



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA

“PRESIDENTE JUAREZ”

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Fisiología y Genética Vegetal

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESPECIES DE GANODERMA ASOCIADAS A LA PUDRICIÓN DE
RAÍZ EN *Persea americana* Miller var *drymifolia* (Schltdl. y Cham) S. F.
Blake

Presenta:
Juan Mendoza Churape

Directora
Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez

Morelia, Mich. Abril, 2021

DEDICATORIA

A mis padres: Ma. de Jesús Churape y Juan G. Mendoza, por su apoyo incondicional, por enseñarme con sus errores y aciertos a ser una mejor persona, por brindarme la confianza y el cariño desmesurado.

A mi querida hermana: Sandra Churape, por creer en mí porque eres parte de este logro, por siempre estar allí y amarme tal cual soy.

A mis abuelos: El profesor Churape a quien orgullosamente llamo papá, una vez más le dedico mi trabajo, por ser mi maestro de vida, por haberme forjado en carácter y ganas de salir adelante, por enseñarme que siempre hay que trabajar sin importar nada. Por todo el cariño y el apoyo que siempre me ha dado. A mi abuelita Carmen Jiménez (q.e.p.d.), con mucho cariño donde quiera que estés abuelita, porque gracias a sus enseñanzas, ejemplo de vida y permitirme crecer a su lado, por ayudarme a forjar mi carácter.

A mi abuelita Triny (q.e.p.d.): por ser pieza clave y fundamental en mi vida, por el inmenso cariño que tenías por mí, por tu vida, por apoyarme incondicionalmente, porque aportaste mucho para que siempre lograra mis sueños, por creer en mí, lamento profundamente que ya no estés aquí.

A mi esposa Viry: Por tu infinita paciencia, amor y apoyo durante esta etapa, tus sacrificios y esfuerzos por salir adelante.

A mis hijas Mariana y Carolina: por ser mi motivación por brindarme una sonrisa en los momentos más difíciles, por restarles horas de convivencia para culminar esta etapa. Las amo.

Al ingeniero Juan E. Zapien Ramos: Porque siempre conté contigo por haber sido parte de todo esto, hasta siempre.

A mi familia en general a quienes creyeron en mí y a quienes no, siempre me dieron fuerza para terminar y no rendirme a terminar este proyecto de vida.

Juan Churape.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la realización de este proyecto de tesis.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme brindado la oportunidad de tener una preparación académica, abriendo las puertas de la Facultad de Agrobiología “Presiente Juárez”, esta institución que siempre llevaré en mi mente.

A la vida y a Dios por hacerme tan afortunado y siempre ofrecerme una salida.

Agradezco el esfuerzo de mi familia de mis padres, abuelos, hermana, de mi esposa e hijas por impulsarme a salir adelante.

A la Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez, por permitirme aprender a su lado, por la confianza depositada en mí. No tengo palabras para agradecer todas sus atenciones, el cariño y el gran apoyo así como el interés que siempre ha mostrado por ayudarme a culminar esta etapa, así como seguir en el camino del estudio por nunca negarme su conocimiento y sabiduría, y sobre todo por creer en mí.

Agradezco a mi Dr. Ricardo Valenzuela G. por el apoyo brindado en la realización de mi tesis, por brindarme más que su conocimiento su amistad y sus sabios consejos así como la motivación que siempre está dispuesto a darme. Gracias Doc!

Agradezco especialmente a mi mesa de sinodales: a la Dra. Martha Elena Pedraza Santos, la Dra. Patricia Delgado Valerio y el Dr. Ignacio Maldonado Mendoza, por su paciencia, sus atinados consejos y observaciones, así como por las valiosas aportaciones que cada uno hizo para hacer esto posible.

Agradezco a mis tías, Amparo Churape, Carmen Churape y Marcelina Churape e Ibón Mendoza por su gran cariño que tienen por mí, y su apoyo moral.

A mis suegros al señor Jesús Figueroa Diosdado y la Señora Leticia Cisneros; por todo su apoyo y cariño hacia mí a lo largo de mi carrera.

A mis compañeros de y amigos del Laboratorio; al ingeniero Andrés Coria, al M.C. Jesús A. Ordaz, al M.C. Roberto Díaz, Ing Miguel Adrián Martínez y todas las chicas que siempre me apoyaron, Lola, Deysi, Citla, Peny, Isa, Michy, Martin, Miny y Dany.

A mis amigos Ing. Jorge Luis Escalera R., a mi Compadre el Ing. Gerardo Arreola Quevedo y su esposa la Sra. Fernanda Rosiles P., La ing. Stephanie Peña, Mayra Naranjo S. y su esposo Jhony, por brindarme su amistad, por apoyarme en mis momentos más difíciles y demostrarme el sentido de la amistad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
Resumen general	vii
General summary	viii
Introducción general.....	1
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis.....	3
Literatura citada.....	4
Capítulo I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE <i>Ganoderma</i> ASOCIADAS A <i>Persea americana</i> Miller, var <i>drymifolia</i> (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake	ix
Resumen	ix
Summary	x
I. Introducción	6
Características morfológicas del género <i>Ganoderma</i>	6
Micelio.....	6
Esporomas.....	7
II. Materiales y Métodos	10
Área de estudio	10
Ubicación del área experimental.....	10
Material biológico.....	10
Purificación y multiplicación.....	11
Elaboración de medios de cultivo.....	11
Identificación de especies de <i>Ganoderma</i> a partir de esporomas.....	12
III. Resultados y discusión	14
Zonas de muestreo.....	14
Síntomas observados en campo.....	15
Aislamiento y purificación de <i>Ganoderma</i> spp.....	16
Caracterización morfológica de cepas.....	18
Forma de la colonia y textura del micelio.....	18
Caracterización morfológica de esporomas.....	19
<i>Ganoderma curtisii</i> (Berkeley, 1849).....	19
<i>Ganoderma applanatum</i> (Persoon, 1908).....	21
<i>Ganoderma lobatum</i> (Schwein, 1908).....	23

<i>Ganoderma resinaceum</i> (G. sessile) (Boud, 1889).....	24
IV. Conclusiones	28
V. Literatura citada	29
CAPÍTULO II: PATOGENICIDAD DE <i>Ganoderma</i> spp. ASOCIADAS A TRONCO Y RAIZ DE <i>Persea americana</i> Miller, VARIEDAD <i>drymifolia</i> (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake	xi
Resumen	xi
Summary	xii
I. Introducción	33
Síntomas y signos de pudrición blanca por <i>Ganoderma</i>	34
Papel de las basidiosporas.....	34
Ciclo de vida de <i>Ganoderma</i> spp.....	35
Pudrición blanca en cultivos agrícolas.....	36
Infección por <i>Ganoderma</i>	36
Hospederos e importancia de <i>Ganoderma</i>	37
II. Materiales y Métodos	39
Purificación.....	39
Conservación de cepas y preparación de inóculo.....	39
Pruebas de patogenicidad.....	41
Preparación del sustrato.....	41
Preparación del material vegetativo.....	41
Inoculación.....	42
Variables respuesta.....	43
III. Resultados y discusión	44
Pruebas de patogenicidad en plántulas de aguacate.....	44
Síntomas y signos expresados durante las pruebas de patogenicidad en las plántulas de aguacate.....	44
Reaislamiento del Fitopatógeno y caracterización de síntomas.....	50
Virulencia de las cepas de <i>Ganoderma</i> spp.....	51
Evaluación de la severidad de la enfermedad.....	51
IV. Conclusiones	55
V. Literatura citada	56
CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Ganoderma</i> spp. ASOCIADAS A TRONCO Y RAIZ DE <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake	xiii
Resumen	xiii
Summary	xiv
I. Introducción	65
Problemas en PCR y extracción de ADN en especímenes de <i>Ganoderma</i>	66
II. Materiales y Métodos	68
Extracción de ácidos nucleicos.....	68
Cuantificación y análisis de calidad del ADN.....	68
Reacción en cadena de la polimerasa.....	69
Secuenciación.....	71
Purificación de productos de PCR.....	71
Secuenciación estándar.....	71
Análisis filogenético.....	72

III. Resultados.....	73
Caracterización molecular.....	73
Análisis filogenético.....	73
Factor de elongación (EF-1 α).....	73
RPB2.....	76
Discusión.....	79
IV. Conclusiones.....	82
V. Bibliografía.....	83

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Características Morfológicas para la identificación de esporoms.....	13
2	Síntomas de <i>Ganoderma</i> en árboles de aguacate.....	15
3	Cepas de <i>Ganoderma</i> spp.....	19
4	Morfología de esporomas de <i>Ganoderma curtisii</i>	20
5	Caracteres analizados en la identificación morfológica de <i>Ganoderma curtisii</i>	21
6	Morfología de esporomas de <i>Ganoderma applanatum</i>	22
7	Caracteres analizados en la identificación morfológica <i>Ganoderma applanatum</i>	22
8	Morfología de esporomas de <i>Ganoderma lobatum</i>	23
9	Caracteres analizados en la identificación morfológica <i>Ganoderma lobatum</i>	24
10	Morfología de esporomas de <i>Ganoderma resinaceum</i> Boud 1889 (<i>G. sessile</i>).....	25
11	Caracteres analizados en la identificación morfológica <i>Ganoderma resinaceum</i> Boud 1889 (<i>G. sessile</i>).....	25
12	Granos de sorgo invadidos por el micelio de las cepas de <i>Ganoderma</i>	41
13	Inoculación de plántulas de aguacate con cepas de <i>Ganoderma</i> spp.	42
14	Fotografía que muestra la Escala de Lara (2008).....	44
15	Sustrato colonizado con micelio de <i>Ganoderma</i> spp.....	45
16	Colonización del micelio en el tejido de los cotiledones.....	46
17	Formación de esporomas de <i>Ganoderma</i> spp., en la corona de las plantas inoculadas.....	46
18	Esporomas de <i>Ganoderma</i> spp., asociados a las raíces y tallos de las plantas de aguacate inoculadas.....	47
19	Síntomas en hojas de plántulas inoculadas con <i>Ganoderma</i> spp.....	48
20	Síntomas en plántulas inoculadas con <i>Ganoderma</i> spp.....	49
21	Síntomas y signos observados de la infección en plantas de <i>Persea americana</i> Miller var <i>drymifolia</i> , inoculadas con <i>Ganoderma</i> spp.....	50
22	Grado de virulencia producido por cada cepa <i>Ganoderma</i> spp., en plantas de aguacate.....	52
23	Gel de agarosa al 1 % para visualización de la integridad del DNA genómico extraído de esporomas de <i>Ganoderma</i> spp., obtenidas de árboles de <i>Persea americana</i> Mill var <i>drymifolia</i> con síntomas de la enfermedad.....	69

24	Electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con Syber Green, para visualizar las amplificaciones para A) RPB2; B) EF-1 α	73
25	Árbol de distancia derivado de secuencias parciais parciais del género Ganoderma codificantes para EFE-1 α	74
26	Árbol de Máxima Parsimonia EFE-1 α	75
27	Árbol de distancia derivado de secuencias parciais parciais del género Ganoderma codificantes para RPB2.....	76
28	Árbol de Máxima Parsimonia RPB2.....	77
29	Árbol de Máxima Parsimonia concatenado EFE-1 α y RPB2.....	78

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Localización geográfica de los 30 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.....	14
2	Características y ubicación de los sitios de recolección de acuerdo a la cepa aislada	16
3	Primers utilizados para la identificación de especies de <i>Ganoderma</i> spp., asociadas a <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i>	70

Resumen General

El presente trabajo se planteó con el objetivo de coleccionar, aislar, caracterizar morfológica y molecularmente, así como determinar la severidad y virulencia de especies del género *Ganoderma*, asociadas a la pudrición de tranco y raíces de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake, en municipios y localidades del estado de Michoacán en la zona conocida como “Franja Aguacatera”. Se realizaron diversas recolectas en las zonas con mayor superficie plantada y se obtuvieron un total de 30 aislados con esporomas de cada recolecta respectivamente. La caracterización morfológica se realizó con base en sus características culturales en medio nutritivo PDA y sus caracteres morfológicos tanto macro como microscópicos descritos para el género. Para la identificación molecular se realizó la extracción de ADN de acuerdo al protocolo descrito por Cenis (1992) y Osuji *et al.* (2015). Posteriormente se llevó a cabo la PCR con base en los iniciadores que codifican para ITS1 e ITS4, factor de elongación (EF-1 α) y RPB2, los fragmentos obtenidos se purificaron y secuenciaron en Macrogen Inc. Estas secuencias se compararon en homología por medio de análisis BLAST, el total de las secuencias se alineó en MEGA 6.0 para la búsqueda del mejor modelo evolutivo, distancias genéticas y la construcción de cladogramas con base en la máxima parsimonia y máxima verisimilitud. Posteriormente se evaluó la patogenicidad de las cepas para determinar la interacción fitopatógeno-hospedero, con pruebas realizadas en plantas de aguacate provenientes de un mismo árbol, éstas se sembraron en un sustrato estéril a base de 2:1 suelo tipo andosol/arena, después de dos meses se inocularon con micelio de las cepas de *Ganoderma* spp. Se evaluó la virulencia de acuerdo al tiempo que tardaron en presentar el primer síntoma, así como la severidad por los daños que produjeron en raíz y ápice caulinar en comparación a los testigos. Con los análisis morfológicos y moleculares se concluye que las 30 cepas pertenecen a *Ganoderma*. La evaluación patogénica determinó que todas las cepas fueron patógenas, presentaron una virulencia que osciló de 16 a 80 días. El total de las cepas fue capaz de generar pudrición blanca radical de tallo, corona y de los cotiledones de la semilla. Así como amarillamiento de las hojas, marchitez y defoliación en el 80 % de los tratamientos y destrucción del sistema radical y del tejido conductor, este último como el síntoma más severo, en algunos casos se obtuvo crecimiento de cuerpos fructíferos de los hongos, los cuales coinciden con los observados en campo.

Palabras clave: Secuenciación, morfología, virulencia.

General Summary

The present work was proposed with the objective of collecting, isolating, characterizing morphologically and molecularly, as well as determining the severity and virulence of species of the genus, associated with the foot rot and roots of *Persea americana* Miller, variety *drymifolia* (Schltdl. And Cham.) SF Blake, in some municipalities and localities of the state of Michoacán in the area known as “Franja Aguacatera”. Various collections were made in the areas with the largest planted area and a total of 30 isolates with sporomas of each one were obtained respectively. The morphological characterization was carried out based on its cultural characteristics in PDA nutrient medium and its morphological characters, both macro and microscopic, described for the genus. For molecular identification, DNA extraction was performed according to the protocol described by Cenis (1992) and Osuji et al., (2015). Subsequently, a PCR was carried out based on the primers that code for ITS (1 and 4) elongation factor ($EF-1\alpha$) and RPB2, the fragments obtained were purified and sequenced in Macrogen Inc. These sequences were compared in homology by means of BLAST analysis, the total of the sequences will be aligned in MEGA 6.0 for the search for the best evolutionary model, genetic distances and the construction of cladograms based on maximum parsimony and maximum likelihood. Later the pathogenicity of these strains was evaluated to determine the interaction strain-host with tests carried out on avocado plants from the same tree, these were sown in a sterile substrate based on sand and after two months they were inoculated with mycelium of the strains of *Ganoderma* spp. Virulence was evaluated according to the time it took to present the first symptom, as well as the severity of the damage caused to the root and apex compared to the controls. Morphological and molecular analyzes concluded that the 30 strains belong to *Ganoderma*. The pathogenic evaluation was conclusive and determined that all the strains were pathogenic, presented a virulence that ranged from 35 to 80 days. All the strains were capable of producing radical white rot of stem, crown and cotyledons of the seed. As well as yellowing of the leaves, wilting and defoliation in 80% of the treatments and destruction of the root system and the conductor tissue, this as the most severe symptom, in some cases growth of fruiting bodies of the fungi was obtained, which coincide with those observed in the field.

Keywords: Sequencing, morphology, virulence.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El fruto de aguacate actualmente es uno de los alimentos de moda en el mundo (Welle, 2019), México es el principal proveedor, contribuye con más del 85 % de la producción total. Para satisfacer la demanda global, las áreas de plantación de este cultivo han incrementado exponencialmente en el país. Las superficies con mayor área plantada se encuentran en el estado de Michoacán, con alrededor de 166,604 ha reportadas (FOSIAP, 2019). Esto dado al cambio de la cubierta forestal en los bosques de pinos y encinos de las zonas afectadas y el proceso de conversión de bosques naturales a huertos de aguacate. Los huertos de aguacate de propiedad privada se encuentran en tierras que fueron bosque anteriormente, el cual se ha visto afectado principalmente por el cambio de uso de suelo, debido a una serie de factores en la normatividad de políticas y normas forestales Mexicanas, y el aumento en la demanda del comercio de dicho frutal (Barsimantova y Antezanab, 2011), ha generado un proceso de desplazamiento y pérdida de especies no solo vegetales sino de otros organismos oriundos del ecosistema, como lo son los hongos que han modificado sus ciclos y hábitos alimenticios, uno de ellos es el género *Ganoderma*, que es originario de bosques de pino-encino, su principal papel en la naturaleza es como degradador de madera y materia orgánica (Encina *et al.*, 2012). A pesar de que Michoacán es líder en producción de aguacate, el cultivo se enfrenta a factores que limitan su producción, estos pueden ser biogénicos (causados por microorganismos como hongos (antracnosis), bacterias (pudriciones) y nematodos; por razones prácticas se incluyen entre estos a los virus y viroides (mancha de sol), cuya identificación como seres vivos es discutible; o abiogénicos que influyen directamente sobre la producción, esto genera un impacto directo sobre la calidad y cantidad de los frutos. Entre estos factores se encuentran: la fluctuación de temperaturas que van desde bajas a muy altas, fenómenos meteorológicos: como exceso de lluvia, heladas, granizadas, y el tipo de suelo: salinidad y acidez, estos factores se encuentran entre los más determinantes para el desarrollo de la planta. (Téliz y Mora 2015; Whiley *et al.*, 2007; Mejía, 2011).

En la zona productora del estado de Michoacán conocida como “la franja aguacatera”, se calcula que las enfermedades presentes en el cultivo afectan en más de una tercera parte de la producción. Las pérdidas económicas se estiman en miles de pesos para los productores y la cifra aumenta año con año, se tienen reportes de fitopatógenos que destruyen el sistema radicular, principalmente *Phytophthora cinnamomi* Rands, que causa la enfermedad de

podrición de la raíz en las plantas de *Persea americana* y es el fitopatógeno económicamente más importante del aguacate en todo el mundo. Este fitopatógeno ataca árboles de todas las edades y destruye a las raíces pequeñas, que se vuelven negras y quebradizas y finalmente mueren, es una de las enfermedades más importantes en el cultivo, se tienen registros no solo en México sino en otros países donde se ha establecido el cultivo; como Australia, Sudáfrica y Estados Unidos, por mencionar algunos (Pegg *et al.*, 2002; Lara, 2008; Téliz y Mora, 2015).

La importancia de los fitopatógenos que afectan a los cultivos está determinada por la distribución y severidad de los daños que ocasionan. Las enfermedades en el cultivo de aguacate están presentes en fruto, follaje, tronco y raíz. Las más destructivas para los árboles son las localizadas en el cuello y raíces, los causantes de estas infecciones principalmente son: *Rosellinia necatrix*, *Fusarium* spp., *Armillaria mellea* y *Ganoderma* spp.; estos últimos causantes de podrición blanca del tejido leñoso y pueden llegar a ser tan severos que producen la muerte del árbol con un conjunto de síntomas bien diferenciados (Campos, 2003; Forest Pest Fact Sheet, 2014; Téliz y Mora, 2015; Loyd *et al.*, 2018).

