o forestales.

Una alternativa de reutilización de los subproductos agrícolas, forestales o agroindustriales, es que sirvan como sustrato para el cultivo y producción de varias especies de hongos comestibles y medicinales (Pant *et al.*, 2006; Das y Mukherjee, 2007; Isikhuemhen y Mikiashvili, 2009; Kulshreshtha *et al.*, 2013; Koutrotsios *et al.*, 2014).

De manera especial, los hongos *Basidiomycetes* (de podredumbre blanca) tienen la habilidad de degradar los componentes lignocelulósicos debido a su capacidad de sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas. Estos hongos secretan una o más de tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de la lignina, las cuales son: lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13) y lacasa (EC 1.10.3.2). Estas enzimas son de importancia fundamental para la eficiente bioconversión de los residuos de las plantas y son un buen prospecto para varias aplicaciones biotecnológicas (Elisashvili y Kachlishvili, 2009).

Se calcula que hay alrededor de 2000 especies de hongos que se consideran comestibles. Sin embargo, sólo 35 especies han sido cultivadas comercialmente y 20 a escala industrial. El cultivo de hongos es una práctica mundial que se ha incrementado en las dos últimas décadas. Las especies que más se producen comercialmente son: *Agaricus bisporus* (en primer lugar), *Lentinus edodes* (el segundo más cultivado desde 1997), *Pleurotus* spp., *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* y *Volvariella volvacea* (Silva *et al.*, 2007). Sin embargo, hay otras especies que se cultivan: *Agrocybe aegerita*, *Ganoderma* spp., *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lepista nuda*, *Coprinus comatus*, *Pholiota nameko* y *Stropharia* spp. (Royse, 2004).

La producción de hongos en 2005 en ton métricas fue de 1,411 en China, 382 en USA, 245 en los países bajos (Holanda), 139 en Francia, 138 en España, 135 en Polonia, 88 en Italia, 80 en Canadá, 77 en Irlanda y 74 en el Reino Unido (Sánchez, 2010). El mercado mundial de la industria de hongos, valuó la producción en el 2005 en más de \$ 45 billones de dólares (Chang, 2006).

Tabla 1. Porcentaje de los componentes lignocelulósicos de varios residuos agrícolas y forestales.

Material lignocelulósico	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Bagazo de caña de azúcar	20	25	42
Sorgo dulce	21	27	45
Madera dura	18-25	24-40	40-45
Madera suave	25-35	25-35	45-50
Olotes	15	35	45
Rastrojos	19	26	38
Paja de arroz	18	24	32.1
Cáscaras de nueces	30-40	25-30	25-30
Periódicos	18-30	25-40	40-55
Pastos	10-30	25-50	25-40
Paja de trigo	16-21	26-32	29-35
Residuos del plátano	14	14.8	13.2
Bagazos	23.33	16.52	54.87
Fibras esponjosas (calabaza)	15.46	17.44	66.59

Fuente: Anwar *et al.* (2014).

2.4. Producción de hongos comestibles en México

México es el mayor productor de hongos en Latinoamérica, ya que genera alrededor del 58.9% de la producción total de la región y lo ubica como el 16º productor mundial. El monto anual de las operaciones supera los 200 millones de dólares y genera alrededor de 25,000 empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en el reciclaje de más de 474,000 ton anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). La producción

comercial de hongos cultivados comercialmente en México para el año 2009, fue para los champiñones [*Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Pilát] de 43,595 ton (42,482 ton para el champiñón blanco; 1,113 ton para el champiñón café); para las “setas” (blanca, gris, café) (*Pleurotus* spp.) fue de 2,920 ton; para el shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] fue de 18.2 ton; para los hongos reishi [*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.] y maitake [*Grifola frondosa* (Dicks.) Gray] los cultivos son a nivel de prueba a escala comercial (Martínez-Carrera y López-Martínez, 2010).

Por otra parte, se tiene información relevante sobre el cultivo de hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica, que de manera significativa impulsa el desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de estos hongos (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

2.5. Algunas características de los Basidiomycetes

Los hongos Basidiomycetes comprenden alrededor de 30,000 especies, de las cuales el 37% han sido descritas. Los Basidiomycetes tienen importancia ecológica e industrial. Algunos son saprobios al alimentarse de materia orgánica muerta o en descomposición y tienen un papel importante en el reciclado de esta materia, ya que tienen la habilidad de degradar moléculas complejas que otros grupos de microbios no pueden hacerlo. Algunos son simbioses, forman micorrizas con plantas vasculares, facilitando la asimilación nutrimental. Otros son patógenos de otros hongos, plantas o animales y son responsables de pérdidas en las cosechas (ejemplo: *Ustilago maydis*) o en enfermedades humanas (*Cryptococcus neoformans*). Sin embargo, los basidiocarpos de muchas especies han sido utilizados como una fuente de alimentación (*Boletus edulis*, *Lactarius* spp.), mientras que otros tienen propiedades alucinógenas (*Amanita muscaria*, *Psilocybe* spp.) y otros son venenosos (*Amanita phalloides*) (Fazenda *et al.*, 2008).

Los cuerpos fructíferos de los Basidiomycetes también llamados basidiocarpos, carpóforos o basidiomas, son adaptaciones para la diseminación de esporas, generalmente sexuales. Los basidiocarpos surgen del micelio que se encuentra dentro de un substrato húmedo. El micelio (homocariótico) en el substrato posee un núcleo haploide por cada compartimento celular, que al fusionarse (plasmogamia) con otro

micelio con el mismo tipo de núcleo, forman un micelio denominado heterocarión, por tener dos núcleos en el mismo filamento, el cual se desarrolla y finalmente los dos núcleos se fusionan (cariogamia) para formar un núcleo diploide, el cual inmediatamente por meiosis forma basidiosporas haploides, las cuales se encuentran en células especiales denominadas basidios. En algunos casos, el núcleo diploide se encuentra en el micelio vegetativo, como sucede en especies de *Armillaria*. Las basidiosporas son descargadas al medio ambiente, pueden germinar y generar un micelio homocariótico y dependiendo de la compatibilidad genética, formarán nuevamente un micelio heterocariótico. Las especies de hongos Basidiomycetes que presentan este esquema de reproducción son llamados heterotálicos (Wösten y Wessels, 2006) (**Figura 1**).

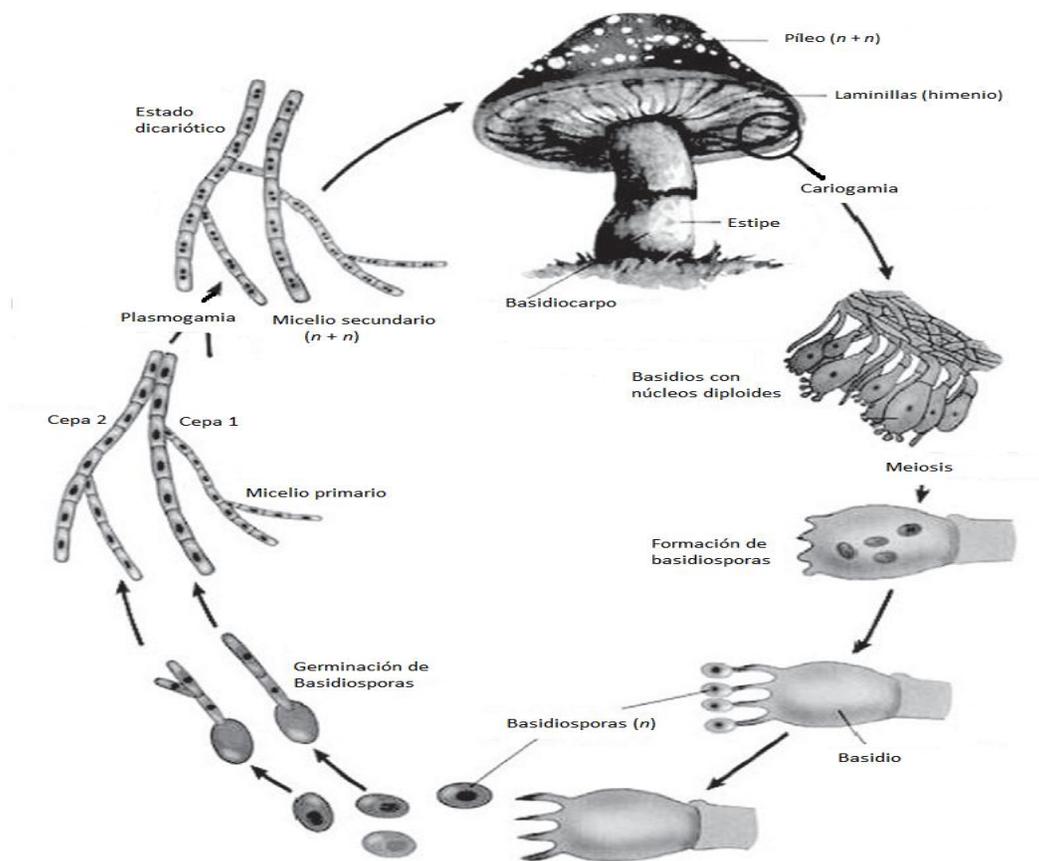


Figura 1. Ciclo biológico de los hongos Basidiomycetes. Fuente: Fazenda *et al.* (2008).

2.6. Características del género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* (Pleurotaceae, Basidiomycetes) es un grupo cosmopolita de hongos con alto valor nutricional, propiedades terapéuticas, con varias aplicaciones biotecnológicas y medioambientales.

2.7. Biología de *Pleurotus*

Basidioma flabeliforme o algunas veces infundibuliforme. **Píleo** blanco, blanquecino, amarillo, café pálido u obscuro, café grisáceo, azul, gris azulado, rosa o rosa naranja, seco o viscido o higrofanó, liso o escamoso, o tomentoso en el centro. **Laminillas** decurrentes, uniformemente blancas, blanquecinas, rosa o rosa-naranja, concoloras en las puntas. **Estipe** ausente o si presente, lateral o excéntrico, corto o largo, liso, tomentoso, o hirsuto mayormente en la base, sólido. **Velo** y **Anillo** presentes en algunas especies. **Contexto** carnoso o blando, blanco o blanquecino. **Olor** y **Sabor** agradable, fungoide o harinoso. **Esporada** blanca, amarillenta, rosa, grisácea, liliácea, gris liliácea, o pálido vinácea. **Esporas** hialinas, cilíndricas, de pared delgada. **Pleurocistidos** ausentes o presentes, nunca como metuloide. **Queilocistidos** usualmente presentes, pero no como metuloide. **Sistema hifal** monomítico o dimítico, con hifas infladas con más de 25 µm de ancho. **Trama himenoforal** subregular o irregular. **Superficie pileal** indiferenciada. **Fíbulas** presentes. **Micelio** blanco, con estructuras en forma de atrapar nematodos. **Estado anamorfo** como sinema con cabezas globosas negras y esporas negras. **Hábitat** sobre plantas vivas o muertas (mayormente árboles), raramente sobre coníferas, creciendo también en varios substratos lignocelulósicos (Guzmán, 2000).

Las esporas germinan en medios de cultivo sintéticos y en 48 a 96 h se forman colonias blanquecinas filamentosas (micelio primario) no fértiles. La fusión entre dos micelios primarios (homotálicos) vienen a desarrollar un micelio secundario (heterotálico = dicariótico), que presenta fíbulas y es fértil para formar cuerpos fructíferos. El micelio de *Pleurotus* es blanco excepto para *P. cystidiosus*, *P. smithii* y *P. columbinus*, los cuales forman coremios (estructuras asexuales). *P. tuber-regium* que en el substrato forma una especie de tubérculo, es comestible y tiene propiedades medicinales. Todas las variedades y especies de *Pleurotus* son comestibles excepto *P. olearius* y *P. nidiformis*

que se han reportado como venenosas. Hay 38 especies registradas en el mundo. En recientes años, 25 especies han sido cultivadas comercialmente, entre las que destacan: *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. sapidus*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. fossulatus*, *P. opuntiae*, *P. cornucopiae*, *P. yuccae*, *P. platypus*, *P. djamore*, *P. tuber-regium*, *P. australis*, *P. purpureoolivaceus*, *P. populinus*, *P. levis*, *P. columbinus* y *P. membra-naceus* (Upadhyay y Singh, 2010).

2.8. Propiedades medicinales de *Pleurotus* spp.

La medicina tradicional atribuye a las especies de *Pleurotus* varias sustancias con propiedades antibióticas, antivirales, antitumorales, anticolesterolémicas y antioxidantes (Cohen *et al.*, 2002; Jayakumar *et al.*, 2011) (**Tabla 2**).

2.9. Características de *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. es llamado el “hongo ostra” o hiratake (Cohen *et al.*, 2002) por la forma que presenta el píleo. El hongo es saprófito sobre la madera de troncos de árboles, tocones y leños. Los hongos se producen en capas sobrepuestas. Son de color blanco, gris o café claro. El píleo es de 5-30 cm de diámetro, tiene un estipe corto y lateral de 1-3 cm de grosor y 2-4 cm de longitud. El himenio está formado por laminillas en la superficie inferior del píleo, en donde se producen las basidioporas (Brenneman y Guttman, 1994).

2.10. Valor nutrimental de *Pleurotus ostreatus*

P. ostreatus es un buen alimento para los humanos, ya que contiene proteínas (53.3% de proteína cruda, sobre base en peso seco), con los principales aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas (Wang *et al.*, 2001) (**Tabla 3**). Además, se ha determinado el valor nutrimental, la composición en azúcares, ácidos grasos y tocoferoles de *P. ostreatus* en comparación con el champiñón y el shiitake (Reis *et al.*, 2012) (**Tablas 4 y 5**).

Tabla 2. Efectos medicinales de especies de *Pleurotus* y algunas de las sustancias identificadas.

Efecto medicinal	Especie	Sitio o sustancia
Antibiótico	<i>Pleurotus</i>	Micelio, polisacárido
Antibacterial	<i>P.ostreatus</i>	β -D-Glucan (pleuran)
Antiviral	<i>P. citrinopileatus</i>	Polisacárido
	<i>P.ostreatus</i>	Ubiquitin- proteína
Inmunomodulador	<i>P. ostreatus</i>	Glucan
Antitumor	<i>P.ostreatus</i>	Glicopéptidos
	<i>P.ostreatus</i>	Basidiocarpo creciendo en olotes de maíz
	<i>P.ostreatus</i>	Basidiocarpo
	<i>P.ostreatus</i>	Lectin
	<i>P. ostreatus</i>	β -D-Glucan (pleuran)
Antiinflamatorio	<i>Pleurotus</i> spp.	-
Anticolesterolémico	<i>P. eryngii</i>	Lovastatin
	<i>P. ostreatus</i>	Basidiocarpo
	<i>P. cornucopiae</i>	Lovastatin
	<i>P. ostreatus</i>	Basidiocarpo
Hemaglutinante	<i>P. cornucopiae</i>	Lectin
Antioxidante	<i>P. ostreatus</i>	β -D-Glucan (pleuran)

Fuente: Cohen *et al.* (2002).

Tabla 3. Aminoácidos, minerales y vitaminas en basidiocarpos de *Pleurotus ostreatus*, cultivados en residuos de granos en la producción de cerveza en proporción 50:50 con paja de trigo.

Aminoácidos (mg/g peso seco)		Aminoácidos (mg/g peso seco)		Minerales (mg/100 g materia seca)		Vitaminas (mg/100 g materia seca)	
Ácido aspártico	31.4	Leucina a	25.7	Na	21.9	Tiamina	1.91
Treonina a	17.1	Tirosina	13.3	P	1647.6	Riboflavina	3.62
Serina	18.1	Fenilalanina a	15.2	Fe	7.1	Niacina	90.0
Ácido glutámico	53.3	Lisina a	22.9	Ca	nd	Ácido ascórbico	nd
Glicina	17.1	Hisitidina	12.4	K	2171.4	----	----
Alanina	28.6	Arginina	27.6	Mg	181.9	----	----
Valina a	21.0	Triptofano a	4.8	Cu	2.5	----	----
Cisteína	3.8	Prolina	15.2	Zn	13.7	----	----
Metionina a	3.8	Total aminoácidos	347.5	Mn	1.6	----	----
Isoleucina a	16.2	Total aminoácidos Esenciales	126.7	----	----	----	----

Fuente: Wang *et al.* (2001). **a** = aminoácidos esenciales.

Tabla 4. Valor nutrimental de *Pleurotus ostreatus* en comparación con el champiñón (*Agaricus bisporus*) y el shiitake (*Lentinula edodes*).

Valor nutrimental (g/100 g frescos)	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. bisporus</i>	<i>L. edodes</i>
Humedad	89.17 ± 2.12	91.27 ± 0.45	79.78 ± 1.31
Cenizas	0.62 ± 0.08	0.85 ± 0.17	1.36 ± 0.05
Proteínas	0.76 ± 0.06	1.23 ± 0.02	0.89 ± 0.09
Grasas	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Carbohidratos	9.30 ± 2.08	6.46 ± 0.57	17.62 ± 1.29
Energía (kcal/100 g frescos)	39.27 ± 7.76	30.86 ± 1.98	72.79 ± 4.98

Fuente: Reis *et al.* (2012).

Tabla 5. Composición en azúcares, ácidos grasos y tocoferoles en *Pleurotus ostreatus*, en comparación con *Agaricus bisporus* y *Lentinula edodes*.

Composición	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. bisporus</i>	<i>L. edodes</i>
Fructosa (g/100 g frescos)	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.69 ± 0.09
Manitol (g/100 g frescos)	0.54 ± 0.04	5.60 ± 0.19	10.01 ± 1.30
Trehalosa (g/100 g frescos)	4.42 ± 0.03	0.16 ± 0.02	3.38 ± 0.37
Azúcares totales (g/100 g frescos)	4.97 ± 0.02	5.79 ± 0.21	14.08 ± 1.76
Ácido palmítico (AGS) (%)	11.2 ± 0.2	11.9 ± 0.3	10.3 ± 0.2
Ácido oleico (AGM) (%)	12.3 ± 0.3	1.1 ± 0.6	2.3 ± 0.3
Ácido linoleico (AGP) (%)	68.9 ± 0.8	77.7 ± 0.7	81.1 ± 0.4
Ácido α-linoleico (AGP) (%)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Ácidos grasos saturados (AGS) (% del total de ácidos grasos)	17.0 ± 0.5	20.3 ± 0.1	15.1 ± 0.1
Ácidos grasos mono-insaturados (AGM) (% del total de ácidos grasos)	13.6 ± 0.3	1.4 ± 0.6	2.9 ± 0.3
Ácidos grasos poli-insaturados (AGP) (% del total de ácidos grasos)	69.4 ± 0.7	78.3 ± 0.7	82.0 ± 0.4
α-tocoferol (µg/100 g peso fresco)	0.59 ± 0.08	0.23 ± 0.02	0.92 ± 0.04
β-tocoferol (µg/100 g peso fresco)	nd	0.85 ± 0.02	nd
γ-tocoferol (µg/100 g peso fresco)	1.49 ± 0.0	1.51 ± 0.14	5.55 ± 0.60
δ-tocoferol (µg/100 g peso fresco)	1.64 ± 0.22	2.60 ± 0.20	4.36 ± 0.54
Totales de tocoferol (µg/100 g peso fresco)	3.72 ± 0.29	5.19 ± 0.03	10.83 ± 0.10

Fuente: Reis *et al.* (2012). nd = no detectado.

2.11. Especies de *Trichoderma* en el cultivo de hongos comestibles

El género *Trichoderma* spp. fue introducido a la literatura en 1794 por Persoon para clasificar cuatro especies que actualmente se consideran no relacionadas entre sí, las cuales son: *Trichoderma viride* (Pers.: S.F. Gray), *Xylohypha nigresce* (Pers.), *Sporotrichum aureum* (Link), y *Trichotecium roseum* (Pers.).

La mayoría de las especies de *Trichoderma*, se han descrito de Norteamérica y de Europa, aunque las nuevas investigaciones de otras áreas geográficas conducirán al reconocimiento de nuevas especies y su interacción en el cultivo de hongos comestibles. La temperatura óptima para su crecimiento en agar, está entre 20 y 28°C, aunque crece bien entre 6 °C a 32 °C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93% al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente a la azul y la violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración. El micelio es escaso, de textura velutinoso. La escasa formación de micelio aéreo hace que la superficie sea levemente hirsuta. Con el tiempo, el centro de la colonia se torna algodonoso y se observa la esporulación en la zona periférica de la colonia en pústulas conidiógenas de color blanco, que luego se tornan verde grisáceo y el medio se torna de color vino tinto.

Las especies de *Trichoderma* spp. son hongos cosmopolitas y típicamente del suelo que pueden ser llevados a sustratos en el cultivo de hongos comestibles. Se ha visto que *Trichoderma* spp., ha demostrado tener gran agresividad contra diversos hongos cultivados, principalmente el champiñón, seguido del hongo seta (Ortega, 2002).

Las especies de *Pleurotus* son hongos comestibles cultivados en diversos sustratos lignocelulósicos, en los que tienen que competir por el espacio y nutrientes con mohos contaminantes y antagonistas como *Trichoderma* spp., que causa pérdidas en las cosechas (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2008). Las especies de *Trichoderma* producen varias enzimas como las quitinasas y glucanasas que están implicadas en la degradación de las paredes celulares del hongo en cultivo (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2004).

Varias especies de *Pleurotus* se cultivan en diversos sustratos, sin embargo, cuando el sustrato no se maneja de manera adecuada, se contamina con el moho verde *Trichoderma* spp. (Mata *et al.*, 2005). Los propágulos (conidios, clamidosporas o fragmentos de micelio) pueden ser esparcidos por corrientes de aire, aerosoles, insectos, ácaros, herramientas, ropas, etc. (Ortega, 2002).

Algunas especies de *Trichoderma* actúan como patógenas y otras como competidores del cultivo de hongos comestibles. Las especies competidoras encontradas en el cultivo de champiñón son: *T. viride* (Pers.: S.F. Gray); como patógenas: *T. koningii* (Qudem) y *T. harzianum* (Rifai). Entre las especies citadas en el sustrato de *P. ostreatus* se encuentran: *T. viride* (Pers.: S.F. Gray), *T. harzianum* (Rifai), *T. hamatum* (Bonord: Bainier) y *T. pseudokoningii* (Rifai) (Ortega, 2002).

Con base en lo anterior, es importante el control de las especies de *Trichoderma* que atacan los sustratos en que crecen los hongos comestibles. Tal control debe realizarse desde la resiembra o propagación en el laboratorio de la cepa a cultivar y en la elaboración del inóculo o “semilla”. El micelio del hongo a cultivar debe estar lo suficientemente fortalecido para desarrollarse en diferentes sustratos sólidos y así evitar el ataque de especies de *Trichoderma* (Ortega, 2002).

2.12. El sistema enzimático de los hongos comestibles

La producción de enzimas lignocelulíticas en los hongos es importante para el tratamiento de la pulpa de papel y el desarrollo de nuevas tecnologías para el pretratamiento de material lignocelulósico para utilizarse como materia prima en la producción de bioalcohol, así como en la biorremediación, biosensores, como estabilizadores en la producción de vinos, detoxificación de aguas residuales y contaminantes orgánicos, en la decolorización de textiles, en la fabricación de antibióticos y medicamentos contra el cáncer o VIH-1, polímero y modificaciones de superficies de fibra, en cosméticos, color en alimentos, polímeros anti-efectos adipogénicos (Bonomo *et al.*, 2001; Couto y Herrera, 2006; Hu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013; Knežević *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2014; Jeon *et al.*, 2014).

El proceso lignocelulítico incluye la degradación de la lignina por diferentes tipos de peroxidasas y la degradación de la celulosa mediante enzimas activas en carbohidratos. En ambos casos, estas actividades son controladas por una familia de genes cuyos miembros varían entre diferentes especies. La lignina es mayormente degradada por lignino peroxidasas (LiP, E.C.1.11.1.14), peroxidasas versátiles (VP, EC1.11.1.16), manganeso peroxidasas (MnP, E.C. 1.11.1.13) y fenol oxidasas (Pox) también conocidas como lacasas (E.C. 1.10.3.2). Este esquema básico de enzimas, está complementado con otras como el aril-alcohol oxidasas (AAO, E.C. 1.1.3.7), superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1), glioxal oxidasas (GLO, E.C. 1.2.3.5) y otras que proveen algunos de los sustratos utilizados en las reacciones correspondientes. La celulosa es degradada por endoglucanasas que atacan la celulosa en las regiones amorfas, y celobiohidrolasas que son exocelulasas que producen disacáridos de celobiosa desde el reductor (tipo I) o no reductor (tipo II) final de la celulosa. La degradación final de la celobiosa se lleva a cabo por β -glicosidasas (Santoyo *et al.*, 2008; Elisashvili y Kachlishvili, 2009).

De manera particular, *P. ostreatus* produce lacasas, Mn-peroxidasas y versátiles peroxidasas como su mayor actividad ligninolítica. Sin embargo, la actividad de la lignina peroxidasa, no se ha detectado en este hongo. Por el contrario, el hongo *Phanerochaete chrysosporium* produce lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa. *P. ostreatus* se incluye en el grupo de hongos que son eficientes degradadores en la naturaleza de la lignina sin la producción de la enzima lignina peroxidasa. De esta manera, *P. ostreatus* se comporta como un hongo selectivo, capaz de degradar la lignina de los sustratos vegetales, dejando la mayor parte de la celulosa intacta (Santoyo *et al.*, 2008).

2.13. Características y propiedades de las lacasas

Yoshida en 1883 fue el primero en describir la lacasa en el látex obtenido del árbol de *Rhus vernicifera*. Una década más tarde, la enzima fue aislada y purificada por Bertrand, quien informó de su mecanismo de acción. Este tipo de actividad fue atribuida exclusivamente a las plantas superiores y hongos. Sin embargo, ahora se reconoce que las lacasas son enzimas casi omnipresentes, ya que han sido aisladas de plantas,

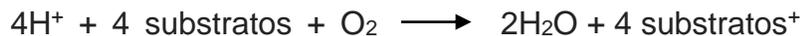
hongos (Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes), procariotas y artrópodos. Entre los Basidiomycetes las lacasas de *Trametes (Coriolus) versicolor*, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *T. villosa*, *T. gallica*, *Phlebia radiata*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Coprinus cinereus*, son las más frecuentemente descritas y reportadas (Dwivedi *et al.*, 2011; Christopher *et al.*, 2014).

Las lacasas se han aislado de insectos, donde su función principal es en el proceso de esclerotización en la síntesis de la cutícula epidérmica. En las bacterias, las lacasas tienen varias funciones, tales como los procesos de morfogénesis, la homeostasis del cobre, la biosíntesis de pigmentos (tales como la melanina y el pigmento de esporas de color marrón), y la protección de esporas contra la luz UV y peróxido de hidrógeno. Por otra parte, las lacasas fúngicas están involucradas en la esporulación, la producción de pigmentos, la formación de cuerpos fructíferos, y en la patogénesis de la planta. Los hongos Basidiomycetes de podredumbre blanca son conocidos por su eficiente descomposición y transformación de la lignina, celulosa, hemicelulosa en dióxido de carbono. En consecuencia, los Basidiomycetes son hongos ampliamente estudiados. En la actualidad, más de 100 lacasas de hongos Basidiomycetes y Ascomycetes se han purificado y caracterizado. La purificación de las lacasas a partir de extractos crudos de plantas es complejo, y por esta razón no se han estudiado ampliamente (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Las lacasas, también llamadas p-difenol: dióxido oxidorreductasas son azul multicobre oxidasas que tienen la capacidad para catalizar la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos orgánicos, concomitantemente con la reducción del oxígeno molecular a agua.

Aunque la mayoría de los substratos de las lacasas son compuestos fenólicos (orto y para-difenoles, fenoles sustituidos con metilo, polifenoles, aminas aromáticas, bencenotioles, hidroxindoles, 1-naftol, siringaldazine) la actividad de la enzima se puede extender a compuestos no fenólicos mediante el uso de mediadores como el ABTS [2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)] y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Durante el proceso catalítico de la lacasa, resultan diferentes reacciones de radicales libres, dependiendo de la estructura y las condiciones de la reacción. Las reacciones más frecuentes son de acoplamiento de los radicales libres que generan productos diméricos o compuestos poliméricos y carboxilaciones oxidativas. La oxidación de los substratos se acopla a la reducción de oxígeno molecular, generando dos moléculas de agua. Para cada oxígeno reducido, cuatro moléculas del substrato son oxidadas sin producción de peróxido de hidrógeno:



Las lacasas son consideradas como catalizadores “verde ideales”, debido a que emplean O_2 como un co-substrato y generan H_2O como subproducto (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Las lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas que normalmente contienen cuatro átomos de cobre por monómero. Para realizar la función catalítica, la lacasa depende de los átomos de cobre que se distribuyen en los tres diferentes centros de cobre, los cuales se clasifican en tres grupos: Tipo-1 o centro de cobre azul, Tipo-2 o de cobre normal y Tipo-3 o centro acoplado binuclear de cobre. Los cuatro átomos de cobre difieren en sus características de señales de resonancia paramagnética electrónica. El Tipo-1 muestra coordinación con dos histidinas, una cisteína y una metionina como ligaduras y tiene una intensa absorción de banda electrónica cerca de 600 nm ($\epsilon = 5000\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), la cual es responsable de su intenso color azul. El Tipo-2 tiene dos histidinas y agua como ligantes. El Tipo-3 está coordinado con tres histidinas y un puente de hidroxilo, el cual mantiene el fuerte acoplamiento anti-ferromagnético entre el Tipo-3. El Tipo-2 no muestra absorción en el espectro visible y está posicionado muy cerca al Tipo-3, el cual tiene una absorción de 330 nm. Dependiendo de la estructura y propiedades de los centros de cobre, las lacasas se dividen en bajo y alto potencial redox. Las lacasas de los Basidiomycetes (de podredumbre blanca) son de alto potencial redox, mientras que las lacasas de las bacterias y de las plantas son de bajo potencial redox (Dwivedi *et al.*, 2011; Kudanga *et al.*, 2011) (**Figura 2**).

Las lacasas tienen la capacidad para oxidar diversos compuestos aromáticos, tales como fenoles sustituidos, diaminas, aminas y tioles aromáticos. Los substratos orgánicos de

las lacasas se pueden dividir en tres grupos: *orto*- (por ejemplo guayacol, *o*-fenilendiamina, pirocatecol, dihidroxifenilalanina, pirogalol, ácido cafeico, ácido gálico y ácido protocatéquico), *meta*- (*m*-fenilendiamina, orcinol, resorcinol y floroglucina) y *para*- (*p*-fenilendiamina, *p*-cresol e hidroquinona). Los compuestos *orto*- sustituidos son los mejores sustratos para la mayoría de las lacasas. La siringaldazina (azina 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído) es referida como un sustrato específico para las lacasas. Además, en presencia de mediadores, la especificidad del sustrato de las lacasas puede ser ampliado y conducir a la oxidación de sustratos más complejos (Dwivedi *et al.*, 2011).

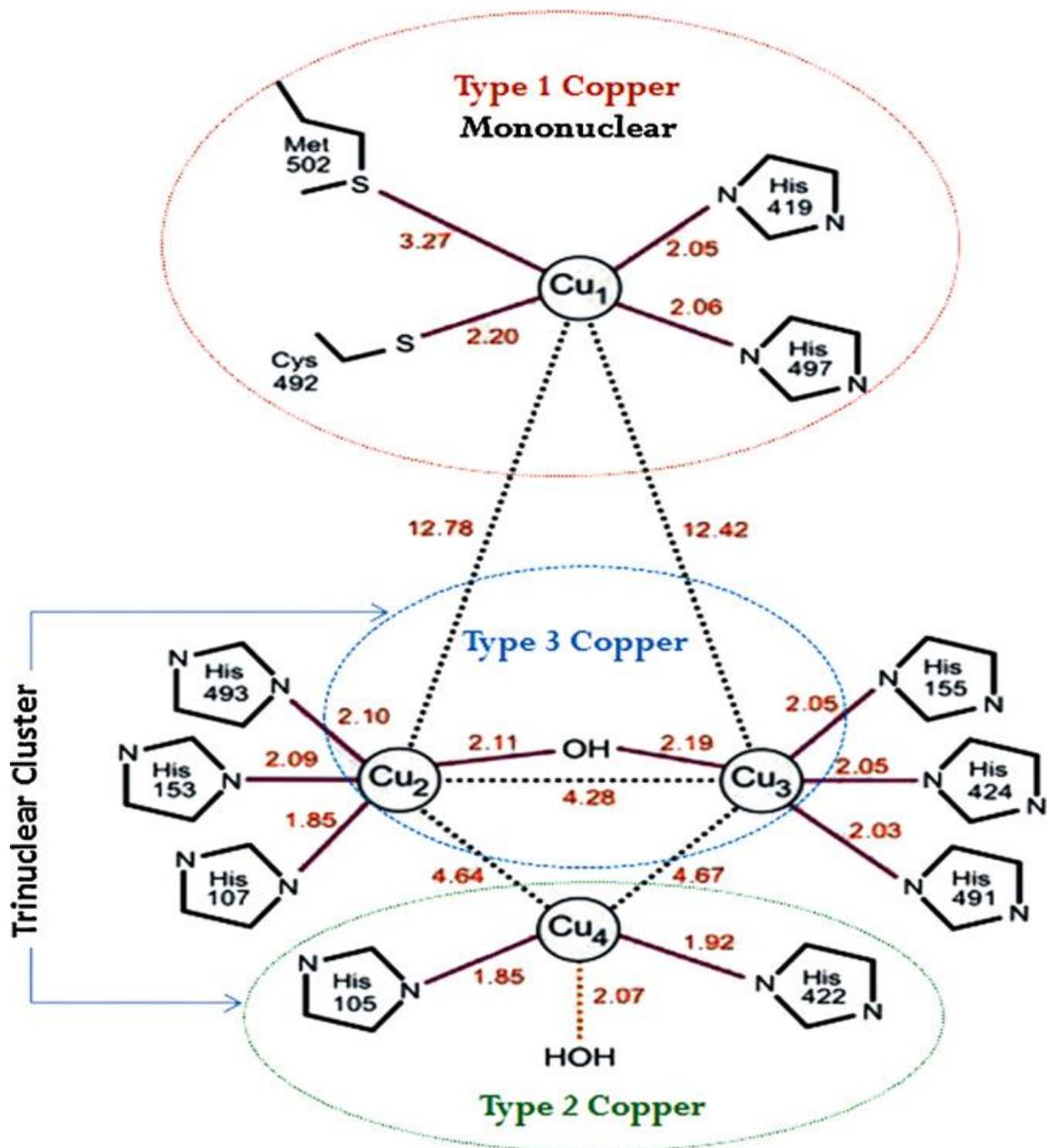


Figura 2. Representación esquemática de una molécula de lacasa mostrando los tipos de cobre y la coordinación de los centros de cobre, incluyendo las distancias interatómicas entre las uniones relevantes. Fuente: Dwivedi *et al.* (2011).

La producción de lacasas en los hongos, es sensible a la concentración de Nitrógeno. Generalmente, altas concentraciones de Nitrógeno son requeridas para obtener grandes cantidades de lacasas. *Lentinula edodes* y *Rigidoporus lignonus* se desarrollaron en un medio con alta concentración de Nitrógeno (24-26 mM) y produjeron altas cantidades de lacasas. Sin embargo, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Phlebia radiata* en un medio limitado de Nitrógeno produjeron elevadas cantidades de lacasas (Dwivedi *et al.*, 2011).

2.14. Inductores o mediadores de lacasas

La enzima lacasa ocupa un importante lugar en el proceso de la lignilolisis (Arora y Gill, 2001). La producción de lacasas y peroxidasas depende de la especie del hongo, las condiciones del cultivo, las fuentes y concentración de Carbono y Nitrógeno, composición del medio de cultivo, pH, temperatura (Wong, 2009).

Las lacasas extracelulares son producidas en pequeñas cantidades; sin embargo, su producción puede incrementarse considerablemente al adicionar al medio de cultivo compuestos fenólicos o aromáticos relacionados con derivados de la lignina, tales como el ácido ferúlico, 2,5 xilidina, *p*-anisidina o alcohol veratril (De Souza *et al.*, 2004; Karp *et al.*, 2012). Otros compuestos no fenólicos son los mediadores: 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxifalimida (HPI), ácido violúrico (VLA) o N-hidroxiacetanilida (NHA). Por otra parte, los iones metálicos, tales como el Mn^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} pueden actuar como mediadores para la producción de lacasas.

Para incrementar la producción de lacasas, se ha realizado el cultivo en fermentación sumergida o fermentación sólida de substratos, con la utilización de diferentes compuestos, así como de varios residuos agrícolas o de alimentos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Diversos compuestos o sustancias químicas, utilizados como inductores para incrementar la producción de lacasas en los hongos.

Compuestos o sustancias	Inductores	Referencias
Compuestos aromáticos (Derivados fenólicos)	Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, guayacol, siringol (2,6-dimetoxifenol), <i>p</i> -etoxifenol, pirocatecol, floroglucinol, 3,5-dihidroxibenzoico, siringaldazina, 2,5-xilidina, alcohol veratril	(Terrón <i>et al.</i> , 2004; De Souza <i>et al.</i> , 2004; Karp <i>et al.</i> , 2012)
Compuestos no fenólicos (mediadores)	1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxiftalimida (HPI), ácido violúrico (VLA) o N-hidroxiacetanilida (NHA)	(Cañas y Camarero, 2010)
Compuestos “naturales” en plantas herbáceas	Siringaldehído, vainillina, acetosiringona, acetovanillone, vainillato de metilo y ácido <i>p</i> -cumárico	(Cañas y Camarero, 2010)
Substancias químicas	Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ (con otros compuestos aromáticos)	(Lu y Ding, 2010; Tlecuil-Beristain <i>et al.</i> , 2008; Rivera-Hoyos <i>et al.</i> , 2013; Lebrun <i>et al.</i> , 2011)
Aminoácidos y vitaminas	DL-metionina, DL-triptofan, glicina y DL-valina. Biotina, riboflavina y piridoxina hidroclicorada. Ácido glutámico, tiamina y otras fuentes de N	(Dhawan y Kuhad, 2002; Levin <i>et al.</i> , 2010)
Frutos	Semilla y cáscara de cacahuete	(Couto y Sanromán, 2006)
Residuos de alimentos	Bagazo de naranja, cáscara de piña, residuos del fruto amarillo de la pasión, bagazo de caña de azúcar, residuos de los granos de olivo	(Bazanella <i>et al.</i> , 2013; Zilly <i>et al.</i> , 2012; Membrillo <i>et al.</i> , 2011; Ruíz-Rodríguez <i>et al.</i> , 2011; Karp <i>et al.</i> , 2012)
Antibióticos	Cloramfenicol, ampicilina trihidratada, kanamicina A monosulfato, sulfato de neomicina, eritromicina, tiostrepton, tetraciclina, sulfato de apramicina y sulfato de estreptomina	(Dhawan <i>et al.</i> , 2005)
Residuos de grano (licor)	Utilizado como fuente de Nitrógeno y como inductor	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
Tallos de algodón	Extractos en etanol, obtenidos del tallo de algodón	(Ardon <i>et al.</i> , 1996)

2.15. Características y propiedades de extractos vegetales

Las plantas a través de la fotosíntesis, elaboran carbohidratos, grasas y proteínas, los que son llamados metabolitos primarios. Pero además, producen otros compuestos a los que se les denomina metabolitos secundarios, muchos de los cuales, el hombre los utiliza para diversos propósitos. Los metabolitos secundarios son conocidos como constituyentes químicos, y los metabolitos responsables de efectos terapéuticos se conocen como constituyentes activos. Otros constituyentes son los llamados inertes, como son la celulosa, lignina y suberina, además del almidón, la albúmina y materias colorantes. La presencia de las sustancias inertes puede modificar o eliminar la absorción o la potencialidad de los constituyentes activos. Para anular estos efectos en drogas crudas o en preparaciones galénicas, los principios activos para uso terapéutico se extraen, purifican y cristalizan.

Los constituyentes farmacológicamente activos son aquellos a los que se les atribuye la actividad terapéutica de la droga; pueden ser una sustancia aislada o una mezcla de principios. En este último caso, la separación de ellos no se considera ni práctica ni ventajosa. Los constituyentes aislados pueden ser alcaloides, glicósidos, enzimas, hormonas, vitaminas, etc. Las mezclas incluyen aceites fijos, grasas, ceras, aceites volátiles, resinas, oleorresinas, gomorresinas, bálsamos, etc. Estas mezclas no sólo tienen uso terapéutico; también son importantes porque se usan en la industria farmacéutica, de cosméticos, en perfumería y como lubricantes.

Las drogas que se obtienen de fuentes naturales provienen de una serie de individuos que viven bajo diferentes condiciones, por lo que, presentan variaciones en su contenido; por lo tanto, las drogas se deben obtener controlando las condiciones de producción, con lo que se tiene cierta homogeneidad (Valencia, 1995). A menos que se conozcan las partes en que se encuentren los compuestos de interés, es recomendable recolectar la planta entera, para garantizar que los extractos sean representativos de todos los metabolitos producidos por la planta. Los metabolitos secundarios específicos varían en cantidad y calidad entre especies, dentro de una misma especie y entre los miembros de una población (Jones y Kinghorn, 2012).

Las drogas crudas vegetales son productos naturales que únicamente han pasado por los procesos de recolección y secado. El término productos naturales se refiere a aquellos productos que se encuentran en la naturaleza, y comprende tanto a plantas superiores como inferiores, sus extractos y otros constituyentes que no han tenido cambios en su estructura molecular.

Las formas en que las drogas vegetales generalmente se presentan son: en planta fresca, como yerba para preparar remedios. La industria alimenticia emplea plantas frescas, cuando se usan como saborizantes; la industria de cosméticos utiliza flores frescas porque tienen mayor cantidad de aceites esenciales. En planta seca, se usa en los casos en que la dosis no es crítica. El método de secado que se use dependerá de la naturaleza de la planta y de sus constituyentes activos. En preparación galénica, que son los extractos obtenidos de las plantas que se usan directamente en terapéutica. Estas preparaciones son económicas y se usan para preparar aditivos, saborizantes y para propósitos culinarios. Las preparaciones galénicas son la primera etapa en el aislamiento de los principios activos y se obtienen por las siguientes técnicas (Valencia, 1995; Jones y Kinghorn, 2012):

- a) *Infusión*: consiste en dejar la droga en contacto con agua fría o caliente poco tiempo (el café es una infusión en caliente).
- b) *Decocción*: cuando la droga se hierve en agua.
- c) *Maceración*: es una infusión prolongada, a menudo en alcohol acuoso.
- d) *Percolación*: es una maceración seguida por la adición de disolvente fresco para reemplazar el disolvente que se ha dejado pasar a través de la droga en polvo.
- e) *Extracción continua*: es una infusión repetida con disolvente caliente. El aparato que se usa en el laboratorio es el extractor Soxhlet.

La desventaja de este último método es que el material extraído está sujeto a un calentamiento continuo, por lo que no debe usarse cuando los compuestos son termolábiles. Una forma de evitar la descomposición es mediante disolventes de muy bajo punto de ebullición. El éxito del proceso de extracción depende de la elección del disolvente. Se puede emplear un disolvente que disuelva únicamente al material activo o bien, uno que elimine el material inactivo y deje a los compuestos activos en la planta.

Las drogas vegetales que contienen grandes cantidades de grasa, primero se extraen con un disolvente no polar como éter de petróleo o hexano, y la planta así desengrasada queda lista para ser extraída con el disolvente que disolverá al principio activo. El factor más importante que influye en la solubilidad del material ya sea activo o no activo, es la polaridad del disolvente y de las moléculas del soluto. Para que se efectúe una solubilización rápida, las moléculas del disolvente deben tener una fuerte atracción por las moléculas de soluto.

Los disolventes no polares como el éter de petróleo y el benceno, disuelven compuestos no polares como las grasas y ceras; mientras que los disolventes polares como el metanol y el agua, disuelven compuestos polares como las sales de los alcaloides y los azúcares. En los procesos de extracción, se tiene en cuenta la polaridad de los disolventes; así, se tienen algunos ejemplos en donde la polaridad va en aumento:

(-) polar \longrightarrow (+) polar

\longrightarrow Ciclohexano, tetracloruro de carbono, benceno, éter, cloroformo, acetona, acetato de etilo, etanol, metanol, agua, ácidos y bases.

2.16. Algunas aplicaciones de extractos vegetales

En la **Tabla 7**, se presentan algunos de los solventes utilizados en la extracción de los principios activos y varias aplicaciones de los extractos vegetales.

Tabla 7. Solventes utilizados en la extracción de los principios activos de algunas plantas y su aplicación.

Solvente utilizado	Extracción en plantas	Aplicación	Referencias
Metanol, etanol y acetona	Antioxidantes en guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	Contra varias enfermedades humanas	(Hamid <i>et al.</i> , 2011)
Hexano, metanol	Antioxidantes y bactericida. <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	Contra varias enfermedades humanas	(Lagouri <i>et al.</i> , 2011)
Éter de petróleo, tolueno, acetato de etilo, acetona y agua	Antioxidantes en granada (<i>Punica granatum</i> L.)	Contra varias enfermedades humanas degenerativas	(Kaneira <i>et al.</i> , 2012)
Metanol	26 especies de plantas. Antioxidantes y compuestos fenólicos	Contra varias enfermedades humanas	(Guleria <i>et al.</i> , 2013)
Acetona	Bactericida. (Fabaceae: <i>Crotalaria capensis</i> , <i>Indigofera cylindrica</i> , <i>Dalbergia nitidula</i>)	Contra bacterias Gram (+) y Gram (-) en animales	(Dzoyem <i>et al.</i> , 2014)
Macerado en etanol	Antioxidante y bactericida. Planta comestible <i>Trollius chinensis</i> Bunge	Contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2014)
Etanol (extractos crudos)	20 especies de plantas de Yucatán	Fungicida contra: <i>Alternaria tagetica</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizopus sp.</i>	(Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2008)
Infusión en agua caliente	20 plantas. Diferentes partes usadas	Fungicida contra: <i>Coriolus versicolor</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2012)
Metanol (extractos crudos)	Hojas de <i>Bauhinia purpurea</i> , <i>Caesalpinia gilliesii</i> , <i>Cassia fistula</i> , <i>Cassia senna</i> , <i>Chrysanthemum frutescens</i> , <i>Euonymus japonicus</i> , <i>Thespesia populnea</i> var. <i>Acutiloba</i>	Fungicida contra: <i>Sclerotium rolfsii</i>	(Soliman <i>et al.</i> , 2012)
Alcohol metílico, acetato de etilo, cloroformo y hexano	Hojas de <i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Fungicida contra: <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Colletotrichum capsici</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	(Bajpai y Kang, 2010)
Butanol, hexano, cloroformo y agua	Plantas: <i>Sophora flavescens</i> , <i>Tulipa edulis</i> , <i>Herba ephedra</i> y <i>Pachyma hoelen</i>	Contra virus (HIV-1) del sida	(Lee <i>et al.</i> , 2010)

2.17. Características de la cebolla (*Allium cepa*)

La cebolla (*Allium cepa* L.) ha sido valorada como un alimento que tiene propiedades medicinales desde la antigüedad. Es ampliamente cultivada y ocupa el segundo lugar después del jitomate entre las verduras. La cebolla ha sido domesticada por más de 4000 años, como lo demuestran los registros del antiguo Imperio Egipcio (2700 aC) y en Sumeria (3000 aC). Incluso registros anteriores aparecen en la India aproximadamente 4000 aC. *Allium cepa* es un miembro de la Sección *Cepa* (Mill). Prokh., del género *Allium*, que incluye especies silvestres y cultivadas muy importantes para el origen y la mejora de especies de *Allium*. *A. cepa* no existe de manera silvestre; la especie silvestre *Allium vavilovii* se reconoce como una especie muy cercana. La distribución de *A. vavilovii* y especies afines en Turkmenistán/Irán sugiere que la domesticación de una especie silvestre ocurrió durante el surgimiento de las civilizaciones antiguas en esta área (McCallum, 2007).

La palabra “onion” (cebolla) se deriva del latín y en el idioma inglés significa “perla grande”. La cebolla se comparó con una perla no solo por su forma, sino también por su gran valor nutrimental. Hoy en día se pueden encontrar cebollas con diferentes colores, sabores y formas del bulbo. La cebolla es un ingrediente importante en todo tipo de platillos en el mundo. Se puede consumir de manera cruda, especialmente aquellas cebollas dulces y suaves. Las cebollas se procesan en aceite o en polvo y dan sabor a una gran variedad de productos. Se cultivan en todo el mundo, en el año 2006, se produjeron alrededor de 50 millones de toneladas métricas. China es el país productor más importante con 46% de la producción mundial, seguido por la India, EE.UU, Turquía, Irán, Pakistán y Japón. Para México se registró una producción de $1,131 \times 10^3$ toneladas métricas en una superficie de cultivo de 44×10^3 hectáreas (Shigyo y Kik, 2008).

El género *Allium* consta de alrededor de 750 especies que se distribuyen casi en su totalidad en el hemisferio norte. La mayoría de las especies de *Allium* se pueden encontrar en Eurasia y una pequeña parte en América. El género se divide en 4 u 11 subgéneros dependiendo del autor. Las especies de *Allium* crecen preferentemente en sitios abiertos, secos y soleados, en climas áridos húmedos. La mayoría de las especies se encuentran en la cuenca del Mediterráneo en el oeste, hacia Asia central en el este.

La cebolla es una planta bianual con fertilización cruzada de especies diploides ($2n = 2x = 16$) en donde una fuerte depresión por endogamia está presente. El bulbo de la cebolla está formado por hojas carnosas, a corta distancia por encima del tallo. Las hojas externas son delgadas, fibrosas y secas, de varios colores y forman la capa protectora del bulbo. Los bulbos son de forma ovoide, de hasta 15 cm en diámetro. Las plantas se reproducen a partir de las semillas. Actualmente, las cebollas se cultivan en todo el mundo en latitudes entre 5° y 60° en ambos hemisferios (Shigyo y Kik, 2008).

Las variedades de la cebolla se distinguen por las características que presenta el bulbo que incluyen la forma, tamaño y color de la piel. La forma del bulbo puede ser achatado, ovado, obovado, oval o como torpedo. El color de la piel puede ser blanco, amarillo, marrón, rojo y compuestos intermedios entre estos colores (Shigyo y Kik, 2008).

La composición de flavonoides en las escamas secas o carnosas proporciona una distintiva variación en apariencia y una atracción alimenticia significativa de esos pigmentos antioxidantes. El color rojo es un rasgo valioso y se asocia erróneamente con un sabor más suave por muchos consumidores, aunque no existe correlación en esto. Los principales pigmentos presentes en todas las cebollas de colores son la quercitina mono, di y triglucósidos. Los conjugados y los productos de oxidación de éstos contribuyen al color de la escama seca. Además, las cebollas rojas también contienen antocianinas, predominantemente cianidina 3-glucósidos y malonilglucósidos (McCallum, 2007).

2.17.1. Clasificación

La cebolla se ha clasificado de diferentes maneras. A continuación se presentan tres clasificaciones, en donde se observa la diferencia en las categorías de clasificación:

Suleria et al. (2015):

Reino: Plantae

Clado: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae
Género: *Allium*
Especie. *Allium cepa* L.

Breu (1996):

Sección: Spermatophyta
Subsección: Angiospermae
Clase: Monocotyledoneae (= Liliariae)
Subclase: Liliidae
Orden: Liliales (= Liliiflorae)
Familia: Alliaceae
Subfamilia: Allioideae
Tribu: Allieae
Subtribu: Alliinae
Género: *Allium*

Los sinónimos de *Allium cepa* L. son: *Allium esculentum* Salisb., o *Allium Porrum Cepa* Rchb.

Butt et al. (2009):

Reino: Plantae – Plantas
Sub-Reino: Tracheobionta – Plantas Vasculares
Súper División: Spermatophyta – Plantas con semillas
División: Magnoliophyta – Plantas con flores
Clase: Liliopsida – Monocotiledóneas
Sub-Clase: Liliidae
Orden: Liliales
Familia Liliaceae
Género: *Allium*
Especie: *Allium cepa* L.

Diferentes autores colocan a *Allium cepa* en la Familia Alinaceae (Rodríguez et al., 2009); Familia Liliaceae (Tsiaganis et al., 2006; Beesk et al., 2010); Familia Alliaceae (Zovko y Jug, 2011; Hariram y Park, 2013).

2.17.2. Composición química

La cebolla contiene aproximadamente 90% de agua con alto contenido de fibra y azúcar. Tiene bajo contenido de sodio y alto contenido de vitamina B 6, ácido fólico, calcio, magnesio y fósforo. En cuanto al contenido de aminoácidos, el ácido glutámico y la arginina presentan cantidades extraordinarias (**Tablas 8 y 9**).

Por otra parte, la cebolla tiene metabolitos como la glucosa, fructuosa, aminoácidos, ácido pirúvico, ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico (Soininen *et al.*, 2014). Contiene compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido ferúlico y ácido protocatéquico, quercetina y kaempferol (Prakash *et al.*, 2007). Sin embargo, hay diferencias en la composición de los metabolitos, dependiendo de los cultivares y de las regiones del cultivo (Kimura *et al.*, 2014).

La cebolla es la fuente más rica en flavonoides en la dieta y contribuye en gran medida en la ingesta total de estos compuestos. Dos grupos de flavonoides se encuentran en la cebolla: las antocianinas, que le confieren un color entre rojo y púrpura a algunas variedades, y los flavonoles como la quercitina y sus derivados, responsables de los colores en las hojas escamosas amarillas y marrones. Los flavonoles son los pigmentos predominantes en la cebolla. La quercitina 3,4-diglucósida (QDG) y la quercitina 4'-glucósida (QMG) son registradas como los principales flavonoles. Estos glucósidos representan aproximadamente 90% de los contenidos globales en las diferentes especies de *Allium*. Existen diferencias significativas en los niveles y proporciones de estos dos compuestos; en las variedades de color rojo, hay 191 mg/100 g de peso seco de QGD y 85 mg/100 en peso seco de QMG; en las de color marrón hay 153 mg/100 g de peso seco de QDG y 58 mg/100 g de peso seco de QMG y para las de color blanco, hay < 1 mg/100 g en peso seco de QGD y < 1 mg/100 g en peso seco de QMG (Suleria *et al.*, 2015).

2.17.3. Propiedades medicinales

La cebolla es una planta rica de varios fitonutrientes, pero además, se utiliza en el tratamiento y prevención de un gran número de enfermedades, que incluyen cáncer, enfermedad cardíaca coronaria, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, hipertensión, cataratas y trastornos del tracto gastrointestinal (por ejemplo: cólico, cólico flatulento y dispepsia). Estas actividades están relacionadas con los tiosulfatos, compuestos de azufre volátiles, que también son responsables de lo acre de la cebolla, son de bajo peso molecular, muy polares, de origen fenólico y estereoidal, a menudo glicosilados, con interesantes propiedades farmacológicas. Por otra parte, los compuestos no volátiles de la cebolla como son las sapogeninas y saponinas, han demostrado actividad antifúngica, antitumoral, citotoxicidad, coagulación de la sangre, antiespasmódica y efecto reductor del colesterol. Se han aislado del bulbo de cebolla roja var. Tropea cuatro nuevas saponinas antiespasmódicas. Por otra parte, los flavonoides que incluyen la quercitina y taxifolina poseen actividad antiulcerosa, antiespasmódica y antidiarreica (Lanzotti, 2006).

Las especies de *Allium* tienen compuestos que son inhibidores contra microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos (Kyung, 2012; Ye *et al.*, 2013). Las saponinas mostraron actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* y *Trichoderma atroviride*. Sin embargo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Sclerotium cepivorum* y *Rhizoctonia solani* fueron muy poco afectados por las saponinas (Lanzotti *et al.*, 2012). En la **Tabla 10**, se presentan diversas propiedades de la cebolla.

Tabla 8. Análisis proximal, vitaminas y minerales en 100 g de cebolla cruda (*Allium cepa*).

Promedio proximal (g)		Promedio de vitaminas (mg)		Promedio de minerales (mg)	
Agua	89.11	Vitamina C	7.4	Calcio	23
Proteínas	1.1	Tiamina	0.046	Hierro	0.21
Lípidos totales	0.1	Riboflavina	0.027	Magnesio	10
Cenizas	0.35	Niacina	0.116	Fósforo	29
Carbohidratos	0.34	Ácido pantoténico	0.123	Potasio	146
Fibra	1.7	Vitamina B 6	0.12	Sodio	4
Azúcar total	4.24	Folato	19 mcg	Zinc	0.17
Sacarosa	0.99	Colina	6.1	Cobre	0.039
Dextrosa	1.97	Betaína	0.1	Manganeso	0.129
Fructosa	1.29	Caroteno	1 µg	Selenio	0.5 µg
Energía	40 Kcal	Vitamina A	2 IU	---	---
---	---	Lutina+zeaxantina	4 µg	---	---
---	---	Vitamina E	0.02	---	---
---	---	Vitamina K	0.4 µg	---	---

Fuente: Suleria *et al.* (2015).

Tabla 9. Lípidos y aminoácidos presentes en 100 g frescos de cebolla (*Allium cepa*).

Promedio de lípidos (g)		Promedio de aminoácidos (g)	
Ácido mirístico	0.004	Triptofano	0.014
Ácido palmítico	0.034	Treonina	0.021
Ácido esteárico	0.004	Isoleucina	0.014
Total ácidos saturados	0.042	Leucina	0.025
Ácido oleico	0.013	Lisina	0.039
Ácido linoleico	0.013	Metionina	0.002
Ácido linoléico	0.004	Cistina	0.004
Total ácidos monoinsaturados	0.013	Fenilalanina	0.025
Total ácidos poliinsaturados	0.017	Tirosina	0.014
Fitoesteroles	15 mg	Valina	0.021
---	---	Arginina	0.104
---	---	Histidina	0.014
---	---	Alanina	0.021
---	---	Ácido aspártico	0.091
---	---	Ácido glutámico	0.258
---	---	Glicina	0.025
---	---	Prolina	0.012
---	---	Serina	0.021

Fuente Suleria *et al.* (2015).

Tabla 10. Diversas actividades de algunos compuestos de la cebolla (*Allium cepa*) en varias enfermedades del hombre, así como alguna actividad antagónica para otros organismos.

Actividad	Compuesto/efecto	Referencia
Antifúngico	Saponinas: ceposida A, ceposida B y ceposida C. Contra: <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Trichoderma atroviride</i>	(Lanzotti <i>et al.</i> , 2012)
Antifúngico	Extracto del aceite esencial de cebolla roja, verde y amarilla contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	(Benkeblia, 2004)
Antifúngico	Extracto acuoso contra dermatofitos: <i>Malassezia furfur</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> sp.	(Masoomah <i>et al.</i> , 2006)
Antibacteriano	Extracto del aceite esencial de cebolla roja, verde y amarilla contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmomella</i> Enteritidis	(Benkeblia, 2004)
Antibacteriano y antifúngico	Aceite esencial contra microorganismos patógenos de alimentos: <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. terreus</i> y <i>Monascus purpureus</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2013)
Antihelmíntico y nematicida	Extractos de <i>Allium cepa</i> y <i>Cocos nucifera</i> (endospermo) contra helmintos y nematodos de los géneros: <i>Toxocara</i> , <i>Nematodirus</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Haemonchus</i> , <i>Trichuris</i> y <i>Moniezia</i> , parasitando ovejas	(Mehlhorn <i>et al.</i> , 2011)
Antidiabético	Extractos crudos o por usos de pobladores	(Grover <i>et al.</i> , 2002; Thirumalai <i>et al.</i> , 2012; Akash <i>et al.</i> , 2014)
Antioxidante (Fenoles)	Extractos en etanol, agua caliente y agua subcrítica	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
Antioxidante (Fenoles)	Extractos en cebolla roja con tolueno, diclorometano y etanol	(Singh <i>et al.</i> , 2009)
Citotóxico y antiinflamatorio	Extractos en etanol. Actividad citotóxica en células de carcinoma en humanos	(Kim <i>et al.</i> , 2013)

2.18. Características de la sábila (*Aloe vera*)

La sábila [*Aloe vera* (L.) Burm. F.] (*Aloe barbadensis* Mill.) al igual que las otras especies del género *Aloe*, son perennes, de hojas suculentas. Las plantas son xerófitas ya que están adaptadas para vivir en áreas de baja precipitación; por lo cual, las hojas son gruesas y carnosas para almacenar agua. La cutícula de la hoja es gruesa, está cubierta con una capa cerosa. La mayoría de las especies tienen grupos de células asociadas con los haces vasculares, llamadas células de aloína o aloíticas, que almacenan y quizás secretan compuestos con valor medicinal. La composición de estas secreciones varía entre las especies. La sustancia es un exudado generalmente de color amarillo, que se presenta cuando la hoja se corta o se rompe.

El origen exacto de *Aloe vera* es incierto, pero es probable que sea originaria de la Península Arábiga, en donde hay una estrecha relación y probablemente sea la misma especie con *Aloe officinalis* Forssk. La mayoría de las especies de *Aloe* se encuentran de manera natural en el continente africano en zonas tropicales y latitudes subtropicales. El género se encuentra en casi todo el continente africano al sur del desierto Sahara. La mayoría de las especies se encuentran en el sur de África. Otras especies se encuentran en la Península Arábiga y en Madagascar y unas pocas especies más se encuentran en pequeñas islas del Océano Índico (Sung, 2006; Chinchilla *et al.*, 2013).

A. vera se extendió de África a América después de las expediciones de Cristóbal Colón y Américo Vesputio, debido al comercio marítimo con el Caribe. El clima cálido y húmedo de América Central favoreció en gran medida la dispersión de la planta en las Islas del Caribe. El nombre *Aloe barbadensis*, surge precisamente de la Isla Barbados que es un sinónimo para *Aloe vera*.

La sábila fue considerada como un dios por su misteriosa elegancia y por sus propiedades terapéuticas legendarias. En el antiguo Egipto, fue la planta cuya “sangre” ofreció la belleza, salud y la vida eterna. La sábila fue parte del ritual del embalsamamiento y acompañaba al faraón en su viaje al otro mundo. Para los emperadores míticos de China, las espinas de la sábila personificaron las uñas de la divinidad. Para los indígenas del nuevo mundo fue una de las 16 plantas veneradas como

dioses. En África los nómadas que pastorean a los camellos la llamaron el “lirio del desierto”; los estadounidenses la llamaron el “curandero silencioso” o “Dr.Aloe” y los rusos la llamaron “el elixir de la vida”.

El nombre *Aloe vera* se deriva del Árabe *alloe* que significa “substancia amarga brillante”, y *vera* se deriva del latín que significa “verdad”. El primer testimonio de la planta de aloe se encontró en Egipto alrededor de 3000 aC que consiste en las representaciones pictóricas que adornan las tumbas y monumentos funerarios. El documento epigráfico más antiguo relativo al uso medicinal aparece en tabletas de arcilla en Sumeria, escrito 2100 años aC que describe las propiedades laxantes de la planta. El papiro de Ebers, que data de 1550 aC, se considera el primer compendio médico por contener fórmulas para la fabricación de elixires con jugo de aloe.

La planta de sábila tiene hojas largas y carnosas, con espinas en ambos bordes. La hoja consta de dos partes, una corteza verde exterior y una pulpa clara en el interior, la cual es mucilaginosa. Esta es la parte que más ha sido utilizada con fines terapéuticos. Esta pulpa se conoce con varios términos: gel interior, gel mucilaginoso, jalea mucilaginosa y parénquima de la hoja. Una gama de actividades biológicas se han atribuido a la sábila entre otras como antivirales, antibacteriales, laxante, protección contra la radiación, antiinflamatorio e inmunoestimulación, particularmente debido a sus polisacáridos (Chinchinilla *et al.*, 2013).

2.18.1. Clasificación

Una clasificación de la planta de la sábila es la siguiente:

Vega *et al.* (2005):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Liliales

Familia: Liliaceae

Género: *Aloe*

Especie: *Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* Miller).

El género *Aloe* se ha incluido también en la Familia Asfodelaceae; sin embargo por sus características individuales, se ha colocado en la Familia Aloaceae (Chinchinilla *et al.*, 2013).

2.18.2. Composición química

Cuando se cortan las hojas de la sábila aparece el exudado más o menos abundante, de color amarillo, que se oscurece rápidamente a marrón o a rojo oscuro. El exudado contiene compuestos fenólicos, los cuales se derivan de la cromona, antroquinona o antrona. Estos compuestos fenólicos no se producen en las células del parénquima dentro de la hoja, en donde los polisacáridos y glicoproteínas son característicos. El exudado tiene un alto contenido de aloína (28% en base húmeda) que es un C-glucósido de aloe-emodin antrona, que tiene actividad como laxante (Chinchinilla *et al.*, 2013).

La composición del gel gelatinoso es de abundante agua (98%), con varios polisacáridos que incluyen el mannan, galactán, arabinán, arabinoramnogalactán, substancias pécticas y ácido glucorónico. Otros compuestos en el gel son el veraciglucán, que son carbohidratos acilados del ácido málico.

En la piel de las hojas se han identificado los siguientes compuestos fenólicos: ácido sináptico, quercitrina, kaempferol, apigenina, ácido gálico, ácido protocatéquico, catequina, ácido vanílico, epicatequina, ácido siríngico, ácido clorogénico, ácido gentístico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, miricetina y quercitina. Además, se ha encontrado el esteroide β -sistosterol, acompañado de pequeñas cantidades de colesterol, ampestrol y lupeol (Sung, 2006; Chinchinilla *et al.*, 2013).

Hay por lo menos 200 diferentes tipos de moléculas en la sábila. El contenido total de sólidos en el gel es de 0.66% y de sólidos solubles 0.56%, con cambios en las diferentes estaciones. En la materia seca del gel hay polisacáridos (55%), azúcares (17%), minerales (16%), proteínas (7%), lípidos (4%) y compuestos fenólicos (1%). El gel contiene las vitaminas A, C, E, B 1 (tiamina), niacina, vitamina B 2 (riboflavina), colina y ácido fólico (Ahlawat y Khatkar, 2011).

En un estudio, se analizó la composición química de ocho especies de Aloe (*A. arborescens* Mill., *A. aristata* Haw., *A. claviflora* Strydenburg, *A. ferox* Mill., *A. saponaria* Ait., *A. striata* Haw., y *A. vera* L.) en las hojas recién cosechadas en tres temporadas diferentes dentro del clima mediterráneo: invierno, primavera y verano. Los resultados revelaron que hubo diferencias en la composición química del gel de las especies de *Aloe* estudiadas en las diferentes temporadas de cosecha. En la temporada de verano, hubo aumento en el gel y sus propiedades cambiaron al haber un aumento de los lípidos, proteínas, aloína, fenoles totales, la actividad antioxidante total (fracciones hidrófilas y lipofílicas) y poliaminas (putrescina y espermidina); además de que se observaron diferencias en las características de las hojas (Zapata *et al.*, 2013).

En el **Tabla 11**, se presentan varios componentes de la pulpa y de los exudados en *A. vera*.

2.18.3. Propiedades medicinales

Se ha afirmado que los polisacáridos en el gel de *A. vera* tienen propiedades terapéuticas, como inmunoestimulación, efectos antiinflamatorios, en la cicatrización de heridas, reparación de daños causados por la radiación, actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antidiabéticas, antineoplásicos, estimulación de la hematopoyesis y efectos antioxidantes. En la **Tabla 12**, se presentan algunos ejemplos de lo mencionado.

2.19. Los extractos de cebolla y sábila en el cultivo de hongos

Se tiene un trabajo realizado por Reyes (2013), en donde se cultivó la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*, con la adición del extracto de cebolla en acetona, en concentración de 10 mg/mL, y se encontró un efecto inhibitor en la velocidad de crecimiento micelial de esta cepa con respecto a su testigo.

Además, se cultivó por separado la cepa CP-50 de *P. ostreatus* y la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* en el medio extracto de malta agar (EMA), con la adición del extracto de cebolla en concentración de 4 mg/mL. Se observó una estimulación en el desarrollo

micelial de la cepa CP-50, mientras que en la cepa CPM-113, se observó inhibición en el desarrollo micelial en las primeras 24 h, con un aumento considerable en la producción de esporas.

De igual manera, se cultivaron por separado las cepas CP- 50 y CPM-113 en EMA, con la adición del extracto de sábila en concentración de 4 mg/mL, obtenido por maceración en etanol. Se observó que el micelio de la cepa CP-50 se mantuvo por encima del testigo, mientras que en la cepa CPM-113, hubo un efecto inhibitorio en el desarrollo micelial durante toda la experimentación.

En un cultivo dual con las cepas CP-50 y CPM-113, se adicionó al medio EMA, la mezcla de extractos de cebolla y sábila en concentración 6 mg/mL de cada extracto. Hubo estimulación en el desarrollo micelial de la cepa CP-50, mientras que para la cepa CPM-113 hubo efecto inhibitorio en el desarrollo micelial.

En este estudio de Reyes (2013), no se evaluó la actividad de lacasas ni de proteínas.

Es por lo que, en este trabajo se estudia el efecto *in vitro* de los extractos de cebolla y sábila en el desarrollo micelial de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* con base en la información de que los extractos de cebolla y sábila han demostrado actividad antifúngica en otras especies de hongos.

Además, con la utilización de compuestos naturales como los extractos vegetales, no hay contaminación ambiental como sucede con algunos productos químicos (antifúngicos) que resultan nocivos al medio ambiente.

Tabla 11. Compuestos aislados de la pulpa y de los exudados de la sábila (*Aloe vera*).

Clase	Compuestos
Antroquinonas y antronas	Aloe-emodin, ácido aloético, antranol, aloin A y B (colectivamente conocidos como barbaloin), isobarbaloin, emodin, éster de ácido cinnamico
Carbohidratos	Mannan puro, mannan acetilado, glucomannan acetilado, glucogalactomannan, galactan, galactogalacturan, arabinogalactan, galactoglucoarabinomannan, sustancias pécticas, xilano, celulosa
Cromonas	8-C-glucosil-(2'-O-cinnamoil)-7-O-metilaloediol A, 8-C-glucosil-(S)-aloesol, 8-C-glucosil-7-O-metil-(S)-aloesol, 8-C-glucosil-7-Ometilaloediol, 8-C-glucosil-noreugenin, isoaloesin D, isorabaicromona, neoaloesin A
Enzimas	Fosfatasa alcalina, amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, ciclooxidasas, ciclooxigenasa, lipasa, oxidasa, fosfoenol, piruvato carboxilasa, superóxido dismutasa
Compuestos inorgánicos	Calcio, cloro, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, fósforo, sodio, zinc
Lípidos y compuestos orgánicos	Ácido araquidónico, ácido γ -linolenico, esteroides (campesterol, colesterol, β -sitosterol), triglicéridos, triterpenoides, giberilina, ligninas, sorbato de potasio, ácido salicílico, ácido úrico
Aminoácidos	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, Fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina
Proteínas	Lectinas, sustancias como lectinas
Sacáridos	Mannosa, glucosa, L-ramnosa, aldopentosa
Vitaminas	B1, B2, B6, C, β -caroteno, colina, ácido fólico, α -tocoferol

Fuentes: (Choi y Chung, 2003; Hamman, 2008; Ahlawat *et al.*, 2011).

Tabla 12. Algunas propiedades o actividades de los compuestos de la sábila (*Aloe vera*).

Actividad	Compuesto/efecto	Referencia
Antifúngica	Gel solo o con timol contra: <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i> en frutos de la nectarina	(Navarro <i>et al.</i> , 2011)
Antifúngica	Látex seco y extractos en metanol, hexano y acetato de etilo, contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Cladosporium cucumerinum</i> . Se identificó al aloin y aloe-emodin como el principio activo	(Nidiry <i>et al.</i> , 2011)
Antifúngica	Extractos etanólicos y acuosos contra: <i>Enterococcus bovis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Morganella morganii</i> , y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Pandey y Mishra, 2010)
Antimicrobiana	Extractos en acetona etanol y agua, contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> . Los compuestos activos: antraquinonas, dihidroxiantraquinonas y saponinas	(Nejatzadeh-Barandozi, 2013)
Antimicrobiana	Jugo de la sábila contra: <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Mycrococcus luteus</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Bacillus sphericus</i>	(Alemdar y Agaoglu, 2009)
Antimicrobiana	Extractos de la hoja en metanol y agua, contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Proteus sp.</i> y <i>Candida albicans</i>	(Mbanga <i>et al.</i> , 2010)
Acaricida	Extractos en acetona, acetato de etilo, etanol y agua, contra la araña roja carmín <i>Tetranychus cinnabarinus</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2011)
Antiviral	Extractos de la corteza de la hoja, contra el virus <i>Herpes simple</i> Tipo 1 (HSV-1) <i>in vitro</i>	(Rivero <i>et al.</i> , 2002)
Larvicida	Extracto en éter de petróleo y en etanol, contra las larvas de <i>Aedes aegypti</i>	(Subramaniam <i>et al.</i> , 2012; Arjunan <i>et al.</i> , 2012)
Leishmanicida	Extracto crudo de hojas contra promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania donovani</i> y <i>L.nia infantum</i>	(Dutta <i>et al.</i> , 2008; Rondon <i>et al.</i> , 2011)
Antidiabética	Efecto anti-hiperglicémico del gel en ratones. El principio activo en 5 fitosteroles.	(Tanaka <i>et al.</i> , 2006)
Anticáncer	Los compuestos aloe-emodin y antraquinon, contra células del carcinoma gástrico	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
Antioxidante (fenoles)	Extracción en agua-etanol	(Kim <i>et al.</i> , 2014)

2.20. El ácido salicílico (AS) y el ácido acetilsalicílico (AAS)

El ácido salicílico (AS) es un metabolito secundario producido por una amplia gama de organismos procariotas y eucariotas incluyendo a las plantas. Químicamente pertenece a un grupo de compuestos fenólicos (anillo aromático con grupo hidroxilo o su derivado funcional). Mucho antes de conocerse los procesos fisiológicos de las plantas, las propiedades farmacológicas de los salicilatos (nombre general del AS y sus derivados) habían sido apreciadas. Los salicilatos han sido conocidos por tener propiedades medicinales desde el siglo V aC, cuando Hipócrates prescribió la hoja y corteza del sauce (*Salix*) para el alivio del dolor durante el parto. Sin embargo, la utilización de plantas que contienen salicilato para curar dolores y fiebre, se remonta a los habitantes del Viejo y Nuevo Mundo (An y Mou, 2011).

En 1828, el científico alemán Johann A. Buchner purificó una pequeña cantidad de sustancia amarilla llamada salicina (un glucósido alcohol salicílico) a partir de la corteza del sauce. Más tarde, Raffaele Piria convirtió la salicina en un azúcar y un ácido que nombró ácido salicílico. Más fuentes naturales del AS y otros salicilatos fueron identificados; sin embargo, la demanda del AS como analgésico superó la capacidad de producción. En 1859, Hermann Kolbe y colaboradores sintetizaron químicamente el AS. Posteriormente, se mejoró el proceso de síntesis, por lo que, la producción se realizó a gran escala a un precio más barato. En 1897, Félix Hoffman redescubrió el derivado sintético del ácido acetilsalicílico (AAS), una sustancia química originalmente creada por Charles Frederic Gerhardt en 1853, la cual es una hidrólisis espontánea del AS, pero produce menos irritación gastrointestinal, con similares propiedades terapéuticas. En 1899, la compañía farmacéutica Bayer registró en el comercio al AAS como "Aspirina". Hoy, la aspirina se ha convertido en uno de los medicamentos más exitosos y ampliamente utilizados en todo el mundo (An y Mou, 2011).

La acción principal de los salicilatos en los mamíferos se atribuye a trastornos del metabolismo del ácido eicosanóico, que altera los niveles de prostaglandinas y leucotrienos. El AS también afecta la expresión génica mediante la alteración de la actividad de múltiples factores de transcripción y la inducción de la molécula de señalización del óxido nítrico. Otros estudios demostraron que el AS parece modular la

señalización a través del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción que juega un papel central en la inmunidad de los animales (An y Mou, 2011).

El AS es un compuesto fenólico que es sintetizado por las plantas. Estos compuestos en un principio se consideraron como metabolitos secundarios, relativamente sin importancia. Este concepto cambió con el descubrimiento de que los compuestos fenólicos están implicados en la biosíntesis de lignina, otros funcionan como compuestos alelopáticos y son sumamente importantes en regular las respuestas de las plantas a estímulos abióticos y juegan un papel crítico en la resistencia a enfermedades, ya sea como defensa contra bacterias (con compuestos llamados fitoalexinas) o por la señalización en la activación de la defensa. El AS tiene influencia en la germinación de las semillas, establecimiento de las plántulas, crecimiento celular, la respiración, el cierre de los estomas, la expresión génica asociada a la senescencia, respuestas al estrés abiótico, termotolerancia basal, nodulación en las leguminosas y producción de frutos. El AS funciona como una señal clave en la regulación de la termogénesis y en la resistencia a enfermedades (Vlot *et al.*, 2009).