Los síntomas ocasionados por *Ganoderma* spp., son: defoliaciones, amarillamiento de las hojas, muerte descendente de ramas, pérdida de vigor, podrición blanca del duramen y principalmente de la albura, por lo cual se presentan canceres de diversas dimensiones en la base del tallo y podrición de las raíces (Schwarze y Ferner, 2003). Los signos que se observan con mayor frecuencia en los árboles infectados son los esporóforos ya sea en árboles aún vivos o muertos y en los tocones y abundante micelio blanco o con diferentes tonalidades de café (Ryvarden, 2000; Swiecki y Bernhardt, 2006).

La clasificación taxonómica que se ha empleado para la identificación de *Ganoderma* es mediante características morfológicas tanto macro como microscópicas. En la actualidad también se realiza con la ayuda de técnicas moleculares y otros caracteres de origen biológico (Ryvarden y Johansen, 1980; Corner, 1983; Gottlieb y Wright, 1999; Ryvarden, 2004, Torres y Guzmán, 2012).

Frecuentemente se utilizan marcadores moleculares para la caracterización e identificación de especies de *Ganoderma*, con la ayuda de secuencias de ADN, lo que ha generado caracteres bien definidos e independientes de la morfología del individuo. Sin embargo, estas

herramientas se utilizan en combinación para identificar especies que anteriormente fueron renombradas o mal identificadas.

Las técnicas moleculares basadas en ADN son las herramientas que más han ayudado para la identificación correcta de la gran diversidad genética y filogenética de especies de *Ganoderma*, han definido y separado grupos entre especies. Hasta el momento no existen reportes sobre la presencia, la expresión y los daños de la enfermedad en las plantas de *Persea americana* Miller var. *drymifolia*, con base en lo anterior se plantearon hipótesis y objetivos para el presente trabajo de investigación:

Hipótesis

Existe diversidad de especies del género *Ganoderma* asociadas a la pudrición blanca de raíces y madera en aguacate (*Persea americana* Mill var. *drymifolia*) e inducen síntomas aéreos y la muerte de la planta.

Objetivo General

Determinar morfológica y molecularmente especies del género *Ganoderma* asociadas a *Persea americana* Miller var. *drymifolia*.

Objetivos específicos:

1. Identificar morfológicamente aislados y esporomas de *Ganoderma* de diferentes sitios de recolección asociados a arboles de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake
2. Evaluar la patogenicidad de las cepas obtenidas de *Ganoderma* spp., para determinar su virulencia y severidad en plantas sanas de *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.
3. Identificar molecularmente esporomas de *Ganoderma* spp., asociados a raíces y troncos de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake mediante técnicas moleculares

II. Literatura citada

- Barsimantova J. y Antezanab J. N. 2011.** Forest cover change and land tenure change in Mexico's avocado region: Is community forestry related to reduce deforestation for high value crops? *Applied Geography*. 32 (2012) 844 -853.
- Campos, A. J. 2003** notas de curso: Descripción de enfermedades del aguacate. Fitopatología y micología. Especialidad de Fruticultura y Parasitología Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
- Corner E. J. H. 1983.** Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. Beihefte zur Nova Hedwigia, Weinheim
- Forest Pest Fact Sheet, 2014.** *Armillaria* root disease (*Armillaria* spp.) Saskatchewan Ministry of Environment. Disponible en URL: <http://www.environment.gov.sk.ca/adx/asp/adxGetMedia.aspx?DocID=3630,184,121,104,81,1,Documents&MediaID=4160&Filename=Armillaria+root+disease.pdf>. Consulta realizada el 30 de julio de 2014.
- Gottlieb AM, Wright JE. 1999.** Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103, 6: 661–673.
- Infosiap. 2019.** “Superficie plantada por estado (Michoacán), cultivo aguacate” http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp Consultado 22 de Julio 2019.
- Lara, Ch. Ma. B. N. 2008.** Variabilidad fenotípica y patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands. En la franja aguacatera de Michoacán, México.
- Loyd A.L., Linder E.R., Anger N.A., Richter B.S., Blanchette R.A., Smith J.A. 2018.** Pathogenicity of *Ganoderma* Species on Landscape Trees in the Southeastern United States. *Plant Disease PLoS ONE* 13: 0199738.
- Mejía, V. E. 2011.** Aguacate, *Persea americana* Miller. Bayer CropScience una división de Bayer S.A. Colombia. 16-48 Pp.

- Pegg, K. G. Coates, L. M. Korsten, L. Harding, R. M. 2002.** Foliar and soilborne diseases. In: WileyAW, Schaffer B, Wolstenholme BN, editors. The avocado: botany, production and uses. Wallingford: CAB International. 299–338 Pp.
- Ryvarden L, Johansen I. 1980.** A preliminary polypore flora of East Africa. Fungiflora, Oslo Vol. 131, Fasc.
- Ryvarden L. 2000.** Studies in Neotropical Polypores 2: A Preliminary key to Neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. Mycologia 92:180-191.
- SAGARPA, 2012.** Monografía del sector aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado http://www.2006-2012.economia.gob.mx/files/Monografia_Aguacate.pdf Consultado 19 de Julio de 2017.
- Schwarze, F. and Ferner, D., 2003.** “*Ganoderma* on Trees - Differentiation of species and studies of invasiveness”. Arboricultural Journal, 27: 59-77.
- Swiecki, T.J. and Bernhardt, E.A., 1990.** “A Delicate balance: Impacts of diseases and insects on the health of California oaks”. Fremontia, 18: 58-63.
- Téliz, O. D. y Mora, A. A. 2015.** El Aguacatero y su Manejo Integrado. 2da Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.
- Torres, M. G., Guzmán-Dávalos L. 2012.** The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. Mycotaxon 119: 201–216.
- Welle D. 2019.** El salmón y el aguacate, los alimentos de moda | DW Documental. ARD, Deutscher Medienrat – Film, Rundfunk und audiovisuelle Medien (de), Informations-Verarbeitungs-Zentrum y German Commission for UNESCO. www.dw.com
- Wiley, A. W. Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. 2007.** El Palto, Botánica, Producción y Usos. Ediciones Universitarias de Valparaiso. 275-310 Pp.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE *Ganoderma* ASOCIADAS A *Persea americana* Miller, var *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se planteó el objetivo de identificar morfológicamente aislados y esporomas de *Ganoderma* obtenidos de diferentes sitios de recolección asociados a arboles de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake. Se realizaron muestreos y se seleccionaron recolectas de raíz, tronco y esporomas en árboles con síntomas de marchitez en la parte aérea y en raíces con pudrición suave y blanca, en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH, donde se obtuvieron 30 aislados que se almacenaron en semillas de sorgo estériles. Se realizó una caracterización cultural y morfológica, se evaluó el tipo de micelio y coloración y se determinaron las características microscópicas; en los esporomas se hicieron cortes para observar el tipo de micelio, coloración y forma de las esporas. En la caracterización cultural todas las cepas presentaron micelio algodonoso, conforme envejece se torna corchoso, con variación en el color; de blanco 23 %, amarillas 26 %, crema 40 % y 13 % color café. Microscópicamente se observó micelio modificado, presencia de fíbulas. Los esporomas que se recolectaron de campo adheridos a los arboles de aguacate enfermos presentan píleo suberoso a leñoso de color amarillo, rojo, café, gris, rojizo, sésiles o con estípites, de 10 a 50 cm de longitud con esporas ornamentadas (ovoides, acerradas, dentadas) coloreadas de café a marrón-rojizo. Estas características son similares a las descritas para el género *Ganoderma*. Se identificaron cuatro especies; *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum* y *Ganoderma resinaceum*.

Palabras clave: Esporoma, fitopatógeno, cepa, basidiospora, hifas.

SUMMARY

In this research work, the objective was to collect, isolate and morphologically characterize species of the genus *Ganoderma*, associated with avocado cultivation in the state of Michoacán. Various samplings were carried out, root, trunk and sporophorous collections were selected in trees with wilting symptoms in localities belonging to the avocado fringe of the state of Michoacán, the samples were taken to the phytopathology laboratory of the "Presidente Juárez" Faculty of Agrobiology of UMSNH, where 30 isolates were obtained and stored in sterile sorghum seeds. A cultural characterization was carried out in PDA culture medium, evaluating the type of mycelium, coloration and morphology, determining microscopic characteristics; from the sporomas, cuts were made to observe the type of mycelium, coloration and shape of the spores. In the cultural characterization, all the strains presented cottony mycelium, as it ages it becomes corky, sometimes white with light brown and / or yellow and reddish tones, with streaks. Microscopically modified mycelium was observed, presence of fibulae. Field-collected sporophores attached to diseased avocado trees present suberous to woody crown of yellow, red, brown, gray, reddish, sessile or stipe, 10 to 50 cm long with ornate spores (ovoid, close , toothed) colored (brown to reddish-brown). Similar characteristics to those described for the genus *Ganoderma*. Identifying six species; *Ganoderma curtisii* *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum*, and *Ganoderma resinceum*.

Keywords: Esporoma, fitopatógeno, cepa, basidiospora, hifas.

I. Introducción

El género *Ganoderma* comprende un grupo de hongos que pertenecen a los macromicetos, género importante dentro de la familia Polyporaceae, es un grupo grande, mantiene una distribución cosmopolita con alrededor de 220 especies, algunas como saprótrofitos, hospederos de madera, tanto muerta como de árboles vivos, estas especies se encuentran principalmente asociadas a raíces, se desarrollan como parásitos y fitopatógenos importantes, causan una muy distintiva pudrición blanca en tejidos leñosos, estas propiedades ligninolíticas fueron determinantes para su clasificación dentro de especies en el grupo de hongos de pudrición blanca (Moncalvo y Ryvarden 1997; Ryvarden 2004; Salmon *et al.*, 2014). Es un grupo diverso, está distribuido a lo largo y ancho de los continentes, ha sido objeto de múltiples investigaciones, por el importante papel que desempeña dentro de varios campos de las áreas científicas, con notable interés económico, en la agricultura, silvicultura y la medicina (Mossebo *et al.*, 2014).

La clasificación taxonómica a la que fueron sometidos los miembros de esta familia se llevó a cabo basada principalmente en la morfología, de acuerdo a las características presentes y perceptibles observadas, como la conformación de la superficie del pileo, ya sea de tipo laqueado, con tonos lustrosos y brillantes o simplemente de aspecto mate u opaco, la configuración del sistema hifal y la superficie del píleo. Otro carácter taxonómico sobresaliente es la disposición de sus basidiosporas, la forma, ornamentación y la presencia de un patrón que también se apega a la estructura, (Furtado, 1962, 1965, 1981; Steyaert, 1972, 1980; Ryvarden y Johansen, 1980; Corner, 1983; Gottlieb y Wright, 1999; Ryvarden, 2004, Torres y Guzmán, 2012). A pesar de los extensos estudios a nivel genérico e infragenérico, actualmente solo cinco géneros son aceptados, *Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia*, *Humphreya* y *Tomophagus* (Moncalvo *et al.*, 1995; Moncalvo y Ryvarden 1997; Ryvarden, 2004; Kirk *et al.*, 2008, Tham *et al.*, 2012).

Características morfológicas del género *Ganoderma*

Micelio

El micelio presenta una fase vegetativa formada por micelio macroscópico. Los basidiomicetos pasan por tres fases de desarrollo que corresponden a tres formas de micelio:

primario, secundario y terciario. El primero es el micelio que se origina de la germinación de una basidiospora, está formado por hifas septadas, monocarióticas y haploides. El micelio secundario se deriva del primario, y en éste las hifas son dicarióticas. Se forman estructuras en forma de grapa (fibulas) para mantener la condición dicariótica, migran los núcleos de un septo a otro; en esta fase las hifas forman un pseudotejido llamado plecténquima, que es pseudotejido del esporoma. El micelio terciario corresponde a la parte fértil del cuerpo fructífero, se encuentra dispuesto en un extracto definido, el himenio, en el cual se forman los basidios y las basidiosporas. El esporoma se encuentra constituido por un pie (estípite, en algunos casos) que sostiene una estructura en forma de cúpula, el sombrero (píleo), en cuya parte inferior se encuentra el himenio, formado por láminas tubos o poros. Cuando el esporoma es joven el himenio se encuentra protegido por una tela muy delgada, llamada velo parcial, que al romperse deja una estructura sobre el estípite llamado anillo; en algunos hongos toda esta estructura se encuentra envuelta en un velo universal, el cual al romperse forma unas escamas sobre el píleo (Trigos-Landa, 2000).

Esporomas

Los esporomas se reconocen por su posición en la base o en los primeros metros de altura del tronco y su gran tamaño, su forma de repisa con el píleo costroso, frecuentemente laqueado, y su color café a rojizo. Todas las especies tienen un sistema hifal trimítico que consiste en la presencia de hifas generativas, esqueléticas y conectivas. En México se reconocen con cierta certeza a las especies: *Ganoderma applanatum*, *G. australe*, *G. colossus*, *G. curtisii*, *G. formcatum*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. oregonense*, *G. resinaceum* y *G. tsugae*, las especies que más se han descrito son: *G. applanatum*, *G. australe*, *G. curtisii*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum* y *G. tsugae*; sin embargo, se acepta que el complejo *Ganoderma resinaceum*, *G. curtisii*, *G. lucidum* requiere de un análisis más detallado en su clasificación (Cibrián *et al.*, 2007).

El píleo con una capa laqueada y brillante, de color amarillento, anaranjado, café rojizo a rojizo, cuando joven y maduro; con tonos más oscuros cuando viejos, con una costra dura, gruesa y opaca, no laqueada en algunas especies, pero si en otras, ni brillante, de color gris, café, café grisáceo, café oscuro a negro. Esporomas sésil, sin estípite o pie, subestipitado a estipitado (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma colossum presenta esporomas anuales, ligero en peso; píleo con una cutícula muy delgada que se desprende fácilmente con la uña, de color amarillento a café amarillento, contexto blanquecino a color crema, esponjoso, de más de 5 cm de grosor; esporas de más de 15 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma resinaceum, presenta esporomas perennes, píleo con una cutícula gruesa, laqueada a resinosa, de color rojiza a café rojiza; contexto café grisáceo a café, duro y corchoso, hasta 5 cm de grosor; esporas de 10-13 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma tsugae, forma esporomas subestipitados a sésiles, crece sólo en coníferas, píleo con cutícula fuertemente barnizada y laqueada, de color café rojizo; contexto de color crema a café pálido, blando y ligeramente esponjoso, hasta 5 cm de grosor; esporas de 13-15 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma lucidum, con esporomas central a lateralmente estipitado, píleo y estípote con una cutícula barnizada o lacada, de color crema a marrón rojizo y marrón oscuro cuando es viejo, esporas de 9 a 12 µm de longitud (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma curtisii, forma esporomas lateralmente estipitados, píleo y estípote con una cutícula delgada, barnizada y laqueada, que se desprende fácilmente con la uña, de color amarillento a café amarillento y café rojizo; contexto de color crema a café; esporas de 10-14 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma lobatum, desarrolla esporomas sésiles a subestipitados, píleo con una cutícula delgada, de color café a café oscuro, se rompe fácilmente con la uña; contexto de color café oscuro, fibroso; esporas de 10-12 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma applanatum, presenta esporomas aplanados, rara vez unguulado, píleo con una cutícula costrosa, de color gris, café o negro, con el margen blanco, contexto de color café oscuro, corchoso o leñoso; esporas de 9-12 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007).

Ganoderma australe, su esporoma es aplanado a unguulado, píleo con una cutícula de hasta 3 mm de grosor, se agrieta con la edad, de color cacao o chocolate a café oscuro; contexto de color café con porciones blanquecinas, corchoso a leñoso; esporas de 7-12 µm de largo (Cibrián *et al.*, 2007). De acuerdo a lo anterior el objetivo de esta investigación fue:

- Identificar morfológicamente aislados y esporomas de *Ganoderma* obtenidos de los diferentes sitios de recolección asociados a arboles de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake

II. Materiales y Métodos

Área de estudio

Los muestreos de raíces de árboles infectados se llevaron a cabo en municipios pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, localizada en la provincia fisiográfica del sistema volcánico transversal entre los paralelos 18° 45' y 20° 6' de Latitud Norte y los meridianos 101° 47' y 103° 13' de Longitud Oeste. En esta región aguacatera sobresalen por su producción 22 municipios, en los cuales existen 94,045.28 ha cultivadas con aguacate. El rango de alturas donde se ubican las plantaciones con este frutal oscila entre 1100 a 2900 msnm, aunque la mayor superficie se ubica entre 1600 a 2100 msnm. Gran parte del cultivo se encuentra establecido en suelos de tipo andosol (89.81 %), se presentan 14 climas; en diez de ellos se encuentra establecido el cultivo. Las temperaturas medias anuales donde se ubican las plantaciones de aguacate oscilan de 16 °C hasta 24 °C y la precipitación pluvial en esta zona fluctúa de 600 a 1500 mm anuales. La humedad relativa predominante donde se encuentra establecido este cultivo es del 90 % (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Ubicación del área experimental

El presente trabajo se desarrolló en campo y en el Laboratorio e Invernadero de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

Material biológico

De los sitios de muestreo se recolectaron esporomas adheridos al tronco, tallo y raíces de plantas de aguacate con síntomas de la enfermedad (amarillamiento, defoliaciones, derribo de árboles, ausencia de raíces alimenticias), raíces de diámetro mayor cuando eran suaves y se descortezan fácilmente y presentaban una coloración blanca por la presencia del micelio del hongo, cada una de las muestras fueron colocadas en bolsas Ziploc® resellables y se etiquetaron de acuerdo al orden de la recolecta, se indicó la fecha y los datos generales del huerto. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH y se almacenaron a 4 °C para su posterior procesamiento.

El aislamiento a partir de material vegetal (raíz, tronco y esporomas) se hizo mediante el protocolo de Agrios (2005), que incluye lavado y desinfección de los fragmentos de raíces, tronco y esporomas y se cultivaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA, para la conservación de los aislados se empleó el medio de cultivo Malta-Agar, ambos se les adicionó 0.20 ml/litro de ácido láctico para evitar contaminación por otros agentes, y obtener los aislados puros del fitopatógeno. Finalmente, los cultivos se incubaron a 22 °C en oscuridad.

Purificación y multiplicación

De los aislamientos de *Ganoderma* spp., se hicieron nuevos cultivos en PDA y Malta-agar adicionados con ácido láctico a la cantidad ya mencionada, se tomaron puntas de hifa con ayuda de un estereoscopio y de un bisturí previamente esterilizado, se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA, para tener únicamente al fitopatógeno de interés. Se almacenaron a 4 °C para su conservación hasta determinar sus características de conservación.

Elaboración de medios de cultivo

Se elaboraron volúmenes de 1000 mL para el medio PDA y 500 mL para el medio PDA Malta-agar de. Los medios se esterilizaron.

PDA

Se colocaron 200 g de cuadritos de aproximadamente 3 mm de papas frescas en agua destilada y se colocaron en el fuego hasta que las papas estuvieron suaves al tacto. La infusión obtenida se filtró a través de una manta de cielo, el volumen final se aforó a 1000 mL y se agregaron 10 g de dextrosa y 18 g de agar y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 20 minutos.

Medio de cultivo PDA Malta-agar

S colocaron 125 g de cuadritos de aproximadamente 3 mm de papas frescas en agua destilada y se pusieron a hervir hasta que las papas estuvieron suaves al tacto. La infusión obtenida se filtró a través de una gasa, el volumen final se aforo a 500 mL y se agregaron 5 g de dextrosa y 10 g de Malta-agar, y se esterilizó como se mencionó anteriormente.

En ambos medios, una vez alcanzada la temperatura adecuada para su manejo, se vaciaron en cajas Petri Klinikus® de 100 x 15 mm y 60 x 15 mm en campana de flujo laminar y se expusieron a luz UV hasta que solidificaron, se guardaron en bolsas de plástico etiquetadas con fecha de elaboración y tipo de medio nutritivo, se almacenaron en refrigeración a temperatura de 4 °C hasta su uso.

Identificación de especies de *Ganoderma* a partir de esporomas

Los esporomas recolectados en campo se limpiaron, fotografiaron y se hizo un herbario, cada esporoma se etiquetó de acuerdo a la información del sitio de origen como: coordenadas de geo posicionamiento, nombre del huerto, número de recolecta y municipio o localidad. Los esporomas se recolectaron durante todo el año 2019, en los mismos sitios donde se recolectaron las muestras de raíz, tallo y corona. Para su conservación se pusieron a secar en la estufa, se observaron diariamente para que no se causaran daños por el calor, se etiquetaron según su procedencia y se colocaron en el herbario, todo esto de acuerdo al protocolo descrito por Fuentes *et al.* (1997), para posteriormente realizar su identificación taxonómica.

Para el estudio morfológico de los ejemplares se siguieron los métodos propuestos por Furtado (1965), Largent *et al.* (1977), Bazzalo y Wrigth (1982), Gottlieb y Wright (1999a, b), Ryvardeen (2000) y Torres-Torres *et al.* (2012). Los principales caracteres macroscópicos estudiados fueron dureza y grosor de la cutícula del píleo, tipo de contexto (homogéneo, relativamente homogéneo o dúplex), presencia de incrustaciones o bandas resinosas y la forma y tamaño de los esporomas. La descripción de los colores de los esporomas se realizó de acuerdo a Kornerup y Wanscher (1978). Se hicieron preparaciones en solución KOH al 5 % y lactofenol blanco para la caracterización de estructuras microscópicas. Estas fueron forma de las basidiosporas, forma, tamaño e incrustaciones de los elementos de la cutícula; diámetro de los poros y la presencia de clamidosporas. Los nombres de las especies y autores están basados en la base de datos Index Fungorum (IFP, 2014), Figura 1. Con los especímenes recolectados y como ya se mencionó se hizo un herbario en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” y se pretende que una parte de las muestras sea depositada en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Análisis de las basidiosporas

El análisis microscópico de las basidiosporas se realizó de acuerdo a Cao *et al.* (2012). Las muestras se examinaron con aumento hasta 100x en un microscopio Nikon Eclipse H550L con contraste de fase de iluminación y se registró en fotomicrografías el tamaño de las esporas, los diámetros de las hifas se obtuvieron con el programa G-Capture Pro-7.



Figura 1. Características morfológicas para la identificación de esporomas; A) Esporomas, tamaño de los poros B) hifas esqueléticas, C) basidiospora.

III. Resultados y Discusión

Zonas de muestreo

Se realizaron 30 muestreos en diferentes localidades ubicadas en la franja aguacatera de Michoacán, las características de las localidades se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Localización geográfica de 30 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.

Comunidad	Municipio	Altitud	Precipitación	Coordenadas
San Andrés Corí	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
Tancitaro	Tancitaro	3 800	1008	N19°20'13" W102°21'45"
San Ángel Zurumicapio	Ziracuaretiro	1609	1121	N19°26'52" W101°53'19"
San Miguel Charahuen	Pátzcuaro	2140	1040	N19°38'00" W 101°38'00"
Santa Ana Zirosto	Uruapan	2505	1600	N19°32'00" W102°19'
Tingambato	Tingambato	1980	1100	N 19° 0' W101° 0'
Santa Rosa	Uruapan	1580	1060	N19°38' W102° 0'
Tacambaro	Tacámbaro	1980	1100	N 19° 0' W 101° 0'

Síntomas observados en campo

Los síntomas observados en árboles fueron presencia de pudrición suave en el tronco a la altura del cuello, ausencia de raíces alimenticias, abundante micelio tanto en raíces de mayor grosor como en el tronco de los árboles infectados, en época de lluvias se observaron esporomas adheridos al tronco o bien dentro de la zona de goteo que es donde se encuentran las raíces, Figura 2.



Figura 2. Síntomas de *Ganoderma* spp en árboles de aguacate. A) Caída de árboles de aguacate afectados por la pudrición radicular; B) signos de pudrición blanca de raíz y micelio; C) defoliación generalizada y frutos pequeños de mala calidad; D) esporomas adheridos al tronco.

En las raíces de sostén se detectó la presencia de micelio blanco y algodonoso, con hiperplasia del tejido vegetal, amarillamiento foliar, hojas pequeñas, defoliación generalizada, frutos abundantes pero pequeños y quemados por el sol debido a la falta de follaje y derribo de árboles a causa del debilitamiento del sistemas radicular.

Aislamiento y purificación de *Ganoderma* spp.

De las recolectas en campo se obtuvieron un total de 30 cepas puras, a las cuales se les asignó la siguiente clave de cepario, de acuerdo a la zona donde se colectaron: G2, G7, G10, G12, G13, G15, G16, G18, G19, G20, G21, G22, G25, G26, G28, G40, G41, G43, G44, G45, G46, G50, G55, G56, G58, G60, G61, G62, G64 y G65, como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características y ubicación de los sitios de recolección de acuerdo a la cepa aislada.

cepa	Sitios de recolecta	Municipio	Altitud (m)	Precipitación (mm)	Coordenadas
G2	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G7	Toreo	Uruapan	1580	1060	N19°38' W102°0'
G10	Tingambato	Tingambato	1980	1100	N19°0' W101°0'
G12	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N 19° 46' W 101° 95'
G13	Toreo	Uruapan	1580	1060	N19°38' W102°0'
G15	Toreo	Uruapan	1580	1060	N19°38' W102°0'
G16	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G18	Tacámbaro	Tacámbaro	1980	1100	N19°0' W101°0'

G19	Tacámbaro	Tacámbaro	1980	1100	N19°0' W 101°0'
G20	Tacámbaro	Tacámbaro	1980	1100	N 19° 0' W 101° 0'
G21	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G22	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G25	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G26	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G28	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G40	San Miguel Charahuen	Pátzcuaro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G41	San Miguel Charahuen	Pátzcuaro	2140	1040	N19°38'00" W 101°38'00"
G43	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G44	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G45	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G46	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'

G50	Santa Rosa	Uruapan	1580	1060	N19°38' W102° 0'
G55	San Ángel Zirumucapio	Ziracuaretiro	1609	1121	N19°26'52" W101°53'19"
G56	Tancitaro	Tancitaro	3 800	1008	N19°20'13" W102°21'45"
G58	San Andrés Coru	Ziracuaretiro	1696	1200	N19°46' W101°95'
G60	Araparicuaro	Tancitaro	3 800	1008	N19°20'13" W102°21'45"
G61	Tancitaro	Tancitaro	3 800	1008	N19°20'13" W102°21'45"
G62	San Ángel Zurumucapio	Ziracuaretiro	1609	1121	N19°26'52" W101°53'19"
G64	Araparicuaro	Tancitaro	3 800	1008	N19°20'13" W102°21'45"
G65	Caracha	Ziracuaretiro	1415	1200	N19°26' W101°55'

Caracterización morfológica de cepas

Las 30 cepas de *Ganoderma* spp., obtenidas presentaron variabilidad cultural, en cuanto a la forma, crecimiento, color y textura del micelio.

Forma de la colonia y textura del micelio

Las 30 cepas presentaron diferencias morfológicas, de coloración, crecimiento y consistencia del micelio (radial estriado, algodonoso, ligeramente granuloso y corchoso), al principio de color blanco, a medida que envejecen tomaron diferente coloración; blanco 23 % las recolectas G20, G25, G21, G13, G12, G7 y G26, amarillas 26 % G65, G44, G45, G18 G19, G20, G16 y G46, crema 40 % G22, G58, G56, G28, G41, G50, G10, G40, G64, G15 y G2 y de color café 13 % G55, G61, G62 y G64. En algunos casos presentó micelio raquíutico

postrado al medio de cultivo, otras cepas conforme envejecieron se formó una costra de micelio compactado, de tonos cafés, es importante señalar que no se colorearon los medios de cultivo (PDA y Malta-Agar), Figura 3.

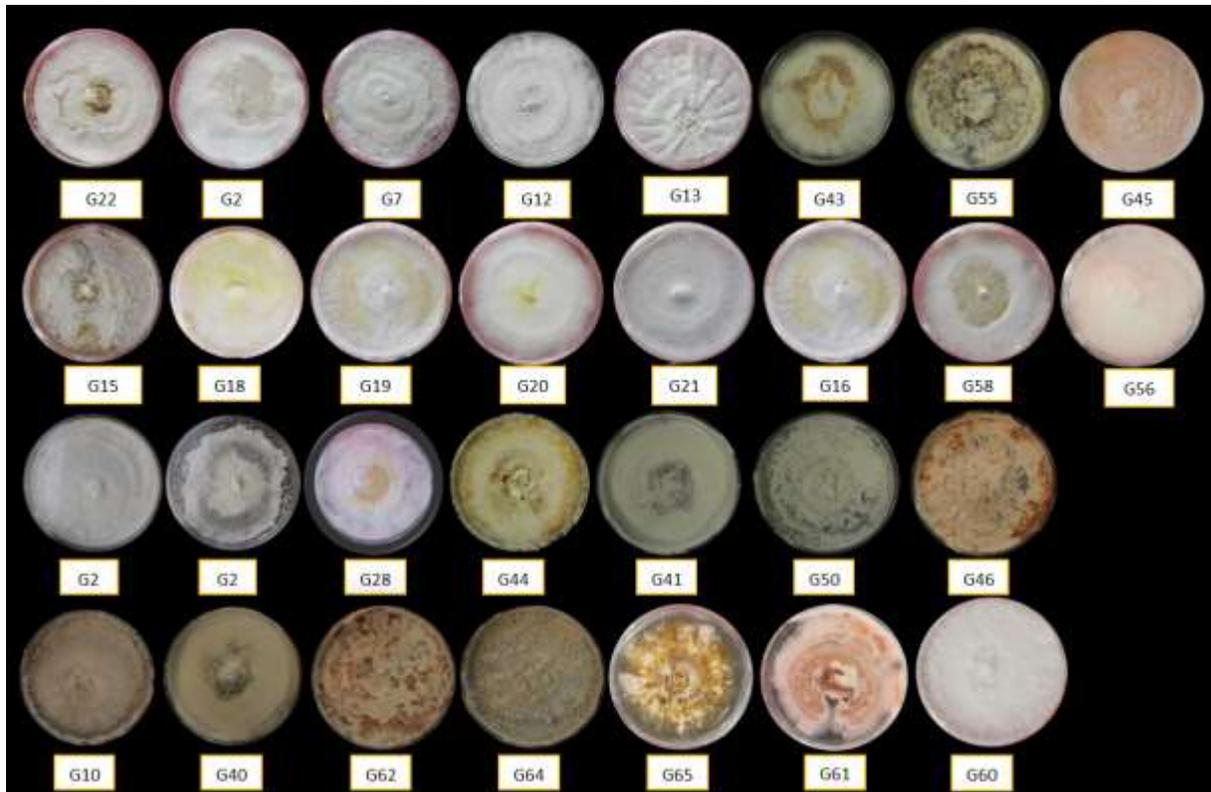


Figura 3. Cepas de *Ganoderma* spp, aisladas de raíz, tronco, corona y esporomas de árboles de aguacate.

Caracterización morfológica de esporomas

De los esporomas recolectados en los distintos sitios se observaron características macro y microscópicas similares a las descritas para el género *Ganoderma*, se identificaron con este método cuatro especies; *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum*, *G. lobatum* y *G. resinaceum* Boud (*G. sessile*), las cuales presentan las siguientes características:

Ganoderma curtisii

Esporoma en promedio de 22-71 × 17-57 × 10-20 mm, anual, estipitado, suberoso a fibroso. Píleo reniforme a semicircular; superficie brillante, laqueada, carácter que se pierde con el tiempo y quedan zonas opacas; anaranjada a amarilla con tonalidades marrón-rojizas. Estípite

de 40-54 × 10-24 mm, lateral, aplanado a cilíndrico, brillante, con tonalidades marrón rojizo. Contexto dúplex, azonado, con 2-4 bandas resinosas, completas o intermitentes a través de todo el contexto. Elementos de la cutícula de 29-47 × 7.3-15.5 μm, claviformes, sin incrustaciones, en ocasiones con protuberancias y ramificaciones laterales.

Basidiosporas de 15.99-27.04 x 13.98-21 μm, elipsoides a oblongas, con pilares interparietales sublibres, (Murrill, 1908), Figuras 4 y 5.



Figura 4. Morfología de esporomas de *Ganoderma curtissi*, en Ziracuaretiro 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15 y 18; Uruapan 2, 6, 7, 17; Tacambaro 10, 16 y 19; Tingambato 12.



Figura 5. Caracteres analizados en la identificación morfológica de *Ganoderma curtissi*: A) Esporoma anaranjada a amarillo con tonalidades marrón rojizas, B) Hifas esqueléticas y C) Basidiosporas elipsoides.

***Ganoderma applanatum* (Persoon, 1908)**

Esporoma de 67–225 X 105–165 X 33–83 mm, perenne, sésil, suberoso a leñoso. Píleo semicircular a ligeramente lobado o irregular; superficie opaca, surcada concéntricamente, zonada, marrón, en ocasiones cubierta con esporas color óxido. Cutícula de hasta 0.48 mm de grosor. Elementos de la cutícula de 30–45 X 5.6–10 μm , claviformes a digitiformes, en ocasiones con protuberancias laterales y ramificaciones, marrón-rojizo a amarillo-dorado, mezclados con hifas esqueléticas. Basidiosporas de 8–9 X 5.2–6.2 μm , Q = 1.45–1.53, elipsoides, marrón claro, exosporio con pilares interparietales libres (Hyménomyc, 1887).

Basidiosporas de 14.23-29.15 x 10.11-17.02 μm elipsoides, truncadas, de color café amarillento, las recolectas de los esporomas así como sus esporas y micelio se presentan en la Figuras 6 y 7.



Figura 6. Morfología de esporomas de *Ganoderma applanatum* recolectadas en; Ziracuaretiro 1, 5 y 6; Pátzcuaro 3; Tancitaro 2 y 4.



Figura 7. Caracteres analizados en la identificación morfológica de *Ganoderma applanatum*: A) Píleo semicircular a ligeramente lobado o irregular, B) basidiosporas elipsoides marrón claro y C) hifas esqueléticas.

***Ganoderma lobatum* (Schwein, 1908)**

Esporoma de 36–155 X 55–125 X 26–44 mm, perenne, sésil, en ocasiones subestipitado, suberoso a leñoso. Píleo dimidiado a lobulado, ocasionalmente semicircular; superficie opaca; marrón a marrón-grisáceo. Elementos de la cutícula de 34–40 × 4.4–10 μm, claviformes a digitiformes, de pared gruesa, marrón a marrón-rojizo. Basidiosporas de 17.32-30.09 x 12.1-19.17 μm, elipsoides a oblongas, con pilares interparietales libres μm, Q = 1.44–1.81, (Schwein. 1908), Figuras 8 y 9.



Figura 8. Morfología de esporomas de *Ganoderma lobatum* recolectada en Pázcuarro.

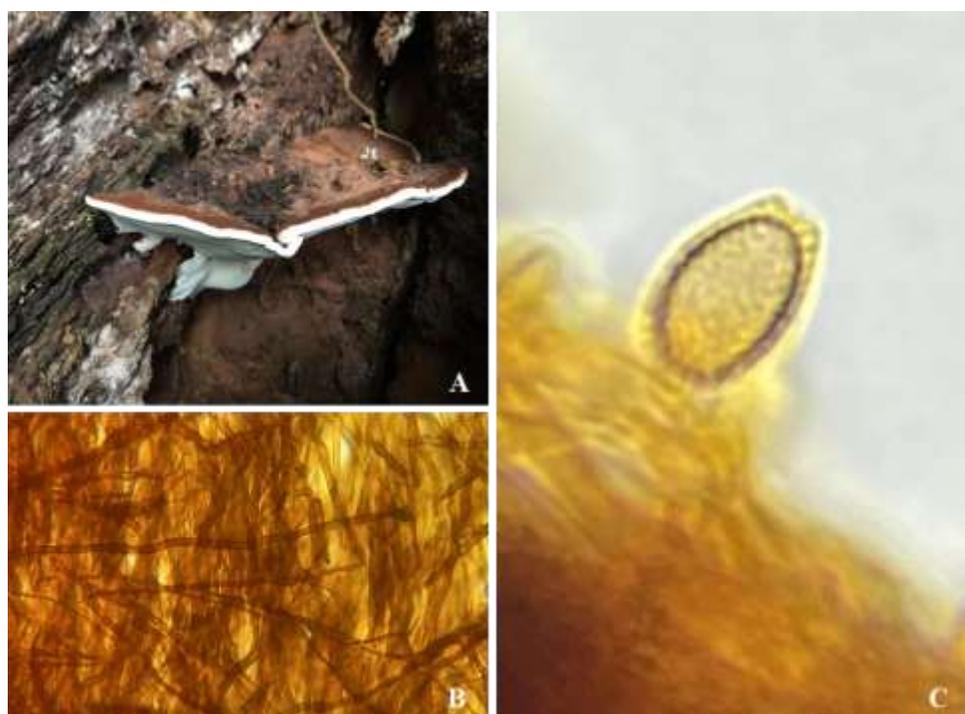


Figura 9. Caracteres analizados en la identificación morfológica: A) esporoma dimidiado a lobulado, ocasionalmente semicircular, B) hifas esqueléticas y C) basidiosporas elipsoides.

***Ganoderma resinaceum* (*G. sessile*) (Boud, 1889)**

Esporoma anual, sésil, gregario, algunos árboles con más de 80 esporomas en la base, globoso en la juventud, semicircular a circular en la madurez, algunos en forma de repisa, de consistencia corchoso-leñosa, los esporomas más grandes miden 17-20 x 28-30 cm. Píleo lanceolado en fresco, de color café rojizo a rojo anaranjado, con el borde café amarillento y finalmente blanco. Himenóforo blanco cuando joven, blanco amarillento a la madurez. Convexo, correoso hasta 5 cm de espesor y color café amarillento. La pudrición por este hongo se presenta hasta 3 m de altura. Afecta la albura y puede llegar hasta el corazón de la madera. Basidiosporas de 17.08-30.04 x 8.22-17.03 μm ovaladas a anchamente elípticas, pardas, con exoperidio radiado, relativamente grueso y poro germinativo hialino.



Figura 10. Morfología de esporomas de *Ganoderma resinaceum* Boud 1889 (*G. sessile*), recolectado en Tancítaro.