El AS juega un papel importante en muchas interacciones planta-patógeno mediante la activación de respuestas de defensa y está típicamente involucrado en la defensa contra biotrofos. En respuesta a los hemibiotrofos, el AS tiene un temprano papel en la infección presentando una respuesta hipersensible, definida como la muerte localizada de las células que contienen y rodean al patógeno invasor (Brodersen *et al.*, 2005). El salicilato también participa en otras respuestas de defensa, tales como la resistencia sistémica adquirida (Derksen *et al.*, 2013).

2.20.1. Algunas aplicaciones del ácido salicílico

El AS se ha aplicado en plantas de diferentes cultivares para incrementar su producción, así como en la preservación de frutos para prolongar la vida en anaquel. De manera general, el AS ha mostrado respuestas positivas. En la **Tabla 13**, se presentan algunos resultados de la aplicación del AS en diferentes cultivares.

Tabla 13. Diversas aplicaciones del ácido salicílico en diferentes plantas de importancia económica.

Ácido Salicílico	Aplicación	Efecto	Referencia
100 mM	En hojas de haba (<i>Vicia faba</i> cv Giza 461) contra el virus del mosaico amarillo	Reducción de los síntomas, incremento del área y número de hojas y en la altura de la planta	(Radwan <i>et al.</i> , 2008)
500 μ M	En plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) expuestas a 25 μ M de Cadmio, que reduce el peso y muestra efectos tóxicos	Las semillas pretratadas con el AS, redujeron los efectos negativos del Cadmio	(Krantev <i>et al.</i> , 2008)
1, 2 y 5 mM	En plantas de cebolla, contra <i>Stemphylium vesicarium</i> , causante de la roya en la hoja	Reducción de los síntomas en 5 y 10 días después de la asperjación	(Abo-Elyousr <i>et al.</i> , 2009)
0.5 mM	En plantas de lenteja (<i>Lens esculenta</i> var. DPL-62), para reducir el estrés salino (100 mM de NaCl)	Incremento en longitud y en peso de las raíces y vástago, tanto en condiciones salinas y no salinas	(Misra y Saxena, 2009)
500 μ M	En plantas de Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L., cv. <i>Ran</i>) expuestas a 5 μ M de Cadmio, muestran los efectos tóxicos	Las semillas pretratadas con AS, restauraron en 33% los niveles de clorofila	(Popova <i>et al.</i> , 2009)
10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} M	Aspersión en esquejes de crisantemo [<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat) Kitamura]	Incremento del peso de materia fresca y seca de follaje y raíz, volumen de raíz y área foliar. Diámetro mayor en flores	(Villanueva-Couh <i>et al.</i> , 2009)
1, 0.01, 0.0001 μ M	Aspersión en plántulas de fresa (<i>Fragaria ananassa</i>) variedad Aromosa a 20 días de cultivo, con tratamiento hasta 40 días	Se incrementó la altura de la planta, número de hojas y flores. Con 0.0001 μ M se incrementó en 23% el número de frutos	(Anchondo-Aguilar <i>et al.</i> , 2011)
1 mM	En plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.), 3 días antes de aplicar el herbicida clethodim que causa estrés oxidativo en las hojas	Evita el amarillamiento de las hojas y elimina el estrés oxidativo	(Radwan, 2012)

2.20.2. Efecto del ácido salicílico en hongos fitopatógenos en el laboratorio

Se observó que el AS redujo la germinación de conidios en *Sphaerotheca fuliginea* (Conti *et al.*, 1996). Redujo y retardó la germinación de blastosporas en el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fimosoroseus* (Vega *et al.*, 1997) e inhibió la formación de esclerocios en *Sclerotium roffsii* y en *Sclerotinia minor* (Georgiou *et al.*, 2000).

El AS en medios de cultivo sólidos y líquidos inhibió el crecimiento micelial del hongo que ataca los viñedos, *Eutypa lata* (Pers. Fr.) Tul. En un pH de 5.5 y a una concentración de 1 mM de AS mostró propiedades fungistáticas con modificaciones estructurales en la pared, mitocondrias, vacuolas y núcleo del hongo. Un efecto fungicida se observó a partir de la concentración de 2 mM hasta 10 mM. La eficiencia antifúngica se incrementó cuando se experimentó a pH 4 (Amborabé *et al.*, 2002).

En ensayos contra *Fusarium oxisporum* en medio PDA con pH 5.5, a concentraciones de 200 a 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AS se inhibió totalmente el desarrollo micelial (Saikia *et al.*, 2003). En medio PDA a una concentración de 800 mg L^{-1} del AS, se inhibió totalmente el crecimiento del micelio y se redujo la germinación de las conidios; mientras que en concentraciones de 200 y 400 mg L^{-1} del AS, se estimuló el crecimiento micelial. El AS en la concentración de 100 mg L^{-1} en el medio PDB (líquido de papa y dextrosa), redujo el crecimiento micelial, de tal manera que el peso de la biomasa seca disminuyó en 52% en relación con el testigo (Wu *et al.*, 2008).

La aplicación del AS en concentración de 4 pmol ml^{-1} en el medio EMA demostró su eficiencia al reducir el crecimiento micelial de los hongos *Alternaria* y *Verticillum* en 13% y en el hongo *Sclerotinia* en 17% (Forchetti *et al.*, 2010).

En cultivo sólido y líquido contra *Fusarium graminearum* que ataca a la planta del trigo, se determinó que entre 800 μM a 1 mM de AS no hay germinación de conidios, mientras que de 3 a 20 mM de AS no hay crecimiento micelial (Qi *et al.*, 2012).

2.20.3. Efecto del ácido acetilsalicílico en los hongos

Se realizó el estudio en donde se evaluó la actividad antifúngica de tres quitosanos a diferentes concentraciones contra tres cepas de *Sclerotinia sclerotiorum* el agente causal de la podredumbre de la zanahoria almacenada, con pruebas *in vitro* e *in vivo*, además, se evaluó el potencial de la resistencia sistémica adquirida inducida por los quitosanos y el ácido acetilsalicílico (AAS). Se inhibió el crecimiento micelial y se redujo el número de esclerocios, por lo cual, se tiene más vida de anaquel de la zanahoria (Reza *et al.*, 2013).

No se tienen referencias de la aplicación del AAS en especies de *Pleurotus*, por lo tanto, en el presente trabajo se estudia por primera vez el efecto que puede tener el AAS como inductor en el desarrollo micelial y en la producción de las enzimas lacasas y proteínas en las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* cultivadas en medio PDA.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los hongos comestibles se han estudiado por tener grandes propiedades alimenticias y por producir enzimas capaces de degradar compuestos lignocelulósicos (Santoyo *et al.*, 2008; Elisashvili y Kachlishvili, 2009). Por ello, se ha incrementado el cultivo artificial al utilizar como sustrato diversos subproductos agrícolas y/o forestales (Isikhuemhen y Mikiashvili, 2009; Kulshreshtha *et al.*, 2013; Koutrotsios *et al.*, 2014).

En el cultivo de los hongos comestibles, se necesitan cepas que estén bien adaptadas a diversas condiciones ambientales y a diferentes sustratos; que sean resistentes a los ataques de plagas y enfermedades, que presenten fructificaciones precoces y que alcancen alto rendimiento en el menor tiempo posible. Sin embargo, existe el riesgo de contaminación por especies del moho verde (*Trichoderma* spp.) al haber una incorrecta manipulación en la producción de inóculos y en la etapa de incubación.

Particularmente, la producción de enzimas lignocelulíticas en *P. ostreatus*, depende de la cepa, composición del sustrato y las condiciones del cultivo (Stajić *et al.*, 2006). Es importante señalar que no todos los hongos producen la misma cantidad y tipo de enzimas (Elisashvili y Kachlishvili, 2009; De Souza *et al.*, 2004; Karp *et al.*, 2012).

En la propagación del micelio y en la preparación de inóculos, se han utilizado diversos medios de cultivo sintéticos, semisólidos o líquidos, en los que la velocidad de crecimiento micelial puede ser diferente dependiendo del medio de cultivo y de la marca comercial.

El sistema enzimático de las lacasas es el que más se ha estudiado, ya que éstas son capaces de catalizar la oxidación de diversos sustratos orgánicos. Para estimular la producción de las lacasas, se han adicionado a los medios de cultivo sintéticos, en los que se desarrolla el micelio, diversos compuestos que actúan como inductores, tales como sulfato de cobre, cicloheximida, amonio, ácido ferúlico, 2,5 xilidina, alcohol veratril, ácido violúrico, entre otros (De Souza *et al.*, 2004; Karp *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, en esta investigación se evaluó el efecto de productos naturales como son los extractos de cebolla y sábila en el desarrollo micelial de *T. aggressivum* (CPM-113) y de *P. ostreatus* (CP-50). También se realizó el cultivo de *P. ostreatus* (CP-50 y CP-753) en medio PDA, con la adición de extractos de cebolla y sábila o con la adición del ácido acetilsalicílico (AAS), para evaluar su efecto como inductores tendientes a incrementar la velocidad del crecimiento micelial y elevar la producción de las enzimas lacasas y proteínas, y con ello, generar la posibilidad de alcanzar mayores rendimientos en el cultivo de especies de *Pleurotus* a partir de una degradación más eficiente del sustrato.

4. HIPÓTESIS

- 4.1. Los extractos de cebolla y sábila tienen efecto sobre el desarrollo micelial de *T. aggressivum* en cultivo dual con *P. ostreatus*.
- 4.2. Una mezcla de extractos de cebolla y sábila, así como el ácido acetilsalicílico, son inductores que estimulan el desarrollo micelial de cepas de *P. ostreatus* e incrementan la producción de enzimas lacasas y de proteínas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los extractos de cebolla y de sábila sobre el desarrollo micelial del mohó verde *Trichoderma aggressivum* y del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*; además, evaluar una mezcla de extractos, así como del ácido acetilsalicílico, determinando su efecto inductor en el desarrollo del micelio, la producción de enzimas lacasas y proteínas en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y generando la posibilidad de una aplicación tecnológica.

5.2. Objetivos particulares

- 5.2.1. Realizar el cultivo dual de las cepas CP-50 de *P. ostreatus* y CPM-113 de *T. aggressivum* en medio PDA, con la adición de la mezcla de extractos de cebolla y sábila para determinar su efecto sobre el desarrollo micelial de ambas cepas.
- 5.2.2. Evaluar el efecto de una mezcla de extractos de cebolla y sábila, y del ácido acetilsalicílico por separado, en la producción de enzimas lacasas y proteínas por el micelio de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus*.
- 5.2.3. Con base a los resultados, formular una estrategia tecnológica con potencial de aplicación en la producción comercial de hongos comestibles.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

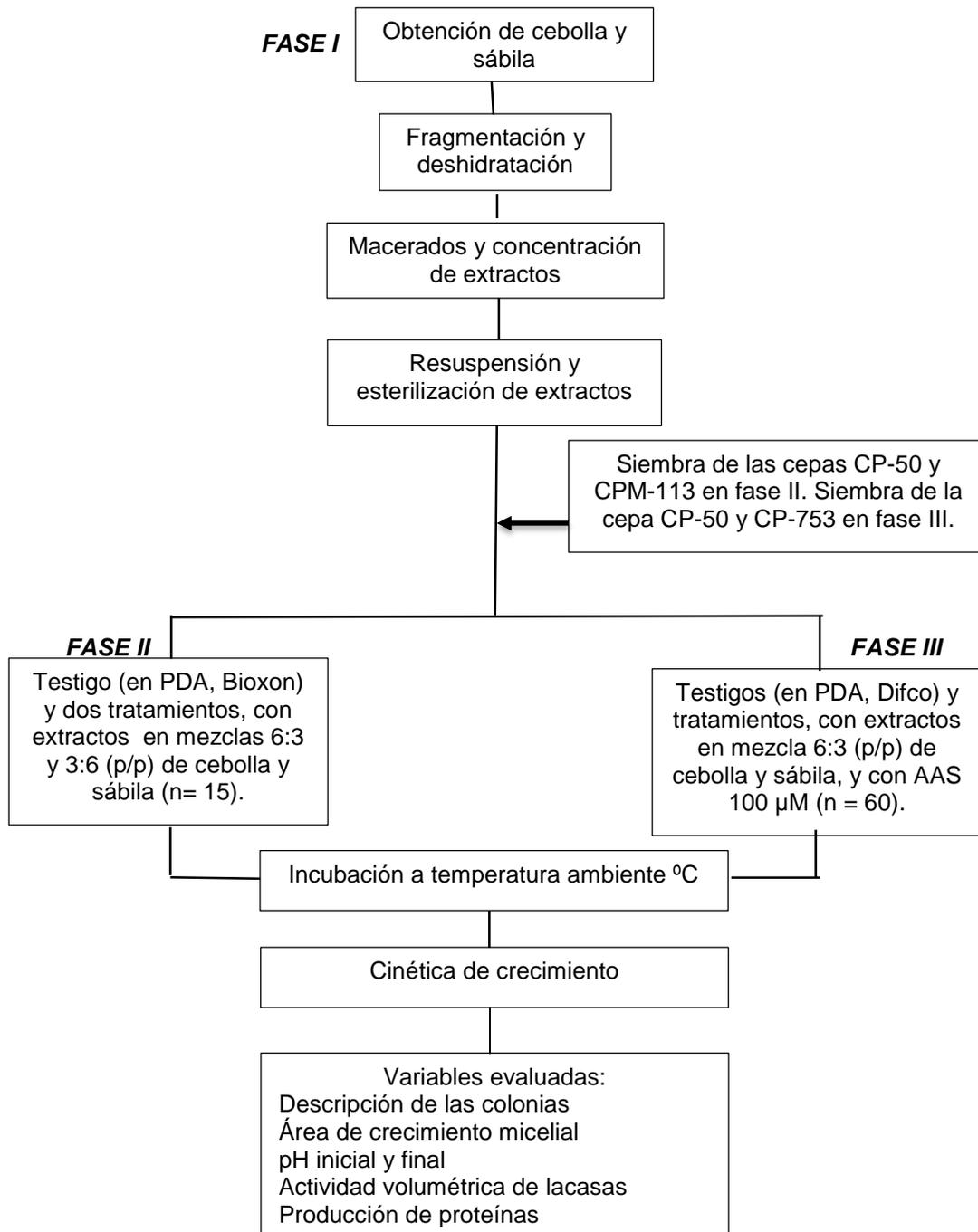


Figura 3. Fases desarrolladas en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* en el medio PDA para determinar el efecto de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*), y del ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μM en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas.

6.1. Material biológico

En la evaluación del ácido acetilsalicílico y de los extractos de la cebolla morada (*Allium cepa* var. "matahari") y la sábila (*Aloe vera*) se utilizaron las cepas CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* y las cepas CP-50 y CP-753 del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Todas las cepas pertenecen a la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.

6.2. Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) de las marcas comerciales Bioxon, Merck y Difco. En la preparación de los medios se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Las cantidades requeridas se prepararon en agua destilada (HYCEL) previamente esterilizada; se disolvieron al calentarse en un horno de microondas, se esterilizaron en ollas de presión a 121°C durante 25 minutos y una vez tibios, se vaciaron en cajas Petri de 90 mm x 15 mm, las cuales se incubaron durante 48 h para asegurarse de que no estaban contaminadas. El proceso se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar (VECO, México). La preparación de medios con los extractos vegetales y/o con la adición de AAS, se presenta en las fases correspondientes.

6.2.1 Medios para inóculos

Para obtener los inóculos, se prepararon 10 cajas Petri (90 mm x 15 mm) con 30 mL cada una con PDA (Bioxon o Difco) de la misma manera que se señaló en el punto 6.2. Una vez que se corroboró que no había contaminación, las cajas Petri se inocularon con las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* e incubaron a temperatura ambiente. A los 10-12 días, el micelio cubrió la superficie del medio y de aquí, con un popote estéril se tomaron discos de 5 mm de diámetro, los cuales se colocaron en el centro de cada caja Petri con el medio de cultivo PDA, ya sea en los testigos o en los tratamientos en estudio.

6.3. Variables evaluadas

6.3.1. Descripción de las colonias

Se observó la morfología, textura, densidad, contorno y color del micelio en desarrollo, así como el cambio de color del medio de cultivo, sobre todo en los tratamientos que se prepararon con los extractos vegetales y con el ácido acetilsalicílico.

6.3.2. Área de crecimiento micelial

Se tomaron fotografías a las cajas Petri con el micelio en desarrollo de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* y de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*. El área micelial se midió en cm² con el programa de cómputo ImageJ (National Institutes of Health, ver., 2012).

6.3.3. pH

Para medir el pH se utilizó una mezcladora comercial (Hamilton Beach) y un potenciómetro (Conductronic pH 120). El medio de cultivo PDA de la caja Petri se dividió en tres partes y cada una de ellas se colocó en un tubo Falcon y se homogeneizó durante 1 minuto. El electrodo del potenciómetro se introdujo en el medio homogeneizado, se obtuvo la lectura del pH correspondiente y la temperatura en °C.

6.4. Obtención de sobrenadantes del micelio en desarrollo

La obtención de las muestras para determinar la actividad volumétrica de las lacasas y las proteínas en el micelio de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus*, se realizó bajo condiciones de esterilidad y se esquematiza en la **Figura 4**.

6.5. Actividad volumétrica de lacasas

La actividad volumétrica de la enzima lacasa se determinó con base a la metodología de Bourbonnais y Paice (1990). Se preparó buffer de acetato de sodio (J.T. Baker) 0.1 M pH 5 y para ello, se mezclaron dos soluciones; la primera con 3.4012 g de acetato de sodio (0.1 M) disuelto en 100 mL de agua destilada y la segunda con 0.572 mL de ácido acético grado reactivo (J.T. Baker) (0.1 mM) en 100 mL de agua destilada. La segunda

solución se agregó poco a poco a la primera, hasta que el pH se ajustó a 5 (con el potenciómetro Conductronic pH 120). Finalmente se aforó a 250 mL con agua destilada. Como sustrato indicador para la reacción de la lacasa se utilizó la sal diamónica del ácido 2, 2'-Azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma, con peso molecular de 548.68 g/mol) a 1 mM. En la preparación se pesaron 0.0054 g de ABTS y se disolvieron en 10 mL de etanol grado reactivo. Se resguardó en un contenedor ámbar y se mantuvo a 4 °C.

Una vez obtenido el sobrenadante de cada muestra (**Figura 4**), se procedió a determinar la enzima lacasa. Se utilizaron microplacas de 96 pozos con fondo en "U" en las cuales por cada columna se colocaron 160 µL de buffer de acetatos; 20 µL de agua (blanco) en los pozos A y E; 20 µL de cada muestra en el resto de los pozos; 20 µL de ABTS en toda la columna e inmediatamente se hizo la lectura a 420 nm de absorción en el espectrofotómetro Epoch BioTek, a través del programa de análisis GEN 5. La oxidación del sustrato enzimático requiere de 8 minutos para presentar las lecturas. La unidad de actividad enzimática de la lacasa se definió como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar 1 µM de sustrato por minuto y se expresó en U/mL.

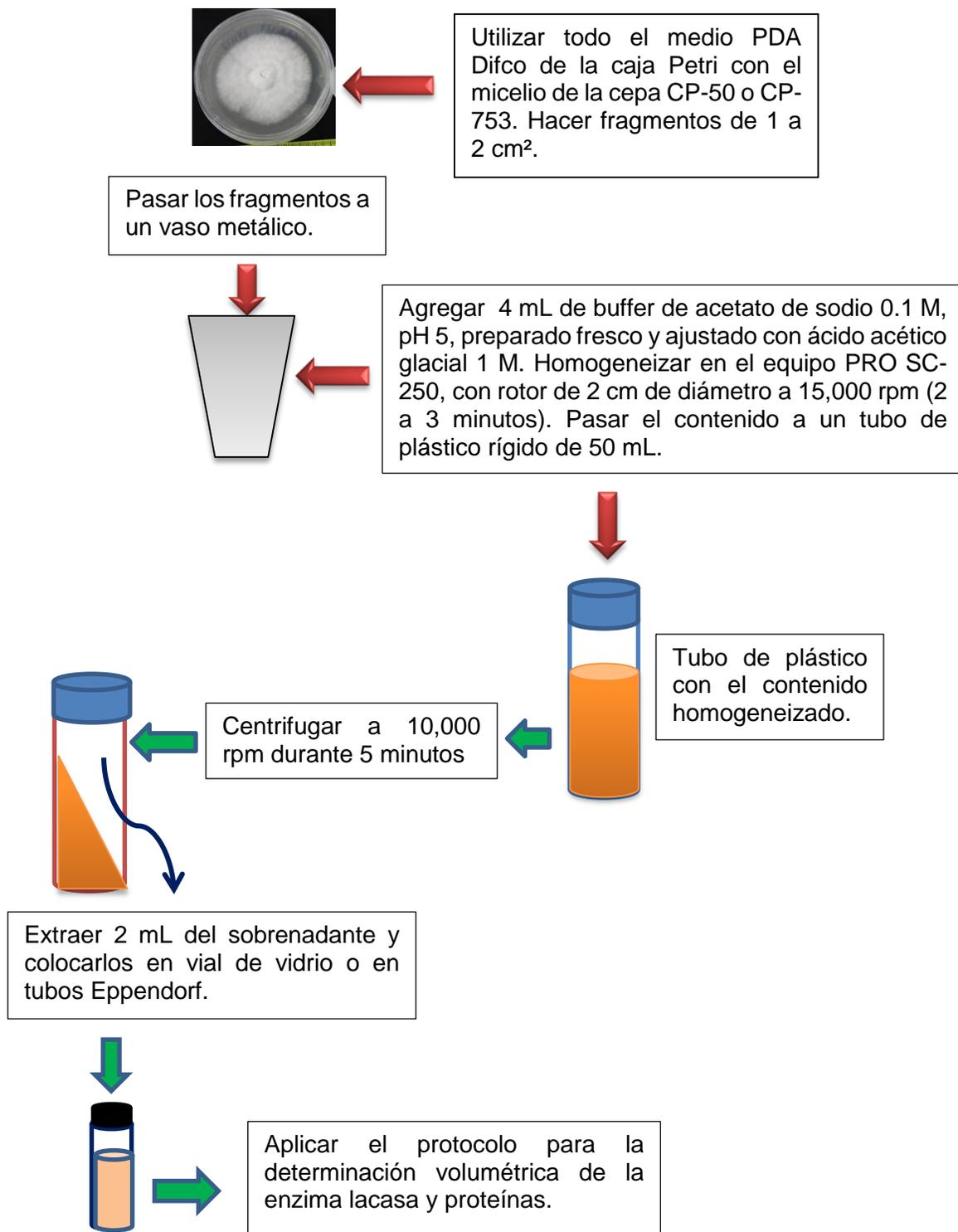


Figura 4. Metodología para obtener la muestra a partir de la caja Petri con PDA (Difco) que contiene el micelio en desarrollo de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus*, para determinar la actividad volumétrica de lacasas y proteínas. Todo el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.

6.6. Producción de proteínas

Los sobrenadantes obtenidos en las muestras del micelio en desarrollo, también se utilizaron en la determinación de la actividad volumétrica de las proteínas del testigo y de los tratamientos. En la determinación de proteínas, se siguió la metodología de Bradford (1976).

Previo a la determinación de las proteínas, se prepararon concentraciones que van de 0, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina bovina (BSA) (Sigma) para hacer la curva de calibración. En la microplaca de 96 pozos, del pozo 1 A al pozo 4 A se agrega el blanco; del pozo 1 B al pozo 4 B se agrega la concentración 10 $\mu\text{g/mL}$ y así sucesivamente hasta llegar a los pozos 1G al 4 G con la concentración 100 $\mu\text{g/mL}$; en los pozos 1 H al 4 H se agrega agua destilada. De cada concentración se agregan 80 μL en los pozos correspondientes. A partir de la columna 5, en cada uno de los pozos se agregan 80 μL de cada una de las muestras. Enseguida, a todos los pozos de las columnas utilizadas, se les agregan 20 μL de colorante Bio-Rad Protein Assay y se deja reposar la microplaca durante 30 minutos en obscuridad. Al término del tiempo, se hace la lectura en el espectrofotómetro Epoch BioTek a 595 nm. Las concentraciones de proteínas se reportaron en $\mu\text{g/mL}$.

6.7. Análisis estadístico

En las experimentaciones se utilizó un diseño completamente aleatorio. A los datos obtenidos, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con el programa Statistical Analysis System ver. 9.0 (SAS, 9.0) y se hizo la comparación de medias de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$.

7. RESULTADOS

FASE I

7.1. Materiales vegetales y proceso para la obtención de extractos de cebolla morada (*Allium cepa* var. "matahari") y sábila (*Aloe vera*)

7.1.1. Resumen

Se obtuvieron los bulbos de la cebolla morada (*Allium cepa* var. "matahari") en octubre de 2012 en las tierras de cultivo en San Cristóbal de Hidalgo, municipio de Acatzingo, Puebla y las plantas de sábila, se obtuvieron en septiembre de 2012 en un vivero ubicado en Atlixco, Puebla. Los bulbos de la cebolla y las hojas de la sábila se fragmentaron y deshidrataron en el interior de un módulo construido con anticipación. Se prepararon macerados con etanol grado reactivo con tres cambios cada 24 h, y por filtración se obtuvieron los sobrenadantes, los cuales se colocaron en un rotavapor a 91 rpm y a 38 °C con presión reducida para eliminar el etanol y obtener los extractos concentrados. En las experimentaciones, los extractos se resuspendieron en agua destilada y estéril. Las proporciones en la preparación de los extractos fueron 6:3 (p/p) (6 mg de extracto de cebolla: 3 mg de extractos de sábila por mL de medio de cultivo) y 3:6 (p/p) (3 mg de extracto de cebolla: 6 mg de extracto de sábila por mL de medio de cultivo). Los extractos se homogeneizaron y esterilizaron en un equipo Millipore con membrana E2-Pack Millipore de 0.45 µM de 47 mm de diámetro (sistema aséptico sterifil). En el recipiente del equipo Millipore, los extractos estériles se mezclaron de acuerdo a la proporción deseada. En rendimiento, 1000 g húmedos de cebolla produjeron en promedio 100 g deshidratados, los que a su vez produjeron 12.05 ± 0.34 g de extracto concentrado, mientras que 1000 g húmedos de sábila produjeron 50.8 ± 5.82 g deshidratados, los que produjeron 11.36 ± 1.91 g de extracto concentrado.

7.1.2. Introducción

Los extractos de la cebolla o de la sábila, se han utilizado como antifúngicos sobre todo en hongos fitopatógenos. En varios ejemplos se tiene que los extractos inhiben el desarrollo micelial del fitopatógeno, pero hay casos en donde los extractos actúan como fungistáticos y en ocasiones fortalecen al hongo.

Por lo anterior, se tienen los objetivos de obtener bulbos de cebolla morada y plantas de sábila, para obtener los extractos y realizar los estudios en los que se pueda determinar el efecto de éstos en el cultivo de hongos comestibles, particularmente con el micelio de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus*.

Es importante señalar que no se tienen referencias sobre la aplicación de los extractos de cebolla o sábila, ya sea para inhibir o fortalecer el micelio de hongos comestibles.

7.1.3. Obtención de la cebolla morada (*Allium cepa* var. “matahari”)

La cebolla morada se obtuvo en octubre de 2012 directamente en las tierras de cultivo del poblado de San Cristóbal de Hidalgo, municipio de Acatzingo, Puebla (**Figura 5**). Se adquirieron 280 kg de cebolla en peso húmedo. El productor, Sr. Raúl Barrales Álvarez, señaló que la semilla es originaria de Estados Unidos y la conoce como el híbrido “matahari” cuyo ciclo de cultivo es de 7 meses aproximadamente. Los bulbos de la cebolla se trasladaron al COLPOS, *Campus* Puebla.

Cabe indicar que al momento de realizarse la cosecha, las plantas de cebolla aún no presentaban inflorescencias, dado que la cebolla es una planta bianual y las presenta cuando los bulbos no se cosechan y se destinan para la formación de dichas inflorescencias y por ende para la obtención de la semilla.



Figura 5. Obtención de la cebolla morada (*Allium cepa* var. “matahari”) en la tierra de cultivo. A: recolección de los bulbos de cebolla y B: llenado de arpilla.

7.1.4. Obtención de las plantas de sábila (*Aloe vera*)

En septiembre de 2012 se obtuvo un lote de 14 plantas sembradas en compost en macetas de plástico en el “Vivero Gardenias” con domicilio en Av. Manuel Gomes Morin, Colonia Cabrera en la ciudad de Atlixco, Puebla. Los productores informaron que las plantas son originarias de la misma localidad y tienen más de dos años de edad. El número de hojas en las plantas de sábila es variable, algunas tienen de 12 a 14 (son más carnosas); otras tienen de 25 a 27 (más o menos carnosas). El escapo es simple a ramificado con las flores amarillas (**Figura 6**). Las plantas de sábila se trasladaron al COLPOS, *Campus Puebla*.



Figura 6. A: plantas de sábila (*Aloe vera*) en el vivero. B: planta mostrando el escapo ramificado con las flores amarillas.

7.1.5. Módulo para la deshidratación de la cebolla y la sábila

Para la deshidratación de la cebolla y de la sábila, se construyó con anticipación un módulo con material de acero inoxidable y láminas de policarbonato. Dicho módulo se construyó en el terreno destinado al cultivo de hongos comestibles y medicinales del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. El piso es de material denominado adoquín. Las medidas del módulo son: 3.5 m de largo x 3.0 m de ancho x 2.5 m de alto, con una puerta del mismo material de 0.9 m de ancho x 1.80 m de alto. En cada una de las paredes tiene colocadas tres ventanas cubiertas con mallas plásticas y con tela porosa para permitir el intercambio de aire. En la parte alta de una pared y al centro, tiene un extractor de aire eléctrico, con capacidad para mover 262.5 m³ por h (**Figura 7**).

En el interior del módulo se armaron 4 estantes con postes metálicos. Cada estante tiene 6 entrepaños de aluminio con malla plástica tipo mosquitero. Cada entrepaño mide 1.5 m de largo x 0.5 m de ancho, por lo que, en cada estante hay una superficie de 4.5 m², con lo cual se habilitaron 18 m² para deshidratar los fragmentos de los bulbos de la cebolla y los fragmentos de las hojas de la sábila.



Figura 7. Construcción del módulo de deshidratación. A: parte externa con paredes de policarbonato y ventanas con malla plástica. B: colocación del extractor de aire eléctrico en lo alto de una pared del módulo.

7.1.6. Deshidratación de la cebolla morada

Lo primero fue eliminar los restos de suelo impregnado en los bulbos y para ello se desprendió manualmente su capa externa. Los bulbos dañados (tal vez por bacterias, nematodos o por germinación prematura) y aquellos de color blanco, se eliminaron (30% aproximadamente).

Cada bulbo de cebolla se cortó en partes longitudinales y cada fragmento se colocó sobre una cuchilla de acero inoxidable de un cortador de vegetales modelo Nicer Dicer Plus (hecho en China) de material plástico, de 25.5 cm de largo x 9.0 cm de ancho x 12 cm de alto. Con la cuchilla se hicieron segmentos de 35 mm de largo x 5 mm de ancho del bulbo de la cebolla. El recipiente colector almacena unos 800 g de fragmentos (**Figura 8**).

Los fragmentos de la cebolla húmeda se colocaron sobre los entrepaños de malla plástica. En la deshidratación, el extractor de aire funcionó dos h por media h de descanso en las 24 h. Por la noche, se utilizó un calefactor (Everheat, de 35 cm de alto x 20 cm de ancho) a 30°C que trabajó 1 h por 0.5 h de descanso. Los fragmentos requirieron de 12 días para su deshidratación (**Figura 9**) y enseguida se colocaron dentro de recipientes de vidrio con tapa hermética, hasta su utilización.



Figura 8. Cortador de vegetales para fragmentar los bulbos de la cebolla (*Allium cepa*). A: forma y tamaño de la cuchilla de acero inoxidable. B: colocación del bulbo de cebolla sobre la cuchilla. C: recipiente colector de los fragmentos de cebolla.



Figura 9. Estantes con entrepaños de malla plástica en los que se colocaron los fragmentos de la cebolla (*Allium cepa*) para su deshidratación.

7.1.7. Deshidratación de la sábila

Se utilizaron las hojas de la parte inferior de las plantas de sábila, por ser las más largas y carnosas. Para eliminar las impurezas de ambas superficies, se limpiaron con una tela humedecida con agua de garrafón. A cada hoja se le eliminaron las espinas de los bordes, se pesó y midió para proceder a su fragmentación. El peso de las hojas fluctuó entre 500 a 272 g; la longitud fue de 66 a 49 cm; el ancho en la base fue de 12 a 9 cm y el grosor de 2.4 a 1.5 cm (**Figura 10**).

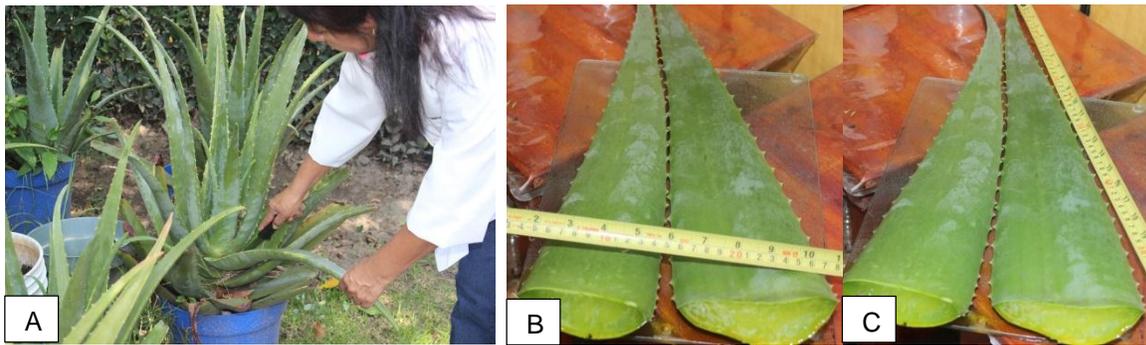


Figura 10. Plantas y hojas de la sábila (*Aloe vera*). A: corte de una hoja inferior, al ras de la inserción con el tallo. B: medidas de ancho de la base de la hoja y C: medidas de longitud de las hojas.

En el proceso de fragmentación y deshidratación de las hojas de sábila, se siguió en parte la metodología presentada por Reyes (2013). Se utilizó el cortador modelo Nicer Dicer Plus (hecho en China) con la cuchilla de acero inoxidable en forma de “V” con la que se hicieron cortes transversales de 2 mm de grosor x 7 a 10 cm de longitud. Los fragmentos se esparcieron en la superficie de vidrios de 50 cm x 50 cm, limpios y desinfectados con alcohol etílico, los cuales se colocaron sobre los entrepaños con malla plástica en los estantes que se encontraban en el interior del módulo de deshidratación. Para acelerar el secado de los fragmentos se utilizó un ventilador doméstico. A las 6 h de deshidratación, los fragmentos se levantaron y voltearon con la ayuda de una pequeña pala de acero inoxidable (7.6 cm de ancho x 9.4 cm de largo, con agarradera de madera) para deshidratar la parte que estaba en contacto con el vidrio. Esto evitó que los fragmentos se adhirieran totalmente a la superficie del vidrio, y a la vez, facilitó su desprendimiento, el cual se hizo con un cuchillo de acero inoxidable. La deshidratación

se llevó a cabo en 48 h, bajo condiciones ambientales del módulo (**Figura 11**). Los fragmentos deshidratados se colocaron dentro de frascos de vidrio con tapa hermética, hasta su utilización.



Figura 11. Proceso del corte y deshidratación de las hojas de la sábila (*Aloe vera*). A: cuchilla de acero inoxidable en forma de “V” con la que se hicieron los cortes transversales de la hoja. B: fragmentos de 2 mm de grosor, extendidos sobre el vidrio.

7.1.8. Macerados de cebolla y sábila

En la preparación de los macerados, se siguió en parte lo señalado por Reyes (2013) y por Khanahmadi *et al.* (2011), quienes trabajaron con *Allium cepa* y *Allium latifolium* Gilib., respectivamente. En la maceración se tomó como base el peso deshidratado (100 g para la cebolla y 50 g para la sábila) proveniente de 1000 g de cebolla o de sábila húmeda, respectivamente. Los fragmentos de cebolla o de sábila se colocaron por separado en frascos de vidrio con tapa hermética, con capacidad de 1,500 mL y se agregaron 1,200 mL de alcohol etílico grado reactivo (96%, CAS: 64-17-5) para cubrir el material vegetal. Los frascos se mantuvieron en obscuridad a temperatura ambiente. A las 24 h de maceración, al contenido de cada frasco se le realizó un filtrado con papel filtro del número 2. Los sobrenadantes se colectaron en un garrafón de vidrio de 20 L de

capacidad. Al frasco de 1,500 mL que contiene el material vegetal fragmentado, se le agregaron otros 1,200 mL de alcohol etílico, y a las 48 h se repitió el filtrado, se agregó alcohol y se recolectó el sobrenadante. Finalmente, a las 72 h se obtuvo el último sobrenadante (**Figura 12**).

7.1.9. Concentración de extractos de cebolla y sábila

Para concentrar los extractos de cebolla o de sábila, se utilizó un rotavapor (HAHN VAPOR, HANN SHIN) a 91 rpm y a 38°C, con presión reducida. Por cada concentración, en el matraz destinado para contener la muestra, se colocaron 500 mL del macerado (sobrenadante) para concentrarlos en 10 mL, lo cual requirió de dos h en promedio.

Con pipeta Pasteur, se extrajeron del matraz los 10 mL del extracto concentrado y se vaciaron en el interior de una caja Petri de vidrio de 15 cm x 18 mm (con peso conocido), la cual se colocó cerca de un ventilador normal para evaporar totalmente los residuos del alcohol. Enseguida, por diferencia del peso de la caja Petri con extracto y el peso de la caja Petri sin extracto, se obtuvo el peso deshidratado del extracto.

Por último, la caja Petri con el extracto se selló con parafilm, se etiquetó y guardó en refrigeración a 4°C, hasta la utilización.



Figura 12. Macerados y concentración de extractos. 1: macerado de la sábila (*Aloe vera*) en etanol, grado reactivo. 2 y 3: sobrenadante del macerado de sábila y cebolla (*Allium cepa*), respectivamente. 4: concentración de extractos en el rotavapor (HAHN VAPOR, HANN SHIN). 5 y 6: concentrado de extractos de sábila y cebolla en cajas Petri, respectivamente.