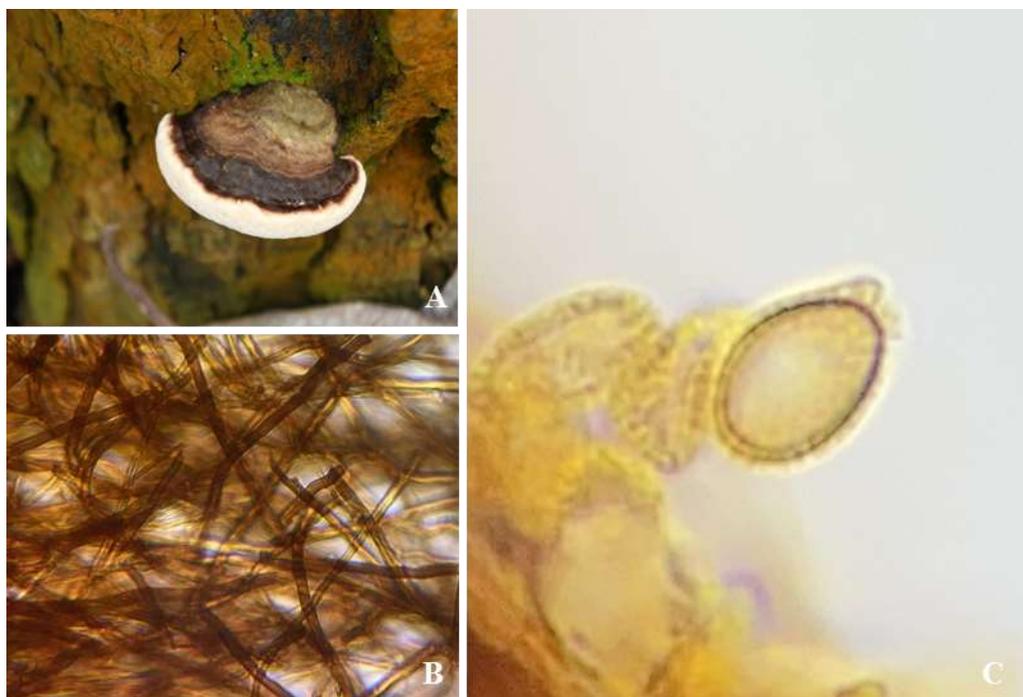


Figura 11. Caracteres analizados la identificación morfológica: A) Pileo lanceolado en fresco, de color café grisáceo, con el borde café amarillento y finalmente blanco, B) hifas esqueléticas y C) basidiosporas ganodermoides.

La nomenclatura y clasificación a nivel especie del género *Ganoderma* ha sido controvertida por tener alta variación (plasticidad), y en ocasiones los autores la ubican en diferentes taxos (Ryvarden, 2004; Steyaert, 1972; 1980; Bazzalo y Wright, 1982), esto por el estudio de especie sobre especie, desde las primeras investigaciones que se han realizado para este género, los taxones de *Ganoderma* han sido tratados como especies con gran plasticidad tanto morfológica como genética, por ejemplo las investigaciones realizadas por Ryvarden, (2004), Steyaert (1972, 1980) quienes mencionan sobre *G. resinaceum* que en ocasiones se confunde con otra especie y puede ser nombrada de manera diferente. Bazzalo y Wright, (1982) y reportaron sinonimia en varias especies diferentes bajo el mismo nombre. Por otro lado, Steyaert (1967a), consideró los depósitos resinosos del contexto como poco importantes para la identificación, principalmente en las especies del subgénero *Elfvigia*. Sin embargo, se ha

reportado que estos depósitos junto con el color del contexto son importantes en la separación de taxones.

Las investigaciones se enfocaban en destacar principalmente la importancia taxonómica del género *Ganoderma*, mediante sus características morfológicas (Furtado 1965, Gottlieb y Wright 1999, Steyaert, 1980), sin embargo, su uso actual es limitado, quizás por la falta de terminología precisa. Gran parte de la complejidad es causada por la gran variabilidad de sus caracteres morfológicos, esto crea confusiones y dificulta encontrar términos precisos y no genéricos. En esta investigación encontramos algunos caracteres fuera de lo común como el gran tamaño de las esporas lo cual concuerda con lo reportado por Torres y Guzmán-Dávalos, (2005) ellos reportan variación en el tamaño y la forma de algunos caracteres taxonómicos propios del género y aseguran que esto depende del sitio muestreado y de la edad del esporoma. Por otra parte las especies identificadas en esta investigación están asociadas al cultivo de aguacate, y de este hospedero no se tienen reportes, donde se encontró una gran variación morfológica (color de esporomas, color de cepas, tamaño de basidiosporas, etc.), y las especies identificadas son reportadas hospederas de pinos y encinos (Barsimantova y Antezanab, 2011) De acuerdo con Cibrian, (2007) y Encina *et al.*, (2012) quizás esto se debe a la sobre explotación y deforestación de los bosques.

La determinación a nivel especies presentó complicaciones debido a que existe un complejo de las mismas reportadas en México, con características muy similares entre sí, (*G. boninense*, *G. multiplicatum*, *G. orbiforme*, *G. subfornicatum* y *G. oerstedii*), todas con contexto de color marrón amarillento a marrón rojizo y basidiosporas café a marrón oscuro, (Haddow 1931, Heim 1962, Furtado 1965b, 1967, Steyaert 1967b, 1972, Bazzalo y Wright 1982, Gilbertson y Ryvarden 1986, Ryvarden 1991, 2000). Pero difieren a las encontradas en esta investigación, en contraste con lo reportado por Torres y Guzmán que señalan *G. curtisii* es una especie cosmopolita en México y con alta variabilidad morfológica. Sin embargo, no existe relación aparente entre las otras tres especies encontradas (*G. applanatum*, *G. lobatum* y *G. resinaceum*) pero si en el aspecto micromorfológico. En conclusión, *Ganoderma curtisii* es una especie muy variable macromorfológicamente, es muy probable que parte de esta variación se deba a que al menos sean dos especies. Se requieren más estudios, en particular

con caracteres moleculares, que permitan dilucidar si la variación observada representa a una o varias especies.

IV. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

Las características morfológicas de los esporomas permitieron la identificación de cuatro especies de *Ganoderma*; *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum* y *Ganoderma resinaceum*

De esporomas adheridos al tronco de *Persea americana* var. *drymifolia* se obtuvieron 30 cepas, con diferencias en color, blancas, amarillas, crema y café, micelio algodonoso corchoso, con estrías. Microscópicamente se observó micelio modificado y presencia de fíbulas.

Los esporomas tuvieron alta variación en su coloración; naranja, amarillo con tonalidades marrón rojizas, color opaco en tonos cafés a gris, marrón opaco a marrón-grisáceo y café rojizo con borde café amarillento a blanco.

La forma de las basidiosporas en su mayoría fue elipsoide, también se observaron ovaladas, con poca variación en su tamaño; de 17.32-30.09 x 12.1-19.17 μm las de tamaño mayor, de 15.99-27.04 x 13.98-21 μm de tamaño intermedio y de 14.23-29.15 x 10.11-17.02 μm , las de tamaño menor.

V. Literatura citada.

- Barsimantov J., Antezana N. 2011.** Land use and land tenure change in Mexico's avocado production region: Can community forestry reduce incentives to deforest for high value crops. 1-20.
- Bazzalo M.E. y Wright J.E. 1982.** Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. Mycotaxon 16:293-325.
- Cao, Y., Wu, S.H., Dai, Y.C., 2012.** Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma mushroom* Lingzhi. Fungal Divers. 56, 49–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0178-5>.
- Cibrian T. D. 2007.** Enfermedades forestales en México/ Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapíngo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canada y Comisión Forestal de America del Norte; COFOAM, FAO. Chapíngo, México. 221-228.
- Corner EJH. 1983.** Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. Beihefte zur Nova Hedwigia, Weinheim
- Encina Osvaldo; Mora Néstor 2012.** Patrones de degradación de las maderas de Pino caribe, Curarire y Drago por *Gloeophyllum trabeum* *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. PDF].Grupo de Investigación en Conservación de Maderas (GICOM). Laboratorio Nacional de Productos Forestales.ULA – MARN Apartado 220, Mérida 5101
- Fuentes M., Aviles M., Rios M.Y., Gonzalez A., Navarro G. V., Zepeda G., Rojas G. M. 1997.** Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. Journal of ethnopharmacology 87 (1), 85-88.
- Furtado JS. 1962.** Structure of the spore of the Ganodermoideae Donk. Rickia 1: 227–241.
- Furtado JS. 1965 b.** Relation of microstructures to the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. Mycologia 57: 588–611.

- Furtado JS. 1981.** Taxonomy of *Amauroderma* (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 34: 1–109.
- Gilbertson RL, Ryvardeen L. 1986.** North American polypores, vol 1. *Fungiflora*, Oslo, Norway. pp. 287–306.
- Gottlieb AM, Wright JE. 1999.** Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103, 6: 661–673.
- Gutiérrez, C. M., Lara, C. B. N., Guillén, A. H., Chávez, B. A. T., 2010.** Agroecología de la Franja Aguacatera del Estado de Michoacán, México. *Interciencia*. (35): 647-653.
- Haddow WR. 1931.** Studies in *Ganoderma*. *Jour Arnold Arb* 12: 25–46.
- Heim R. 1962.** L'organisation architecturale des spores des Ganodermes. *Rev Mycol* 27: 199–212.
- Hymenomyc. 1887.** Brief Conspectus of the order agaricales underw to the flora fungus of magnolia. Institute of botany. Mongolian Academy of Sciences.
- IFP (Index Fungorum Partnership). 2014.** Index Fungorum. Disponible en: <Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/> > (último acceso el 15 de Octubre de 2020.)
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, 2008.** *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CABI, The Netherlands.
- Kornerup A. y Wanscher J.H. 1978.** *Methuen handbook of color*. Eyre Methuen, London 33-68.
- Largent D.L., Johnson D. y Watling R. 1977.** *How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic Features*. Mad River Press, Eureka.
- Moncalvo, J. Ryvardeen, L. 1997.** A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum* 11. *Fungiflora*, Oslo.
- Moncalvo J. M., Wang H. H., Hseu R. S. 1995.** Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:223-238 DOI 10.2307/3760908.

- Moncalvo J, Ryvar den L. 1997.** A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. Synopsis Fungorum 11. Fungiflora, Oslo.
- Mossebo D.C., Kengni Ayissi MB, Ambit RT, 2014.** New taxa and potential pharmacological properties of some Ganodermataceae (Basidiomycota) from Cameroon and central Africa. In abstracts book (Scripta Botanica B elgica 52, 291) of the Proceedings of the XXth AETFAT Congress, Stellenbosch, South Africa, 13th -17th January 2014.
- Murrill WA. 1908** The Polyporaceae of North America, part I. The genus *Ganoderma*. Bull Torrey Club 29: 599–6.
- Ryvar den L. 2004.** Neotropical polypores Part 1. Synopsis Fungorum. Fungiflora, Oslo 67-99.
- Ryvar den L. 2000.** Studies in Neotropical Polypores 2: A Preliminary key to Neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. Mycologia 92:180-191
- Ryvar den L. 1991.** Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. Oslo: Fungiflora.
- Ryvar den L, Johansen I. 1980.** A preliminary polypore flora of East Africa. Fungiflora, Oslo 98-102.
- Ryvar den L, Johansen I. 1980.** A preliminary polypore flora of East Africa. Fungiflora, Oslo 98-102.
- Salmon, D.N.X., Spier, M.R., Socol, C.R., Vandenberghe, L.P., Weingartner Montibeller, V., Bier, M.C.J., Faraco, V., 2014.** Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56. Fungal Biol. 118, 655 e 662.
- Schwein A. 1908.** Neotropical polypores: part 1: Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. Phytopatology.

- Steyaert RL. 1967 b.** Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria. *Persoonia* 7: 55–118.
- Steyaert R. L. 1967.** Considérations generales sur le genre *Ganoderma* et plus spécialement sur les espèces européennes. *Bull Soc R Bot Belg* 100: 189–211.
Steyaert RL. 1967b. Les *Ganoderma* palmicoles. *Bull Jar Bot Nat Belg* 37: 465–492.
- Tham LX, Hung NLQ, Duong PN, 2012.** *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new Ganodermataceae species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes. *Mycological Progress* 11: 775–780.
- Trigos-Landa Á; 2000.** Química de los hongos. En “producción de la vitamina D2 a partir de Hongos Macromicetos: Aspectos Científicos, Técnicos y Económicos”; Editorial Guadalupe. Pág. 34-36 Pp.
- Torres, M. G., Guzmán-Dávalos L. 2012.** The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon* 119: 201–216.
- Torres-Torres M.G., Guzmán-Dávalos L. y de Mello Gugliotta A. 2012.** *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon* 121:93-132.
- Torres, M. G., Guzmán-Dávalos L. 2012.** The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon* 119: 201–216.

CAPÍTULO II:

PATOGENICIDAD DE *Ganoderma* spp. ASOCIADAS A TRONCO Y RAIZ DE *Persea americana* Miller, VARIEDAD *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake

RESUMEN

El presente estudio se planteó con el objetivo de evaluar la patogenicidad de especies del género *Ganoderma* asociadas al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán, mediante la virulencia y severidad de las cepas. Se llevaron a cabo diversos muestreos en localidades ubicadas en la franja aguacatera, se obtuvieron 30 aislados provenientes de esporomas de los cuales se identificaron morfológicamente las especies: *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum*, *G. lobatum* y *G. resinaceum*. Para evaluar la patogenicidad se obtuvieron plantas de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, la semilla procedió de un mismo árbol, éstas se sembraron en un sustrato constituido de 2:1 suelo andosol/arena estéril. Las plantas de tres meses después de la siembra se inocularon con micelio de los 30 aislados de *Ganoderma* spp., el aislado de *Ganoderma* se obtuvo al inocular las cepas en semillas sorgo estéril durante 35 días que fue cuando la mayoría de las especies invadieron por completo la semilla de sorgo. Se evaluó la virulencia con base al tiempo en que aparecieron los primeros síntomas y la severidad de la enfermedad de las cepas por los daños observados en la raíz y ápice comparados con los testigos. Los 30 aislados de *Ganoderma* spp., fueron patogénicos para *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*. La virulencia de los aislados osciló entre 16 a 80 días y la severidad fluctuó entre 35 a 80 días, que fue cuando se murió la primera planta. El total de las cepas fue capaz de producir pudrición blanca en raíz, tallo, corona y los cotiledones, así como amarillamiento de las hojas, marchitez, defoliación en el 80 % de los tratamientos, destrucción del sistema radical, del tejido conductor y finalmente la muerte de la planta, también se obtuvo crecimiento de cuerpos fructíferos del fitopatógeno, los cuales coinciden con los observados en campo.

Palabras clave: Virulencia, Severidad, Inoculo, Infección.

SUMMARY

The present study was proposed with the objective of evaluating the pathogenicity of species of the genus *Ganoderma* associated with the cultivation of avocado in the state of Michoacán, through the virulence of the strains and the severity of the disease. Various samplings were carried out in localities belonging to the avocado fringe, 30 isolates were obtained from which the species were identified: *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum*, *G. lobatum* and *G. resinaceum*. To evaluate the pathogenicity, *Persea americana* Mill. Var *drymifolia* plants were obtained from the same tree, these were developed in a sterile sand-based substrate. The three-month-old plants were inoculated with mycelium from each of the 30 *Ganoderma* isolates obtained. Virulence was evaluated based on the time in which the first symptoms appeared and the severity of the disease of the strains due to the damage observed in the root and apex compared with the controls. The 30 *Ganoderma* isolates were pathogenic for *Persea americana* Mill. Var *drymifolia* under the conditions given for this experiment. The virulence of the isolates ranged from The pathogenic evaluation was conclusive and determined that all the strains were pathogenic, they presented virulence that ranged from 16 to 80 days. All the strains were capable of producing radical white rot of stem, crown and cotyledons of the seed. As well as yellowing of the leaves, wilting, defoliation in 80% of the treatments, destruction of the root system and the conductive tissue, this as the most severe symptom, in some cases growth of fruiting bodies of the fungi was obtained, which coincide with those observed in the field. These symptoms coincide with that reported by Pataky, (1999) who reports descending death of the branches and defoliation, loss of vigor in the plant, in addition, the death of oil palm explants inoculated with *Ganoderma* species was reported, which presented symptoms of rot by the enzymatic complex of the pathogen.

Key words: Virulence, Severity, Inoculum, infection.

I. Introducción

Al género *Ganoderma* se le denomina como hongo de la pudrición blanca, posee un complejo enzimático con la capacidad de descomponer y degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes principales que conforman la estructura de la madera (Schwarze y Ferner, 2013), todas las especies miembros del género *Ganoderma* se clasifican como causantes de esta enfermedad, por el síndrome que ocasionan en los árboles y su característico síntoma que expresa en la madera de la cual se alimenta, al dejar el tejido leñoso sin sus componentes iniciales al colonizar el tejido, ocasionan una coloración blanca pálida, y la presencia de micelio blanco y algodonoso, de ahí el nombre de dicha enfermedad. Todas las especies de *Ganoderma* son capaces de ocasionar una descomposición simultánea y generalizada, que se conforma del proceso donde la celulosa y la lignina se descomponen gradualmente conforme el fitopatógeno coloniza el tejido leñoso, la deslignificación selectiva, es cuando la lignina se descompone preferentemente sobre la celulosa (Blanchette, 1984). Las investigaciones recientes sugieren que los árboles con descomposición simultánea tienen más pérdida de resistencia de la madera, lo que genera un debilitamiento estructural del árbol, y favorece la susceptibilidad a otros fitopatógenos en comparación con los árboles donde los hongos han causado una deslignificación selectiva (Schwarze y Ferner, 2013). La pudrición blanca generada por especies de *Ganoderma* se puede encontrar en árboles vivos aparentemente sanos, la infección recurrentemente ocasiona la muerte a los árboles y el derribo debido a la fuerza del viento, el cual se ve favorecido por las fracturas causadas por la pérdida de resistencia y rigidez del tejido a causa de la descomposición de la celulosa y la lignina del tronco y la pérdida de raíces de sostén generada por la pudrición (Sinclair y Lyon, 2005). Es muy común que cuando se detecta la presencia de cuerpos fructíferos de *Ganoderma* asociados en árboles vivos, se consideren peligrosos y se recomiende su eliminación como medida preventiva, ya que quedan expuestos al viento. Diversas investigaciones han reportado que *Ganoderma* es el agente causal de la enfermedad denominada pudrición blanca, asociado con muerte, declinación y el derribo en varias especies de árboles (Toole, 1966; Adaskaveg *et al.*, 1991; Adaskaveg *et al.*, 1993; Fernando, 2009; Glen *et al.*, 2009; Elshafie *et al.*, 2013; Bhadra, 2015; Coetzee *et al.*, 2015), se han obtenido resultados positivos al realizar los postulados Koch, con el fin de corroborar la patogenicidad de *Ganoderma* spp., relacionadas con infecciones de origen fungoso con pudrición blanca y la muerte de varias especies leñosas

(Pirone, 1957; Toole, 1966; Adaskaveg y Gilbertson, 1987; Elliott y Broschat, 2001; Deflorio *et al.*, 2008; Hidayati *et al.*, 2014).

Síntomas y signos de pudrición blanca por *Ganoderma*

Los árboles afectados presentan pudrición blanca del duramen y principalmente de la albura, por lo cual se presentan canceres de diversas dimensiones en la base del tallo y pudrición de las raíces (Schwarze y Ferner, 2003). Los árboles también presentan muerte descendente de las ramas y defoliación, se manifiesta una pérdida de vigor, lo que los hacen más susceptibles a heladas y el viento (Pataky, 1999). Los esporomas de *G. lucidum* en encino se localizan en la base del tallo de árboles vivos afectados en forma individual o en sinergia con *Hypoxylon thouarsianum*, al igual que en árboles muertos y tocones. Estos esporomas son los signos más obvios de que un encino está enfermo o ha sido destruido por este hongo, afecta tanto a árboles jóvenes como a maduros, (Swiecki y Bernhardt, 2006; Schwarze y Ferner, 2003). Los signos que se observan con mayor frecuencia en los arboles infectados son los esporomas ya sea en árboles aún vivos o muertos, en los tocones y abundante micelio blanco a diferentes tonalidades de café (Ryvarden, 2000; Swiecki y Bernhardt, 2006).

Papel de las Basidiosporas

Turner (1965), menciona que las basidiosporas son poco viables como inóculo para la infección directa, Turner y Hasan (1998), en diferentes experimentos probaron como infectar palmas con esporas, evaluaron suspensiones de esporas sobre hojas después de podadas, en pecíolos e inflorescencia masculina y sobre pedúnculos de racimos maduros, concluyeron que las esporas no infectan estos materiales, Bah (1997), probó doblando hojas para abrir las axilas, práctica común en semilleros, para trata de imitar las condiciones que podían llevar al desarrollo de la pudrición superior del tallo, después de 12 meses no se observaron síntomas en ninguna de las palmas inoculadas. Hasan y Flood, (2000) han tratado de infectar las bases de hojas cortadas con micelio monocariótico derivado de una sola basidiospora, sin éxito. Se ha probado con micelio dicariótico (derivado de un cuerpo fructífero de *Ganoderma* o de la mezcla de monocariones compatibles) y no hay infección por sí solo en condiciones experimentales. En contraste con estos trabajos, Rees *et al.* (2009) reportan que cada basidiospora de *Ganoderma* spp., germina en un hifa monocariótica genéticamente única que es saprófita y capaz de colonizar madera muerta, en el cultivo de Palma aceitera. *Ganoderma*

spp., cuenta con un sistema tetrapolar de apareamiento que favorece el cruce. Son heterotálicos con dos pares de alelos en dos loci de apareamiento, así asegura al máximo la diversidad genética al restringir la endogamia al 25 %, las especies de apareamiento compatible con anastomosis para producir un micelio dicariótico que podría ser potencialmente invasivo. El heterotalismo tetrapolar de *Ganoderma* spp., también implica diferentes fenómenos como: Mayor diversidad genética, como se observó en los aislamientos dentro de una plantación, donde fue mayor entre plantas, por lo que la enorme diversidad genética de los hongos observada en las plantas infectadas podría ser resultado de la plasmogamia de micelios genéticamente diferentes provenientes de basidiosporas, la pudrición basal tarda tiempo en ser evidente en el campo, debido a la plasmogamia o anastomosis de los tipos de apareamiento compatibles para formar micelio dicariótico, virulento y tienen una capacidad competitiva débil en el suelo o en los restos de materia orgánica (Rees *et al.*, 2007).

Ciclo de vida de *Ganoderma* spp.

El ciclo de vida de *Ganoderma*, como el de la mayoría de los Polyporaceos y la enfermedad que producen a sus hospederos, donde la enfermedad que se induce en los árboles comúnmente es causada por un inóculo primario, esto es por fragmentos tanto del micelio como de tejido vegetal infectado, la infección se desencadena sutilmente a través de heridas en las raíces y en el tronco de los árboles a los que causan pudriciones mediante el debilitamiento de la madera, lo que resulta en un síndrome generalizado con síntomas muy notables y el deterioro progresivo de la salud de los árboles (Sinclair y Lyon, 2005). Los resultados obtenidos en diversos trabajos sobre la biología de los basidiomicetos endófitos en los árboles, ha demostrado que la mayoría de los géneros que son descomponedores de la madera se encuentran asociados a madera sana, lo que sugiere que son de carácter biotrofo, en donde se encuentra al género *Ganoderma*, el cual inicialmente se desarrolla en madera totalmente sana de árboles vivos como endófito, este descubrimiento agrega otro nivel al ciclo de vida de este fitopatógeno de madera (Parfitt *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2015).

Por otra parte Rees *et al.* (2007), mencionan que en el caso de las infecciones producidas por *Ganoderma* spp., en plantas de palma aceitera, su conjunto de síntomas, en la mayoría de los casos no son detectadas a simple vista, por lo que sugieren que el micelio se presenta

monocariótico y que puede vivir como saprófito en tejidos muertos sobre la superficie de la palma sin tener capacidad infecciosa.

Este heterocarion prolifera y crece con dos núcleos haploides que se dividen y multiplican independientemente en cada unidad de tabique hasta que el ciclo de vida de *Ganoderma* se complete cuando el dicarion de las hifas producen un cuerpo fructífero conocido como esporoma (Hasan y Flood, 2003). El esporoma tiene células especializadas llamados basidios que se asemejan a pequeños globos donde se produce la cariogamia. Los basidios se dividen meióticamente para producir genéticamente basidiosporas únicas (Campbell *et al.*, 2008).

Pudrición blanca en cultivos agrícolas

El género *Ganoderma* causa grandes pérdidas económicas alrededor del mundo en palma aceitera, especialmente en el Sudeste de Asia (Corley y Tinker, 2003), las especies de este hongo atacan una amplia gama de cultivos perennes tropicales y subtropicales, como: Coco (*Cocos nucifera*), té (*Camellia sinensis*), goma (*Ficus elastica*) areca (*Dyopsis lutescens*) y acacia (*Acacia mangium*), así como varias especies de palmeras silvestres. En cultivos de oleaginosas perennes, es importante por los daños que ocasiona al afectar la economía en los trópicos húmedos de las tierras bajas del sur y sudeste de Asia y Oceanía, las pérdidas económicas más importantes reportadas en cultivos es la ocasionada por *Ganoderma adspersum* que causa pudrición del corazón de haya y otros árboles de hoja ancha (Flood *et al.*, 2000).

Infección por *Ganoderma*

Ganoderma vive como saprofito gran parte de su ciclo de vida, daña solamente hospederos debilitados por otros fitopatógenos o por condiciones adversas del medio ambiente, o bien como fitopatógeno secundario, (Miller *et al.*, 2000). Sin embargo, también se reporta como facultativo con la capacidad de infectar plantas jóvenes. Abdullah (2000), describe a *Ganoderma* como un endófito en plantaciones de cocos. Panchal y Bridge (2005), relacionan ADN de *Ganoderma* encontrado en palma aceitera asintomática. El hongo se propaga por esporas y crece en los tejidos, primeramente no vivos, luego pasa a células vivas, debilita el árbol y lo hacen susceptible al viento por la ausencia de raíces, en la parte aérea de la planta las ramas son susceptibles a romperse con el viento. *Ganoderma* se establece en la parte aérea

de las plantas a partir de esporas transportadas por el viento, en heridas causadas por el hombre o en ramas rotas por el viento. Los cuerpos fructíferos liberan gran número de esporas y estas infectan árboles sanos (Deacon, 1997).

Este género se encuentra con amplia distribución en México, se reportan alrededor de 10 especies (Cibrián *et al.*, 2007; López-Peña *et al.*, 2016), sin embargo, aún falta mucho por hacer, especialmente en cultivos agrícolas, no se tiene información sobre las especies de hospederos y los daños que les producen, debido a esto se tiene necesidad de continuar con su revisión taxonómica. Las especies del género *Ganoderma* viven tanto en ambientes tropicales como templados, infectan raíces, el cuello de la raíz y parte baja de troncos, también se han encontrado en ramas altas de árboles, en troncos caídos, algunas son saprofitas, pero otras son fitopatógenas en árboles vivos, atacan coníferas, dicotiledóneas y, en menor grado, monocotiledóneas. Todas las especies causan pudrición blanca y afectan a la albura (parte joven de la madera, que corresponde a los últimos anillos de crecimiento del árbol). Con frecuencia sus infecciones obligan a la adopción de medidas de control o valoración de riesgos, en particular en árboles de ambientes urbanos de las ciudades del centro y sur de México (Cibrián *et al.*, 2007).

En los árboles muertos por este fitopatógeno se pudre primero la albura, en el caso de especies de árboles urbanos representan un factor de alto riesgo para la seguridad de personas y bienes, por su posible caída por vientos fuertes o lluvia. *G. tsugae* afecta coníferas y es común en Estados Unidos y Canadá, en México se tienen escasos reportes de árboles muertos a causa de esta especie. *G. australe* es común en los ambientes tropicales y es posible confundirlo con *G. applanatum*, ya que ambos tienen esporomas perennes; en plantaciones de cedro rojo (*Cedrela odorata*) se ha reportado que produce daños en árboles jóvenes, llegan a producirles la muerte. En ciudades como Xalapa, Oaxaca y Ciudad de México se han registrado muertes de personas ocasionadas por la caída de los árboles dañados por *G. applanatum* (Cibrián *et al.*, 2007).

Hospederos e importancia de *Ganoderma*

Este fitopatógeno se encuentra principalmente en árboles jóvenes y maduros, vivos o muertos, de *Quercus* spp., en los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Querétaro y Veracruz, sin embargo, no está confinado a estos estados sino

que tiene una amplia distribución en México así como en toda América, Europa, Asia y Oceanía (Cibrián *et al.*, 2007).

Cibrián *et al.* (2007), mencionan que *G. lucidum* es un hongo de importancia en huertos comerciales de durazno, mata árboles jóvenes y obliga a tomar diferentes medidas de control, en las zonas infectadas o bien hacer un cambio de cultivo a especies no hospederas, esta especie también afecta a coníferas y latifoliadas en los bosques naturales. Swiecki y Bernhardt (1990), mencionan que *G. lucidum*, que es un fitopatógeno importante y letal de encinos maduros, tanto en áreas silvestres como en las zonas urbanas de California, EE. UU, especies de *Ganoderma* fueron encontradas tanto en árboles maduros como en jóvenes de *Q. potosina*. En California, Hickman y Perry (2003), señalan que este fitopatógeno puede afectar al género *Acacia* spp., a arboles de manzano, fresno, abedul, Cerezo, *Citrus* spp., olmo, magnolia, maple, olivo, durazno, pino, álamo, pimienta y sauce, entre otros, inclusive los puede matar en un periodo de tres a cinco años. Downer (2006), menciona que las pudriciones más comunes en *Q. agrifolia* y *Q. lobata* en California, son causadas por *G. lucidum* y *G. applanatum*, ambas especies están asociadas con un declinamiento y defoliación de encinos, especialmente *G. lucidum*. Además, indica que *G. lucidum* afecta principalmente la base del tallo y con frecuencia emergen los esporomas del suelo a partir de las raíces enfermas. Olsen (1999), describe a *G. lucidum* como un hongo fitopatógeno, en encinos y otros árboles de zonas urbanas de Arizona, también se ha reportado en árboles de *Q. nigra* y *Q. phellus*, muertos, secos, con pudrición radicular, en los estados de Arkansas, Mississippi y Florida, mismos que fueron debilitados por periodos de sequía en los años 1978 y 1980 (Lewis, 1981). Debido a lo anterior el objetivo de la presente investigación fue:

- Evaluar la patogenicidad de cepas obtenidas de *Ganoderma* spp., para determinar su virulencia y severidad mediante la inoculación de plantas sanas de *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*

II. Materiales y métodos

Recolecta y aislamiento

Se realizaron muestreos en cuatro comunidades de cuatro municipios en el estado de Michoacán, en cada sitio se tomaron las lecturas de localización y altura con ayuda de un GPS Garmin Oregon 450. En cada sitio de muestreo se recolectaron muestras de raíz, tallo y corona de árboles con síntomas iniciales de amarillamiento, defoliaciones y signos del fitopatógeno, (micelio y esporomas) con ayuda de herramienta previamente desinfectada entre cada recolecta cada muestra se depositó en una bolsa resellable de, se etiquetaron de acuerdo al orden de recolecta con datos del huerto y las coordenadas, en el caso de las raíces se recolectaron con una muestra de suelo para evitar la pérdida de humedad. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH.

El aislamiento se hizo a partir del micelio de esporomas recolectados en campo, de acuerdo al protocolo descritos por Agrios (2005), la técnica incluye lavado y desinfección de esporomas La muestra se tomó de la parte interna no contaminada, se colocaron cinco trozos de 0.5 cm de tejido de forma equidistante en una caja Petri con medio de cultivo PDA. adicionado con ácido láctico 0.20 mm/lit como se indicó en el capítulo I. Se c

Purificación

Una vez que se obtuvo el aislamiento y crecimiento del fitopatógeno se tomaron puntas de hifa con ayuda de un estereoscopio y de un bisturí previamente esterilizado y se transfirieron a otra caja Petri con medio de cultivo PDA, para tener únicamente al fitopatógeno de interés, cuando la caja estuvo llena del micelio se almacenó a 4 °C hasta su uso, para determinar sus características de conservación, como se describe en el capítulo I.

Conservación de cepas y preparación de inóculo

Para la conservación de las cepas se seleccionó un sustrato con los elementos necesarios para su desarrollo y conservación, se utilizaron semillas de sorgo, se consideró la sanidad de los mismos, que estuvieran libres de plagas y de enfermedades.

Para la preparación del inóculo se limpiaron las semillas de sorgo mediante enjuagues en un recipiente, para eliminar el polvo y basuras de restos del cultivo, se sumergió el grano en agua durante 24 horas para obtener una buena hidratación y se escurrió la semilla durante 60 minutos. Después se colocaron los granos en frascos de vidrio de 600 ml, los cuales se llenaron en un 75 % de su capacidad para poder mover la semilla y que se mantuviera buena aireación, así como una rápida invasión del micelio, posteriormente se taparon los frascos con torundas hechas de gasa y algodón y sombreros de papel, con la finalidad de evitar contaminantes. Cuando estuvieron listos los frascos con el grano se esterilizaron en una autoclave a 15 libras de presión durante una hora.

Después se efectuó la inoculación del hongo *Ganoderma* spp., en las semillas de sorgo previamente esterilizadas. Este proceso se realizó en un área aséptica en el laboratorio, en campana de flujo laminar. El material empleado (agujas de disección, sacabocados, navajas y asas de platino) se esterilizó previamente. La inoculación del micelio en la semilla se hizo con la ayuda de un sacabocado, se cortaron discos en el medio de cultivo de 1cm³ donde contenía el micelio del hongo. Estos discos de micelio se depositaron sobre la superficie de cada uno de los frascos con el grano hidratado y estéril (4 discos de 1 cm³, 2 frasco por cepa) con ayuda de una aguja de disección o asa de platino. Cada frasco se tapó con la torunda y el sombrero de papel para evitar contaminaciones del exterior, se movió el sustrato para que el micelio quedara disperso e invadiera la semilla con rapidez. Se incubaron los frascos a una temperatura de 28 ° C en una estufa, durante el tiempo necesario para que el micelio invadiera por completo la semilla. En este tiempo se hicieron revisiones continuas para detectar cualquier irregularidad (contaminantes, anaerobiosis, etc.), (Guzmán *et al.*, 1993), Figura 12.



Figura 12. Granos de sorgo invadidos por el micelio de las cepas de *Ganoderma* spp.

Pruebas de patogenicidad

En el Invernadero de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” se desarrollaron las pruebas de patogenicidad con la inoculación de plántulas de aguacate de *Persea americana* Miller var. *drymifolia*, con cada una de las 30 cepas de *Ganoderma* spp.

Preparación del sustrato

En bolsas de plástico limpias y desinfectadas con cloro se depositó una mezcla de sustrato, éste consta de una mezcla de suelo tipo andosol y arena en una proporción 2:1 respectivamente, previamente el sustrato se colocó en bolsas de plástico de 2 kg y se esterilizó durante cinco horas a 121 ° C.

Preparación del material vegetativo

Se recolectaron frutos maduros de 4-12 cm de largo, ovoides, con el exocarpo delgado de color oscuro, pulpa de color verde, de un solo árbol de aguacate criollo de la raza mexicana, con buenas características de porte y vigor, así como sanidad de la planta. Los frutos fueron recolectados directamente del árbol, se evitaron aquellos que estaban en contacto con el suelo. Al fruto se le retiró la pulpa y el endocarpo, una vez limpia la semilla se seleccionaron

aquellas con un tamaño uniforme de 6-8 cm, sanas (sin plagas ni enfermedades) y sin daños mecánicos. Las semillas se sumergieron en agua a 50 °C durante 30 minutos, para eliminar posibles infecciones de microorganismos y mantener su viabilidad (Lara, 2008), las semillas se sumergieron en agua estéril fría para disminuir su temperatura y se sembraron inmediatamente en el sustrato estéril en contenedores de plástico de uno litro de capacidad, nuevos y previamente desinfectados con cloro al 33 %.

Inoculación

Cuando las plantas alcanzaron en promedio 25 cm de altura se efectuó la inoculación, mediante el protocolo descrito por Lara (2008), para lo cual pesaron 5 g de inóculo contenido en el frasco con semillas de sorgo, y se colocó en cada planta cerca de la raíz y se tapó con sustrato estéril, se evitó ocasionar daño a la raíz, posteriormente, Figura 13.

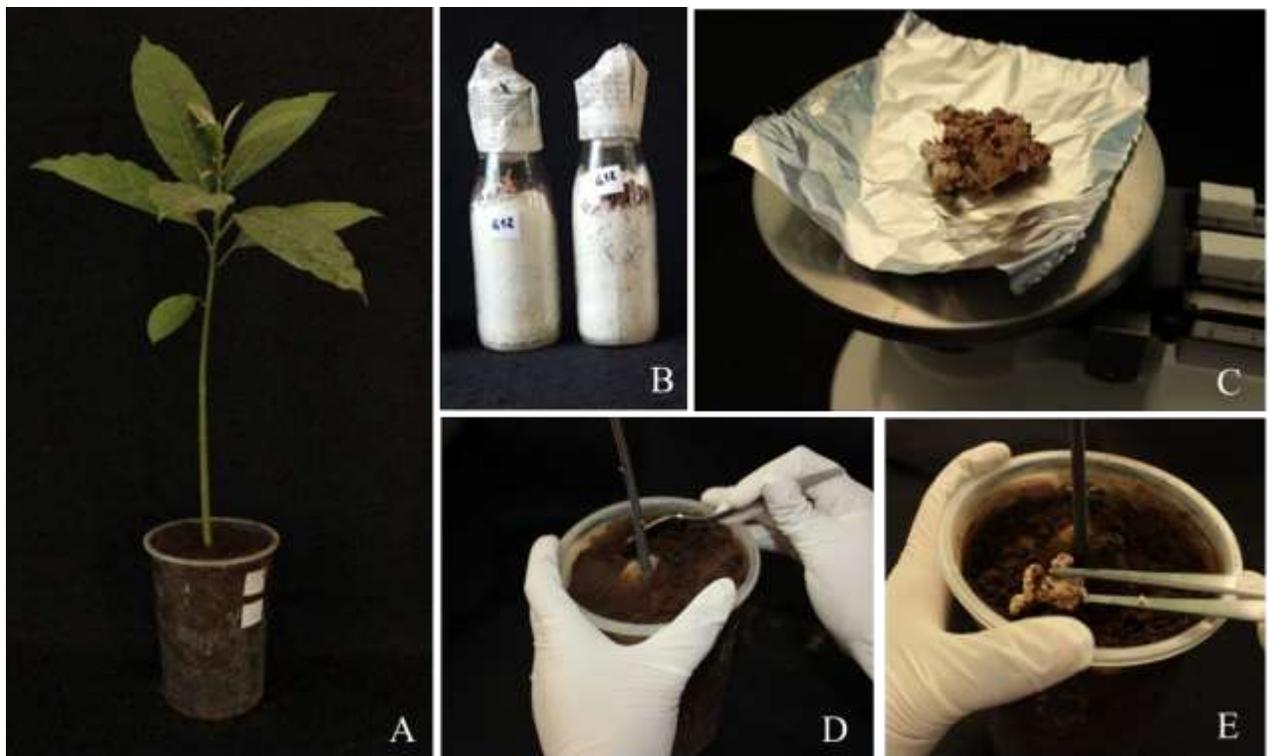


Figura 13. Inoculación de plántulas de aguacate con cepas de *Ganoderma* spp. A) Planta sana; B) Inóculo; C) remoción de la capa superficial de sustrato para descubrir la raíz; D) inoculación.