7.1.10. Rendimiento de la cebolla

Por cada corte y fragmentación de la cebolla, se deshidrataron aproximadamente 50 kg de cebolla fresca colocada sobre la malla plástica de los cuatro estantes metálicos. En la **Tabla 14**, se presenta el número de cortes realizados, la cantidad y el peso deshidratado de la cebolla. De acuerdo a las cifras de esta Tabla 14, 1000 g de bulbos de cebolla fresca al deshidratarse pierden aproximadamente 90% de humedad, por lo que, se obtiene en promedio 100 g de cebolla en peso deshidratado.

En la **Tabla 15**, se presentan las temperaturas y la humedad relativa que prevalecieron en el interior del módulo durante la deshidratación.

En la **Tabla 16** se muestra el número de macerados realizados y el promedio general del rendimiento obtenido en el extracto de cebolla.

Tabla 14. Número de cortes y fragmentación de la cebolla (*Allium cepa*), cantidad de cebolla fresca y peso de la cebolla deshidratada en los meses de octubre y noviembre de 2012.

Cortes/fragmentación	Peso fresco (kg)	Peso deshidratado (kg)
1	51.398	4.691
2	53.549	5.796
3	31.209	3.257
TOTAL	136.157	13.745

Tabla 15. Temperaturas y humedad relativa en los meses de octubre y noviembre de 2012 en el interior del módulo en la etapa de deshidratación de la cebolla (*Allium cepa*).

Temperatura máxima (°C) y σ	Temperatura mínima (°C) y σ	Humedad relativa máxima (%) y σ	Humedad relativa mínima (%) y σ
24.66 ± 1.46	10.62 ± 1.89	74.2 ± 10.7	41.32 ± 8.09

Tabla 16. Número de macerados de cebolla (*Allium cepa*) a partir de diciembre 2012 a octubre de 2013. Rendimiento (g) del extracto de cebolla obtenido en cada macerado relacionado con 100 g deshidratados que proceden de 1000 g frescos.

Macerados	Peso deshidratado (g) de 1000 g frescos	Rendimiento del extracto (g)
1	100	12.4
2	100	11.8
3	100	12.3
4	100	11.6
5	100	12.13
Promedio	100	12.05 ± 0.34

7.1.11. Rendimiento de la sábila

Se procesaron aproximadamente 40 kg en peso fresco de hojas de sábila en diferentes fechas, bajo las condiciones ambientales que prevalecieron en el interior del módulo (**Tabla 17**). El peso deshidratado varió en los diferentes cortes, sin embargo, la sábila tiene aproximadamente 95% de humedad. El rendimiento del extracto de la sábila se muestra en la **Tabla 18**, considerando los números de corte y deshidratación.

Tabla 17. Cortes a partir de noviembre 2012 a octubre de 2013, y condiciones ambientales en el interior del módulo, durante la deshidratación de los fragmentos de las hojas de sábila (*Aloe vera*).

Cortes	Temperatura máxima (°C) y σ	Temperatura mínima (°C) y σ	Humedad relativa máxima (%) y σ	Humedad relativa mínima (%) y σ
1	24.02 ± 1.43	9.3 ± 1.1	67.25 ± 4.11	36 ± 9.11
2	25.32 ± 3.04	13 ± 1.55	56.7 ± 6.2	32.9 ± 3.6
3	25.65 ± 0.67	19.22 ± 2.68	60.4 ± 3.5	36.8 ± 2.09
4	27.07 ± 1.44	19.87 ± 1.88	61.9 ± 3.2	38 ± 4.1
5	23.3 ± 3.08	11.9 ± 0.99	66.36 ± 5.3	41.1 ± 4.99

Tabla 18. Número de cortes y macerados, peso fresco y peso deshidratado, y rendimiento del extracto de sábila (*Aloe vera*) relacionado con aproximadamente 50 g deshidratados que provienen de 1000 g frescos.

Cortes y macerados	Peso fresco (kg)	Peso deshidratado (kg)	Peso deshidratado de 1000 g frescos	Rendimiento del extracto (de ≈ 50 g secos)
1	7	0.340	48.6	9.5
2	8	0.376	47	9.7
3	8	0.379	47.4	11.98
4	8	0.399	49.9	11.42
5	9	0.549	61	14.2
Promedio	8	0.4086±0.08	50.78±5.82	11.36±1.91

7.1.12. Resuspensión y esterilización de los extractos

La resuspensión de los extractos se hizo en agua destilada y estéril; fue de manera particular en las Fases II y IV. Las mezclas de extractos se homogeneizaron y enseguida se esterilizaron para posteriormente adicionarse al medio de cultivo. La esterilización se realizó en el sistema aséptico sterifil Millipore (con sus componentes estériles). Cada extracto se vació poco a poco en el recipiente superior y se esterilizó al pasar a través de una membrana E2-Pack Millipore de 0.45 μM de 47 mm de diámetro. Los extractos así esterilizados, se colectaron en el recipiente inferior del equipo para posteriormente adicionarlos al medio de cultivo. La esterilización se hizo con la ayuda de una bomba de vacío. El procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar (**Figura 13**). Las cantidades de extractos a utilizar, se explican en cada una de las fases en estudio.

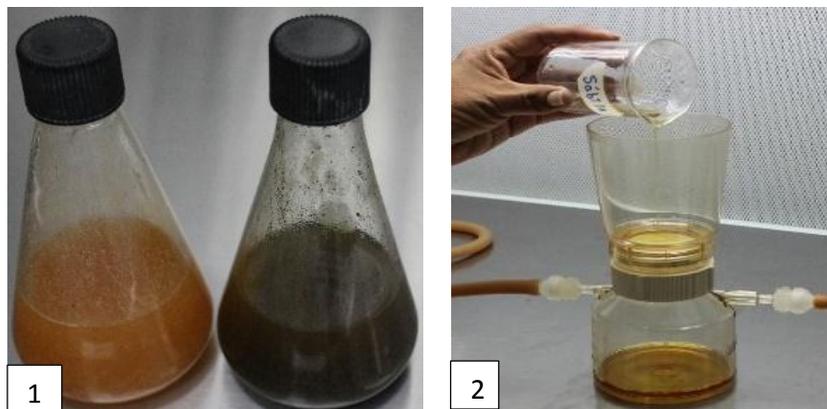


Figura 13. Resuspensión en agua y esterilización de extractos. 1: matraces Erlenmeyer con extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*), respectivamente. 2: esterilización y mezcla de los extractos con el sistema aséptico sterifil Millipore.

El proceso de fragmentación y deshidratación de la cebolla y la sábila, se considera que fue eficiente, ya que fue mucho el material vegetal que se procesó. En cuanto al rendimiento de los extractos, no se tienen datos comparativos.

FASE II

7.2. Efecto de los extractos de cebolla y sábila en el cultivo dual de las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CPM-113 de *Trichoderma aggressivum*

7.2.1. Resumen

Se determinó el efecto de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) (6 mg/mL de extracto de cebolla: 3 mg/mL de extracto de sábila) y 3:6 (p/p) (3 mg/mL de extracto de cebolla: 6 mg/mL de extracto de sábila), con el respectivo testigo, en el cultivo dual de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* y de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* en medio PDA (Bioxon) e incubadas entre 25 °C y 26 °C en obscuridad durante cinco días. Se evaluó la morfología colonial, velocidad de crecimiento del área micelial en ambas cepas. El micelio de los tratamientos con la cepa CP-50 al día 5 de incubación, lograron $6.22 \pm 1.18 \text{ cm}^2$ y $6.06 \pm 1 \text{ cm}^2$ en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p), respectivamente, con lo cual superaron al testigo ($3.74 \text{ cm}^2 \pm 1.38 \text{ cm}^2$) con 39.8% y 38.3%, respectivamente. Mientras que el micelio de la cepa CPM-113 en los extractos en proporción 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) mostraron $29.7 \pm 9.3 \text{ cm}^2$ y $37.3 \pm 8.3 \text{ cm}^2$ superando al testigo ($18.4 \pm 4.9 \text{ cm}^2$) con 38.3% y 50.8%, respectivamente. A partir del día 6 de incubación, el micelio de *T. aggressivum* desarrollado en los extractos vegetales, comenzó a invadir todo el medio PDA sobrepasando al micelio de la cepa CP-50. Por lo tanto, los extractos vegetales mostraron efecto estimulador en el desarrollo micelial de ambas cepas.

7.2.2. Introducción

Con base al trabajo previo realizado por Reyes (2013), en el presente estudio se realizó el cultivo dual de las cepas CP-50 y CPM-113, para determinar el efecto de los extractos vegetales en el desarrollo micelial de ambas cepas (**Figura 14**).

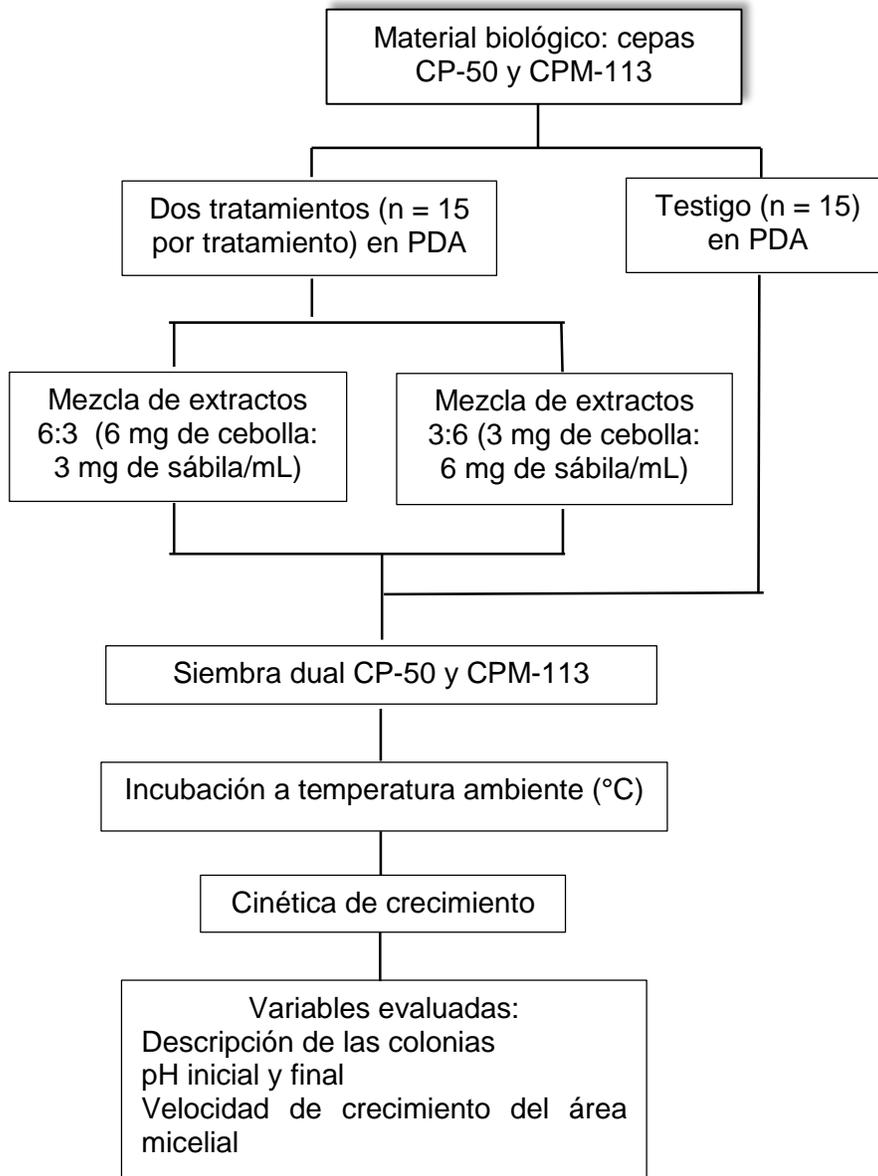


Figura 14. Diagrama utilizado para determinar el efecto de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en cultivo dual de las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* incubadas entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad, durante cinco días.

7.2.3. Materiales y métodos

7.2.4. Preparación de testigo y tratamientos

Se consideró que en cada tratamiento las cajas Petri tuvieran 30 mL del medio PDA incluyendo la adición de los extractos de cebolla y sábila. En la proporción 6:3 (p/p) (6 mg de cebolla: 3 mg de sábila en cada mL de medio de cultivo PDA, Bioxon) se tienen 180 mg de extracto de cebolla y 90 mg de extracto de sábila. Para la proporción 3:6 (p/p) (3 mg de cebolla: 6 mg de sábila en cada mL de medio de cultivo PDA, Bioxon) se tienen 90 mg de cebolla y 180 mg de sábila. Se trabajó con $n = 15$ por tratamiento, por lo que, en la proporción 6:3 (p/p), se utilizaron 2,700 mg de extracto de cebolla y 1,350 mg de extracto de sábila, mientras que en la proporción 3:6 (p/p) se utilizaron 1,350 mg de extracto de cebolla y 2,700 mg de sábila.

Una vez obtenido el peso de los extractos para cada concentración, éstos se resuspendieron en 50 mL de agua destilada y estéril en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad; 2 matraces con extracto de cebolla y 2 matraces con extracto de sábila y se homogeneizaron en una incubadora orbital (MAX^Q 4000, Barnstead/Lab Line) durante 1 h a 150 rpm y a 34.5 °C. Enseguida se procedió a su esterilización de acuerdo a la sección 7.1.12.

Los 100 mL de la mezcla de extractos ya estériles, se adicionaron al medio PDA estéril y tibio (preparado en 350 mL, para completar 450 mL al adicionar una de las mezclas de extractos), se homogeneizó en un plato agitador magnético (CIMAREC Barnstead|theromolyne). Enseguida, en una probeta estéril se midieron cada vez 30 mL del medio PDA ya con los extractos, y se vaciaron en cada caja Petri. El proceso se realizó en una cámara de flujo laminar. Las cajas Petri con el medio gelificado se guardaron durante 48 h para asegurarse de que no había contaminación.

7.2.5. Inoculación de testigo y tratamientos

A las cajas Petri se les inoculó en una parte lateral un disco de 5 mm de diámetro, con micelio previamente desarrollado de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*; en la parte lateral

opuesta al inóculo de la cepa CP-50, se inoculó la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*. Las cajas Petri inoculadas se incubaron a temperatura ambiente en el laboratorio de hongos del COLPOS (25°C y 26°C) y en obscuridad, durante solo 5 días, ya que el hongo *T. aggressivum* comenzó a invadir al medio PDA a partir del sexto día de incubación.

7.2.6. Variables a evaluar

Las variables evaluadas fueron: descripción de las colonias, pH inicial (día 0) y final (día 5), y la velocidad del crecimiento del área micelial en el testigo y tratamientos, de acuerdo a las secciones 6.3.1 a 6.3.3.

7.2.7. Resultados

7.2.8. Variables evaluadas

Descripción de las colonias. El micelio de *P. ostreatus* en el testigo y en los tratamientos en su cara superior presentaron: textura fibrosa, densidad abundante y color blanco (**Figura 15**). La cara inferior en el testigo fue blanco grisácea y en los tratamientos fue rojo claro a rojo oscuro. El micelio de *T. aggressivum* en los tratamientos con extractos de cebolla y sábila en las concentraciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) presentaron zonas concéntricas con textura lanosa de color blanco-café, densidad regular, con abundantes esporas de color verde olivo concentradas en el sitio cercano a la inoculación; mientras que en el testigo, el micelio presentó textura lanosa, con esporas esparcidas, formando pústulas blanco amarillentas (**Figura 15**).

pH inicial y final. En la **Tabla 19**, se presentan los valores de pH inicial con el inóculo sembrado y pH final con el micelio en desarrollo en el testigo y en los tratamientos, así como la temperatura en todos los casos.

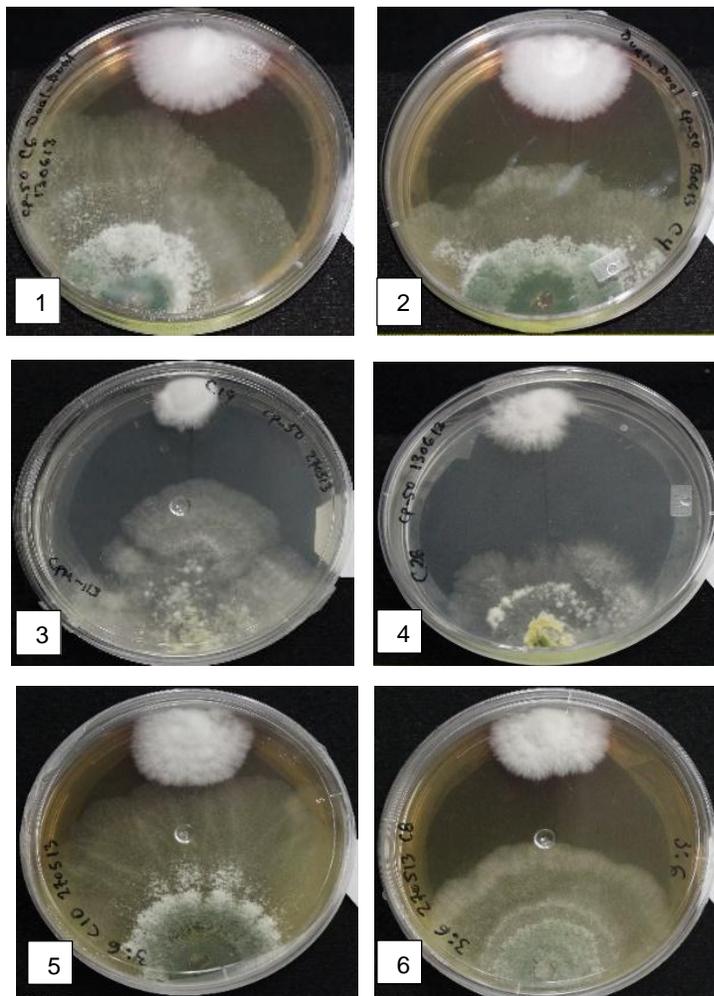
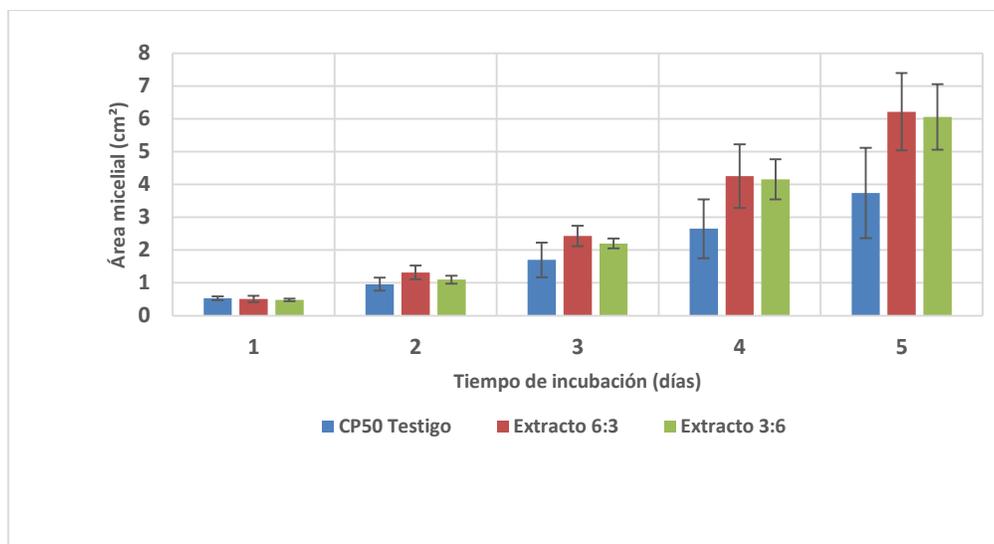


Figura 15. Cultivo dual de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* en medio PDA con adición de extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en 5 días de incubación. Núm. 1 y 2: proporción 6:3 (p/p); núm. 3 y 4: testigo; núm. 5 y 6: proporción 3:6 (p/p).

Tabla 19. Valores de pH inicial y final, y temperatura durante el crecimiento micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad, durante cinco días de incubación, con adición de extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p).

Tratamientos	pH inicial	Temperatura °C inicial	pH final	Temperatura °C final
Testigo PDA	5.8	26.1	5.5	25.3
Proporción 6:3	5.7	26.8	5.4	25.9
Proporción 3:6	4.6	25.4	4.2	25.8

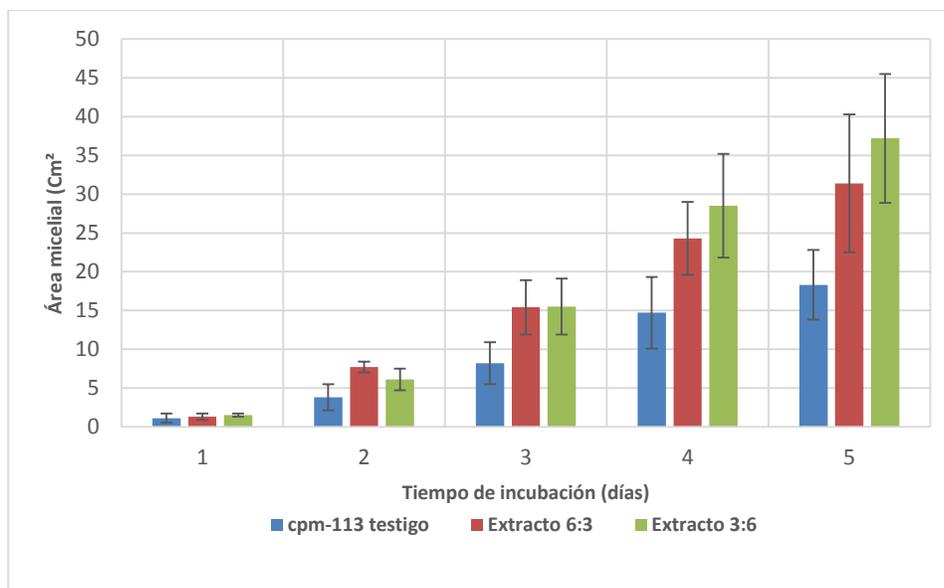
Crecimiento del área micelial. Con la cepa CP-50, los micelios en los extractos en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) al día cinco de incubación, lograron crecer 6.22 ± 1.18 cm² y 6.06 ± 1 cm² superando al testigo (3.74 ± 1.38 cm²) con 39.8% y 38.3%, respectivamente. El valor del tratamiento en proporción 6:3 (p/p) únicamente en el día dos, fue significativamente superior a aquel del tratamiento en proporción 3:6 (p/p) con 16.7% y en el resto de los días, mostró diferencias numéricas con respecto a este mismo tratamiento con 2.4% a 9.47% (**Figura 16**).



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)				
	1	2	3	4	5
CP-50 Testigo	0.53±0.06 a	0.96±0.2 b	1.7±0.53 b	2.65±0.9 b	3.74±1.38 b
Extracto 6:3	0.51±0.1 a	1.32±0.21 a	2.43±0.31 a	4.26±0.97 a	6.22±1.18 a
Extracto 3:6	0.48±0.04 a	1.1±0.12 b	2.2±0.15 a	4.16±0.61 a	6.06±1 a

Figura 16. Efecto del extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en el área micelial (cm²) de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en cultivo dual en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Análisis de los datos por ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 15$.

El desarrollo micelial en la cepa CPM-113 con los extractos en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) igualmente al día cinco de incubación, registraron 29.7 ± 9.3 cm² y 37.3 ± 8.3 cm² con lo cual superaron al testigo (18.3 ± 4.9 cm²) con 38.3% y 50.8%, respectivamente. Entre ambos tratamientos con extractos vegetales, no hubo diferencias significativas en sus valores durante los días de incubación (**Figura 17**).



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)				
	1	2	3	4	5
CPM-113 testigo	1.1±0.6 a	3.8±1.7 b	8.2±2.7 b	14.7±4.6 b	18.3±4.5 b
Extracto 6:3	1.3±0.4 a	7.7±0.7 a	15.4±3.5 a	24.3±4.7 a	31.4±8.9 a
Extracto 3:6	1.5±0.2 a	6.1±1.4 a	15.5±3.6 a	28.5±6.7 a	37.2±8.3 a

Figura 17. Efecto del extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en las proporciones 6:3 (p/p) y 3:6 (p/p) en el área micelial (cm²) de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* en cultivo dual en PDA (Bioxon) entre 25 °C y 26 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Análisis de los datos por ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 15.

7.2.9. Discusión

Hubo un efecto estimulador en el desarrollo micelial tanto en la cepa CP-50 como en la cepa CP-113. Este efecto, se relaciona con los metabolitos y compuestos fenólicos presentes en la cebolla y en la sábila (Soininen *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2007; Ahlawat y Khatkar, 2011; Chinchilla *et al.*, 2013), además del contenido nutrimental que tiene la cebolla morada, al presentar diversas proteínas y vitaminas como la B1, B2 y C; del contenido de potasio y los polisacáridos fructosa y sacarosa; así como de péptidos, aceites esenciales, antocianinas, flavonoides y antioxidantes (Yang *et al.*, 2004; Shon *et al.*, 2004; Downes *et al.*, 2009).

La tendencia general fue de que al término de la experimentación, los tratamientos con extractos presentaron los mejores promedios del área micelial; por lo que, se concluye

que hubo un efecto estimulador para el desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* y de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*.

Los resultados del presente estudio, no coinciden con el trabajo de Reyes (2013), quien señaló que los extractos de la cebolla y de la sábila inhiben el desarrollo micelial de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*. Esto puede deberse al origen y lote de las plantas de sábila, la manera en que se realizó la deshidratación de la cebolla y de la sábila, el medio de cultivo empleado, la época en que se obtuvieron los extractos y las condiciones de incubación de las cepas, entre otras causas. Se debe recordar que los organismos presentan variabilidad en uno u otro aspecto, ya que una misma especie, bajo condiciones similares puede presentar comportamientos diferentes.

Para continuar con las investigaciones, se seleccionó la concentración 6:3 (p/p) de extractos de cebolla y sábila, por haber presentado una mayor densidad en el micelio y por haber registrado los mejores valores numéricos con respecto a la concentración 3:6 (p/p).

Previamente a la realización de la Etapa III, se realizó el cultivo de la cepa CP-50 en tres medios de cultivo comerciales (Merck, Bioxon y Difco), para seleccionar el mejor medio en que se desarrolla el micelio. Se seleccionó el medio PDA marca Difco. Después, se cultivó esta misma en el medio seleccionado y se hizo la determinación de lacasas (Anexo 1 y Anexo 2).

FASE III

7.3. Efecto de los extractos de cebolla y sábila o del AAS en el desarrollo micelial y en la producción de lacasas y proteínas en las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus*

7.3.1. Resumen

Se cultivaron las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en medio PDA Difco con testigos y dos tratamientos, de los cuales, a uno se le adicionó el extracto de cebolla y de sábila en proporción 6:3 (p/p) y al otro se le adicionó ácido acetilsalicílico (AAS) en concentración 100 μ M. Las variables evaluadas fueron: morfología colonial, crecimiento del área micelial, actividad volumétrica de lacasas y producción de proteínas. En el testigo y en los tratamientos, el micelio fue blanco, densidad abundante, textura algodonosa, colonia regular con zonas concéntricas diferenciadas. La cara inferior fue blanco grisácea, excepto en el tratamiento con los extractos, en donde el micelio fue color rojo. El efecto del AAS fue positivo en el desarrollo micelial, mayormente en la cepa CP-753. En la actividad volumétrica de las lacasas, fueron significativamente superiores los tratamientos con extractos vegetales y con AAS con respecto a sus testigos. En la producción de proteínas sólo el tratamiento con extractos vegetales fue superior al resto de los tratamientos. Los extractos vegetales y el AAS 100 μ M resultaron ser buenos inductores ya que incrementaron los valores de producción de las enzimas lacasas.

7.3.2. Introducción

En esta experimentación, se continuaron los estudios con la proporción 6:3 (p/p) de los extractos vegetales, incluyendo además otros tratamientos con la adición del ácido acetilsalicílico (AAS) en concentración 100 μ M, con la finalidad de determinar el efecto que tienen los extractos vegetales y el AAS como inductores en el desarrollo micelial y en la producción volumétrica de lacasas y proteínas, en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* desarrolladas en el medio PDA, Difco (**Figura 18**).

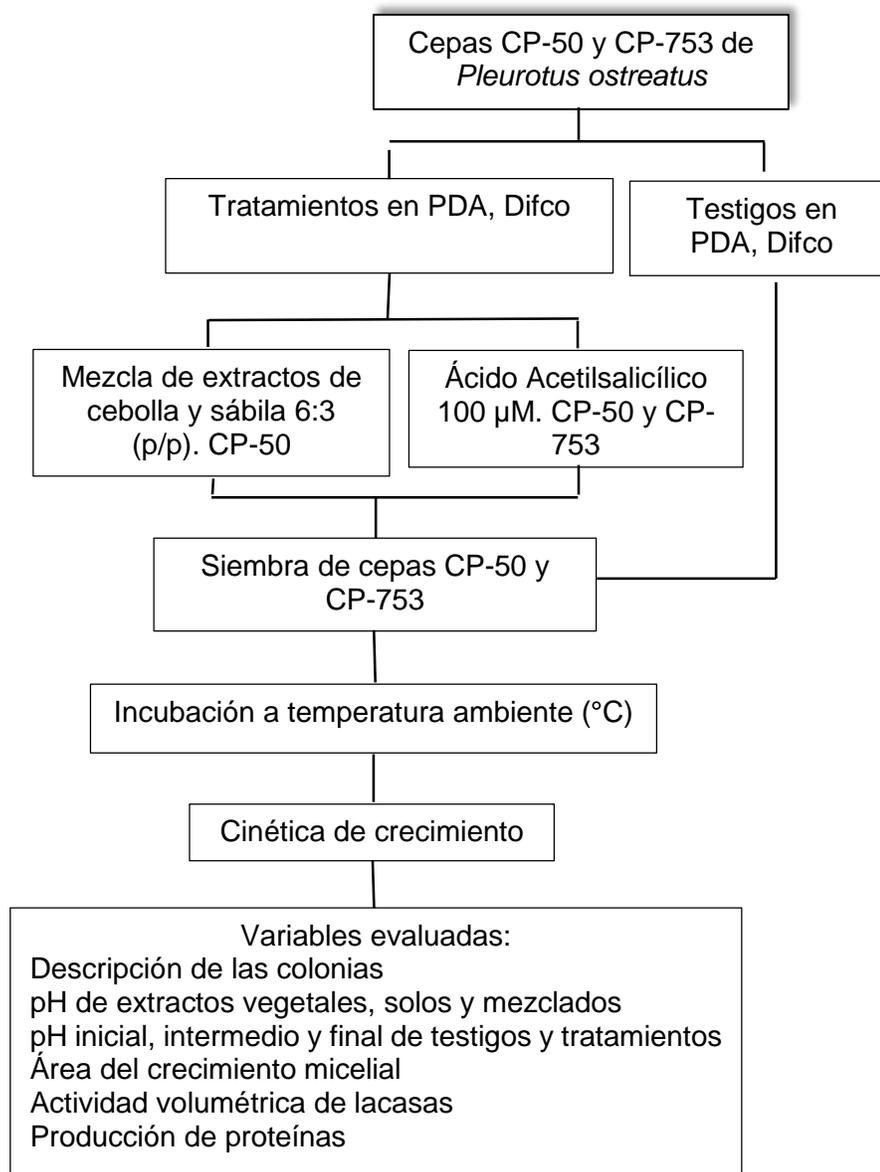


Figura 18. Efecto de los extractos de la cebolla (*Allium cepa*) y de la sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) y del ácido acetilsalicílico 100 µM en el desarrollo micelial y en la actividad volumétrica de lacasas y producción de proteínas en las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus*.

7.3.3. Materiales y métodos

7.3.4. Preparación de medios de cultivo

Testigo. El medio PDA se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante; se disolvió al calentarse en un horno de microondas. Enseguida, se midieron en una probeta 30 mL del medio y se vaciaron en tubos de ensayo con tapa de baquelita, los que se esterilizaron a 121 °C durante 25 minutos. Una vez tibio el medio en los tubos, se vació en las cajas Petri, bajo condiciones de esterilidad.

Tratamiento con extractos de cebolla y sábila 6:3 (p/p). Las cantidades de extractos de cebolla y de sábila requeridas (10,800 mg de extracto de cebolla y 5,400 mg de extracto de sábila), se resuspendieron por separado en 150 mL de agua destilada en matraces Erlenmeyer de 150 mL, los cuales se colocaron en un plato térmico agitador y en el interior de ellos se agregó un agitador magnético (CIMAREC Barnstead | Thermolyne) para homogeneizarlos durante 1 h. Enseguida, los extractos se esterilizaron en el equipo Millipore, de acuerdo con la sección 7.1.12.

La cantidad del medio PDA se calculó con base a las especificaciones del fabricante, descontando la cantidad de agua destilada y estéril en los que se resuspendieron los extractos vegetales. Una vez disuelto el medio PDA, se midieron en una probeta 26 mL del medio y se vaciaron a tubos de ensayo con tapa de baquelita, los que se esterilizaron a 121°C durante 25 minutos. De la mezcla de extractos previamente esterilizados (sección 7.1.12.) se midieron 4 mL y se vaciaron en cada tubo de ensayo que ya contenía 26 mL de medio PDA estéril y tibio. Cada tubo se homogeneizó manualmente y rápidamente se vació en la caja Petri. Así, se completaron los 30 mL del medio PDA para mantener la concentración 6:3 (p/p) de los extractos de cebolla y sábila (**Figura 19**). Todo el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.

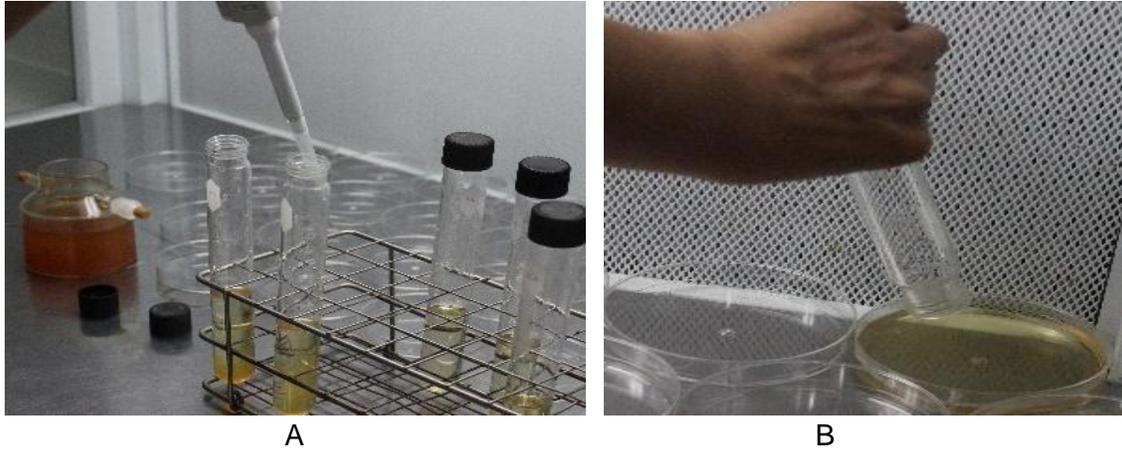


Figura 19. Adición de extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) esterilizados y vaciado en caja Petri. A: toma de 4 mL de la mezcla de extractos vegetales 6:3 (p/p) y agregados a los tubos de ensayo que contienen 26 mL de medio PDA estéril. B: vaciado del tubo con medio PDA que contiene los extractos vegetales.

Tratamientos con AAS 100 μ M. En el agua destilada destinada para preparar el medio de cultivo PDA, se adicionó el AAS en concentración 100 μ M, enseguida se disolvió en un horno de microondas. Después, en una probeta se midieron 30 mL del medio y se vaciaron en tubos de ensayo con tapa de baquelita y se esterilizaron a 121 °C durante 25 minutos. Finalmente, el medio de los tubos de ensayo se vació en las cajas Petri, bajo condiciones de esterilidad.

7.3.5. Inoculación e incubación de las cepas CP-50 y CP-753

A las cajas Petri de los testigos y de los tratamientos, se les inoculó en la parte central un disco de 5 mm de diámetro con micelio previamente desarrollado de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus*, respectivamente. Las cajas Petri se incubaron durante 9 y 11 días en obscuridad a temperatura ambiente en el laboratorio de hongos del COLPOS.

7.3.6. Variables a evaluar

Descripción de las colonias. Se observó la densidad, la textura y la forma colonial en los testigos y en los tratamientos. Se registró el cambio de color en el medio de cultivo o en el micelio, sobre todo en el tratamiento con extractos vegetales.

pH de los extractos, solos y mezclados. Se obtuvieron 6 g de extracto de cebolla y 3 g de extracto de sábila. Cada extracto se resuspendió en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. A ambos matraces se le introdujeron agitadores magnéticos para colocarlos en un plato térmico agitador (CIMAREC Barnstead | Thermolyne), durante 1 h para homogeneizar los extractos. Enseguida, de cada matraz se tomaron tres muestras de 10 mL y se midió el pH en el potenciómetro CONDUCTRONIC pH 120. A continuación, se hizo la mezcla de ambos extractos e igualmente se procedió a medir el pH.

pH inicial, intermedio y final de los testigos y tratamientos. El pH de los testigos y de los tratamientos, se midió en el día 0 (inicial), intermedio y día final cuando el micelio cubrió totalmente al medio de cultivo. En el día 0, la lectura se tomó en la caja Petri que ya contenía el inóculo de 5 cm de diámetro recién colocado. En los días intermedio y final, en la lectura del pH, se utilizó una caja Petri tanto de los testigos como de los tratamientos con el micelio en desarrollo. El procedimiento para la lectura del pH y la temperatura, es similar a lo señalado en la sección 6.3.3.

Área de crecimiento micelial. Diariamente se tomaron fotografías a 3 cajas Petri del testigo y de los tratamientos, que se utilizaron para obtener las muestras (sobrenadantes), durante 9 u 11 días. El área micelial se midió con el programa de cómputo ImageJ (National Institutes of Health, ver. 2012) (sección 6.3.2.).

Evaluación volumétrica de las lacasas. La determinación de las lacasas se realizó diariamente del día 0 al día 9 u 11 de incubación con la obtención de 3 muestras de los testigos y de los tratamientos (n = 3) (**Figura 4** y secciones 6.4 y 6.5).