Variables respuesta

Las variables evaluadas para determinar la patogenicidad de las cepas de *Ganoderma* spp., fueron la virulencia de las cepas y el grado de severidad de la enfermedad. La virulencia fue determinada con base en el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas en la planta, los datos obtenidos se someterán a un análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba de Tukey (α 0.05), el diseño experimental fue completamente al azar. Para determinar la severidad de la enfermedad se tomó en cuenta la escala descrita por Lara (2008), con cuatro grados de daño; (a) planta sana, (b) amarillamiento, (c) marchitez apical y (d) muerte de planta.

III. Resultados y discusión

Pruebas de patogenicidad en plántulas de aguacate

Los primeros síntomas en las plántulas de aguacate se presentaron a los 16 días posteriores a la inoculación; fueron: amarillamiento y defoliación inicial apical; a los 22 días se presentó defoliación apical casi completa; a los 35 días se observó muerte apical y a los 80 días muerte completa de la primera planta Figura 14. Todas las cepas presentaron variación en la virulencia y severidad de la enfermedad. Estos síntomas coinciden con lo reportado por Pataky, (1999) quien reporta muerte descendente de las ramas y defoliación, pérdida de vigor en la planta además de la muerte de explantes de palma aceitera inoculadas con especies de *Ganoderma*, las cuales presentaron síntomas de pudrición por el complejo enzimático del patógeno (González *et al.*, 2016)



Figura 14. Grado de daños en plantas inoculadas con *Ganoderma*, de acuerdo a la escala de Lara (2008), PS planta sana; Grado I amarillamiento; Grado II marchitamiento; Grado III: muerte apical y Grado IV muerte de planta.

Síntomas y signos expresados en las pruebas de patogenicidad Durante del experimento se observó el avance del micelio entre el sustrato y el contenedor de plástico transparente, así como una colonización masiva tanto del sustrato como de las raíces de la planta, los síntomas que expresaron las plántulas de aguacate por el fitopatógeno fueron necrosamiento de raíces (Figura 15), en la parte superior del sustrato se observó la formación de primordios del hongo

e invasión de los cotiledones Figura 16, posteriormente la formación de cuerpos fructíferos (esporomas), Figuras 15, 16, 17 y 18.



Figura 15. Sustrato colonizado con micelio de *Ganoderma* spp., raíces con síntomas de pudrición B) raíces invadidas por el micelio y necrosamiento de raíces.



Figura 16. Colonización del micelio en tejidos de los cotiledones y B) tallo



Figura 17 Formación de Esporomas de *Ganoderma* spp., en la corona de las plantas inoculadas.



Figura 18. Esporomas de *Ganoderma* spp., asociados a las raíces y tallo de las plantas de aguacate inoculadas.

En la parte área de las plantas de aguacate se observaron hojas cloróticas y de tamaño reducido, muerte ay defoliación apical, Figuras 19 y 20.



Figura 19. Síntomas en hojas de plántulas inoculadas con *Ganoderma* spp., A) Necrosamiento del tejido foliar; B) amarillamiento; C) marchitamiento y D) deficiencias nutricionales causadas por el taponamiento de haces vasculares.



Figura 20. Síntomas en plántulas inoculadas con *Ganoderma* spp. A y B) Defoliación de ápices, C) amarillamiento y mal formación de hojas, D y E) muerte apical, D) defoliación generalizada.

Las raíces de las plantas de *Persea americana* var. *drymifolia*, inoculadas con *Ganoderma* spp, presentaron un alto avance de los signos característicos reportados para la enfermedad conocida como pudrición blanca, que fue micelio blanco y corchoso, se observó crecimiento del fitopatógeno desde la raíz central o de sostén, las raíces alimenticias hasta la corona y el tallo Figura 21.

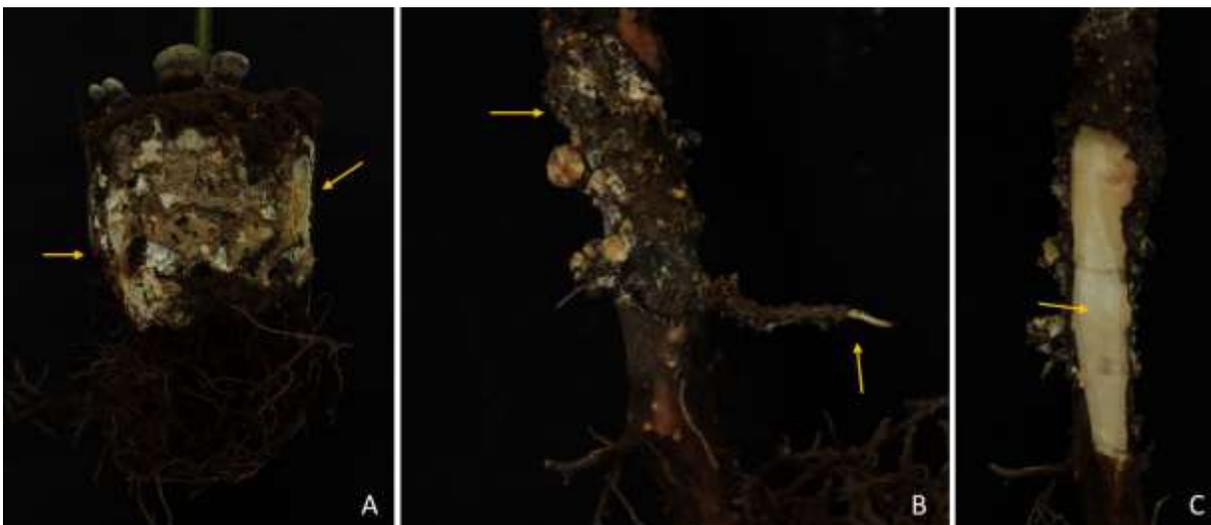


Figura 21. Síntomas y signos observados de la infección en plantas de *Persea americana* Miller var. *drymifolia*, inoculadas con *Ganoderma* spp. A) Colonización de micelio de *Ganoderma* spp.; en la zona del sistema radicular; B) pudrición blanca y degradación del tejido vegetal en tallo, corona y raíces alimenticias; C) albura de tono pálido por la acción de las enzimas de *Ganoderma* spp, para extraer la lignina y la celulosa.

Reaislamiento del fitopatógeno y caracterización de síntomas

De acuerdo con los postulados de Koch, (1890) se procedió a reaislar el fitopatógeno de las plantas anteriormente inoculadas, se realizó la siembra de tejido radical de acuerdo al protocolo descrito por Agrios (2005), en medio nutritivo PDA, el resultado fue positivo en todos los casos, comprobándose la relación fitopatógeno planta.

Virulencia de las cepas de *Ganoderma* spp

El análisis de varianza de las pruebas de patogenicidad indicó diferencias altamente significativas ($P > 0.0001$) para esta variable. Los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) se muestran en la Figura 18. El tiempo transcurrido para que se presentaran los primeros síntomas fue distinto entre cepas, vario entre 16 a 80 días posteriores a la inoculación cuando se produjo la muerte de la primera planta; los síntomas observados fueron: amarillamiento, necrosamiento foliar, defoliación apical, pudriciones radiculares y muerte descendente de puntas; después de 20 días se observó defoliación apical casi completa; a los 35 días se presentó muerte apical y a los 80 días la muerte completa de la primera planta. Todas las cepas presentaron variación en virulencia y severidad de la enfermedad, pero en la mayoría de los casos se ocasionó la muerte de las plántulas de aguacate inoculadas. Estos síntomas coinciden con lo observado por Pataky (1999), quien reporta muerte descendente de las ramas y defoliación, pérdida de vigor en la planta, además de la muerte de explantes de palma aceitera inoculadas con especies de *Ganoderma* las cuales presentaron síntomas de pudrición por el complejo enzimático del patógeno (González *et al.*, 2016). La cepa más virulenta fue G16 con una alta capacidad de producir la muerte en las plántulas de aguacate a los 80 día después de ser inoculadas, las cepas G22, G41, G55, G56, G61 y G62 solamente produjeron amarillamiento, un tercer grupo conformado por las cepas G21, G40 y G60 produjeron el síntoma de marchitamiento, y el cuarto grupo con las cepas G2, G7, G10, G12, G13, G15, G18, G19, G20, G25, G26, G28, G43, G44, G45, G46, G50, G58 y G65 ocasionaron muerte apical en las plántulas de aguacate.

Evaluación de la severidad de la enfermedad

La severidad de la enfermedad determinada en plántulas de aguacate inoculadas con los 30 aislados de *Ganoderma* indicó variabilidad y se vio reflejada en la reducción del porte de las plantas. A nivel radical, las 30 cepas presentaron una colonización y degradación del tejido, seguido por pudriciones suaves, decaimiento de las plantas respecto al testigo, así como una coloración clorótica foliar, defoliaciones generalizadas y muerte de ápices Figura 22.

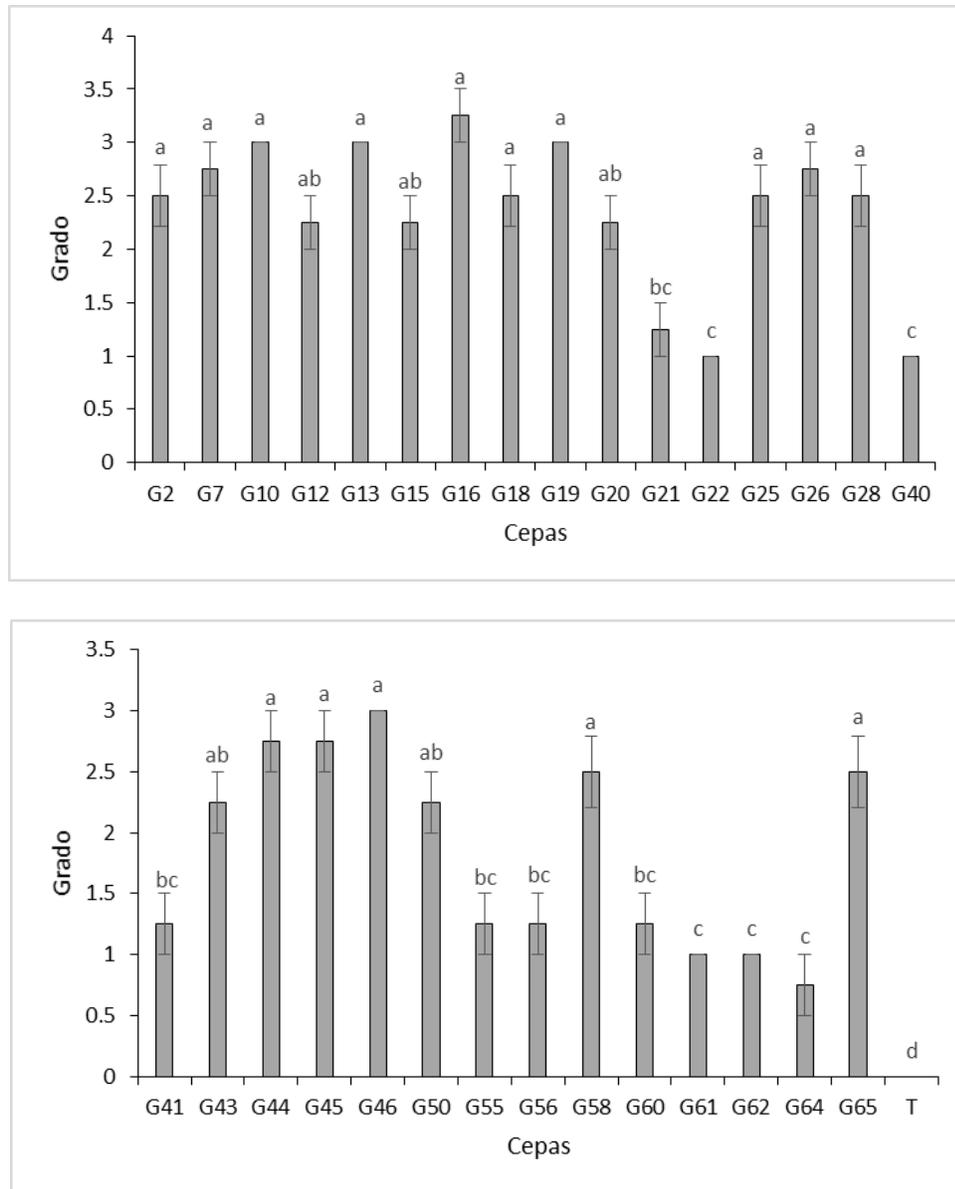


Figura 22. Grado de virulencia producida por cepa de *Ganoderma* spp., inoculadas en plántulas de aguacate.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los reportes de Rees *et al.* (2009), quienes describen la infección ocasionada por *G. boninense* en palma aceitera (*Elaeis guineensis*), donde observaron una invasión del patógeno en la corteza, raíces, cotiledones, corona y la base del tallo, esta colonización fue intracelular por células especializadas llamadas hifas. En la presente investigación se observó este proceso ya que los contenedores

donde se hicieron las pruebas de patogenicidad con las plantas de aguacate fueron transparentes. La colonización del fitopatógeno sobre el tejido vegetal, es un modo de invasión que se ha reportado como fase hemibiotrófica (el fitopatógeno forma inicialmente una asociación con células vivas del huésped, y más tarde se vuelve necrotrófico) bien caracterizada con *Colletotrichum* spp. (Perfect *et al.*, 1999; Latunde- Dada y Lucas, 2007), esta asociación es una estrategia implementada por ciertos ascomicetos, para los basidiomicetos no está bien descrita en huéspedes leñosos (Gesteira *et al.*, 2007). Abdullah (2000), señala que *G. boninense*, es capaz de realizar una invasión a su huésped de una manera muy sutil y describió al hongo como un endófito en palmas cocoteras, esto refuerza lo reportado por Panchal y Bridge (2005), que detectaron ADN de *Ganoderma* en palmas aceiteras las cuales no tenían ningún síntoma de la enfermedad. El modo hemibiotrófico de invasión fue seguido por una fase necrotrófica agresiva asociada con una extensa degradación de las paredes celulares del tejido vegetal infectado, *Ganoderma* spp., produce un complejo enzimático degradador el cual utiliza para penetrar, colonizar y degradar exitosamente el tejido radicular (Blanchette, 1984; Cooper, 1984). Posiblemente las defensas de la palma de aceite dependen más de los compuestos antimicrobianos, como se encuentran en la albura de muchas especies de árboles para evitar o retardar la infección por *Ganoderma*, (Pearce, 1996).

La mayoría de los síntomas de infección que se encontraron para *Ganoderma* en las plántulas de aguacate, coinciden en los registrados en trabajos similares pero realizados en palmas; necrosis de las raíces primarias, seguido de necrosis del tronco del tallo, síntomas foliares y la aparición de esporomas de *Ganoderma* spp. Los reportes en plántulas de palma aceitera infectadas por *Ganoderma* también indican que se invade la raíz por estar en contacto directo con la fuente de inóculo, de igual manera sucedió en nuestra investigación en las plántulas de aguacate, el patógeno primero invadió las raíces alimenticias y posteriormente la infección progresó a todo el sistema radical, tallo y tronco y síntomas foliares, similares a los observados en campo. Rees *et al.* (2009), mencionan que los síntomas en las pruebas de patogenicidad fueron similares a los observados en campo. Finalmente, aparecieron primordios en el sustrato y en la base del tronco de algunas de las plántulas inoculadas. Rees *et al.* (2009) reportan una masa de *Ganoderma* en el tronco del tallo de las plántulas de palma infectadas, también detalla la infección y la progresión del síndrome a través de una técnica de infección similar a la que se utilizó en esta investigación, y la infección por especies de *Ganoderma* en la superficie de

la raíz ocurrió por el contacto de la raíz con las hifas y e indican que penetran en la epidermis y exodermis de la raíz (Rees *et al.*, 2009). Flood *et al.* (2000; 2005) corroboran estas investigaciones e indican que el modo de infección de *Ganoderma* spp., es través del contacto entre el inóculo y la raíz de la palma aceitera. La desecación progresiva de hojas y emergencia de primordios de color blanco, que se desarrollaron posteriormente en pequeños esporomas, son muy similares a los reportados en otros estudios por Breton *et al.* (2006); Sariah *et al.* (2007) con resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

IV. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización patogénica de los 30 aislados de *Ganoderma* spp se concluyó lo siguiente:

Las 30 cepas de *Ganoderma* spp., fueron patogénicas para *Persea americana* Miller var. *drymifolia*.

La virulencia de las cepas de *Ganoderma* spp., mostró variación, fluctuó entre 16 y 80 días la presencia de síntomas y la muerte de la primera planta.

Los síntomas ocasionados por *Ganoderma* fueron pudrición blanca en raíz, corona y tallo, en el área foliar se observó amarillamiento, marchitez y defoliación de las plantas de *Persea americana* Miller var. *drymifolia*.

V. Literatura Citada

- Agudelo V. D., Uribe Echeverry P. T., Betancur Pérez J. F. 2019.** De novo assembly and annotation of the *Ganoderma australe* genome. Genomic. doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.008
- Aubin-Hort N., Reen C. P. S. 2009.** Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology*. 1-18 pp.
- Badotti F., De Oliveira F.S., Garcia C.F., Vaz A.B.M., Fonseca P.L.C... Nahum L.A ... Góes-Neto A. 2017.** Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi), *BMC Microbiol.* 17 (1) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>.
- Badotti, F. Camargos, P. L. Ribeiro, L. T. Trindade, D. 2018.** ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. *Brazilian Journal of Botany*. 1-9 pp.
- Baldauf, S.L., Palmer, J.D., 1993.** Animals and fungi are each others closest relatives—congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11558–11562.
- Bernicchia A., 2005.** Polyporaceae s.l. Edizioni Candusso, Savona, Italy, 808 Pp.
- Bridge P. D., Roberts P. J., Spooner B. M., Panchal G. 2003.** On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* 160:4348 DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00861.x.
- Brown, S. P., Jumpponen, A. 2014.** Contrasting primary successional trajectories of fungi and bacteria in retreating glacier soils. *Molecular Ecology* 23: 481-197.
- Cao, Y., Wu, S.H., Dai, Y.C., 2012.** Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom Lingzhi. *Fungal Divers.* 56, 49–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0178-5>.

- Cenis J.L., 1992.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acid Research* 20, 23–80 Pp.
- Chen S., Xu J., Liu C., Zhu Y., Nelson D.R., Zhou S., Sun C. (2012).** Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Nat. Commun* 913–919, <https://doi.org/10.1038/ncomms1923>.
- Chen M., Lin L., Zhang Y., Sun L., An Q. 2016.** Genome sequence of *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from the pioneer grass *Psammochla villosa*. *Genome Announcements* 1: e00601-e00613.
- Gardes M., Bruns T. D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Glen M, Bougher NL, Francis AA, Nigg SQ, Lee SS, Irianto R, Barry KM, Beadle CL, Mohammed CL. 2009.** *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australas Plant Pathol* 38(4):345–356. <https://doi.org/10.1071/AP09008>.
- Gomes-Silva, A., Ryvardeen, L. y Baptista, T. 2011.** New records of Ganodermataceae (Basidiomycota) from Brazil. *Nova Hedwigia* 92 (1–2): 83–94 Pp.
- Gottlieb A.M., B.O Saidman and J.E. Wright, 1998.** Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* 102, 415–426 Pp.
- Gottlieb AM, Wright JE, 1999.** Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103: 661e673.
- Guglielmo F, Gonthier P, Garbelotto M, Nicolotti G (2007).** A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* sl and *Phellinus* sl. *FEMS Microbiol Lett* 282:228–237
- Guglielmo F., Bergemann S. E. 2008.** A multiplex PCR- based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5), 1490-1507.

- Hall T. A. (1999)** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Hibbett D.S., 1996.** Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 13, 903–917.
- Hibbett D. S, Vilgalys E. M, 1993.** Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 12002–12006.
- Hibbett D.S., Gilbert, L.B., Donoghue, M.J., 2000.** Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407,506–508.
- Jargalmaa S., Eimes J.A., Park M.S., Park J.Y., Oh S.Y., Lim Y.W. 2017.** Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation, *Peer J.* 5 e 3596, <https://doi.org/10.7717/peerj.3596>.
- Jung P. E., Fong J. J., Park M. S., Oh S. Y., Kim C., Lim Y. W. 2014.** Sequence validation for the identification of the white-rot fungi *Bjerkandera* in public sequence databases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1301-1307 DOI 10.4014/jmb.1404.04021.
- Kaliyaperumal M. and T.K. Pudupalayam, 2008.** *Ganoderma australe* from southern India. *Microbiological Research* 163, 286–292.
- Kaliyaperumal M., Kalaichelvan P.T. 2008.** *Ganoderma australe* from southern India, *Microbiol. Res.* 163 (3) 286–292, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.003>.
- Kües U, Nelson D.R., Liu C., Yu G.J., Zhang J., Li J., Sun H. 2015.** Genome analysis of medicinal *Ganoderma* spp. with plant-pathogenic and saprotrophic life-styles, *Phytochemistry* 114 18–37, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.019>.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004.** MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignments. *Brief Bioinform.* 5, 150–163.

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz. C., Tamura K. 2016.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547-1549.
- Lasserre B., E. Motta, L. D'Amico, M. Scirè and M. Marchetti, 2010.** Utilizzo del Resistograph® per l'individuazione di diverse tipologie di alterazione del fusto di abete bianco in Alto Molise. *Forest@* 7, 190-198 [online: 2010-10-13] URL: <http://www.sisef.it/forest@/?oi=10.3832/efor0638-007>
- Leonard A.C., 1998.** Two *Ganoderma* species compared. *Mycologist* 12, 65–68 Pp.
- Levy S.E y Myers R.M. 2016.** Advancements in next-generation sequencing, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 17 (1) (2016) 95–115, <https://doi.org/10.1146/annurevgenom-083115-022413>.
- Liu D., Gong J., Dai W., Kang X., Huang Z., Zhang H.M., ... Xiong X. 2012.** The genome of *Ganoderma lucidum* provide insights into triterpene biosynthesis and wood degradation, *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036146>.
- Liu Y. J., Whelen S, Hall B. D. 1999.** Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Liu Y. J., Hall B. D. 2004.** Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *PNAS*. Vol 101, No 13, 4507-4512, pp 1-6.
- Lothamer K., Jumpponen A., Zeglin L., Prestat E., David M., Dvornick J., Jansson J., Rice C.W., Tringe S., Myrold D. 2013.** Fungal Community responses to discrete precipitation pulses under altered rainfall intervals. *Phytopathology* 103 (6s).
- Matheny P. B. 2005.** Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe, Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.11.014>.
- Mohanta K., Bae H. 2015.** The diversity of fungal genome. *Biological procedures online* 17(1), 1-9.

- Moncalvo J. M., Wang H. F., Wang H.H., Hseu R. S., 1994.** The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM, eds. *Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology*. Vancouver: International Mycological Congress, 31-44.
- Moncalvo J.M., 2000.** Systematic of *Ganoderma*. In: *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. (J. Flood, P.D. Bridge, M. Holderness, ed.), CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 23–45 Pp.
- Moncalvo J.M., 2005.** Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum- australe* species complex (Basidiomycota). *Mycol. Res.* 112, 425-436.
- Moore D, Robson GD, Trinci APJ 2011.** 21st century guidebook to fungi. New York: Cambridge University Press. 639 p.
- Moore – Landecker E. 1996.** Fundamentals of the fungi. Prentice Hall. No. Ed. 4 pp xiv 574 pp.
- More – Landecker E., Stotzky G., Hansen S. 2008.** Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. *Mycologia* 65 (3), 519-530.
- Mount David W. 2013.** Bioinformatics, sequence and genome analysis. *Inf. Model.* 53 (9) 1689–1699, <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Nicolotti G., M. Negri and N. Anselmi, 1992.** Incidence and biology of *Ganoderma* species causing decline of trees in northern Italy. *Petria* 2, 159–170 Pp.
- Nilsson R. H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K. H., Kõljalg U. 2006.** Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLOS ONE* 1:e59 DOI 10.1371/journal.pone.0000059.
- Nilsson, R. H. Tedersoo, L. Abarenkov, K. Ryberg, M. Kristiansson, E. Hartmann, M. Schoch, C. L. Mylander, J. A. A. Bergsten, J. Porter, T. M. Jumpponen, A. Vaishampayan, P. Ovaskainen O. Hallenberg, N. Bengtsson-Palme, J. Eriksson,**

- K. M. Larsson, K. H. Larsson, E. Kóljalg, U. 2012.** Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycoKeys* 4: 37-63.
- O'Donnell, K.L., Ward, T.J., Lutzoni, F., Benny, G.L., 2001.** Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* 93, 286–296.
- Osuji C., Mowobi G. G., Abubakar S., Nweke O. 2015.** Extraction of Good Quality Genomic DNA from Dry woody Mushroom Samples for Molecular Analysis: A Case Study of *Ganoderma lucidum*. *Translational Medicine and Biotechnology. Bi-Monthly, Volume-03, Issue05*. <https://www.researchgate.net/publication/334634945>.
- Page D. E., Glen M., Puspitasari D., Rimbawanto A. D. y Mohammed C. 2017.** Sexuality and mating types of *Ganoderma philippii*, *Ganoderma mastoporum* and *Ganoderma australe*, three basidiomycete fungi with contrasting ecological roles in south-east Asian pulpwood plantations. *Australasian Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0531-y>.
- Paterson, R.R.M., 2007.** Internal amplification controls have not been employed in diagnostic fungal PCR hence potential false negative results. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1–10 Pp.
- Paterson, R.R.M., 2008.** Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR. *Curr. Enzyme Inhib.* 4, 46–59 Pp.
- Peterson J.E., 1987.** *Ganoderma* in Northern Europe. *Mycologist* 1, 62–67 Pp.
- Pegler D. N., Yao Y. J. 1996.** Oriental species of *Ganoderma* section *Ganoderma*. *Botany and Mycology*
- Pawlik R. J., McMurray E. S., Patrick E., Zea S. 2015.** No evidence for food limitation of Caribbean reef sponges. *Ecology Progress Series* 527, 281-284.
- Porras – Alfaro A., Cole R. J., Brown C. T. 2014.** Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput RNA analysis. *Nucleic Acids Research* Vol 42. 633- 644.
- Quail M., Smith M.E., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., ... Gu Y. 2012.** A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers, *BMC Genomics* 13 (1) (2012) 341, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>.

- Ramirez – Lopez E.M., Villareal A. I. 2013.** Sorption mechanism of anionic dyes on pecan nut shells (*carya illinoensis*) using batch and continuous systems. *Science direct* 48, 89-97.
- Rehner, S.A., Buckley, E., 2005.** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97, 84–98.
- Richter C, Wittstein K, Kirk P, Stadler M, 2015.** An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity* 71: 1–15.
- Roger, A.J., Sandbloom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H., 1999.** An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16, 218–233.
- Ryvarden L, 2004.** European Polypores. Part 1. Abortiporus e Lindtneria. *Synopsis Fungorum* 6: 1e387.
- Sankaran, K.V., Bridge, P.D., Gokulapalan, C., 2005.** *Ganoderma* diseases of perennial crops in India – an overview. *Mycopathologia* 159, 143–152.
- Schoch C. L, Seifert K., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Fungal Barcoding Consortium*. 109:6241-6246. DOI 10.1073/pnas.1117018109.
- Schwarze F.W.M.R. and D. Ferner, 2003.** *Ganoderma* on trees - Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal* 27, 59–77 Pp.
- Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M. 2012.** Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research, *Mol. Ecol* 1794–1805, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver-sion 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.
- Tamura, K., Nei, M., 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Terho M., J. Hantula and A.M. Hallaksela, 2007.** Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki city. *Forest Pathology* 37, 420–432 Pp.
- Torres, M., Guzmán, L. y Gugliota, A. 2012.** *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon* 121: 93–132.
- Vilgalys R. 2003.** Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 160:4-5 DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00894.x.
- Wang, C.H., Hsieh, S.C., Wang, H.J., Chen, M.L., Lin, B.F., Chiang, B.H., Lu, T.J., 2014.** Concentration variation and molecular characteristics of soluble (1,3;1,6)-b-D-glucans in submerged cultivation products of *Ganoderma lucidum* mycelium. *J. Agric. Food Chem.* 62, 634–641.
- Weber, C. F. Vilgalys, R. Kuske, C. R. 2013.** Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization varies with soil horizon. *Frontiers in Microbiology* 4: 78 doi: 10.3389/fmicb.2013.00078.
- White, T. J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. W. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wu, S.H., Dai, Y.C., 2005.** Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. *Fungal Divers.* 56, 49–62.

- Yang, F., Feng Z.H. 2013.** Antibacterial activity of 9-octadecanoic acid-hexadecanoic acid-tetrahydrofuran-3,4- diylester from neem oil. *Agr. Sci. China* 9 (8), 1236–1240.[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60212-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60212-1)
- Yao, Y.J., Wang, X.C., Wang, B., 2013.** Epitypification of *Ganoderma sichuanense* J.D. Zhao & X.Q. Zhang (Ganodermataceae). *Taxon* 62, 1025–1031. <http://dx.doi.org/10.12705/625.10>.
- Zhang, N., Blackwell, M., 2002.** Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycol. Res.* 106, 148–155.
- Zhao J.D., Zhang X.Q. 2000.** *Flora fungorum sinicorum* vol. 18, Ganodermataceae. Beijing: Science Press. pp. 1–178.
- Zhao J.D. 1979.** The Ganodermataceae in China. *Bibl Mycol.* 132:1–176.
- Zheng L., Jia D., Fei X., Luo X., Yang Z. 2009.** An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological* 164: 312-321.
- Zhou, L.-W., Cao, Y., Wu, S.-H., Vlasák, J., Li, D.-W., Li, M.-J., and Dai, Y.-C. 2015.** Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114:7-15.
- Zhu Y., Xu J., Sun C., Zhou S., Xu H., Nelson D.R., Chen S. 2015.** Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*, *Sci. Rep.* 5 (May), 1–14, <https://doi.org/10.1038/srep11087>.

CAPITULO III.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Ganoderma* spp. ASOCIADAS A *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake

Resumen

En la presente investigación se caracterizaron molecularmente especies del género *Ganoderma* asociadas al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán. Fueron examinados molecularmente 30 cepas obtenidos de diferentes localidades del estado de Michoacán. La extracción de ácidos nucleicos se hizo con base al protocolo descrito por Cenis, (1992); Osuji *et al.*, (2015), y se evaluó la concentración y pureza, posteriormente se amplificaron los fragmentos codificantes para RPB2 y factor de elongación por PCR y se enviaron a Macrogen Inc. en Seúl, Corea del Sur para su secuenciación. Las secuencias se sometieron a un análisis para cuantificar el contenido de guanina y citosina, posteriormente se compararon en homología por medio de un análisis BLAST y se seleccionaron las que presentaron una mayor similitud con los aislamientos en estudio. La totalidad de las secuencias fueron alineadas en MEGA 6.0, se realizó la búsqueda del mejor modelo evolutivo, cálculo de distancias genéticas y construcción de cladogramas con base a neighbor-joining, máxima parsimonia y máxima verosimilitud. El análisis filogenético de las secuencias que codifican para RPB2 y factor de elongación demostró que los aislados pertenecen a las especies: *G. australe*, *G. curtisii*, *G. parvulum* y *G. adspersum*.

Palabras clave: RPB2, Factor de Elongación, verosimilitud, PCR.

Summary

In the present investigation, species of the genus *Ganoderma* associated with avocado cultivation in the state of Michoacán were molecularly characterized. 30 strains obtained from different locations in the state of Michoacán were molecularly examined. The nucleic acid extraction was done based on the protocol described by Cenis, (1992); Osuji et al., (2015), and the concentration and purity were evaluated, later the coding fragments for RPB2 and elongation factor were amplified by PCR and sent to Macrogen Inc. in Seoul, South Korea for sequencing. The sequences were subjected to an analysis to quantify the guanine and cytosine content, later they were compared in homology by means of a BLAST analysis and those that presented a greater similarity with the isolates under study were selected. All the sequences were aligned in MEGA 6.0, a search for the best evolutionary model was carried out, calculation of genetic distances and construction of cladograms based on neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood. The phylogenetic analysis of the sequences that code for RPB2 and elongation factor showed that the isolates belong to the species: *G. australe*, *G. curtisii*, *G. parvulum* and *G. adspersum*.

Keywords: RPB2, Elongation Factor, likelihood, PCR.

I. Introducción

Las secuencias ITS han sido particularmente útiles para el desarrollo del código de barras de ADN de los hongos, el aumento desmesurado en la generación de secuencias de ADN disponibles en varias bases de datos, los resultados obtenidos en diversos estudios filogenéticos y moleculares han ayudado a resolver la taxonomía de numerosos grupos de hongos (Schoch *et al.*, 2012), aunque otros loci como el factor de elongación de traducción 1- (TEF1-) y la segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB2) (Liu, Whelen y Hall, 1999; Matheny *et al.*, 2007) han sido fundamentales para resolver relaciones evolutivas ambiguas entre las especies de *Ganoderma*. Mientras que los avances moleculares en general han llevado a mejorar en filogenética y taxonomía, la relativa facilidad y velocidad del código de barras de ADN también tiene potencial para aumentar la confusión a menudo asociada con la taxonomía de hongos. Hasta el 20 % de las secuencias encontradas en bases de datos pueden ser erróneas debido a la incorrecta identificación de especies (Bridge *et al.*, 2003; Vilgalys, 2003; Nilsson *et al.*, 2006). Este problema dentro del género *Ganoderma* se ha incrementado, debido a la ausencia de características morfológicas confiables, una alta tasa de clasificación de sinónimos y las asignaciones taxonómicas incorrectas, la combinación morfológica y los análisis moleculares (idealmente multilocus), puede resolver los problemas asociados con este creciente problema de secuencias erróneas (Jung *et al.*, 2014).

Con la ayuda de las innovaciones tecnológicas en las herramientas moleculares se ha podido construir genomas haploides de especies de *Ganoderma* como es el caso de una cepa de origen colombiano variedad *australe* con tecnología de secuenciación de alto rendimiento (PacBio) y la implementación de software, se obtuvo un genoma continuo de 84.2 Mb distribuido en 776 andamios, con un tamaño de andamio N50 de 200 kb y un porcentaje de GC de 55.57 %. Este porcentaje de GC concuerda con otros reportes dentro del género *Ganoderma*, este genoma establecido presento 3.1 % de regiones repetitivas esto fue evaluado con la herramienta RepeatMasker (Agudelo *et al.*, 2019), Chen *et al.* (2016) reportan 8.1 % de regiones repetitivas en el genoma de *G. lucidum*, Liu *et al.* (2012) y Kües *et al.* (2015), evaluaron los elementos transponibles del genoma de *G. lucidum*, y mencionan que hay entre 5 % y 2.1 % de elementos transponibles. Zhu *et al.* (2015) determinan que *G. sinense* tiene 12.2 % de elementos transponibles en esta especie.

Las diferencias observadas entre las especies de *Ganoderma* pueden estar relacionadas con el tipo de asilado utilizado para la secuenciación, como se muestra en los resultados obtenidos para el genoma de *G. lucidum*, presentado por Chen *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2012), el tipo de tecnología utilizada para obtener la secuencia del genoma, así como para el proceso de ensamblaje, puede influir en los tamaños genómicos y los procesos de anotación asociado con especies del género *Ganoderma* u otras especies de hongos (Quail *et al.*, 2012; Shokralla *et al.*, 2012; Kües *et al.*, 2015; Levy y Myers, 2016). Esto sobresale en los ensamblajes reportados para *G. boninense* (acceso a Genbank: GCA_002900995.1 y GCA_001855635.1), los cuales poseen tamaños genómicos que difieren en aproximadamente ~ 19 Mb, esto debido al uso de varias secuencias y técnicas de ensamblajes, sin considerar el origen de la cepa fúngica. El análisis filogenético de *Ganoderma* ha demostrado que las especies principales dentro del género son distantes, por ejemplo, *G. lucidum* y *G. australe*. Algunos estudios han demostrado que el análisis de *Ganoderma* tiene que ser útil en la determinación de si estas especies son estrechamente relacionados o son parientes lejanos (Kaliyaperumal y Kalaichelvan, 2008; Schoch *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2015; Badotti *et al.*, 2017). Jargalmaa *et al.* (2017) analizó diferentes relaciones entre *Ganoderma* sp., y encontró varios complejos dentro del género, que pueden explicar las variaciones genómicas. Estas representaciones dentro del género *Ganoderma* y el contenido genómico de la especie, ha demostrado que no todos tengan la misma historia, un hecho que puede conducir a la divergencia dentro de los géneros (Mount, 2013) y presentar diferencia del contenido genómico cuando es analizado (Mohanta y Bae, 2015).

Problemas en PCR y extracción de ADN en especímenes de *Ganoderma*

Existen reportes de trabajos con ADN donde se ha intentado analizar al género *Ganoderma*, tal es el caso del trabajo realizado por Yao *et al.* (2013), no pudieron obtener resultados positivos del ADN en el análisis del holotipo y paratipo de una muestra de *Ganoderma sichuanense*, nombre que los autores le dieron a ese espécimen, las muestras tipo son cruciales para la fijación de nombres, también encontraron en los aislados cepas novedosas como topotipos de los cuales lograron obtener datos de ADN y los consideraron como representantes de la especie. Concluyeron que al no poder amplificar el ADN de los tipos originales, que esto tiene las mismas implicaciones en análisis de ADN para otros organismos como las plantas y

los tipos de estos especímenes, que también han pasado por herbarios o colecciones. Yao *et al.* (2013) afirman que las amplificaciones de ADN la realizaron en repetidas ocasiones, pero no tuvieron éxito debido a la condición del material de estudio, los intentos de amplificar el holotipo fallaron debido a la calidad de ADN y los ensayos para amplificar fragmentos de ADN del holotipo, paratipo y de los especímenes auténticos de *G. sichuanense* con los cuales no tuvieron éxito, afirman que aparentemente, el ADN no ha estado bien conservado en estos especímenes en comparación con el de los topotipos de *G. sichuanense*, no proporcionaron datos de respaldo indicando que el ADN este dañado, como la presencia en geles, espectroscópicos, característica y curva de fusión del ADN. En general, en un futuro los investigadores no pueden usar los tipos para el análisis de ADN en nomenclatura si, el ADN está completamente degradado, tales aseveraciones deben hacerse con cautela y con evidencia que sustente tal hecho. Esto demuestra que se necesita un mayor esfuerzo para determinar la mejor manera de preservar las muestras de ADN para su posterior análisis. De hecho, no todo está perdido, ya que una PCR fallida, puede reflejar la inhibición del ADN polimerasa utilizada en la reacción, problemas con los reactivos y/o una falla térmica en el termociclador (Paterson, 2007). El problema puede no ser ADN degradado, en *Ganoderma* es bien conocido que produce metabolitos biológicamente activos y algunos de estos por ejemplo: cerebrósidos y terpenoides, son inhibidores del ADN polimerasa, ADN extraído con controles de amplificación interna (IAC) para evaluar estas posibilidades los IAC son ADN o cebadores adicionales agregados a los tubos de reacción que proporcionan otro amplicón, junto con el ADN objetivo, si todos las condiciones son favorables entonces es un problema con los reactivos para PCR, el termociclador y/o la inhibición de la polimerasa si no se produce el amplicón (Paterson, 2008; Yao *et al.*, 2013; Paterson, 2007). Por supuesto, una indicación crucial de que el ADN no está dañado en el análisis de Yao *et al.* (2013) y que las otras posibilidades ocurrieron debido a que amplificaron con éxito el holotipo y por lo tanto, es aceptable para su propósito previsto como una especie tipo, estos autores se refieren al espécimen como *Ganoderma lingzhi*, claramente separado de *G. sichuanense* (Yao *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015).