Evaluación de proteínas. La determinación de proteínas se realizó en los mismos sobrenadantes que a diario se obtuvieron ($n = 3$). La preparación de materiales, reactivos y equipo de lectura, se describen en la sección 6.6 y **Figura 4**.

7.3.7. Resultados

7.3.8. Variables evaluadas en tratamientos con extractos vegetales y AAS

Descripción de las colonias. En el testigo como en los tratamientos, la cara superior del micelio de la cepa CP-50 fue de color blanco, con densidad abundante, textura algodonosa, forma colonial regular con zonas concéntricas diferenciadas. La cara inferior del micelio en el testigo y en el tratamiento con AAS fue blanco grisáceo. En el tratamiento con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p), el micelio en la cara inferior tomó un color rojo (**Figura 20**).

pH de los extractos solos y mezclados. pH inicial, intermedio y final del testigo y tratamientos. Los valores de los pH determinados, se presentan en las **Tablas 20 y 21**.

Área de crecimiento micelial. El crecimiento del micelio fue similar en el testigo y en los dos tratamientos a partir del día 1 al día 5. Después, los micelios con el AAS y el testigo, se desarrollaron de manera similar hasta el día 11 y ambos superaron significativamente al tratamiento con los extractos vegetales (**Figura 21**).

El desarrollo micelial del tratamiento con AAS superó al micelio del testigo en el día 7 con 18.3%, mientras que en el resto de los días, los porcentajes oscilaron entre 3.7% y 7.7%. El desarrollo micelial del testigo superó significativamente al desarrollo del micelio del extracto de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p) en el día 8 con 43.9% y para los días 9, 10 y 11, los porcentajes oscilaron entre 26.5% y 39.1%. Al comparar el desarrollo micelial del tratamiento con AAS con el tratamiento con extractos de cebolla y sábila en proporción 3:6 (p/p), éste último fue ampliamente superado a partir del día 7 al día 11 con valores entre 38.4% a 43.8%.

Tabla 20. Valores de pH de los extractos de la cebolla (*Allium cepa*) y de la sábila (*Aloe vera*) de manera individual y mezclados en proporción 6:3 (p/p).

Extracto	pH	Temperatura °C
Cebolla	3.85	23.5
Sábila	2.45	23.2
Mezcla de extractos de cebolla y sábila 6:3 (p/p).	2.58	23.5

Tabla 21. Valores de pH obtenidos en el cultivo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio PDA (Difco), adicionado con AAS 100 μ M o con extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) durante el inicio de la siembra (0), día 5 y día 11.

Día de muestreo	Tratamiento	pH	Temperatura °C
0	Testigo	5.57	23.3
	AAS 100 μ M	5.60	23.1
	Extracto 6:3 (p/p)	4.33	23.1
5	Testigo	5.9	20.4
	AAS 100 μ M	5.30	21.6
	Extracto 6:3 (p/p)	4.23	21.3
11	Testigo	6.8	24.6
	AAS 100 μ M	6.58	25.9
	Extracto 6:3 (p/p)	4.46	23.3

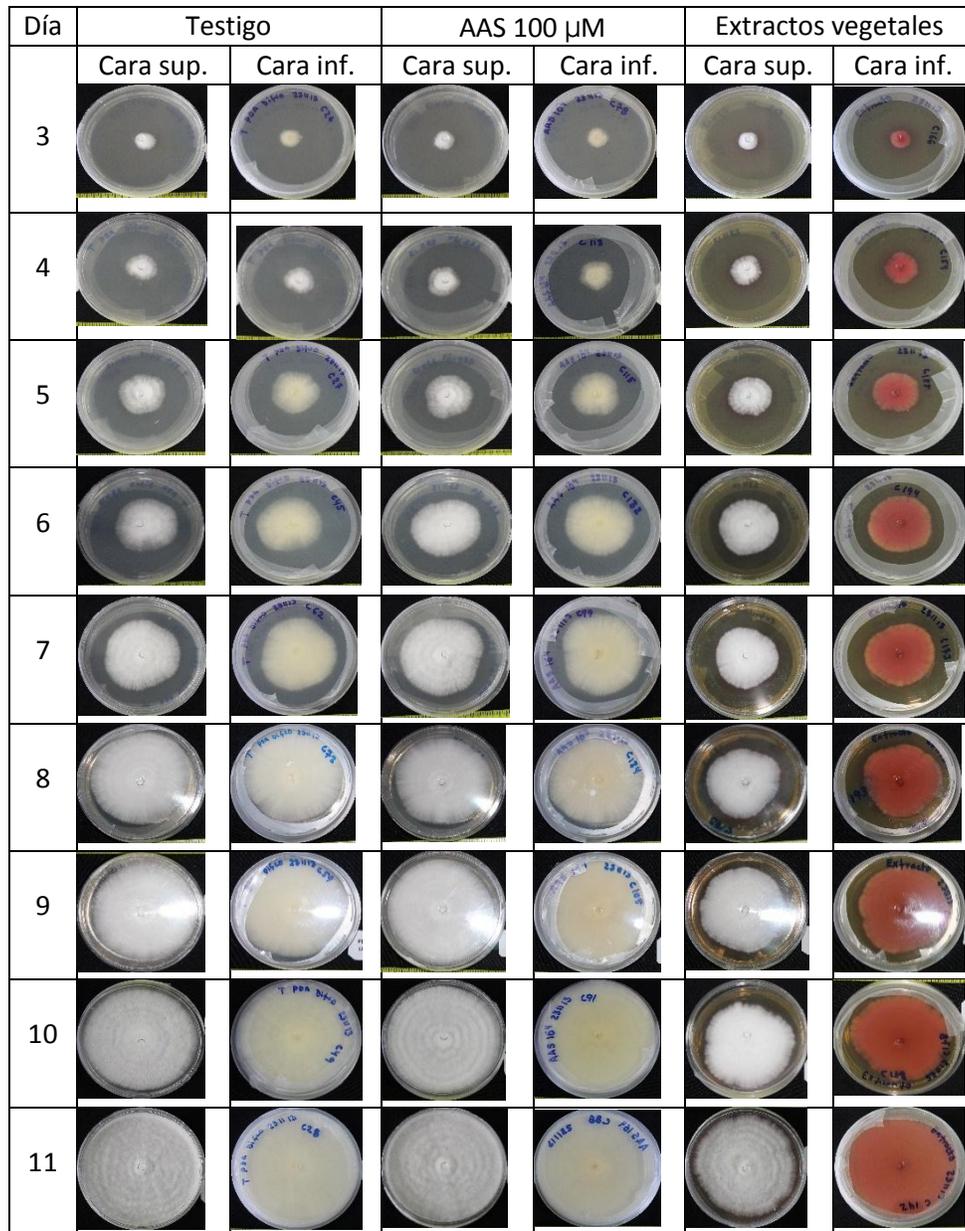
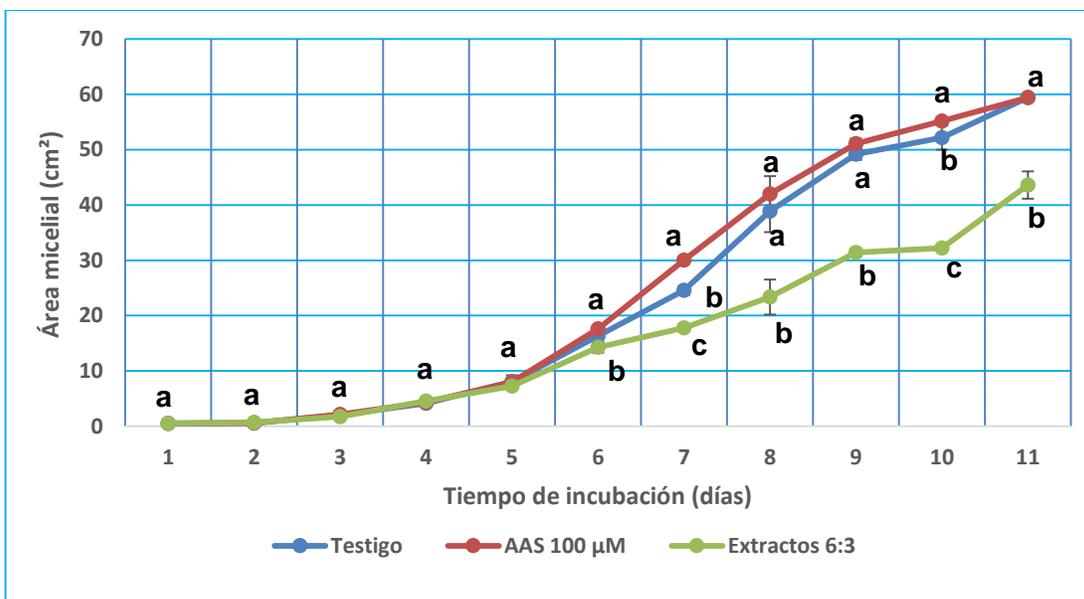


Figura 20. Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, cultivada en PDA (Difco) durante 11 días de incubación a temperatura ambiental entre 21 °C y 24 °C y en oscuridad, con adición de AAS 100 μ M o con extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p).



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Testigo	0.5 ± 0 a	0.6 ± 0 a	2 ± 0 a	4.1 ± 0.1 a	8 ± 1.2 a	16.4 ± 1.2 ab	24.5 ± 0.9 b	38.9 ± 3.8 a	49.2 ± 1 a	52.2 ± 2.1 b	59.4 ± 0 a
AAS 100 µM	0.5 ± 0 a	0.6 ± 0.1 a	2.1 ± 0.1 a	4.3 ± 0.3 a	8 ± 0 a	17.6 ± 0.5 a	30 ± 0.4 a	42 ± 3.2 a	51.1 ± 0.9 a	55.2 ± 0.5 a	59.4 ± 0 a
Extractos 6:3	0.5 ± 0 a	0.7 ± 0 a	1.7 ± 0.3 a	4.5 ± 0.4 a	7.3 ± 0.4 a	14.3 ± 0.9 b	17.8 ± 0.6 c	23.4 ± 3.2 b	31.4 ± 0.7 b	32.2 ± 0.4 c	43.6 ± 2.5 b

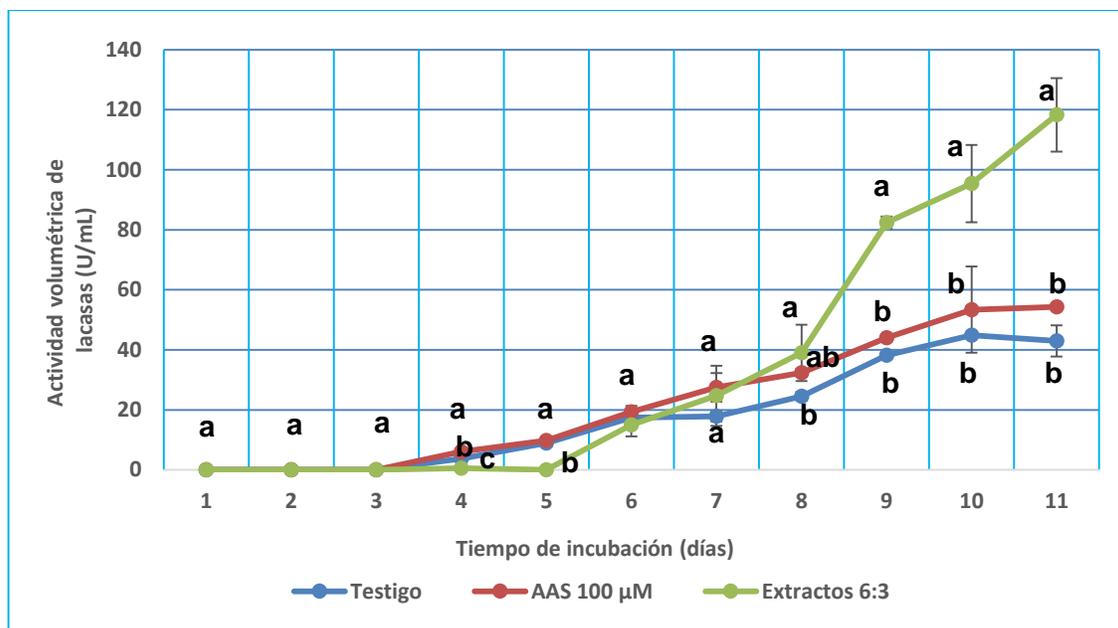
Figura 21. Efecto del AAS 100 µM y de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) en el área micelial (cm²) en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.

Actividad volumétrica de lacasas. Los valores de la actividad volumétrica de las lacasas fueron evidentes en el testigo y en el tratamiento con AAS a partir del día 4 de incubación, mientras que en el tratamiento con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p) se produjeron a partir del día 6. Los valores del testigo en el día 4

fueron de 3.7 ± 0.6 U/mL, que se incrementaron al día 10 con un valor máximo de 44.9 ± 0.8 U/mL. El tratamiento con AAS al día 4, presentó 6.1 ± 1.3 U/mL y para el día 11 mostró su máximo valor con 54.3 ± 1 U/mL. El tratamiento con los extractos vegetales presentó al día 6 de incubación un valor de 15 ± 3.9 U/mL que se incrementó al día 11 hasta alcanzar 118.3 ± 12.2 U/mL, cantidad que fue significativamente mayor a aquellas de los valores del testigo y del tratamiento con AAS (**Figura 22**).

El tratamiento con los extractos vegetales, superó al testigo en los días 6 y 7 con 4.8% y 8.6%, respectivamente, y en el día 8 fue ligeramente superado por el testigo; sin embargo en los días 9, 10 y 11, los porcentajes de los extractos vegetales nuevamente fueron superiores a los del testigo con 53% a 63.9%. También el tratamiento con los extractos vegetales fue superior al tratamiento con AAS a partir del día 8 hasta el día 11 con 16.8% a 54.5%. Por lo tanto, el tratamiento con extracto de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p) superó al testigo y al tratamiento con AAS en los últimos 4 días de la experimentación con porcentajes mayores al 50%.

Al comparar sólo los valores del tratamiento con AAS, se encontró que éstos tienen diferencias significativas a partir del día 7 de incubación, con respecto a aquellos valores del testigo. El tratamiento con AAS superó al testigo en el día 7 con 35.3%, el cual disminuyó en los días 9 y 11 con 13.2% y 20.7%, respectivamente. Esto corrobora que el AAS100 μ M es un buen inductor para la producción de las enzimas lacasas (**Cuadro anexo a la Figura 22**).



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Testigo	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	3.7 ± 0.6 b	8.9 ± 0.2 a	17.4 ± 1.5 a	17.8 ± 1.7 a	24.5 ± 1.5 b	38.2 ± 0.9 b	44.9 ± 0.8 b	43 ± 5.2 b
AAS100 µM	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	6.1 ± 1.3 a	9.8 ± 1 a	19.3 ± 2 a	27.5 ± 4.8 a	32.4 ± 1.3 ab	44 ± 0.5 b	53.4 ± 14.4 b	54.3 ± 1 b
Extractos 6:3 (p/p)	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0.5 ± 0 c	0 ± 0 b	15 ± 3.9 a	24.7 ± 10 a	39 ± 9.4 a	82.4 ± 2 a	95.4 ± 12.9 a	118.3 ± 12.2 a

Figura 22. Efecto del AAS 100 µM y de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.

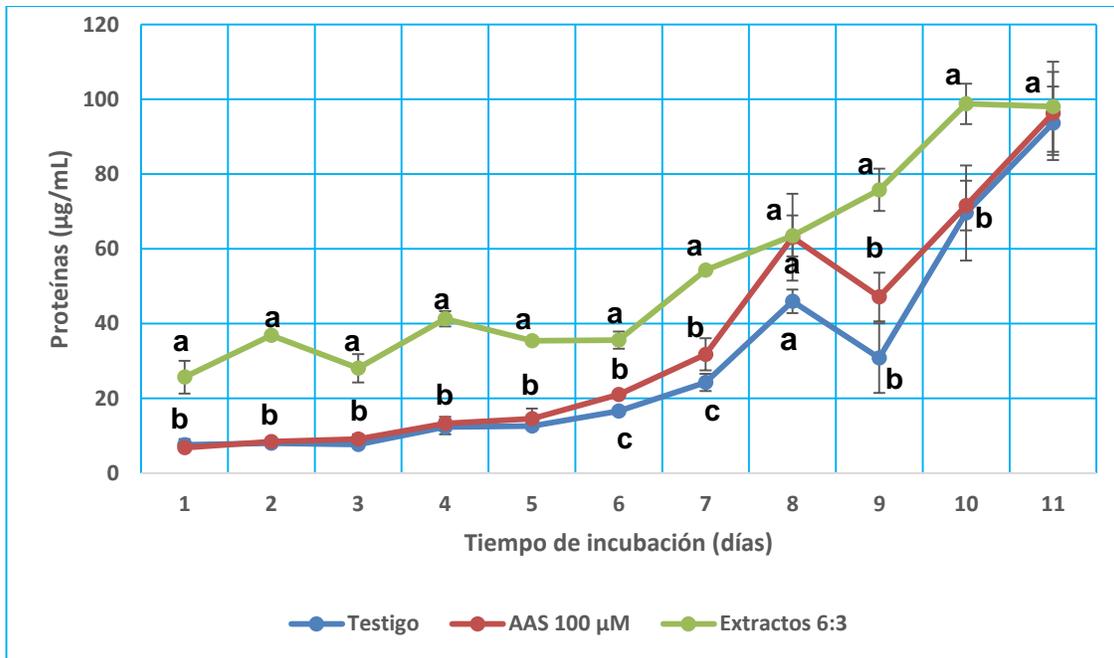
Cuadro comparativo entre los valores del testigo y aquellos valores del tratamiento con AAS. Hubo efecto positivo en el tratamiento con AAS, ya que mostró diferencias significativas en la producción de la enzima lacasa con respecto a aquella del testigo.

Tratamientos	Tiempo de incubación (días)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Testigo	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	3.7 ± 0.6 b	8.9 ± 0.2 a	17.4 ± 1.5 a	17.8 ± 1.7 b	24.5 ± 1.5 b	38.2 ± 0.9 b	44.9 ± 0.8 a	43 ± 5.2 b
AAS100 µM	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	6.1 ± 1.3 a	9.8 ± 1 a	19.3 ± 2 a	27.5 ± 4.8 a	32.4 ± 1.3 a	44 ± 0.5 a	53.4 ± 14.4 a	54.3 ± 1 a

Producción de proteínas. La producción de proteínas se manifestó en el testigo y en los tratamientos a partir del día 1 de incubación. Los valores alcanzados por el tratamiento con extracto de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p), fueron significativamente mayores que los logrados por el testigo y por el tratamiento con AAS, excepto en los días 8 y 11, en donde no hubo diferencias estadísticas entre ellos. El valor inicial del tratamiento con los extractos vegetales fue de $25.7 \pm 4.4 \mu\text{g/mL}$ y para el día 10 fue de $98.8 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$, con descensos en los días 3, 5 y 6. Los valores del testigo y del tratamiento con AAS fueron similares estadísticamente y solo en los días 6 y 7 hubo diferencias significativas, siendo mejor el tratamiento con AAS. Los valores iniciales del testigo fueron de $7.6 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ y los del tratamiento con AAS fueron de $6.9 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$, mientras que los valores al día 10 de ambos fueron de $69.6 \pm 12.7 \mu\text{g/mL}$ y $71.6 \pm 6.7 \mu\text{g/mL}$ con un descenso muy marcado en el día 9, cuyos valores fueron de $30.8 \mu\text{g/mL}$ y $47.1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el día 11 de incubación, los valores fueron mayores a $90 \mu\text{g/mL}$ tanto en el testigo como en los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 23**).

El resultado del ANOVA mostró de manera general, que el mejor tratamiento en la producción de proteínas fue el extracto de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p) seguido por el tratamiento con AAS $100 \mu\text{g/mL}$ y al último el testigo.

En la evaluación del efecto de los tratamientos con respecto al testigo, el tratamiento con AAS $100 \mu\text{M}$ lo superó durante los días del 5 al 9 con 13.8% a 34.7%, mientras que el tratamiento con extractos vegetales, lo superó desde el día 1 hasta el día 9 con valores de 78.3% a 59.4% que disminuyeron en los días 10 y 11 con 20.1% y 4.5%, respectivamente. Por otra parte, el tratamiento con extractos vegetales superó al tratamiento con AAS entre el día 1 al día 4 con valores de 77% a 67.6%, que a partir del día 5 disminuyeron de 58.8% al día 11 con un valor de 1.8%.



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Testigo	7.6 ± 1.6 b	8 ± 0.4 b	7.7 ± 0.7 b	12.4 ± 2 b	12.6 ± 0.8 b	16.6 ± 0.9 c	24.3 ± 2.3 c	46 ± 3.2 a	30.8 ± 9.3 b	69.6 ± 12.7 b	93.6 ± 9.8 a
AAS 100 µM	6.9 ± 0.7 b	8.5 ± 0.7 b	9.1 ± 1.3 b	13.3 ± 1.8 b	14.6 ± 2.7 b	21.0 ± 0.7 b	31.8 ± 4.3 b	63.1 ± 11.6 a	47.1 ± 6.5 b	71.6 ± 6.7 b	96.2 ± 11.1 a
Extractos 6:3 (p/p)	25.7 ± 4.4 a	36.9 ± 0.7 a	28.1 ± 3.8 a	41.3 ± 2 a	35.4 ± 0.9 a	35.6 ± 2.3 a	54.3 ± 0.7 a	63.5 ± 5.5 a	75.8 ± 5.7 a	98.8 ± 5.4 a	98 ± 12 a

Figura 23. Efecto del AAS 100 µM y de los extractos de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en proporción 6:3 (p/p) en la producción de proteínas en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 21 °C y 24 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.

7.3.9. Variables evaluadas en tratamientos con AAS en las cepas CP-50 y CP-753

Descripción de las colonias. En la cepa CP-50, el testigo y en el tratamiento, la cara superior del micelio fue de color blanco, con densidad abundante, textura algodonosa, forma colonial regular con zonas concéntricas diferenciadas. La cara inferior del micelio en el testigo y en el tratamiento con AAS fue blanco grisáceo.

En la cepa CP-753 tanto en el testigo como en el tratamiento, la cara superior del micelio fue de color blanco grisáceo con pequeñas pigmentaciones amarillentas en la parte central de la colonia, con densidad abundante, textura algodonosa, forma colonial regular con zonas concéntricas; la cara inferior fue blanco grisácea (**Figura 24**).

pH inicial, intermedio y final de los testigos y tratamientos. En ambas cepas, los valores de pH al transcurrir los días de incubación, se fueron incrementando hasta ser cercanos al pH neutro, mayormente en los testigos sin la adición del AAS. Estos valores se presentan en la **Tabla 22**.

Área de crecimiento micelial. En la cepa CP-50, el crecimiento del micelio fue similar en el testigo y en el tratamiento durante todo el tiempo de incubación, excepto en el día 2, en donde el AAS mostró diferencias significativas con respecto al testigo. En la cepa CP-753, el desarrollo micelial del tratamiento con AAS tuvo diferencias significativas con respecto al testigo, al cual superó en los días 6 y 8 de incubación con 20.83% y 10.64%, respectivamente (**Figuras 25 y 26**).

En ambas cepas, el micelio cubrió al medio de cultivo PDA a los 10 días de incubación, con un área micelial de 59.4 cm².

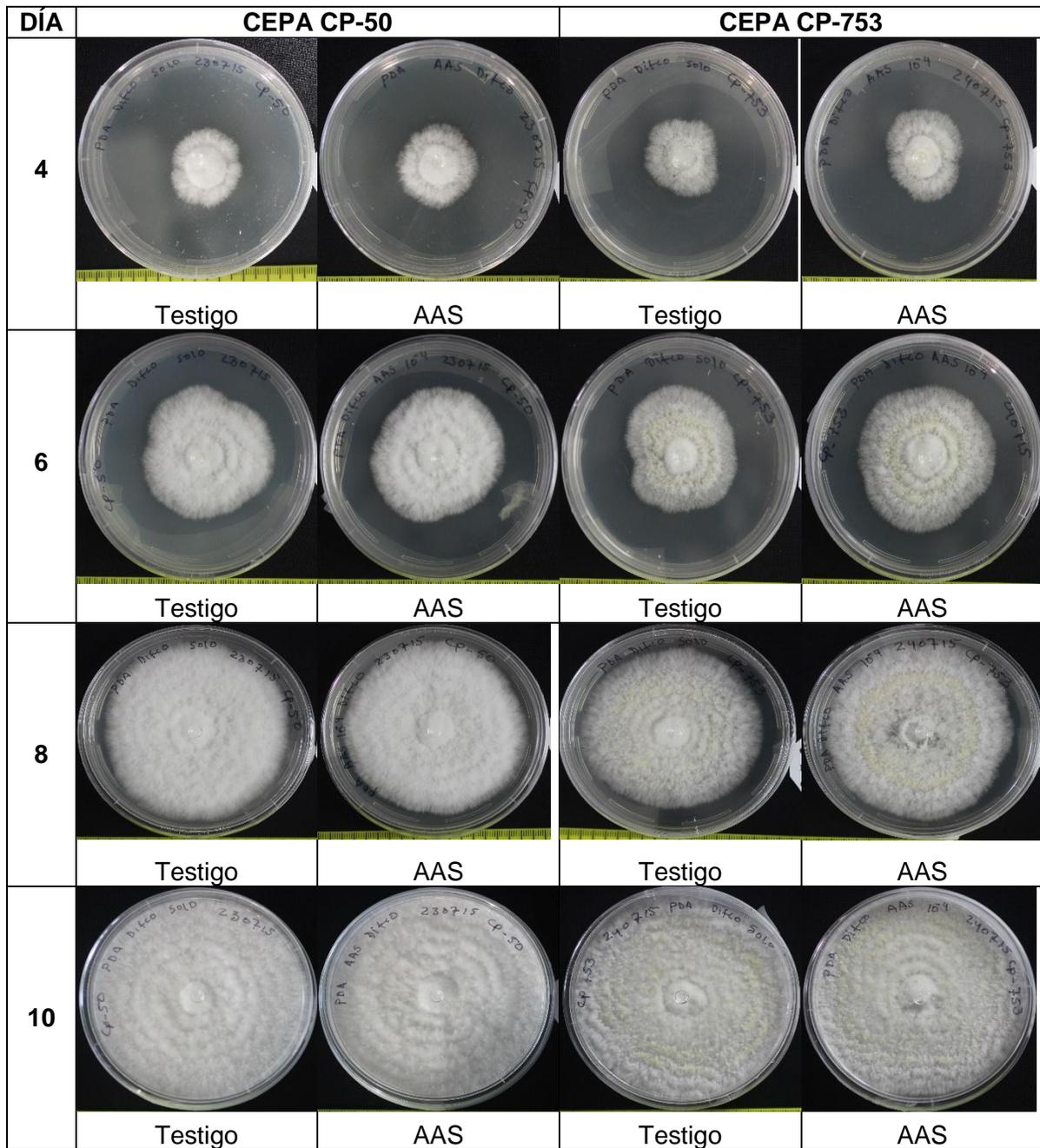
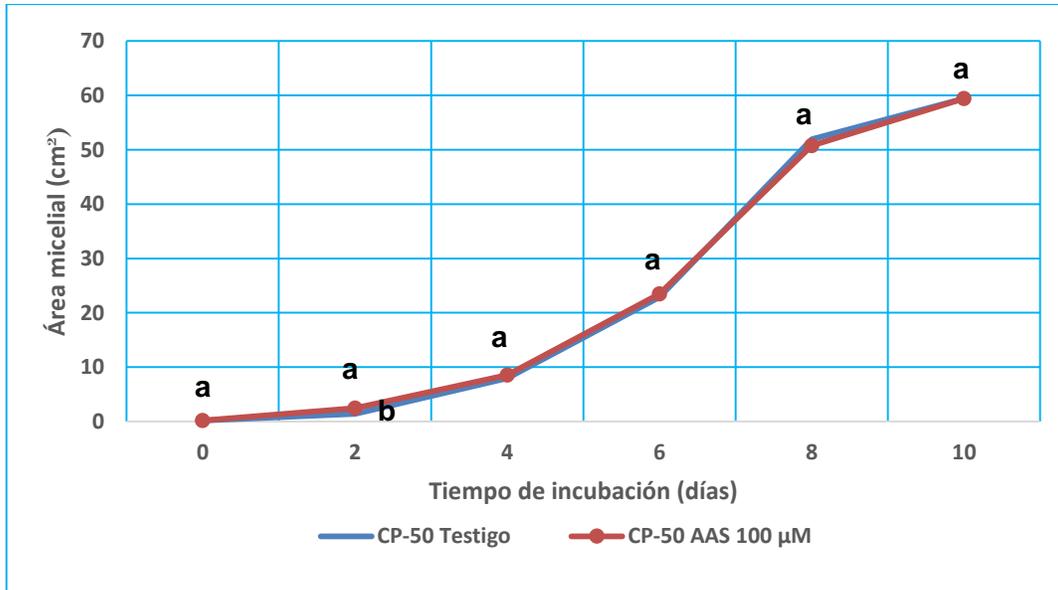


Figura 24. Desarrollo micelial de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus*, cultivadas en PDA (Difco) durante 10 días de incubación a temperatura ambiental entre 25 °C y 27 °C y en oscuridad, con adición de AAS 100 µM.

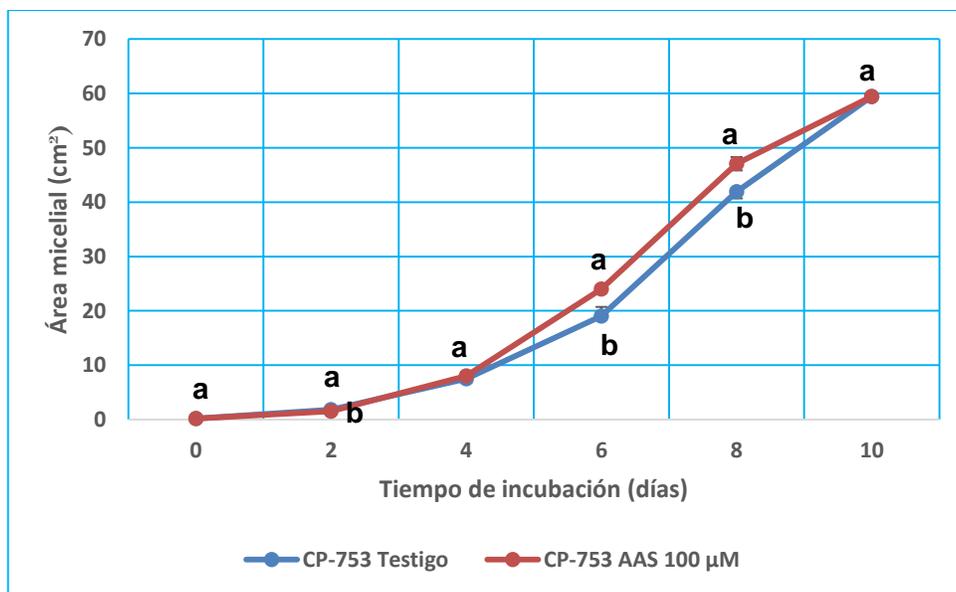
Tabla 22. Valores de pH obtenidos en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en medio PDA (Difco), adicionado con AAS 100 μM durante el inicio de la siembra (día 0), día 6 y día 10 de incubación.

Día	Tratamientos	pH	Temperatura °C
0	CP-50 Testigo	5.9	23.1
	CP-50 AAS 100 μM	5.79	23.3
	CP-753 Testigo	5.9	23.3
	CP-753 AAS 100 μM	5.8	23.3
6	CP-50 Testigo	6.6	24.2
	CP-50 AAS 100 μM	6.47	24.7
	CP-753 Testigo	6.56	25.2
	CP-753 AAS 100 μM	6.09	24.8
10	CP-50 Testigo	6.81	25.3
	CP-50 AAS 100 μM	6.76	25.2
	CP-753 Testigo	6.94	25.8
	CP-753 AAS 100 μM	6.13	25.4



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-50 Testigo	0.19±0 a	1.4±0.08 b	8±0.5 a	22.9±0.9 a	51.9±0.5 a	59.4±0 a
CP-50 AAS 100 µM	0.19±0 a	2.5±0.2 a	8.6±0.07 a	23.5±0.4 a	50.8±0.6 a	59.4±0 a

Figura 25. Efecto del AAS 100 µM en el área micelial (cm²) de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en oscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.



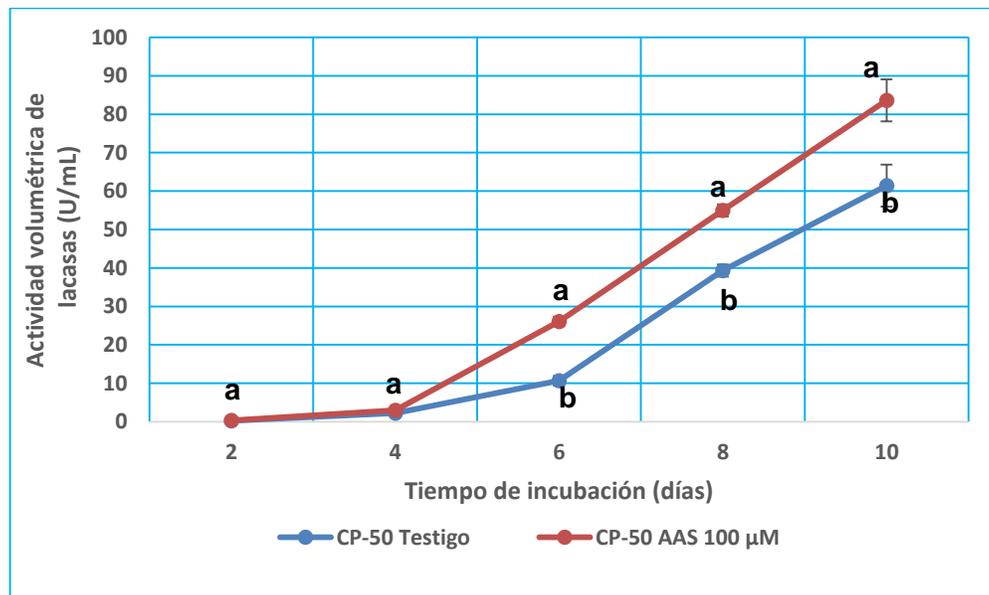
Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-753 Testigo	0.19±0 a	1.8±0.05 a	7.5±0.2 a	19±1.7 b	42±0.6 b	59.4±0 a
CP-753 AAS 100 µM	0.19±0 a	1.5±0.02 b	8±0.7 a	24±0.7 a	47±1.2 a	59.4±0 a

Figura 26. Efecto del AAS 100 µM en el área micelial (cm²) de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en oscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con n = 3.

Actividad volumétrica de lacasas. En la cepa CP-50, el tratamiento con AAS presentó valores estadísticamente superiores a aquellos del testigo a partir del día 6 hasta el día 10 de incubación, con un máximo de 83.6 ± 7.1 U/mL, mientras que en el testigo el valor máximo fue de 61.4 ± 8.7 U/mL (**Figura 27**). El tratamiento con AAS superó al testigo en el día 6 con 59%, el cual disminuyó en los días 8 y 10 con 28.55% y 26.56%, respectivamente.

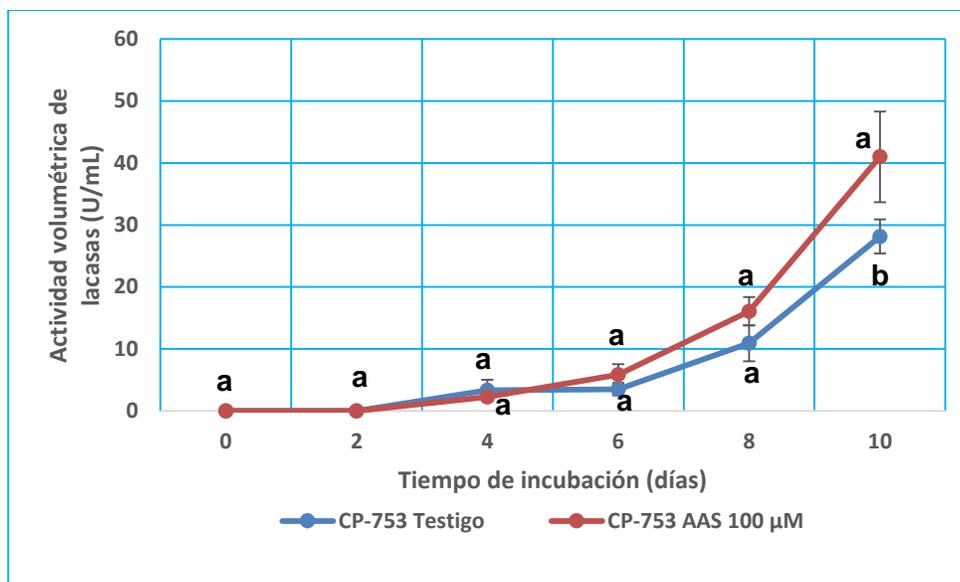
En la cepa CP-753, los valores de las lacasas se presentaron a partir del día 4 de incubación. El tratamiento con AAS, mostró valores numéricos superiores al testigo desde el día 4 al día 8 de incubación, mientras que al día 10, los valores fueron significativamente superiores a aquellos del testigo con 41 U/mL y 28.2 U/mL,

respectivamente (**Figura 28**). El tratamiento con AAS, superó al testigo en el día 10 de incubación con 31.2%.



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-50 Testigo	0	0.2±0.1 a	2.3±1.2 a	10.7±1.6 b	39.3±5.5 b	61.4±8.7 b
CP-50 AAS 100 µM	0	0.4±0.2 a	3±0.7 a	26.1±4 a	55±1.5 a	83.6±7.1 a

Figura 27. Efecto del AAS 100 µM en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$.



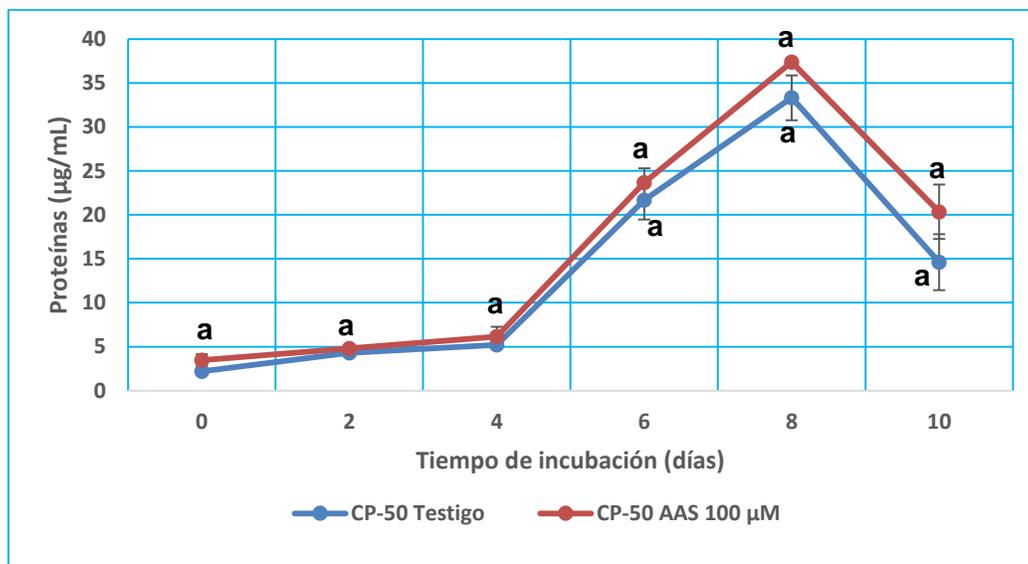
Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-753 Testigo	0 a	0 a	3.3±1.7 a	3.5±1 a	10.9±3 a	28.2±2.8 b
CP-753 AAS 100 µM	0 a	0 a	2.2±0.5 a	5.9±1.7 a	16±2.3 a	41±7.3 a

Figura 28. Efecto del AAS 100 µM en la actividad volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$.

Producción de proteínas. En la cepa CP-50, los valores en la producción de proteínas fueron estadísticamente similares entre el testigo y el tratamiento con AAS. Los valores máximos se presentaron en los días 6 y 8 de incubación con 21.7 ± 2.2 µg/mL en el testigo y 23.7 ± 1.6 µg/mL en el tratamiento, y con 33.3 ± 2.6 µg/mL en el testigo y 37.4 ± 0.3 µg/mL en el tratamiento, respectivamente. Para el día 10 de incubación, los valores descendieron a 14.6 ± 3.2 µg/mL en el testigo y a 20.4 ± 3.1 µg/mL en el tratamiento (**Figura 29**).

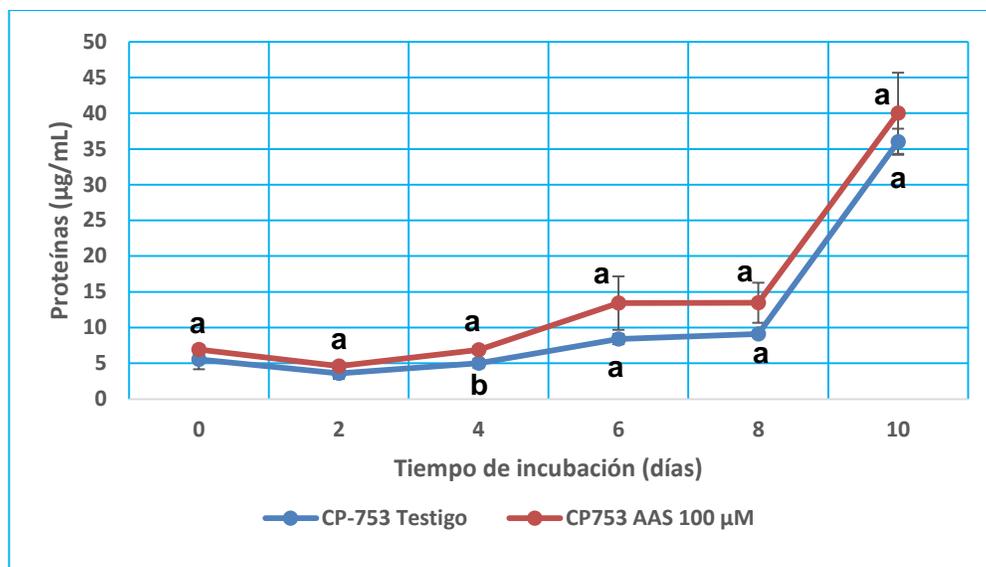
En la cepa CP-753, los valores del testigo y del tratamiento con AAS fueron similares estadísticamente, excepto en el día 4 de incubación, en donde los valores del tratamiento

con AAS fueron significativamente superiores a aquellos del testigo con $6.9 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ y con $5 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los máximos valores numéricos se presentaron en el día 10 de incubación con $36 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ para el testigo y con $40 \pm 5.7 \mu\text{g/mL}$ para el tratamiento (**Figura 30**).



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-50 Testigo	2.2±0.4 a	4.3±0.4 a	5.2±0.4 a	21.7±2.2 a	33.3±2.6 a	14.6±3.2 a
CP-50 AAS 100 µM	3.5±0.7 a	4.8±0.1 a	6.1±1.1 a	23.7±1.6 a	37.4±0.3 a	20.4±3.1 a

Figura 29. Efecto del AAS 100 µM en la producción de proteínas en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en oscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$.



Tratamientos	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	4	6	8	10
CP-753 Testigo	5.6±1.4 a	3.6±0.8 a	5±0.6 b	8.4±0.7 a	9.1±0.3 a	36±1.8 a
CP753 AAS 100 µM	6.9±0.6 a	4.6±0.6 a	6.9±0.5 a	13.4±3.8 a	13.5±2.8 a	40±5.7 a

Figura 30. Efecto del AAS 100 µM en la producción de proteínas en la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus*, desarrollada en PDA Difco entre 25 °C y 27 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Se realizó el ANOVA y la separación de medias, de acuerdo a Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 3$.

7.3.10. Discusión

El crecimiento del micelio fue prácticamente similar en el testigo y en el tratamiento con AAS en la cepa CP-50, pero ambos superaron significativamente al tratamiento con los extractos vegetales. Sin embargo, en la segunda etapa del cultivo, el desarrollo micelial el AAS tuvo efecto positivo en la cepa CP-753 en los días 6 y 8 de incubación, mientras que en la cepa CP-50 no hubo efecto positivo con la adición del AAS.

Es probable que el desarrollo micelial de la cepa CP-50 en el tratamiento con extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) haya sido afectado por los compuestos de saponinas presentes en los extractos (Lanzotti *et al.*, 2012). La producción de lacasas en este tratamiento se presentó a partir del día 6 de incubación; al parecer esto se debió a una etapa de adaptación del micelio. Esto aunado a los compuestos fenólicos presentes en

los extractos de cebolla y sábila que actuaron como inductores (Prakash *et al.*, 2007; Chinchinilla *et al.*, 2013).

Por otra parte, el crecimiento micelial del tratamiento con los extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) fue más lento que el de aquellos del tratamiento con AAS y del testigo; sin embargo, registró los más altos valores en la producción volumétrica de las lacasas. Esto coincide con lo reportado por Flores *et al.* (2009) quienes realizaron un cultivo dual con la cepa CP-50 de *P.ostreatus* y una cepa de *Trichoderma* sp. en medio PDA, en donde no hubo correlación entre el crecimiento micelial y la agresividad de *Trichoderma* sp. en la producción de lacasas.

Al comparar los valores en la actividad volumétrica de las lacasas entre las cepas CP-50 y CP-753, se encontró que la cepa CP-50 mostró los valores más altos en el tratamiento con AAS, con respecto al testigo, en donde se presentó una diferencia significativa a partir del día 6 de incubación. Mientras que en la cepa CP-753, únicamente hubo diferencia significativa en el día 10 de incubación en el tratamiento con AAS.

Spezia (2012) registró valores inferiores de lacasas a los del presente estudio, entre 3.56 U/mL y 11.68 U/mL en el cultivo de la cepa CP-50 en agar extracto de malta (EMA) con adición de antraceno. En otro estudio bajo condiciones de fermentación sólida utilizando bagazo de caña de azúcar y con la adición de sulfato de amonio, las cepas CP-50 e IE-8 de *P. ostreatus* produjeron menos de 0.01 IU/g de peso seco y 0.04 IU/g de peso seco de lacasas, respectivamente (Membrillo *et al.*, 2008).

Una cepa de *P. ostreatus* se cultivó en fermentación sólida con el residuo del fruto amarillo de la pasión y salvado de trigo, registrando entre 6,040 a 10,200 U/L y 5,900 a 10,900 U/L, respectivamente (Zilly *et al.*, 2012).

Otra cepa de *P. pulmonarius* registró 830 ± 90 U/L en cultivo adicionado con salvado de trigo. Con la adición de la cáscara de piña, registró $1,400 \pm 100$ U/mL; con la adición de bagazo del fruto de la naranja registró $1,800 \pm 160$ U/L y con la adición del residuo del fruto amarillo de la pasión registró $1,600 \pm 180$ U/mL (Bazanella *et al.*, 2013).

Los valores obtenidos de la actividad volumétrica de las lacasas a 11 días de incubación (testigo, con 43 ± 5.2 U/mL; AAS 100 μ M, con 54.3 ± 1.0 U/mL y en los extractos 6:3 (p/p), con 118.3 ± 12.2 U/mL) superaron a la mayoría de aquellos trabajos señalados, inclusive a los valores registrados por Camacho (2013) en el cultivo de la cepa CP-50 en EMA con valores entre 0.22 a 26.25 U/mL, en diferentes días de desarrollo micelial.

En la producción de las proteínas, resulta difícil establecer comparaciones, ya que como en el caso de las lacasas, las condiciones en que se realizó el presente cultivo de la cepa CP-50 y CP-753, son diferentes a otros trabajos. En la producción de proteínas, en ambas cepas tanto en los testigos como en los tratamientos, la adición del AAS, no mostró efectos positivos.

Spezzia (2012) registró 15 μ g/mL en el cultivo de la cepa CP-50 en PDA con adición de antraceno. Membrillo *et al.* (2008) en el cultivo de las cepas CP-50 e IE-8 de *P. ostreatus* en bagazo de caña con adición de sulfato de amonio registraron 0.758 mg/g y 0.630 mg/g en peso seco de proteínas, respectivamente. Por otra parte, Camacho (2013), en el cultivo de la cepa CP-50 en EMA, registró valores finales de proteínas en los testigos entre 32.99 μ g/mL a 49.91 μ g/mL, que son inferiores a los obtenidos en el presente estudio [para los extractos 6:3 (p/p), con 98 ± 12 μ g/mL; para el testigo 93.6 ± 9.8 μ g/mL y para el tratamiento con AAS, 96.2 ± 11.1 μ g/mL].

Finalmente, se realizó la correlación lineal entre las variables de estudio, como fue la comparación entre el área micelial y las lacasas, área micelial y proteínas, y las lacasas con proteínas. En la mayoría de las comparaciones, hubo correlación altamente significativa y positiva con $\alpha = 0.01$ (**Anexo 3**).

Los valores en tablas para determinar la significancia estadística de la correlación con $n = 9$ (tratamientos con extractos vegetales y AAS), son para $\alpha 0.05 = 0.602$ y para $\alpha 0.01 = 0.735$. Los valores en tablas para determinar la significancia estadística de la correlación con $n = 4$ (tratamientos con las cepas CP-50 y CP-753), son para $\alpha 0.05 = 0.811$ y para $\alpha 0.01 = 0.917$.

8. DISCUSIÓN GENERAL

En la Fase I, fue importante que los bulbos de la cebolla y plantas de la sábila procedieran de un mismo lote. Así mismo, fue determinante la construcción del módulo de herrería para la buena deshidratación del material vegetal.

A pesar de que no se tienen datos comparativos, se considera que hubo un buen rendimiento de los extractos vegetales. De 1000 g de bulbos húmedos de cebolla o de 1000 g de la hoja fresca de sábila, se obtuvieron en promedio 12.05 ± 0.34 g y 11.36 ± 1.91 g de extractos, respectivamente.

Con respecto a la Fase II, se planteó en la primera hipótesis que los extractos de cebolla y sábila tienen efecto sobre el desarrollo micelial de *T. aggressivum* en cultivo dual con *P. ostreatus*.

Lo anterior se comprobó, ya que los extractos vegetales estimularon el desarrollo micelial tanto en la cepa CP-50 como en la cepa CPM-113 en el cultivo dual. Los valores del área micelial en los tratamientos con los extractos vegetales, fueron significativamente superiores a aquellos de los testigos. Este efecto, se relaciona con los metabolitos y compuestos fenólicos presentes en la cebolla y en la sábila (Soininen *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2007; Ahlawat y Khatkar, 2011; Chinchilla *et al.*, 2013), al presentar diversas proteínas, vitaminas, potasio y los polisacáridos fructosa y sacarosa; así como péptidos, aceites esenciales, antocianinas, flavonoides y antioxidantes (Yang *et al.*, 2004; Shon *et al.*, 2004; Downes *et al.*, 2009). Como consecuencia de esto, se sostiene la hipótesis planteada.

Por otro lado, los resultados de esta Fase II no coinciden con el trabajo de Reyes (2013), quien señaló que los extractos de la cebolla y de la sábila inhiben el desarrollo micelial de la cepa CPM-113 de *T. aggressivum*. Esto puede deberse al origen y lote de las plantas de sábila, la manera en que se realizó la deshidratación de la cebolla y de la sábila, el medio de cultivo empleado, la época en que se obtuvieron los extractos y las condiciones de incubación de las cepas, entre otras causas. Se debe recordar que los

organismos presentan variabilidad en uno u otro aspecto, ya que una misma especie, bajo condiciones similares puede presentar comportamientos diferentes.

En la Fase III, en el cultivo de la cepa CP-50 con los tratamientos de extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) y con AAS en concentración 100 μ M, el crecimiento del micelio, fue prácticamente similar en el testigo y en el tratamiento con AAS, y ambos superaron significativamente el crecimiento micelial del tratamiento con extractos vegetales.

Probablemente en los primeros días de incubación, el micelio desarrollado en los extractos vegetales fue estimulado por las vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, presentes en la cebolla y en la sábila, pero en los siguientes días, se vio afectado por las saponinas presentes en la sábila (Lanzotti *et al.*, 2012). Sin embargo, este tratamiento registró los valores más elevados en la producción de lacasas y proteínas, lo que se atribuye a la presencia de los compuestos fenólicos en los extractos de cebolla y sábila que actuaron como inductores (Prakash *et al.*, 2007; Chinchinilla *et al.*, 2013).

En la segunda etapa en el cultivo de las cepas CP-50 y CP-753 con la adición del AAS 100 μ M, hubo efecto positivo únicamente sobre el desarrollo micelial en la cepa CP-753 en los días 6 y 8 de incubación.

Al comparar los valores en la actividad volumétrica de las lacasas entre las cepas CP-50 y CP-753, se encontró que la cepa CP-50 mostró los valores más altos en el tratamiento con AAS con respecto al testigo, en donde hubo diferencia significativa a partir del día 6 de incubación. Mientras que en la cepa CP-753, únicamente hubo diferencia significativa en el día 10 de incubación en el tratamiento con AAS, con respecto al testigo.

Es probable que el AAS al ser absorbido por el micelio y ya dentro de las hifas, tenga algún impacto en uno o varios compuestos, que participan en la producción de las lacasas.

Por lo tanto, los extractos de cebolla y sábila, y el AAS actuaron como inductores capaces de incrementar la producción de lacasas, y además, es probable que haya habido un incremento en la producción de otras enzimas lignilolíticas (no determinadas).

Spezzia (2012) registró valores inferiores de lacasas a los del presente estudio, entre 3.56 U/mL y 11.68 U/mL en el cultivo de la cepa CP-50 en agar extracto de malta (EMA) con adición de antraceno. En otro estudio bajo condiciones de fermentación sólida utilizando bagazo de caña de azúcar y con la adición de sulfato de amonio, las cepas CP-50 e IE-8 de *P. ostreatus* produjeron menos de 0.01 IU/g de peso seco y 0.04 IU/g de peso seco de lacasas, respectivamente (Membrillo *et al.*, 2008).

Una cepa de *P. ostreatus* se cultivó en fermentación sólida con el residuo del fruto amarillo de la pasión y salvado de trigo, registrando entre 6,040 U/L a 10,200 U/L y 5,900 U/L a 10,900 U/L, respectivamente (Zilly *et al.*, 2012).

Los valores obtenidos en el presente estudio de la actividad volumétrica de las lacasas a 11 días de incubación (testigo con 43 ± 5.2 U/mL; AAS 100 μ M con 54.3 ± 1.0 U/mL y en los extractos 6:3 (p/p), con 118.3 ± 12.2 U/mL) superaron a la mayoría de aquellos trabajos señalados, inclusive a los valores registrados por Camacho (2013) en el cultivo de la cepa CP-50 en EMA adicionado con antraceno, en donde mostró valores entre 0.22 a 26.25 U/mL, en diferentes días de desarrollo micelial.

En la producción de las proteínas, resulta difícil establecer comparaciones, ya que como en el caso de las lacasas, las condiciones en que se realizó el presente cultivo de la cepa CP-50 y CP-753, son diferentes a otros trabajos. En la producción de proteínas, en ambas cepas tanto en los testigos como en los tratamientos, la adición del AAS, no mostró efectos positivos.

Spezzia (2012) registró 15 μ g/mL de proteínas en el cultivo de la cepa CP-50 en PDA con adición de antraceno. Membrillo *et al.* (2008) en el cultivo de las cepas CP-50 e IE-8 de *P. ostreatus* en bagazo de caña con adición de sulfato de amonio registraron 0.758 mg/g y 0.630 mg/g en peso seco de proteínas, respectivamente. Por otra parte, Camacho (2013), en el cultivo de la cepa CP-50 en EMA, registró valores finales de proteínas en los testigos entre 32.99 μ g/mL y 49.91 μ g/mL, que son inferiores a los obtenidos en el presente estudio [para los extractos 6:3 (p/p), con 98 ± 12 μ g/mL; para el testigo 93.6 ± 9.8 μ g/mL y para el tratamiento con AAS, 96.2 ± 11.1 μ g/mL].

Por lo que respecta a la segunda hipótesis planteada, hubo diferencias en el desarrollo micelial, en la producción de lacasas entre los tratamientos con los extractos vegetales en proporción 6:3, así como en los tratamientos con AAS 100 μM . Además, de que no hubo efecto en todos los tratamientos en la producción de proteínas, por lo que, la hipótesis no se sostiene.

Finalmente, en la correlación lineal entre las variables de estudio, como fue la comparación entre el área micelial y las lacasas, área micelial y proteínas, y las lacasas con proteínas, en la mayoría de las comparaciones, hubo correlación significativa y positiva con $\alpha = 0.05$.

9. CONCLUSIONES

- 1) Por primera vez se obtuvieron y aplicaron extractos de cebolla y sábila en las proporciones 3:6 (p/p) y 6:3 (p/p) en el cultivo dual de las cepas CPM-113 de *T. aggressivum* y CP-50 de *P. ostreatus* en el medio PDA. El efecto de los extractos fue estimular el desarrollo micelial en ambas cepas.
- 2) Por primera vez se realizó el cultivo de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el medio PDA con adición de extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) y con la adición de ácido acetilsalicílico en concentración 100 μ M.
- 3) Se estableció la comparación de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus*, al cultivarlas en medio PDA (Difco) con adición de ácido acetilsalicílico en concentración 100 μ M en donde se reafirmó su efecto, mayormente en la producción de lacasas y en mínima parte en el desarrollo micelial.
- 4) Los extractos vegetales en proporción 6:3 (p/p) y el ácido acetilsalicílico en concentración 100 μ M, son buenos inductores para incrementar significativamente la producción de lacasas en cepas de *P. ostreatus*.

10. ESTRATEGIA PROPUESTA

Con los resultados obtenidos, se tiene una nueva tecnología que puede desarrollarse para incrementar la producción de lacasas y con ello, fortalecer el micelio a nivel de laboratorio de las cepas de *Pleurotus* spp. para adaptarse de mejor manera en los substratos sólidos en que se cultiven, lo cual traerá un incremento en la producción de hongos, ya sea a pequeña o gran escala.

10.1. Algunas consideraciones y acciones a realizar

Los resultados hasta ahora obtenidos, no son concluyentes para plantear una producción de inóculos con la aplicación de los extractos vegetales o con el AAS. Es necesario realizar más investigaciones sobre estos aspectos, por lo cual, se plantean algunas acciones tendientes a consolidar la estrategia de aplicación.

Acciones o actividades a realizar

- Continuar las experimentaciones con la aplicación de los extractos vegetales y del AAS con varias cepas de hongos comestibles o medicinales, que de manera natural no produzcan grandes cantidades de lacasas. Con ello, inducir su producción enzimática.
- Seleccionar las cepas de hongos que mejor respondan a los extractos vegetales y al AAS.
- Investigar el efecto de los extractos vegetales y del AAS en la producción de otras enzimas diferentes a las lacasas en varias cepas de hongos.
- Producir inóculos o “semilla” con micelio fortalecido con los extractos vegetales o con el AAS y realizar el cultivo experimental de hongos en substrato sólido ya sea en subproductos agrícolas, subproductos agroindustriales y/o forestales. Establecer comparativos en la producción (eficiencia biológica, tasa de producción, etc.).
- Realizar estudios de costo-beneficio en la obtención de los extractos vegetales.
- Investigar los costos en el mercado de otros inductores para incrementar la producción de lacasas.

- De ser redituable la obtención y aplicación de los extractos vegetales, sobre todo por ser de origen natural y no contaminar el ambiente, se continuaría con las siguientes etapas.

10.2. Producción de inóculos con extractos vegetales y/o con AAS

Inicialmente, la producción de inóculos se realizaría en el laboratorio de hongos del COLPOS, *Campus* Puebla. En donde además, se establecería el protocolo para determinar las condiciones, cantidades, tiempo de incubación, materiales y equipo para la producción de inóculos. Es en este laboratorio en donde se está generando el conocimiento y la estrategia de aplicación.

10.3. La estrategia

La estrategia en esta investigación representa un gran potencial en el cultivo de hongos comestibles y medicinales con la utilización de inóculos fortalecidos en el desarrollo micelial y en la producción enzimática para degradar diversos substratos lignocelulósicos. Con ello, se obtendrían mayores rendimientos en la producción y se beneficiarían principalmente los pequeños productores en el sector rural. Por otra parte, los substratos degradados por el micelio, pueden tener otras aplicaciones más como puede ser la producción de compostas para generar abonos o fertilizantes, o bien aplicarse en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

10.4. Paquete tecnológico

En este aspecto, se generó el conocimiento sobre el incremento de la enzima lacasa en las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* al utilizar como inductores a una mezcla de extractos de cebolla y de sábila, así como del ácido acetilsalicílico. Este conocimiento se extiende a la aplicación de otras cepas de hongos comestibles y medicinales.

De manera general, se plantean las siguientes etapas a seguir para la transferencia del conocimiento generado:

- Contar en el laboratorio con personal para el manejo, obtención y aplicación de los extractos vegetales y del AAS.
- Tener la infraestructura para la fragmentación, deshidratación y obtención de los extractos de cebolla y sábila. En este caso, considerar el módulo de herrería con láminas de policarbonato que se construyó para tal fin.
- En laboratorio, la producción de inóculos o “semilla” para la siembra en substratos sólidos y su incubación.
- Producción y cosecha de hongos en módulos de producción (planta productora), evaluación de la producción y reutilización de los residuos lignocelulósicos.
- Venta y presentación del producto.

10.5. Actores de la estrategia

Los actores involucrados son:

- Los productores de hongos comestibles y medicinales.
- Los productores de cebolla y de sábila.
- El laboratorio de hongos del COLPOS, *Campus Puebla*.
- Instituciones de investigación (Universidades, Institutos, etc.).
- Instituciones gubernamentales que proporcionen apoyos financieros y técnicos.
- La población consumidora de los hongos comestibles y medicinales.

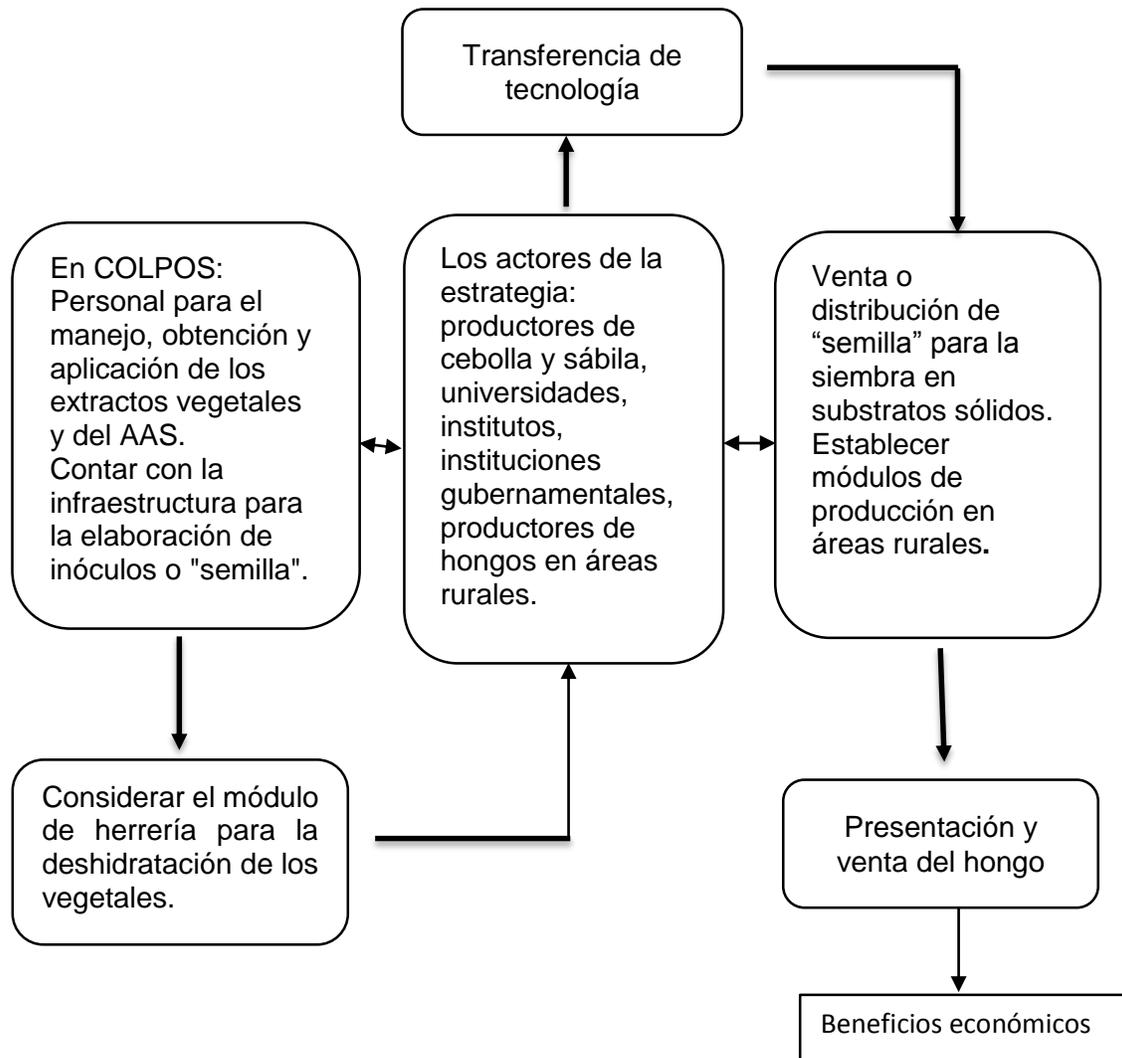


Figura 31. Etapas para implementar la estrategia y el paquete tecnológico para la producción de “semilla” y el cultivo de cepas de *Pleurotus ostreatus*.

11. LITERATURA CITADA

- Abo-Elyousr, K., M. A. M. Hussein, A. D. A. Allam and M. H. Hassan. 2009. Salicylic acid induced systemic resistance on onion plants against *Stemphylium vesicarium*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42 (11): 1042-1050.
- Ahlawat, K. S. and B. S. Khatkar. 2011. Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review. *Journal of Food Science and Technology* 48 (5): 525-533.
- Akash, M. S. H., K. Rehman and S. Chen. 2014. Spice plant *Allium cepa*: Dietary supplement for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* 30: 1128-1137.
- Almendar, S. and S. Agaoglu. 2009. Investigation of *in vitro* antimicrobial activity of *Aloe vera* juice. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (1): 99-102.
- Amborabé, B-E., P. Fleurat-Lessard, J-F. Chollet and G. Roblin. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1051-1060.
- An, C. and Z. Mou. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* 53 (6): 412-428.
- Anchondo-Aguilar, A., A. Núñez-Barrios, T. Ruiz-Anchondo, J. Martínez-Tellez, S. Vergara-Yoisura y A. Larqué-Saavedra. 2011. Efecto del ácido salicílico en la bioproductividad de la fresa (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (2): 293-298.
- Anwar, Z., M. Gulfranz and M. Irshad. 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7: 163-173.
- Ardon, O., Z. Kerem and Y. Hadar. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal of Biotechnology* 51: 201-207.
- Arjunan, N., K. Murugan, P. Madhiyazhagan, K. Kovendan, K. Prasannakumar, S. Thangamani and D. R. Barnard. 2012. Mosquitocidal and water purification properties of *Cynodon dactylon*, *Aloe vera*, *Hemidesmus indicus* and *Coleus amboinicus* leaf extracts against the mosquito vectors. *Parasitology Research* 110: 1435-1443.

- Arora, D. S. and P. K. Gill. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology* 77: 89-91.
- Bajpai, V. K. and S. C. Kang. 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chem Society* 87: 327-336.
- Bazanella, G. C. dos S., D. F. de Souza, R. Castoldi, R. F. Oliveira, A. Bracht and R. M. Peralta. 2013. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia Microbiologica* 58: 641-647.
- Beesk, N., H. Perner, D. Schwarz, E. George, L. W. Kroh and S. Rohn. 2010. Distribution of quercetin-3, 4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-monoglucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry* 122: 566-571.
- Benkeblia, N., 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37: 263-268.
- Bolívar, F. G. 2004. Introducción general. En: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Compilador y Editor: Francisco G. Bolívar Zapata. *El Colegio Nacional*. Pp. 6-16.
- Bonomo, R. P., G. Cennamo, R. Purello, A. M. Santoro and R. Zappalà. 2001. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 83: 67-75.
- Bourbonnais, R. and M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 9-102.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brenneman, J. A. and M. C. Guttman. 1994. The edibility and cultivation of the oyster mushroom. *The American Biology Teacher* 56 (5): 291-293.

- Breu, W. 1996. *Allium cepa* L. (Onion) Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine* (3) 3: 293-306.
- Brodersen, P., F. G. Malinovsky, K. Hématy, M-A. Newman and J. Mundy. 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiology* 138: 1037-1045.
- Butt, M. S., M. T. Sultan, M. S. Butt and J. Iqbal. 2009. Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49: 538-551.
- Camacho, M. F. J., 2013. Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.
- Cañas, A. and S. Camarero. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694-705.
- Chang, S-T. 2006. The world mushroom industry: Trends and technological development. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 8 (4): 297-314.
- Chen, S-H., K-Y. Lin, C-C. Chang, C-L. Fang and C-P. Lin. 2007. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2296-2303.
- Chinchilla, N., C. Carrera, A. G. Durán, M. Macías, A. Torres and F. A. Macías. 2013. *Aloe barbadensis*: how a miraculous plant becomes reality. *Phytochemistry Reviews* 12: 581-602.
- Choi, S. and M. H. Chung. 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine* 1 (1): 53-62.
- Christopher, L. P., B. Yao and Y. Ji. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research | Bioenergy and Biofuels* 2 (12): 1-13.
- Cohen, R., L. Persky and Y. Hadar. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582-594.

- Conti, G. G., A. Pianezzola, A. Arnoldi, G. Violini and D. Maffi. 1996. Possible involvement of salicylic acid in systemic acquired resistance of *Cucumis sativus* against *Sphaerotheca fuliginea*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 537–544.
- Couto, S. R. and M. A. Sanromán. 2006. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. *Journal of Food Engineering* 73: 388-393.
- Couto, S. R. and J. L. T. Herrera. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.
- Das, N., and M. Mukherjee. 2007. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. *Bioresource Technology* 98: 2723-2726.
- De Souza, C. G. M., G. K. Tychanowicz, D. F. de Souza and R. M. Peralta. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44 (2): 129-136.
- Derksen, H., C. Rampitsch and F. Daayf. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science* 207: 79- 87.
- Dhawan, S. and R. C. Kuhad. 2002. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresource Technology* 84: 35-38.
- Dhawan, S., R. Lal, M. Hanspal and R. C. Kuhad. 2005. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology* 96: 1415-1418.
- Downes, K., G. A. Chope and L. A. Terry. 2009. Effect of curing at different temperatures on biochemical composition of onion (*Allium cepa* L.) skin from three freshly cured and cold stored UK-grown onion cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 54: 80-86.
- Dutta, A., D. Sarkar, A. Guirb-Fakim, C. Mandal and M. Chatterjee. 2008. *In vitro* and *in vivo* activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* 102: 1235-1242.

- Dwivedi, U. N., P. Singh, V. P. Pandey and A. Kumar. 2011. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 117-128.
- Dzoyem, J. P., L. J. McGaw and J. N. Eloff. 2014. *In vitro* antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14 (147): 1-7.
- Elisashvili, V. and E. Kachlishvili. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. Review. *Journal of Biotechnology* 144: 37-42.
- Fazenda, M. L., R. Seviour, B. McNeil and L. M. Harvey. 2008. Submerged culture fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63: 33-103.
- Flores, C., C. Vidal, M. R. Trejo-Hernández, E. Galindo and L. Serrano-Carreón. 2009. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *Journal of Applied Microbiology* 106: 249-257.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, M. J. Izaguirre, S. Alemanno, D. Álvarez and G. Abdala. 2010. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current Microbiology* 61: 485-493.
- Gamboa-Angulo, M. M., J. Cristóbal-Alejo, I. L. Medina-Baizabal, F. Chí-Romero, R. Méndez-González, P. Simá-Polanco and F. May-Pat. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1955-1959.
- Georgiou, C. D., N. Tairis and A. Sotiropoulou. 2000. Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in phytopathogenic fungi. *Mycologia* 92: 825–834.
- Guleria, S., A. K. Tikku, G. Singh, A. Koul, S. Gupta and S. Rana. 2013. *In vitro* antioxidant activity and phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22 (1): 9-15.

- Guzmán, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetideae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2: 95-123.
- Grover, J. K., S. Yadav and V. Vats. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81-100.
- Hamid, M. K., A. Abdullah, K. Jusoh and V. Subramaniam. 2011. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods* 4:100-107.
- Hamman, J. H. 2008. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules* 13: 1599-1616.
- Hariram, N. S. and S. W. Park. 2013. Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Life Science* 7 (3-4): 224-228.
- Hu, D. D., R. Y. Zhang, G. Q. Zhang, H. X. Wang and T. B. Ng. 2011. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea*. *Phytomedicine* 18: 374-379.
- Isikhuemhen, O. M. and N. A. Mikiashvilli. 2009. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1353-1362.
- Jayakumar, T., P. A. Thomas, J. R. Sheu and P. Geraldine. 2011. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International* 44: 8851-8861.
- Jeon, J. K., J. Lee and J-Y. Imm. 2014. Effects of laccase-catalyzed rutin polymer fraction on adipogenesis inhibition in 3T3-L1 adipocytes. *Process Biochemistry* 49: 1189-1195.
- Jones, W. P. and A. D. Kinghorn. 2012. Extraction of plant secondary metabolites. Chapter 13. In: Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.), *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, vol. 864.

- Kaneira, M. J., M. B. Bapodara and S. V. Chanda. 2012. Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem. *Food Analytical Methods* 5: 396-404.
- Karp, S. G., V. Faraco, A. Amore, L. Birolo, C. Giangrande, V. T. Soccol, A. Pandey and C. R. Soccol. 2012. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 114: 735-739.
- Khanahmadi, K., S. Rezazadeh, F. Shahrezaei, M. and Taran M. Rezaei. 2011. Study on chemical composition of the essential oil, antimicrobial and antioxidant activities of *Allium latifolium* Gilib. (Liliaceae). *Extract, Journal of Essential Oil Bearing Plants* 14 (3): 345-353.
- Kim, S., and B.E. Dale. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26: 361-375.
- Kim, J., J-S. Kim and E. Park. 2013. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 62: 199-204.
- Kim, S., L. Asnin, A. D. Assefa, E. Y. Ko, K. Sharma and S. W. Park. 2014. Extraction of antioxidants from *Aloe vera* leaf gel: a response surface methodology study. *Food Analytical Methods* 7: 1804-1815.
- Kimura, Y., K. Okazaki, D. Yanagida and T. Muro. 2014. Cultivar and regional differences in the metabolite composition of onion (*Allium cepa*). *Scientia Horticulturae* 168: 1-8.
- Knežević, A., I. Milovanović, M. Stajić, N. Lončar, I. Brčeski, J. Vukojević and J. Čilerdžić. 2013. Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology* 138: 117-123.
- Koutrotsios, G., K. C. Mountzouris, I. Chatzipavlidis and G. I. Zervakis. 2014. Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi - Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chemistry* 161: 127-135.

- Krantev, A., R. Yordanova, T. Jandab, G. Szalaib and L. Popova. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165: 920-931.
- Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 1-30.
- Kudanga, T., G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz and S. Burton. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 48: 195-208.
- Kulshreshtha, S., N. Mathur, P. Bhatnagar and S. Kulshreshtha. 2013. Cultivation of *Pleurotus citrinopileatus* on handmade paper and cardboard industrial wastes. *Industrial Crops and Products* 41: 340-346.
- Kulshreshtha, S., N. Mathur and P. Bhatnagar. 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4:29.
- Kumar, B. S., S. K. Singla and R. K. Bhardwaj. 2012. Evaluation of plant extracts as antifungal agents against wood rotting fungi *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quelet. *Journal Indian Academy of Wood Science* 9 (1): 62-65.
- Kyung, K. H. 2012. Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 142-147.
- Lagouri, V., M. Guldaz and O. Gurbuz. 2011. *In vitro* antioxidant/free radical scavenging and antibacterial properties of endemic oregano and thyme extracts from Greece. *Food Science and Biotechnology* 20 (6): 1487-1493.
- Lal, R. 2005. World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environment International* 31 (4): 575-584.
- Lal, R. 2008. Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. *Waste Management* 28: 747-758.
- Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112: 3-22.
- Lanzotti, V., A. Romano, S. Lanzuise, G. Bonanomi and F. Scala. 2012. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* 74: 133-139.

- Lebrun, J. D., I. Lamy and C. Mougin. 2011. Favouring the bioavailability of Zn and Cu to enhance the production of lignin-modifying enzymes in *Trametes versicolor* cultures. *Bioresource Technology* 102: 3103-3109.
- Lee, K. A., K-T. Kim, H. J. Kim, M-S. Ghung, P-S. Ghang, H. Park and H-D. Paik. 2014. Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. *Food Science and Biotechnology* 23 (2): 615-621.
- Lee, S-A., S-K. Hong, C-I. Suh, M-H. Oh, J-H. Park, B-W. Choi, S-E. Park and S-Y. Paik. 2010. Anti-HIV-1 efficacy of extracts from medicinal plants. *The Journal of Microbiology* 48 (2): 249-252.
- Levin, L., E. Malignani and A. M. Ramos. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology* 101: 4554-4563.
- Lu, J., P-Z. Qin, X. Han, Y-P. Wang and Z-H Li. 2014. Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of extracts from *Trollius chinensis* Bunge. *European Food Research and Technology*. DOI 10.1007/s00217-014-2329-2
- Lu, X. and S. Ding. 2010. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience* 51:68-74.
- Manpreet, S., S. Sawraj, D. Sachin, S. Pankaj and U. C. Banerjee. 2005. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology* 1 (2): 1-9.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1. Pp. 209-224. In: El cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata and H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Martínez-Carrera, D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora (Eds.). 2010. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.

- Martínez-Carrera, D. y L. de A. López-Martínez. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. Pp. 513-551. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 28.* Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Masoomeh, S-G., M-R. Shokoohamiri, N. Amirrajab, B. Moghadasi, A. Ghajari, F. Zeini, G. Sadeghi and M. Razzaghi-Abyaneh. 2006. *In vitro* antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia* 77: 321-323.
- Mata, G., D. M. M. Hernández and L. G. I. Andreu. 2005. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 143-150.
- Mbanga, J., N. Mangoma and B. Saidi. 2010. An evaluation of the antimicrobial activities of *Aloe barbadensis*, *A. chabaudii* y *A. arborescens* leaf extracts used in folklore veterinary medicine in Zimbabwe. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (23): 2918-2923.
- McCallum, J. 2007. Onion. Chapter 11. Pp. 331-348. *In: Genome mapping and molecular breeding in plantas. Vegetables.* Vol 5: Ed. Chittaranjan Kole. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mehlhorn, H., S. Al-Quraishy, K. A. S. Al-Rasheid, A. Jatzlau and F. Abdel-Ghaffar. 2011. Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. *Parasitology Research* 108: 1041-1046.
- Membrillo, I., C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela and O. Loera. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* 99: 7842-7847.

- Membrillo, I., C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela and O. Loera. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102: 1581-1586.
- Misra, N., and P. Saxena. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science* 177: 181-189.
- Navarro, D., H. M. Díaz-Mula, F. Guillén, P. J. Zapata, S. Castillo, M. Serrano, D. Valero and D. Martínez-Romero. 2011. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with *Aloe vera* gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of Food Microbiology* 151: 241-246.
- Nejatzadeh-Barandozi, F. 2013. Antibacterial activities and antioxidant capacity of *Aloe vera*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* 3:5 pp. 1-8.
- Nidiry, E. S. J., G. Ganeshan and A. N. Loksha. 2011. Antifungal activity of some extractives and constituents of *Aloe vera*. *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (2): 196-200.
- Ortega, G. P. 2002. Plagas, enfermedades y competidores en plantas productoras de hongos comestibles en la region central de México y la estrategia para su prevención y control. Tesis de Maestría. Estrategias para el Desarrollo Agrícola y Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.
- Pandey, R. and A. Mishra. 2010. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1356-1361.
- Pant, D., U. G. Reddy and A. Adholeya. 2006. Cultivation of oyster mushrooms on wheat straw and bagasse substrate amended with distillery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 267-275.
- Popova, L. P., L. T. Maslenkova, R. Y. Yordanova, A. P. Ivanova, A. P. Krantev, G. Szalai and T. Janda. 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 224-231.
- Prakash, D., B. N. Singh and G. Upadhyay. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry* 102: 1389-1393.

- Qi, P-F., A. Johnston, M. Balcerzak, H. Rocheleau, L. J. Harris, X-Y Long, Y-M Wei, Y-L Zheng and T. Oullet. 2012. Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. *Fungal biology* 116: 413-426.
- Radwan, D. E. M., G. Lu, K. A. Fayez and S. Y. Mahmoud. 2008. Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 845-857.
- Radwan, D. E. M. 2012. Salicylic acid induced alleviation of oxidative stress caused by clethodim in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102:182-188.
- Reis, F. S., L. Barros, A. Martins and I. C. F. R. Ferreira. 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 50: 191-197.
- Reyes, Q. C. K. 2013. Propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del “moho verde” (*Trichoderma* spp.) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula*, *Pleurotus*). Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla. Tesis doctoral.
- Reza, M. O., A. A. Almoneafy, Z. qi Cui, G-L. Xie, J. Zhang, C. Shang and B. Li. 2013. Application of acetyl salicylic acid and chemically different chitosans against storage carrot rot. *Postharvest Biology and Technology* 84: 51-60.
- Rivera-Hoyos, C., E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez and J. M. Delgado-Boada. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* 27: 67-82.
- Rivero, M. R., E. A. Rodríguez Leyes, R. Menéndez Castillo, J. A. Fernández Romero, G del Barrio Alonso y M. L. González Sanabia. 2002. Obtención y caracterización preliminar de un extracto de *Aloe vera* L. con actividad antiviral. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 7 (1): 32-38.
- Rodríguez, G. B. C. T. Rodríguez, E. M. R. Rodríguez and C. D. Romero. 2009. Fructans and major compounds in onion cultivars (*Allium cepa*). *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 25-32.
- Rondon, F. C. M., C. M. L. Bevilaqua, M. P. Accioly, S. M. Morais, H. F. Andrade-Juniorc, L. K. A. Machado, R. P. A. Cardoso, C. A. Almeida, E. M. Queiroz-Junior and A.

- C. M. Rodrigues. 2011. *In vitro* effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary Parasitology* 178: 235-240.
- Royse, D.J. 2004. Specialty mushrooms. In: *Mushroom Fact Sheet, Mushroom Spawn Laboratory*. Penn State University, Pennsylvania.
- Ruíz-Rodríguez, A., I. Polonia, C. Soler-Rivas and H. J. Wichers. 2011. Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, spawn and substrates. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 285-293.
- Saikia, R., T. Singh, R. Kumar, J. Srivastava, A. K. Srivastava, K. Singh and D. K. Arora. 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research* 158: 203-213.
- Sains, M. B. 2009. Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 45: 314-329.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1321–1337.
- Santoyo, F., A. E. González, M. Terrón, L. Ramírez and A. G. Pisabarro. 2008. Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 137-143.
- Shigyo, M. And C. Kik. 2008. Onion. Pp. 120-159. In: *Vegetables II. Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. Eds. Jaime Prohens and Fernando Nuez. Springer Science+Business Media, LLC.
- Shon, M. Y., D. Ch. Sang, G. G. Kahng, S. H. Nam and N. Sung. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scanning activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food and Chemistry Toxicology* 42: 659-666.
- Silva, É.S., J. R. P. Cavallazzi, G. Muller and J. V.B. Souza. 2007. Biotechnological applications of *Lentinus edodes*. *Journal of Food, Agriculture Environment* 5 (3,4): 403-407.
- Singh, B. N., B. R. Singh, R. L. Singh, D. Prakash, D. P. Singh, B. K. Sarma, G. Upadhyay and H. B. Singh. 2009. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion

- (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1161-1167.
- Soininen, T. U., N. Jukarainen, S. O. K. Auriola, R. Julkunen-Tiitto, R. Karjalainen and J. J. Vepsäläinen. 2014. Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC–MS. *Food Chemistry* 165: 499-505.
- Soliman, D. A., Y. H. Dewir and A. E-N B. El-Sayed. 2012. Antifungal activity of some plant extracts against sugar beet damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. *Annals of Microbiology*: 62: 1021-1029.
- Spezzia, M. T. 2012. Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de biorremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. Colegio de Postgraduados *Campus Puebla*. Tesis doctoral.
- Stajić, M., L. Persky, D. Friesem, Y. Hadar, S. P. Wasser, E. Nevo and J. Vukojević. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1-2): 65-73.
- Subramaniam, J., K. Kovendan, P. M. Kumar, K. Murugan and W. Walton. 2012. Mosquito larvicidal activity of *Aloe vera* (Family: Liliaceae) leaf extract and *Bacillus sphaericus*, against Chikungunya vector, *Aedes aegypti*. *Saudi Journal of Biological Sciences*: 19: 503-509.
- Suleria, H. A. R., M. S. Butt, F. M. Anjum, F. Saeed and N. Khalid. 2015. Onion: Nature Protection Against Physiological Threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55: 50–66.
- Sung, C. K., 2006. The history of Aloe. Chapter 2. Pp. 7-34. In: *New perspectives on Aloe*. Eds. Young In Park and Seung Ki Lee. Springer Science+Business Media, LLC. USA.
- Tanaka, M., E. Misawa, Y. Ito, N. Habara, K. Nomaguchi, M. Yamada, T. Toida, H. Hayasawa, M. Takase, M. Inagaki and R. Higuchi. 2006. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as anti-diabetic compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (7): 1418-1422.

- Terrón, M. C., T. González, J. M. Carbajo, S. Yagü, A. Arana-Cuenca, A. Téllez, A. D. W. Dobson and A. E. González. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 41: 954-962.
- Thirumalai, T., B. C. David, K. Sathiyaraj, B. Senthilkumar and E. David. 2012. Ethnobotanical study of anti-diabetic medicinal plants used by the local people in Javadhu hills Tamilnadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*: S910-S913.
- Tlecuil-Beristain, S., C. Sánchez, O. Loera, G. D. Robson and G. Díaz-Godínez. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* 112: 1080-1084.
- Tsiaganis, M. C., K. Laskari and E. Melissari. 2006. Fatty acid composition of *Allium* species lipids. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 620-627.
- Upadhyay, R. C. and M. Singh. 2010. Production of Edible Mushrooms. Chapter 4. Pp. 79-97. *Industrial Applications, 2nd Edition The Mycota X*. Ed. M. Hofrichter Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Valencia, O. C. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Editorial Trillas, S. A. de C. V., México, D. F.
- Vega, F. E., P. F. Dowd, M.R. McGuire, M.A. Jackson and T.C. Nelsen. 1997. *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal or Invertebrate Pathology* 70: 209-213.
- Vega, G. A., N. Ampuero C., L. Díaz N. y R. Lemus M. 2005. El *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición* 32 (3): 1-12.
- Velázquez-Cedeño, M. A., A. M. Farnet, E. Ferré and J. M. Savoie. 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia* 96 (4): 712-719.

- Velázquez-Cedeño, M., A. M. Farnet, G. Mata and J-M. Savoie. 2008. Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates. *Bioresource Technology* 99: 6966-6973.
- Villanueva-Couoh, E., G. Alcántar-González, P. Sánchez-García, M. Soria-Fregoso y A. Larque-Saavedra. 2009. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura] en Yucatán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 15 (2): 25-31.
- Vlot, A. C., D. M A. Dempsey and D. Klessig. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47:177-206.
- Wang, D., A. Sakoda and M. Suzuki. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* 78: 293-300.
- Wang, F., J-H. Hu, C. Guo and C-Z. Liu. 2014. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresource Technology* 166: 602-605.
- Webb, C., A. A. Koutinas and R. Wang. 2004. Developing a sustainable bioprocessing strategy based on a generic feedstock. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89: 195-268.
- Wei, J., W. Ding, Y-G. Zhao and P. Vanichpakorn. 2011. Acaricidal activity of *Aloe vera* L. leaf extracts against *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14: 353-356.
- Wong, D W S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 174-209.
- Wösten, H. A. B and J. G. H. Wessels. 2006. The emergence of fruiting bodies in Basidiomycetes, Chapter 19, Pp 393-414. *The Mycota I. Growth, differentiation and sexuality*. Eds Kües/Fischer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wu, H-S., W. Raza, J-Q. Fan, Y-G. Sun, W. Bao, D-Y. Liu, Q-W. Huang, Z-S. Mao, Q-R. Shen and W-G. Miao. 2008. Antibiotic effect of exogenously applied salicylic acid on *in vitro* soilborne pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Chemosphere* 74: 45-50.

- Yang, J., K. J. Meyers, J. Van der Heide and L. RuiHai. 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52: 6787-6793.
- Ye, C-L., D-H. Dai and W-L Hu. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* 30: 48-53.
- Zapata, P. J., D. Navarro, F. Guillén, S. Castillo, D. Martínez-Romero, D. Valero and M. Serrano. 2013. Characterisation of gels from different *Aloe* spp. as antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. *Industrial Crops and Products* 42: 223-230.
- Zhang, Y.H.P. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biofineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 367-375.
- Zhu, M-J., F. Du, G-Q. Zhang, H-X. Wang and T-B. Ng. 2013. Purification of a laccase exhibiting dye decolorizing ability from an edible mushroom *Russula virescens*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 82: 33-39.
- Zilly, A., G. C. do S. Bazanella, C. V. Helm, C. A. V. Araújo, C. G. M. de Souza, A. Bracht and R. M. Peralta. 2012. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. *Food Bioprocess Technology* 5:1573-1580.
- Zovko, K. M. and M. Jug. 2011. Antioxidant and bioadhesive properties of onions (*Allium* L., Alliaceae) processed under acidic conditions. *International Journal of Food Properties* 14: 92-101.

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1

Cultivo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio PDA en tres marcas comerciales

12.1.1. Resumen

Se cultivó la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en el medio PDA, en las marcas comerciales: Bioxon, Merck y Difco a temperatura ambiental entre 21°C a 22 °C en obscuridad, durante diez días de incubación. Se evaluaron las variables velocidad de crecimiento del área micelial, la morfología colonial y la coloración del micelio. En la velocidad de crecimiento del área micelial, entre los medios marca Difco y Merck no hubo diferencias estadísticas y a los diez días de incubación alcanzaron 41.6 ± 4.86 y 39 ± 5.67 cm², respectivamente y fueron significativamente superiores al medio Bioxon, el cual logró 18.8 ± 7.83 cm². En las tres marcas del medio PDA, el micelio fue blanco con densidad abundante. La cara inferior en los medios Bioxon y Difco fue blanco-grisáceo y el medio Merck fue de color amarillo. Se seleccionó el medio PDA marca Difco para continuar con los trabajos.

12.1.2. Introducción

En la elaboración comercial de los medios de cultivo sintéticos para el desarrollo micelial de diferentes hongos, puede existir variación en la cantidad y calidad de nutrimentos que son indispensables para que el hongo se desarrolle de la mejor manera.

Por lo anterior, fue necesario realizar ensayos para determinar en cual o cuales marcas comerciales se desarrollaría de mejor manera la cepa CP-50 de *P. ostreatus* y así, evitar resultados heterogéneos. Se realizó el cultivo de esta cepa en el medio PDA, elaborado por las marcas comerciales Bioxon, Difco y Merck.

12.1.3. Materiales y métodos

Se utilizaron los medios de cultivo PDA de las marcas comerciales Bioxon, Merck y Difco. Por cada medio de cultivo se prepararon 5 cajas Petri de 92 mm x 15 mm, con 30 mL cada una.

Los tres medios de cultivo se prepararon siguiendo las instrucciones de cada fabricante, se disolvieron y esterilizaron a 121 °C. A las 48 h de su preparación, las cajas Petri se inocularon colocando en el centro un disco de 5 mm de diámetro con micelio de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* previamente desarrollado. La incubación de las cajas Petri fue a temperatura ambiente en el laboratorio de hongos comestibles del COLPOS (21°C a 22°C) y en obscuridad. En la **Figura 32** se presenta el diagrama de trabajo.

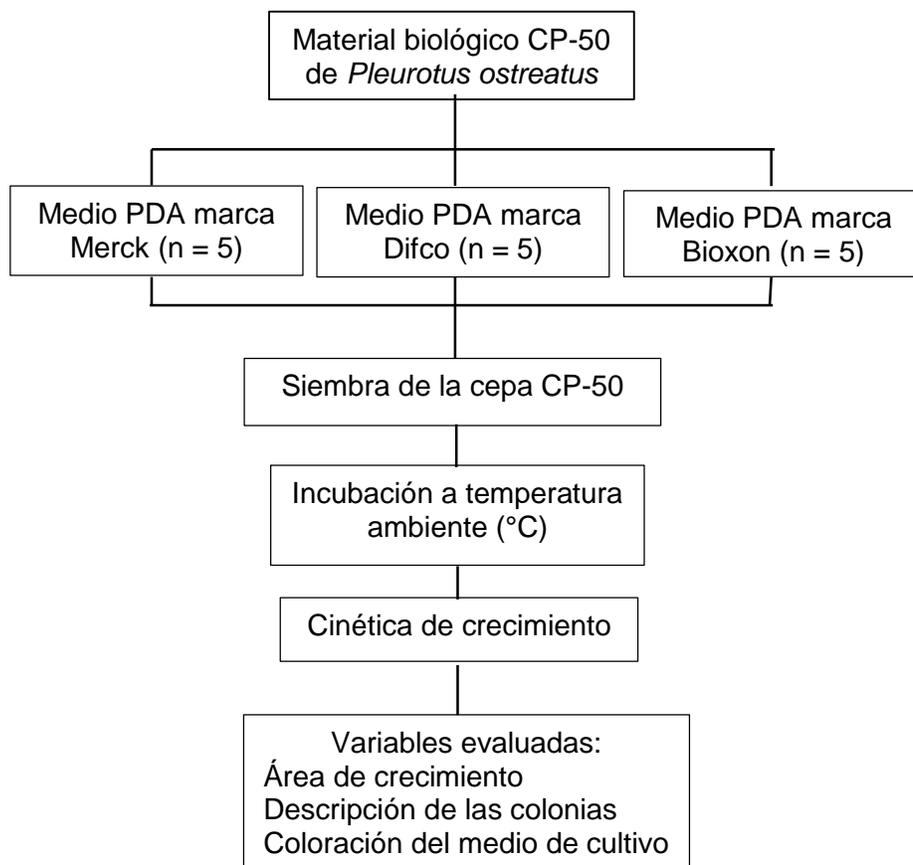


Figura 32. Evaluación del desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en PDA de tres marcas comerciales.

12.1.4. Variables a evaluar

Área de crecimiento micelial. Para determinar el área micelial, se tomaron fotografías al micelio de las cajas Petri con medio PDA en las tres marcas comerciales, por una sola vez, a los diez días de incubación. Las imágenes del micelio se midieron con el programa de cómputo ImageJ (National Institutes of Health, ver., 2012) (sección 6.3.2.).

Descripción de las colonias. Se observó la morfología colonial, densidad y textura del micelio en cada una de las tres marcas comerciales del medio de cultivo PDA.

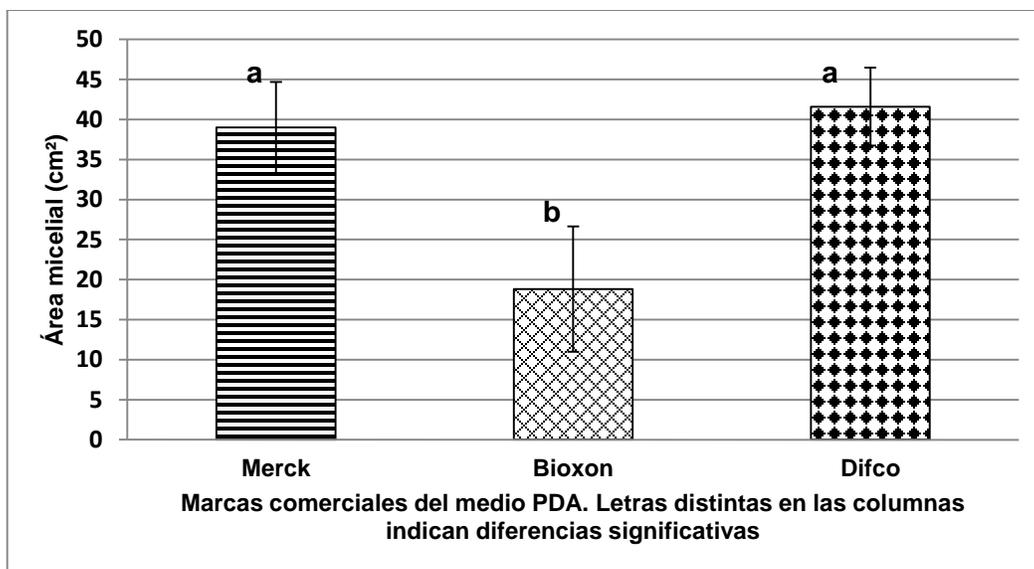
Coloración del medio de cultivo. Se hicieron observaciones del color del micelio en la cara superior y en la cara inferior de las cajas Petri en las tres marcas comerciales.

12.1.5. Resultados y discusión

En la **Figura 33**, se presenta el resultado del área de crecimiento del micelio de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*, comparada en las tres marcas comerciales del medio PDA.

El desarrollo del micelio de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*, fue similar en los medios de cultivo de las marcas Merck y Difco, ya que entre ellos no hubo diferencia significativa. Sin embargo, ambos medios son significativamente mejores que el medio de cultivo Bioxon.

Por otra parte, el color del micelio fue diferente en la cara inferior de la caja Petri. En los medios de cultivo Bioxon y Difco el color fue blanco-grisáceo y en el medio Merck el color fue amarillo (**Figura 34**).



Marca del medio de cultivo	Promedio del área (cm ²)
Merck	39 ± 5.67 a
Bioxon	18.8 ± 7.83 b
Difco	41.6 ± 4.86 a

Figura 33. Desarrollo del micelio de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* inoculado en tres medios de cultivo sintéticos con diez días de incubación en temperatura ambiental entre 21 °C y 22 °C en obscuridad. Análisis de los datos con ANOVA, con prueba de rango múltiple de Tukey con $\alpha = 0.05$ (SAS, 9.0). Réplicas con $n = 5$.

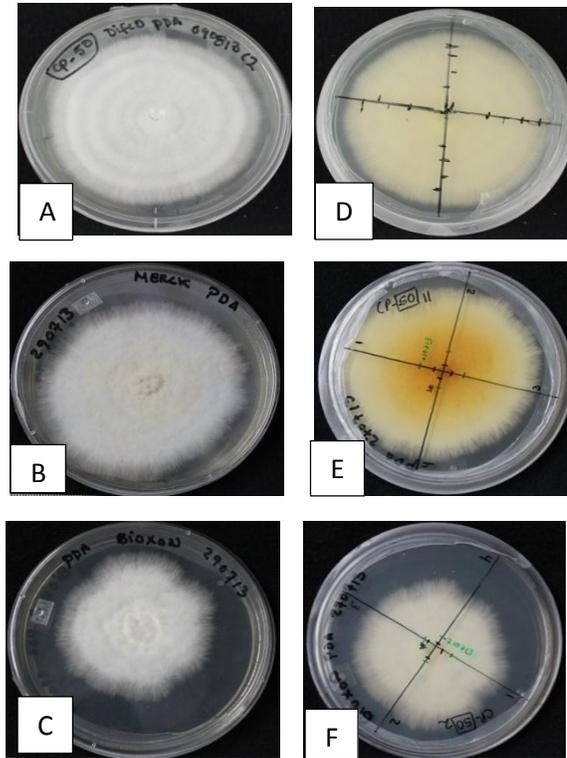


Figura 34. Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en tres marcas comerciales del medio de cultivo sintético PDA a nueve días de incubación. A, B y C: cara superior; D, E y F: cara inferior, con el micelio de las marcas Difco, Merck y Bioxon, respectivamente.

Los mejores medios de PDA en el desarrollo de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* fueron las marcas Merck y Difco, sin embargo, en el medio de la marca Merck la cara inferior fue amarilla, lo cual se puede deber a que este medio tenga alguna substancia que obliga al micelio a presentar dicho color. Por esto mismo, a pesar de que tuvo un buen desarrollo micelial, no se consideró apto para continuar con los trabajos.

Con base a lo anterior, se continuó con las investigaciones desarrollando la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el medio de cultivo PDA Difco, ya que presentó un buen desarrollo micelial homogéneo y libre de coloraciones extrañas.

12.2. ANEXO 2

Producción de lacasas por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en PDA (Difco)

12.2.1. Resumen

Se cultivó la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el medio de cultivo PDA Difco, seleccionado previamente, en comparación con las marcas Merck y Bioxon (Anexo 1). La incubación fue entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad durante 11 días. Se evaluó la morfología colonial, el área del crecimiento micelial y se determinó la producción volumétrica de lacasas con muestreos a los 3, 5, 7, 9 y 11 días de incubación utilizando como substrato el ABTS a 1 mM. El micelio cubrió el diámetro de la caja Petri a los 9 días de incubación; la cara superior presentó un color blanco, y la cara inferior un color blanco cremoso. La densidad fue abundante, la textura algodonosa, la colonia regular y zonificada. En el desarrollo del área micelial, en el día 3 (muestra inicial) presentó $6.0 \pm 0.16 \text{ cm}^2$ y al día 9 con la caja llena alcanzó $59.44 \pm 0 \text{ cm}^2$. La actividad volumétrica de las lacasas en el muestreo del día 3 de incubación, presentó $1.16 \pm 0.41 \text{ U/mL}$, que se incrementó al día 11 con $49.03 \pm 1.05 \text{ U/mL}$.

12.2.2. Introducción

Con base a la previa selección del medio de cultivo PDA en la comparación de tres marcas comerciales (Merck, Bioxon y Difco) (Anexo 1), se cultivó la cepa CP-50 en el medio PDA marca Difco, ya que presentó un mejor desarrollo micelial en este medio. Esto fue con la finalidad de estandarizar el mejor desarrollo micelial en el medio PDA y evitar un desarrollo heterogéneo. Por otra parte, se evaluó la actividad volumétrica de lacasas en 5 muestreos durante los 11 días de incubación de dicha cepa.

12.2.3. Materiales y métodos

Se prepararon 15 cajas Petri con 30 mL ($n = 15$) del medio de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se siguió la metodología de la sección 6.2. A las 48 h de su preparación, a cada caja Petri se le colocó en el centro un disco de 5 mm con micelio

de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* previamente desarrollado en PDA (Difco). La incubación fue durante 11 días a temperatura ambiente en el laboratorio de hongos comestibles del COLPOS (27 °C a 28 °C) y en obscuridad.

12.2.4. Variables a evaluar

Se evaluó la morfología colonial, pH inicial y final (secciones 6.3.1 a 6.3.4.), y desarrollo del área micelial. Para determinar el área del desarrollo micelial, se tomaron fotografías en los días del muestreo a partir del día 3 al día 9 (sección 6.3.2.). El área se determinó con el programa de cómputo ImageJ (National Institutes of Health, ver. 2012).

12.2.5. Obtención de muestras y determinación de las lacasas

Obtención de muestras. En la obtención de las muestras (sobrenadante) del medio PDA, se siguió el procedimiento que se señala en la **Figura 4**.

Determinación de la actividad volumétrica de las lacasas. La actividad volumétrica de la enzima lacasa, se midió a los 3, 5, 7, 9 y 11 días de incubación con muestras de $n = 3$, con el ABTS a 1 mM. Se siguió la metodología descrita en la sección 6.5.

12.2.6. Resultados y discusión

Morfología colonial. El micelio en la cara superior presentó un color blanco, mientras que en la cara inferior tuvo un color blanco cremoso. La densidad fue abundante, la textura algodonosa, con la forma de la colonia regular y zonificada (**Figura 35**). El micelio se desarrolló rápidamente; a los nueve días de incubación el micelio cubrió completamente la superficie del medio de cultivo PDA Difco contenido en la caja Petri (**Figura 36**).

pH. El valor del pH inicial (día 0) con el inóculo sembrado, fue de 5.64 con temperatura de 23.4°C, y el valor final al día 9 de incubación fue cercano al punto neutro con 6.80 y temperatura de 22.9 °C, con el micelio totalmente desarrollado.

Crecimiento del área micelial. Los promedios del crecimiento del área micelial diaria, se presentan en la **Figura 37**. El micelio con 3 días de desarrollo mostró $6.0 \pm 0.16 \text{ cm}^2$ y al día 9, registró $59.44 \pm 0 \text{ cm}^2$.

Evaluación volumétrica de las lacasas. Los valores de las lacasas aumentaron conforme avanzó el desarrollo micelial en la etapa de incubación. El valor inicial fue de $1.16 \pm 0.41 \text{ U/mL}$ en el día tres del desarrollo micelial. La máxima actividad volumétrica de la enzima lacasa se presentó a los 11 días de incubación, con $49.03 \pm 1.05 \text{ U/mL}$ (**Figura 38**).

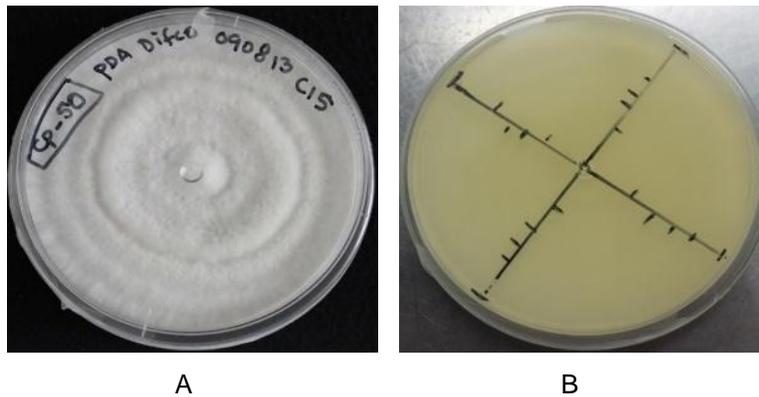


Figura 35. Morfología colonial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* desarrollada en PDA (Difco) entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad con nueve días de incubación. A: cara superior. B: cara inferior.

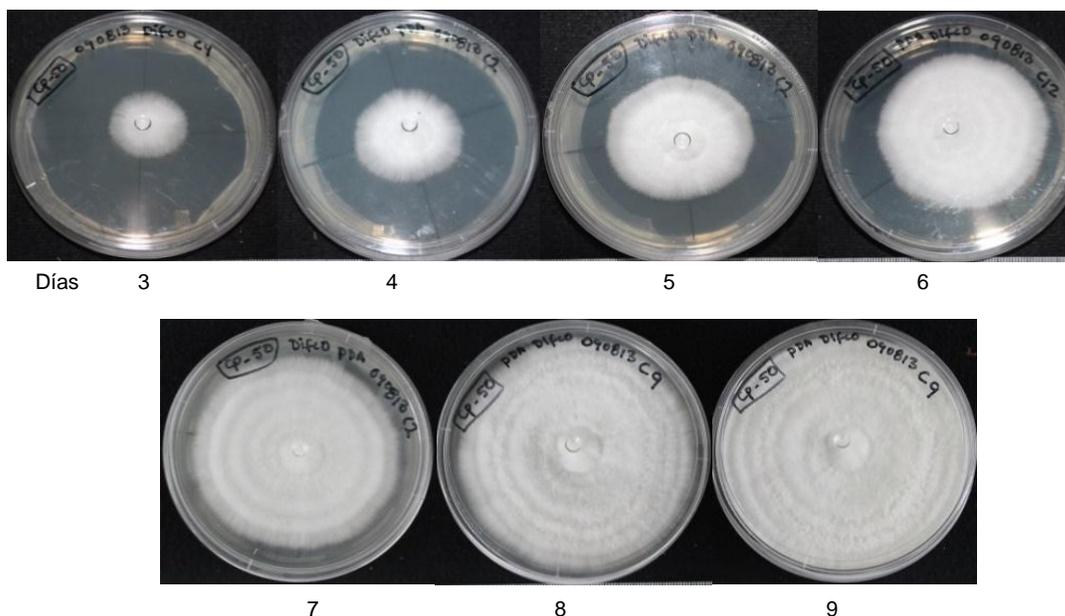
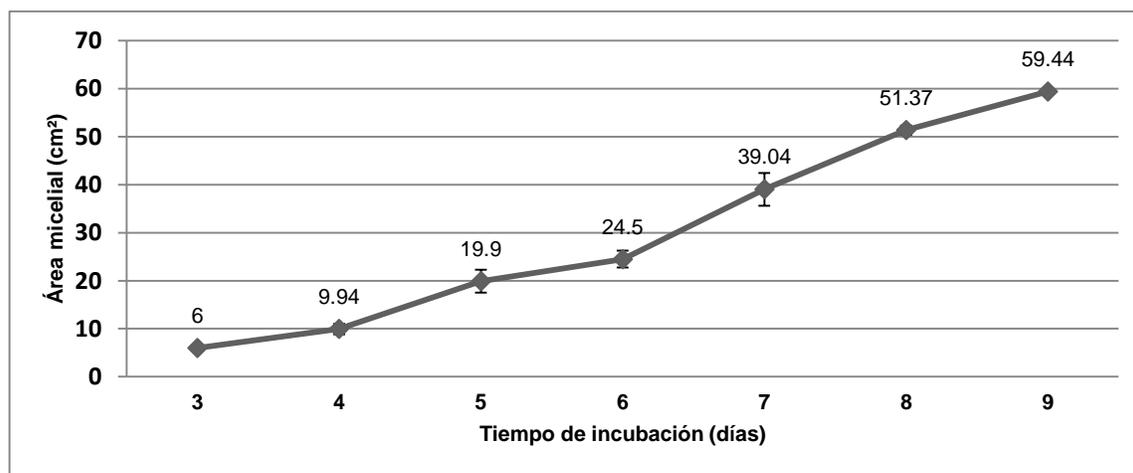
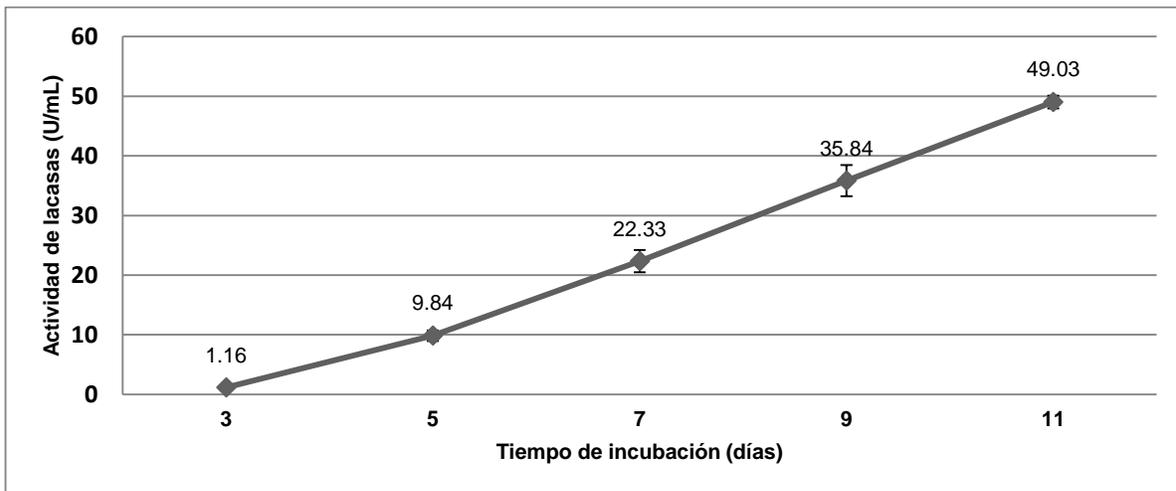


Figura 36. Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en PDA Difco con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.



Cepa	Tiempo de incubación (días)						
	3	4	5	6	7	8	9
CP-50	6 ± 0.16	9.94 ± 1.11	19.9 ± 2.4	24.5 ± 1.77	39.04 ± 3.39	51.37 ± 0.98	59.44 ± 0

Figura 37. Desarrollo del área micelial (cm²) de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en PDA (Difco) con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.



Cepa	Tiempo de incubación (días)				
	3	5	7	9	11
CP-50	1.16 ± 0.41	9.84 ± 0.87	22.33 ± 1.86	35.84 ± 2.62	49.03 ± 1.05

Figura 38. Producción volumétrica de la enzima lacasa en la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en PDA (Difco) con nueve días de incubación entre 27 °C y 28 °C de temperatura ambiental y en obscuridad. Réplicas con n = 15.

El desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* se puede considerar que fue veloz. Esto probablemente fue a causa de la temperatura ambiental en la que se incubó y por el medio PDA marca Difco, el cual tuvo mejor composición en su elaboración o preparación, lo que benefició al micelio.

Por otra parte, en la evaluación de la producción volumétrica de las lacasas, los valores desde el inicio del muestreo (día 3) con 1.16 ± 0.41 U/mL fueron en aumento constante hasta el día 11 de incubación con 49.03 ± 1.05 U/mL. Estos valores son superiores a los registrados por Camacho (2013), quien realizó el cultivo de la cepa CP-50 en el medio extracto de malta agar (EMA) en presencia de antraceno en diferentes concentraciones y en los correspondientes testigos (sin antraceno); los valores de las lacasas que registró este autor, estuvieron entre 0.41 U/mL y 26.25 U/mL, en diferentes días de incubación.

En ese mismo trabajo, el desarrollo micelial de la cepa CP-50 fue heterogéneo, ya que la caja Petri se cubrió entre 17 y 33 días, de acuerdo al cultivo en las diferentes concentraciones del antraceno. Es probable que el medio de cultivo y la presencia del antraceno hayan influido de manera determinante en la producción de las lacasas.

Con base a los resultados aquí obtenidos, los trabajos continuaron con la utilización del medio de cultivo PDA marca Difco, con la adición de extractos vegetales y/o la adición del ácido acetilsalicílico.

12.3. ANEXO 3

Coeficientes de correlación entre las variables de estudio en las cepas CP-50 y CP-753.

12.3.1. Cepa CP-50 con extractos vegetales y AAS

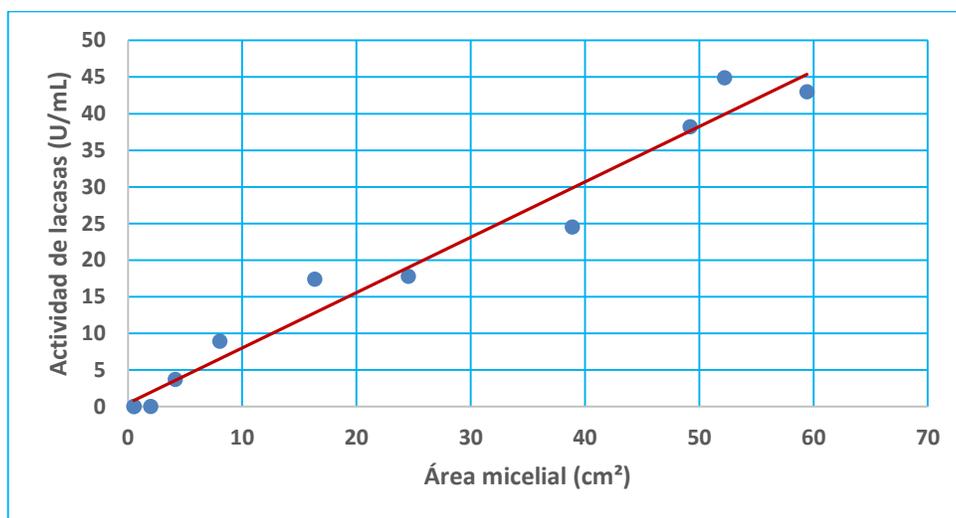


Figura 39. Coeficiente de correlación 0.9846. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

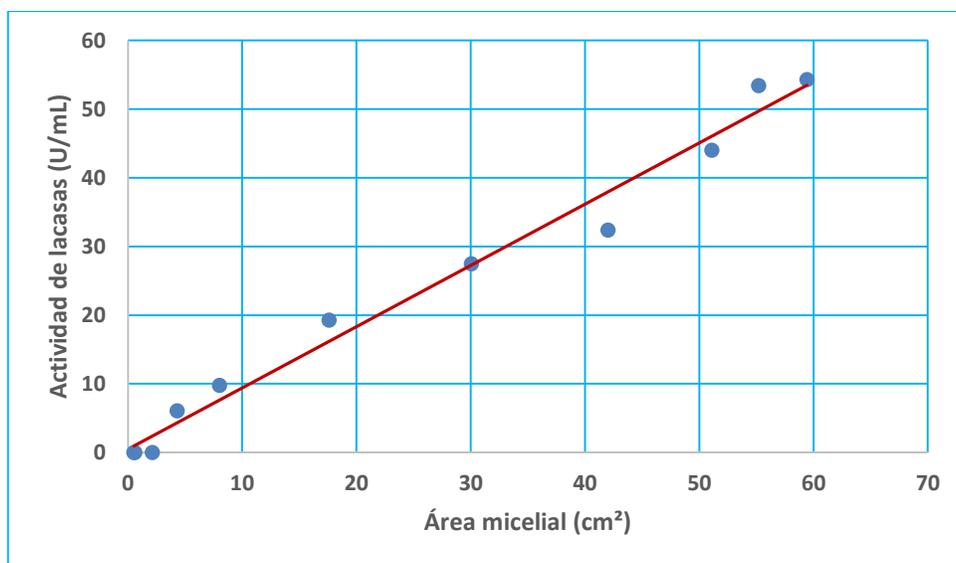


Figura 40. Coeficiente de correlación 0.9917. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM .

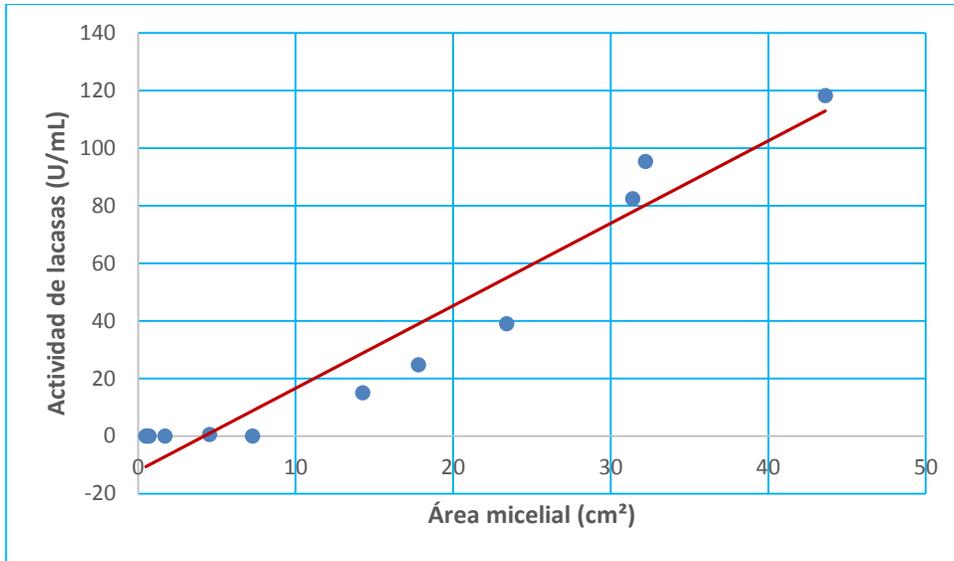


Figura 41. Coeficiente de correlación 0.9667. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).

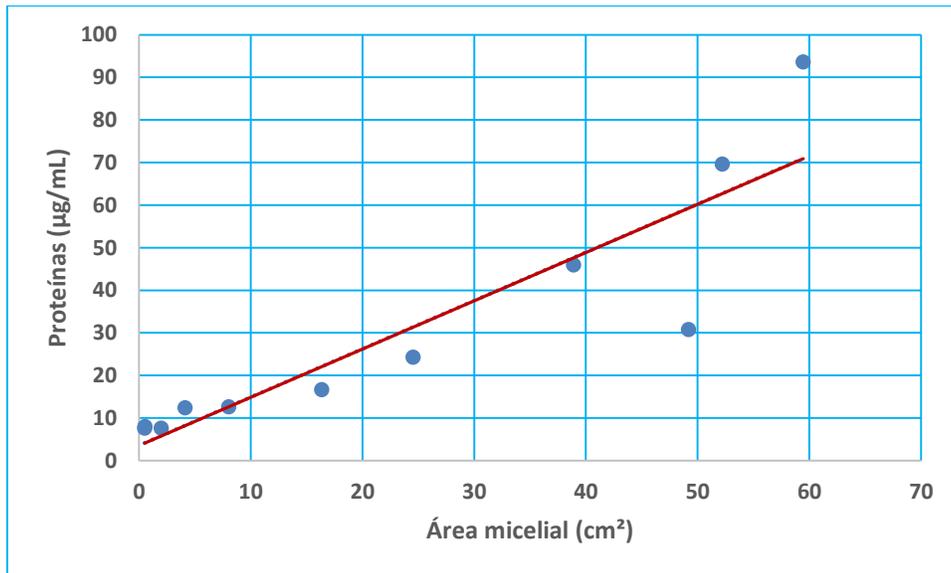


Figura 42. Coeficiente de correlación 0.9032. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

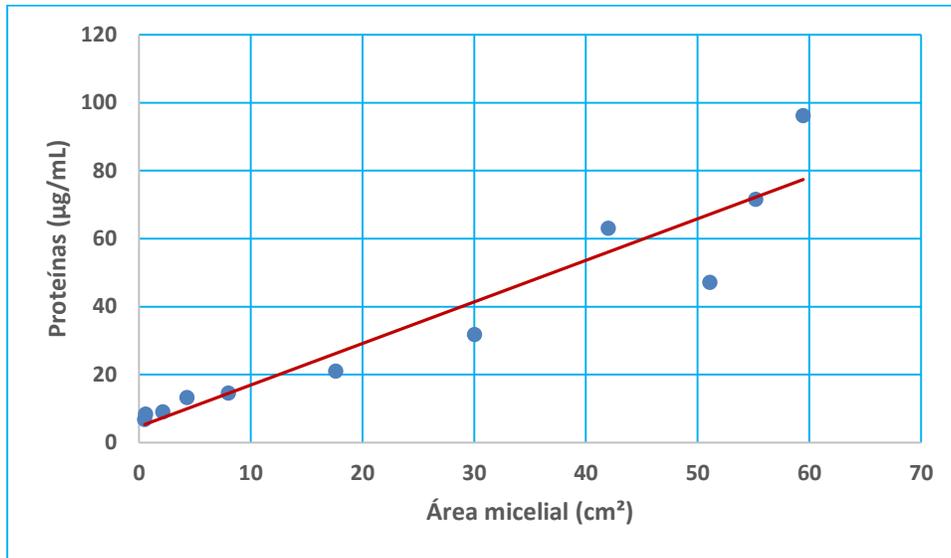


Figura 43. Coeficiente de correlación 0.9473. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM .

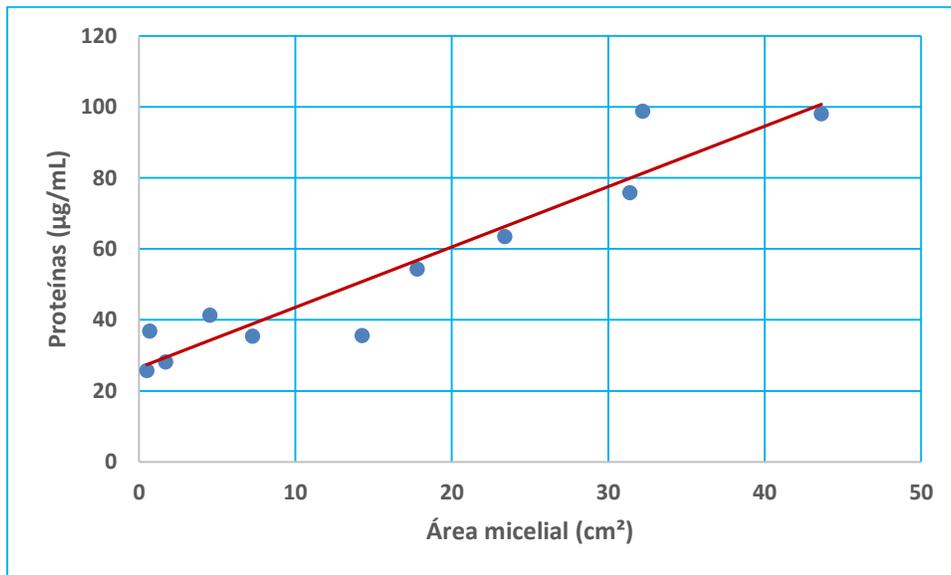


Figura 44. Coeficiente de correlación 0.9475. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).

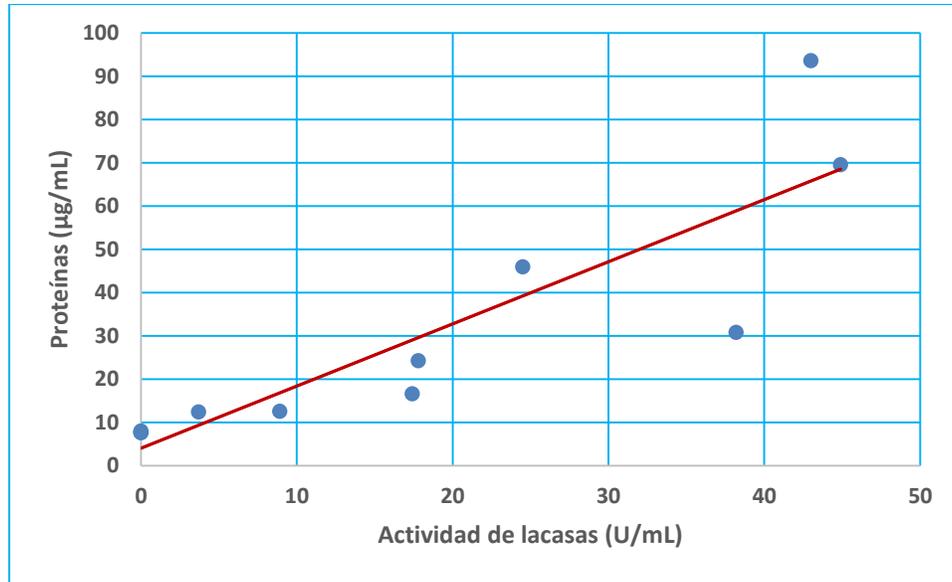


Figura 45. Coeficiente de correlación 0.8788. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

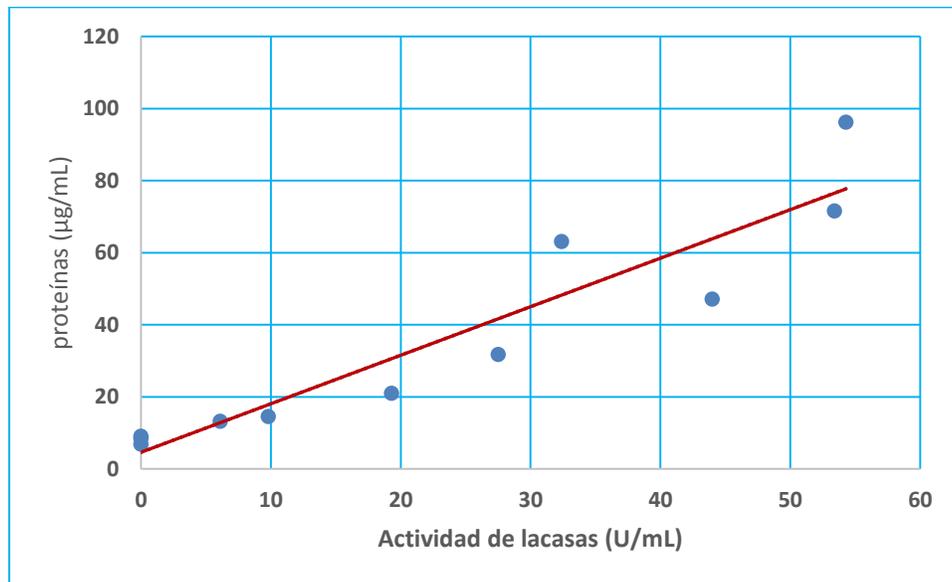


Figura 46. Coeficiente de correlación 0.9385. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM .

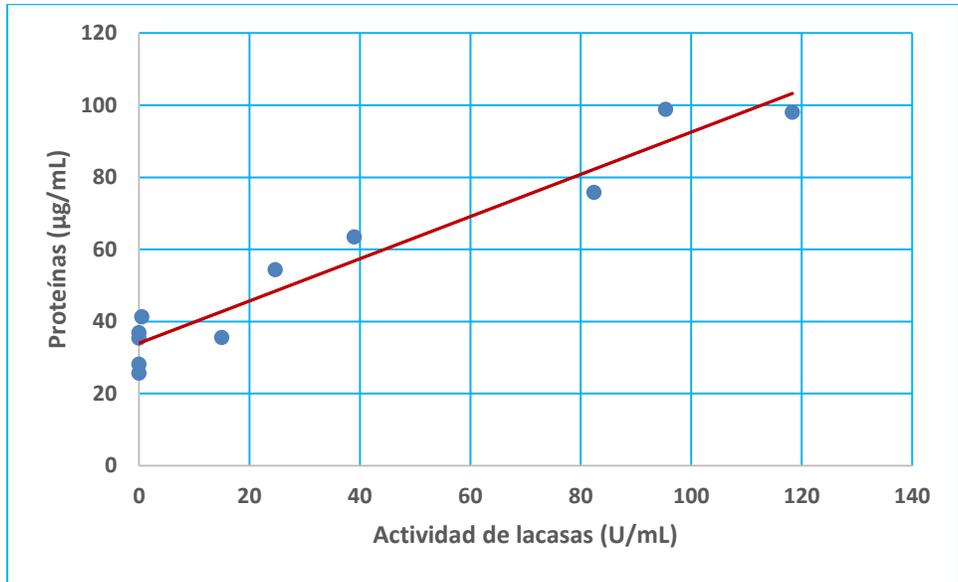


Figura 47. Coeficiente de correlación 0.9684. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con extractos de cebolla y sábila en proporción 6:3 (p/p).

12.3.2. Cepas CP-50 y CP-753, con adición de AAS

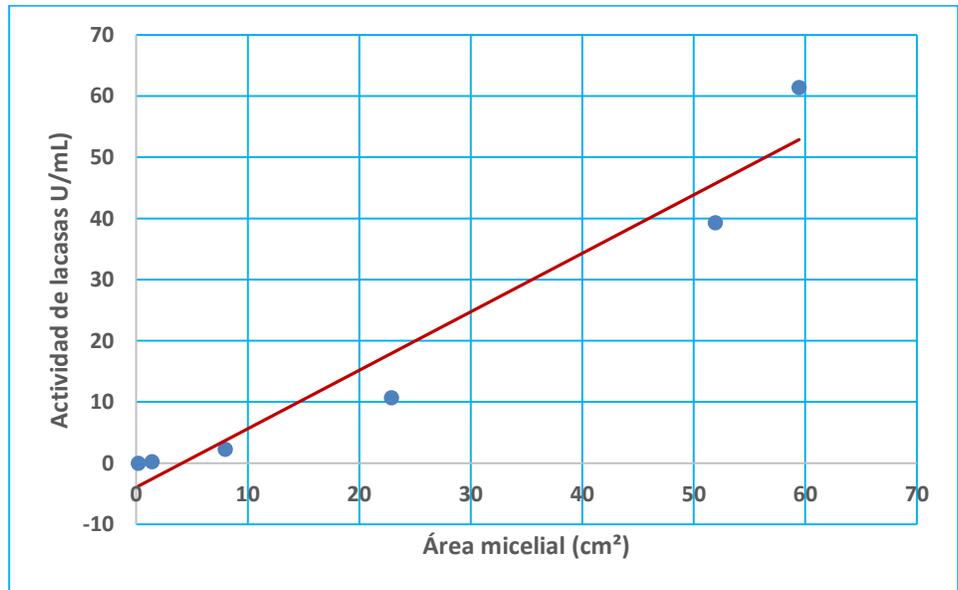


Figura 48. Coeficiente de correlación 0.9704. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

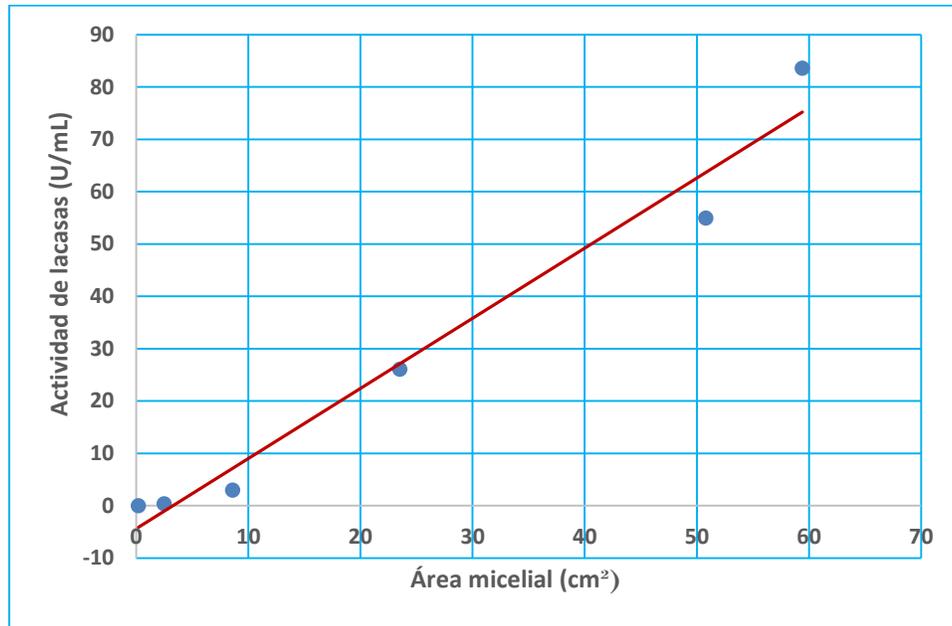


Figura 49. Coeficiente de correlación 0.9846. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM .

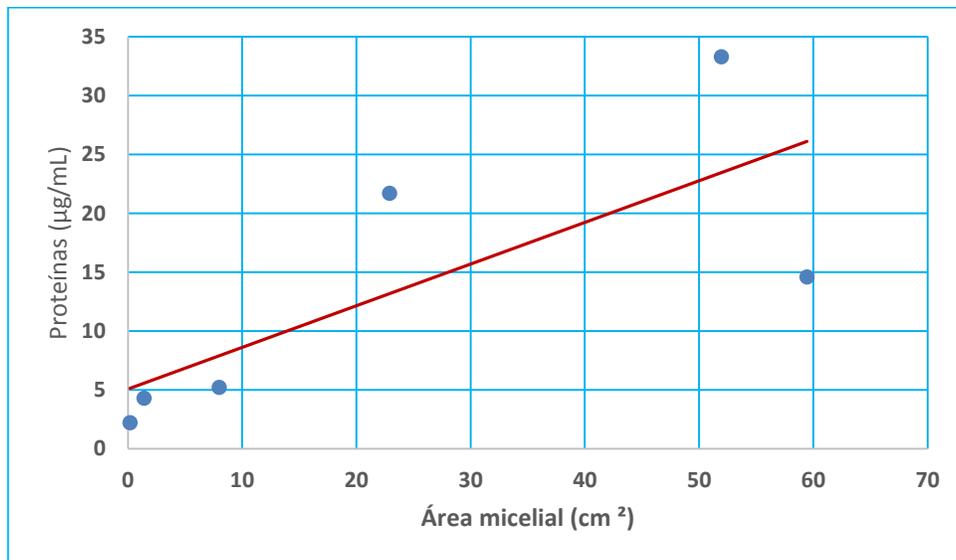


Figura 50. Coeficiente de correlación 0.7544. Positiva, no significativa entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

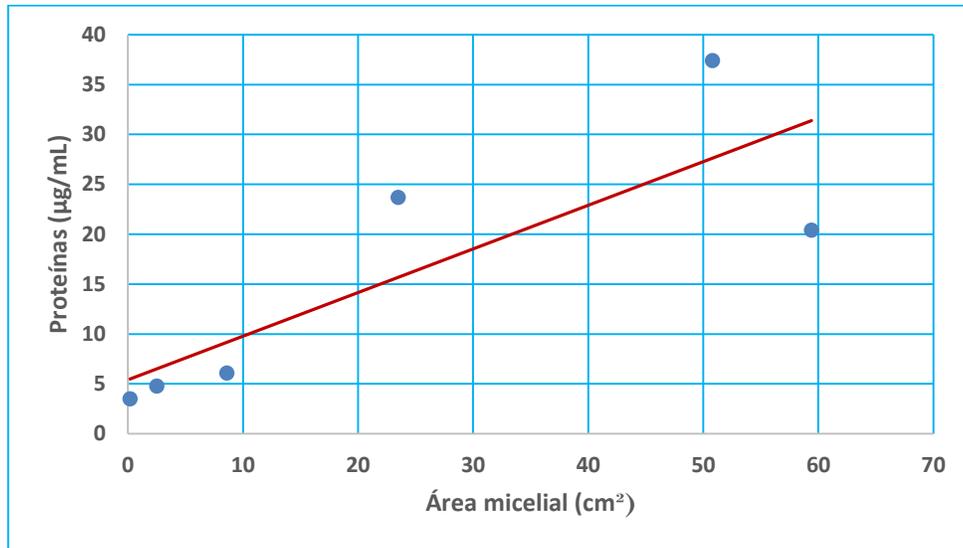


Figura 51. Coeficiente de correlación 0.8222. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 μM .

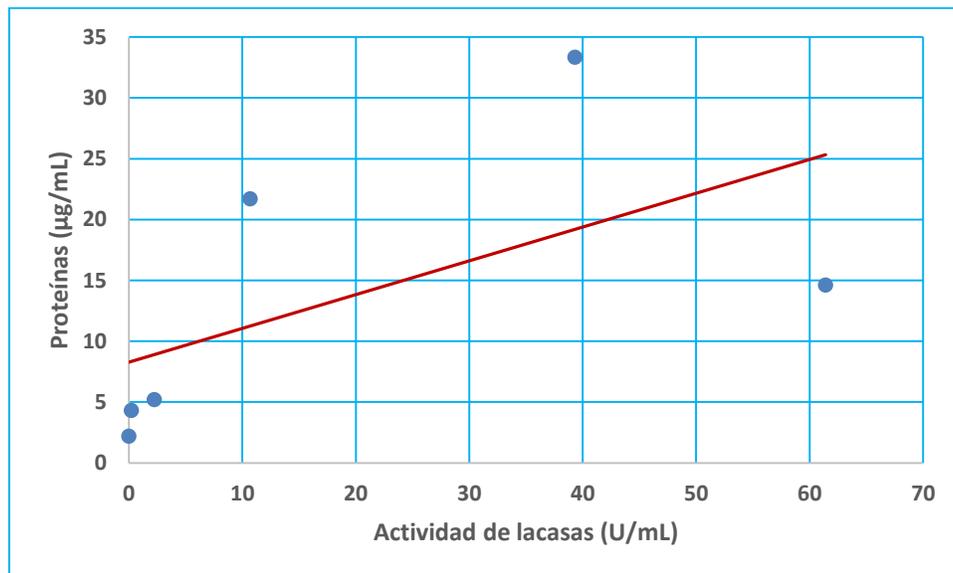


Figura 52. Coeficiente de correlación 0.5824. Positiva, no significativa entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, testigo.

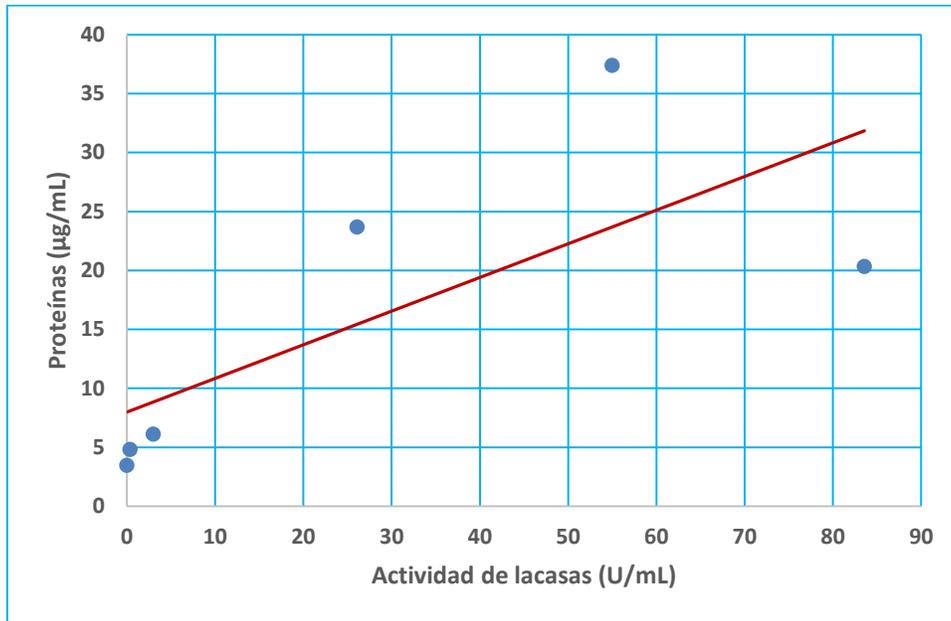


Figura 53. Coeficiente de correlación 0.7304. Positiva, no significativa entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-50 en medio PDA, con AAS 100 µM.

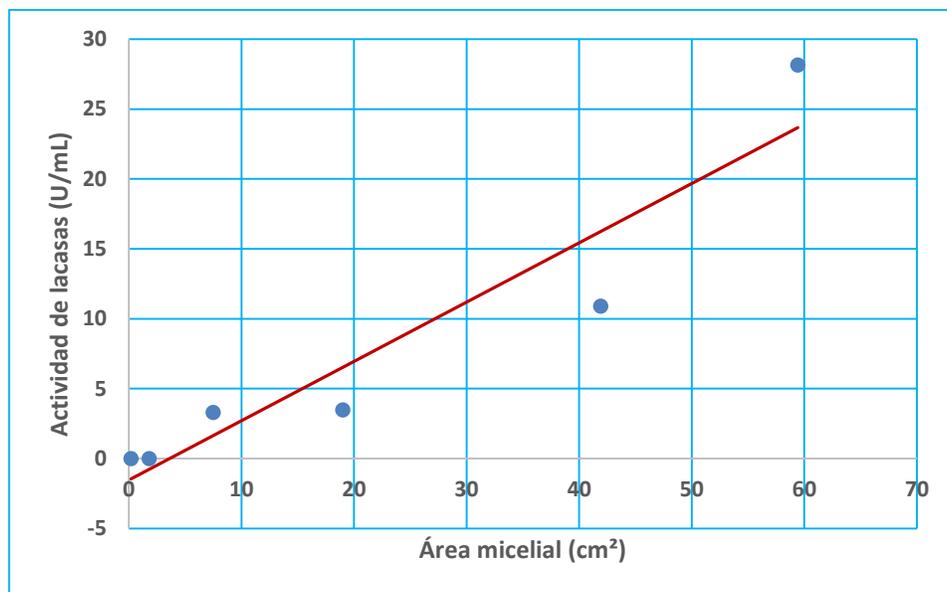


Figura 54. Coeficiente de correlación 0.9443. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.

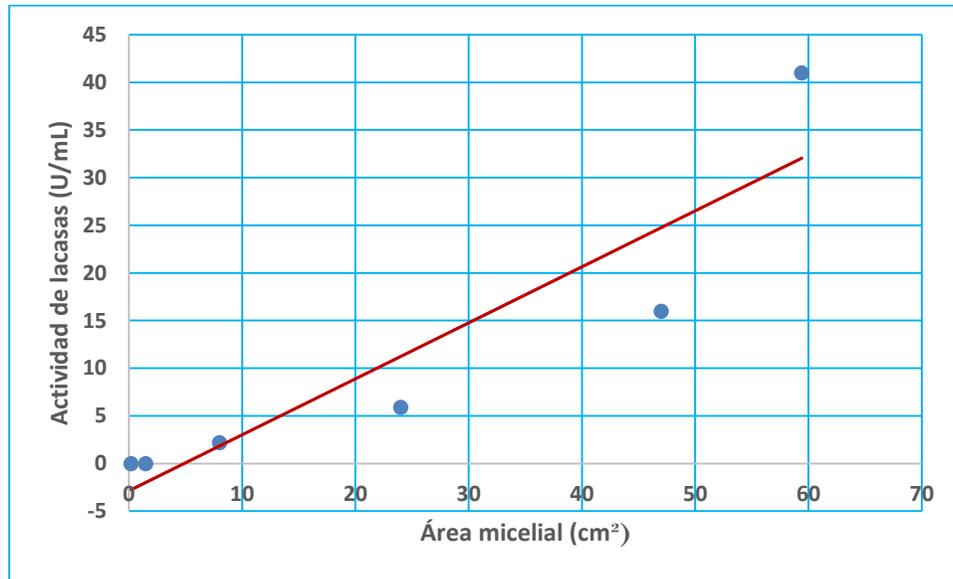


Figura 55. Coeficiente de correlación 0.9191. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y lacasas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM .

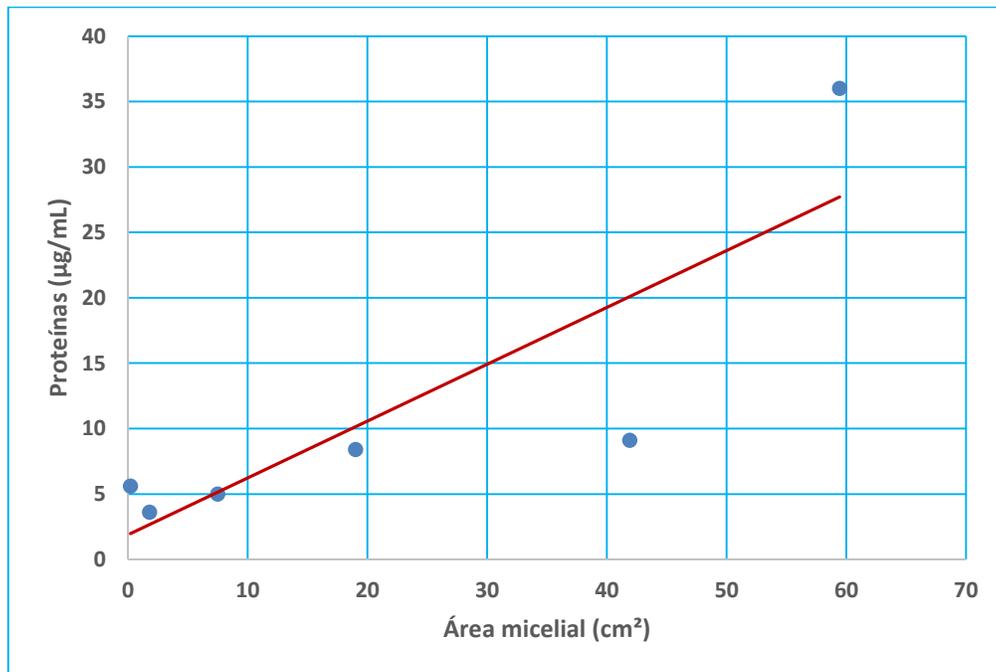


Figura 56. Coeficiente de correlación 0.8521. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.

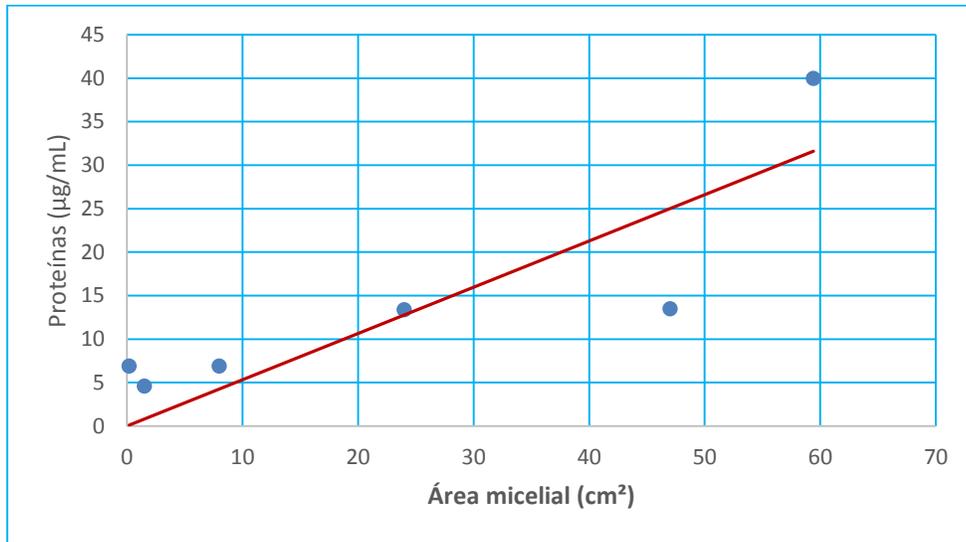


Figura 57. Coeficiente de correlación 0.8558. Con $\alpha = 0.05$ significativa y positiva entre las variables área micelial y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM .

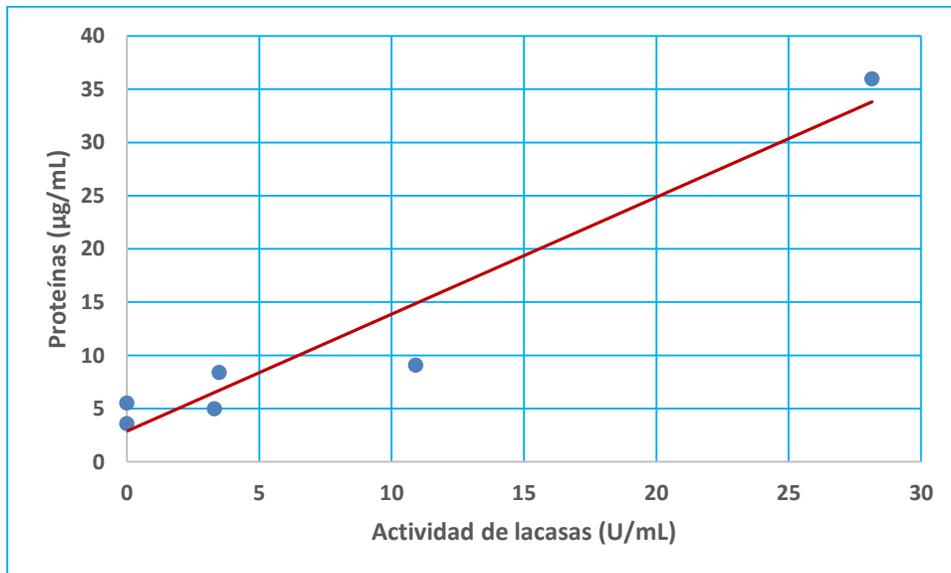


Figura 58. Coeficiente de correlación 0.9658. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, testigo.

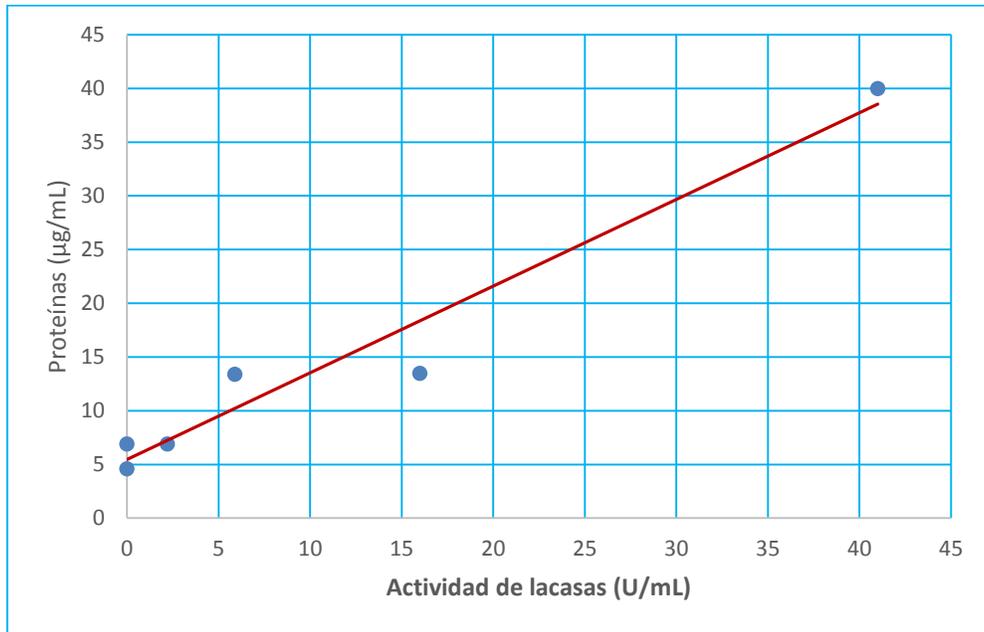


Figura 59. Coeficiente de correlación 0.9772. Con $\alpha = 0.01$ altamente significativa y positiva entre las variables lacasas y proteínas en la cepa CP-753 en medio PDA, con AAS 100 μM .