Con base en lo anterior, se estableció el siguiente objetivo: Identificar molecularmente esporomas de *Ganoderma* spp., asociados a raíces y troncos de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake.

II. Materiales y Métodos

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó de cada uno de los 30 esporomas obtenidos en campo con ayuda del protocolo CTAB -1 de Cenis, (1992); Osuji *et al.*, (2015), Buffer de extracción: GL (DEB-2 % CTAB) = 2 % (w / v). Este buffer de extracción contiene: Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, 2 % CTAB (w / v), 1% PVP (grado molecular, biología BDH), NaCl 1.4 M, 2 % (v / v) β- mercaptoetanol (BME) agregar antes de su uso. Posteriormente se agregaron 200 mg de tejido de *Ganoderma* seguido se transfirió a tubos eppendorf estériles de 2 ml, con la adición de 500ul de GL DEB-2% de buffer de extracción CTAB. Se mezcla bien y se incuba a 65 °C por 60 min (se agregaron 3 µl de proteinasa K a cada muestra) agitando a intervalos de 10 minutos, a continuación se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionó 500 µl de alcohol isoamílico y de cloroformo (CIA), se sacude fuertemente hasta homogeneizar y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante es transferido en nuevos tubos de microcentrífuga y se lavó con CIA dos veces más. Se agregaron 15 µl de acetato de potasio a 5 M y 500 µl y de isopropanol frío y se mezcló suavemente antes de incubar las muestras a -20 °C durante 60 min. A continuación se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se decantó el isopropanol con cuidado. La pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 70 % (v / v) esto se realizó tres veces y finalmente con etanol absoluto, posteriormente se recupera la pastilla por medio de centrifugado a 13,000 rpm, a continuación se secó al aire con cuidado. Las muestras de ADN extraídas finalmente se reconstituyen con 50 µl de agua ultra pura y se almacenará a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación y análisis de calidad del ADN

La calidad del producto de extracción se valoró en un gel de agarosa al 1 % teñido con Syber Green®, mediante electroforesis a 80 volts por 30 minutos y se observó en un transiluminador. La concentración y pureza se midieron con ayuda de un espectrofotómetro Smart Spec® de BioRad®. Figura 23

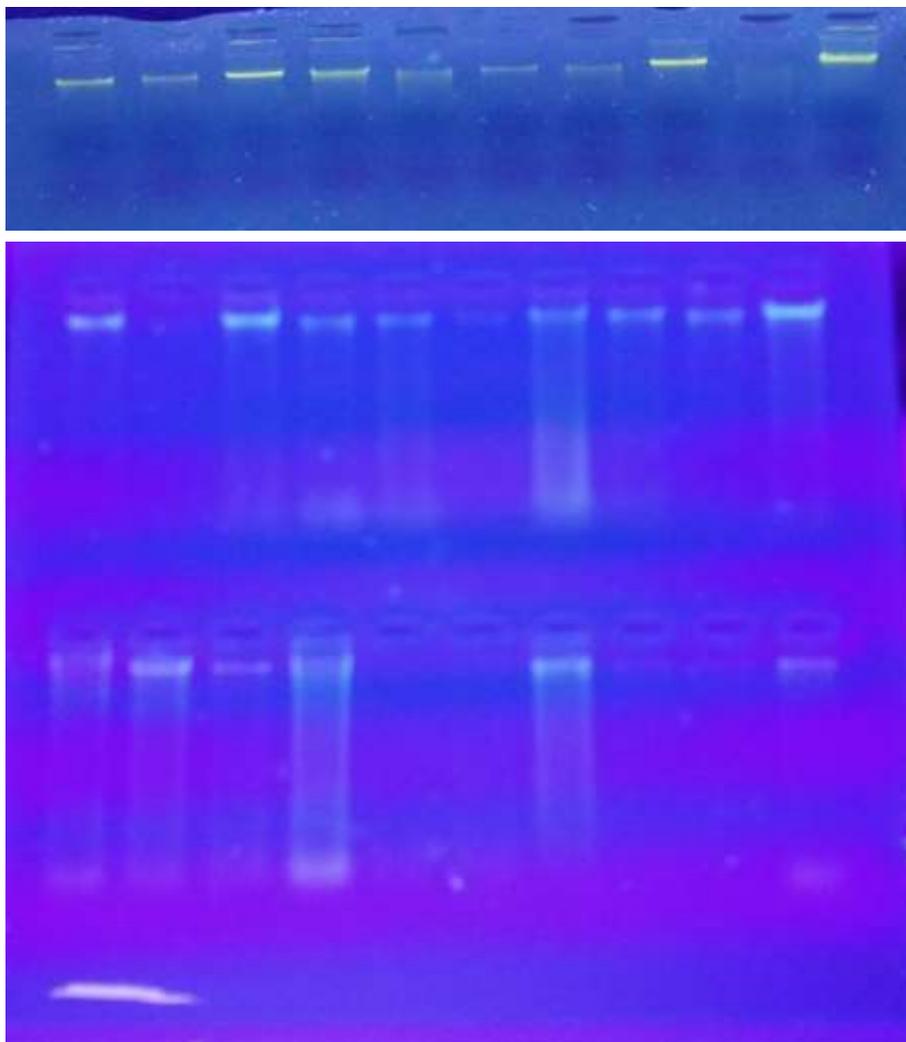


Figura 23. Gel de agarosa al 1 % para visualización de la integridad del DNA genómico extraído de esporomas de *Ganoderma* spp., obtenidas de árboles de *Persea americana* Mill var *drymifolia* con síntomas de la enfermedad.

Reacción en cadena de la polimerasa

El proceso de PCR múltiple se llevó a cabo con la utilización de primers específicos, Cuadro 3.

Cuadro 3. Primers utilizados para la identificación de especies de *Ganoderma* spp., asociadas a *Persea amerivana* Mill. var. *drymifolia*.

Primers	Secuencias (5'-3')	References
RPB2-5F	GAYGAYMGWGAT CAT TTYGG	(Liu <i>et al.</i> , 1999; Liu and Hall, 2004;
RPB2-7CR	CCCATRGCTTGY TTRCCC AT	Matheny, 2005; Reeb <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2004; Zhang and Blackwell, 2002)
EF-1α-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	(Baldauf and Palmer, 1993; O'Donnell
EF-1α-1567R	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	<i>et al.</i> , 2001; Rehner and Buckley, 2005; Roger <i>et al.</i> , 1999).

Las muestras de ADN genómico se amplificaron mediante PCR con los primers RPB2 y EF-1 α . Los perfiles térmicos de PCR para la región del gen RPB2 fueron: 95 ° C por 3 min, 34 ciclos a 94 ° C por 40 s, alineación de 56 ° C por 45 s, seguido de 72 ° C por 1 min y extensión final de 72 ° C por 10 min. (Liu *et al.*, 1999; Matheny 2005).

Los perfiles térmicos de PCR para el gen EF-1 α fueron las siguientes: 95 ° C por 3 min, 34 ciclos de 94 ° C por 40 s, 56 ° C por 45 s, seguido de 72 ° C por 1min y extensión final de 72 ° C por 10 min.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó para cada reacción final 20 μ l, Platinum Hot Start Master Mix® Thermo scientific® 1 μ l, iniciador Forward (ITS/RPB2/LSU/ EF-1 α) 10 μ l, iniciador (RPB2/ EF-1 α) reverse 1 μ l, Platinum G-C Enhancer 4 μ l, H₂O ultra pure RNAsa free ® 2 μ l y 1 μ l de ADN /100 ng/ μ l. (White *et al.*, 1990; Alabama, 1990; Gardes y Bruns 1993; Gardes *et al.*, 1993; Hibbett y Vilgalys, 1993; Guglielmo *et al.*, 2007; Guglielmo *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2012; Schoch *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2012; Lothamer *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Porrás-Alfaro *et al.*, 2014; Brown y Jumpponen, 2014; Badotti *et al.*, 2018; Cabarroi *et al.*, 2019).

Secuenciación

El producto de PCR se envió al laboratorio de Macrogen Inc. En Seúl, Corea del Sur, para su purificación y secuenciación. El cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se lleva a cabo con la ayuda de una enzima de nombre ExoASP-IT® (usb), el protocolo es el siguiente:

- a) Mezcle 5 µl de un producto de reacción post-PCR con 2 µl de ExoSAP-IT para una formar una combinación de ambas. El volumen de reacción final es de 7 µl. Nota: Al tratar volúmenes de producto de PCR superiores a 5 µl, simplemente aumente la cantidad de ExoSAP-IT proporcionalmente.
- b) Incubar a 37 ° C durante 15 min para degradar los cebadores y nucleótidos restantes.
- c) Incubar a 80 ° C durante 15 min para inactivar ExoSAP-IT.

El producto final es el resultado de los pasos anteriores.

Secuenciación estándar

La secuenciación estándar se lleva a cabo con ayuda de un Kit de secuenciación: el Kit de secuenciación de ciclos BigDye (R) Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y un Secuenciador: Analizador ABI PRISM 3730XL (tipo 96 capilares) para procesar las muestras.

Protocolo

- a) Los productos de PCR purificados se secuencian por Sanger con el terminador BigDye v3.1 kit de secuenciación y un secuenciador automático 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CALIFORNIA).
- b) Las secuencias de nucleótidos se determinan en ambas cadenas de amplificación por PCR. Los productos son de secuenciación de Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea).

Análisis filogenético

Las secuencias fueron editadas con el software MEGA v7.0.26 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0.26 for Bigger Datasets) (Kumar *et al.*, 2016; Tamura, 2015) y comparadas con secuencias del NCBI (National Center for Biotechnology International) por medio de análisis del software BLAST-N, y se bajaron las secuencias homologas y alinearon con programa MAFFT v7 versión en línea, se recortaron con el programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999), los arboles filogenéticos fueron construidos usando el método neighbour joining (NJ) y los modelos de sustitución para EF-1 α y RPB2: Tamura Ney (TN93+G) con base a los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud con el programa MEGA v7.0.26.

Las secuencias obtenidas se compararon en homología con las secuencias en el GenBank por medio de un análisis BLAST-N, de donde se obtuvieron las que presentaron mayor índice de sinapomorfias. A partir de las secuencias amplificadas se hizo la inferencia molecular por medio del método de distancia Neighbor Joining (NJ) y un bootstrap de 1000 réplicas en el programa MEGA v7.0.26.

Concatenado

Los arboles de distancia derivados de la combinación de secuencias parciales de los genes RPB2 y EF-1 α , obtenidas de las cepas del genero *Ganoderma*, se construyeron con el método Máxima verosimilitud y Máxima parsimonia y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 500 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente con la aplicación del algoritmo neighbor-join (NJ).

III. Resultados

Caracterización Molecular

El ADN genómico obtenido fue verificado en su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y estas muestras de ADN genómico se emplearon para amplificar por PCR las región RPB2, de igual manera para el gen EF-1 α . La amplificación se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con SyberGreen®, para cada uno de los genes, Figura 24.

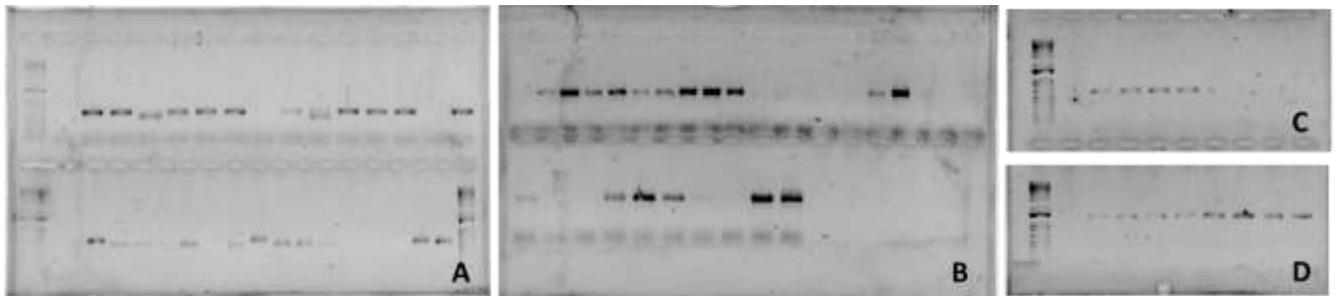


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con Syber Green, para visualizar los amplicones para A) RPB2; B) EF-1 α .; C) amplicones de ADN para RPB2, ampliaciones de ADN para EF-1 α

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se compararon en homología con las secuencias en el GenBank por medio de un análisis BLAST-N, de donde se obtuvieron las que presentaron mayor índice de similitud, así como aquellas que presentaron características morfológicas y con antecedentes relevantes para el estudio.

Factor de elongación (EF-1 α)

El análisis filogenético de la región codificante para EF-1 α se realizó con base en los caracteres de las secuencias y un modelo de sustitución Tamura-Nei (TN) el árbol producto del análisis de máxima verosimilitud y máxima parsimonia presentaron una resolución muy similar con 5 grupos monofiléticos. Los grupos fueron: *Ganoderma aspersum*, *Ganoderma australe*, *Ganoderma parvulum* y *Ganoderma curtisii*.y un grupo externo de una secuencia

proporcionada por el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH de *Trametes elengan*. Figuras 25 y 26.

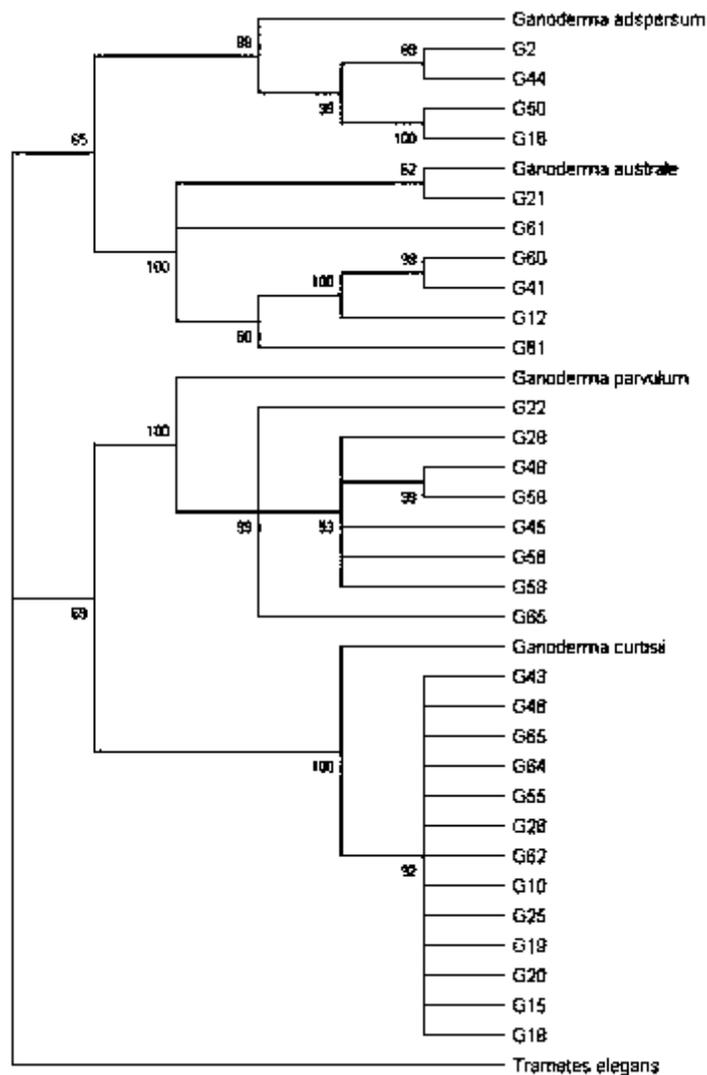


Figura 25. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero *Ganoderma* codificantes para EF-1 α , se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 500 repeticiones en bootstrap. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join (NJ).

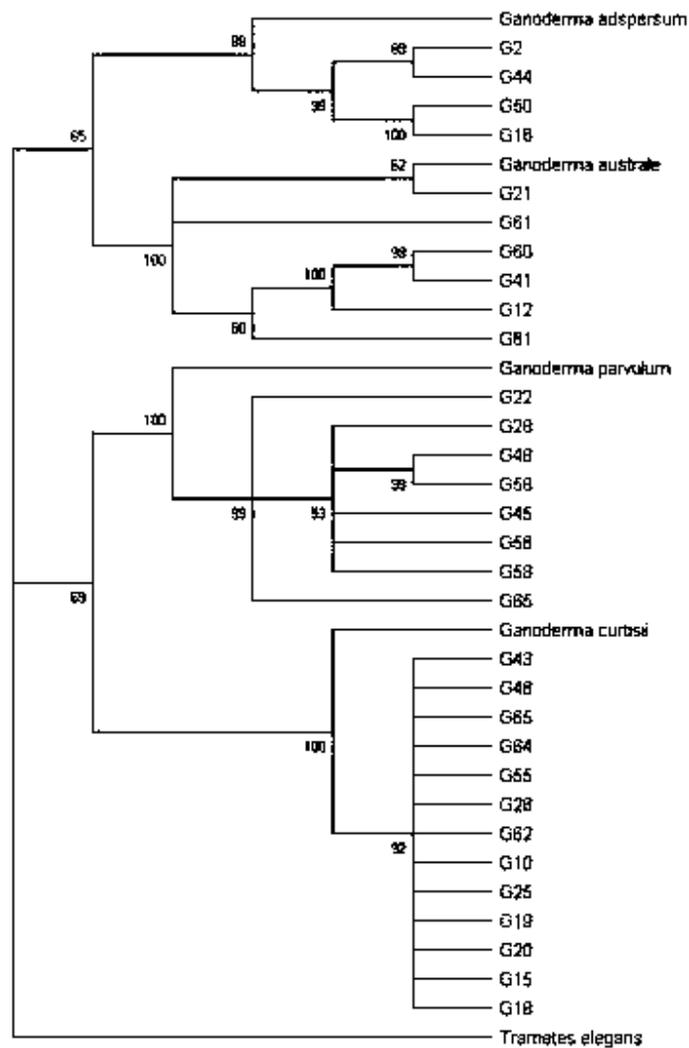


Figura 26. Árbol de Máxima Parsimonia de las secuencias del género *Ganoderma* para la región amplificada Efl-1 α . Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) con el nivel de búsqueda 1 mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Con 500 repeticiones bootstrap.

RPB2

El análisis filogenético de la región codificante para RPB2 se realizó con base a 412 caracteres y un modelo de sustitución Kimura (K2). Los árboles obtenidos del análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud fueron similares, presentan una resolución con tres grupos monofiléticos, Figuras 27 y 28.

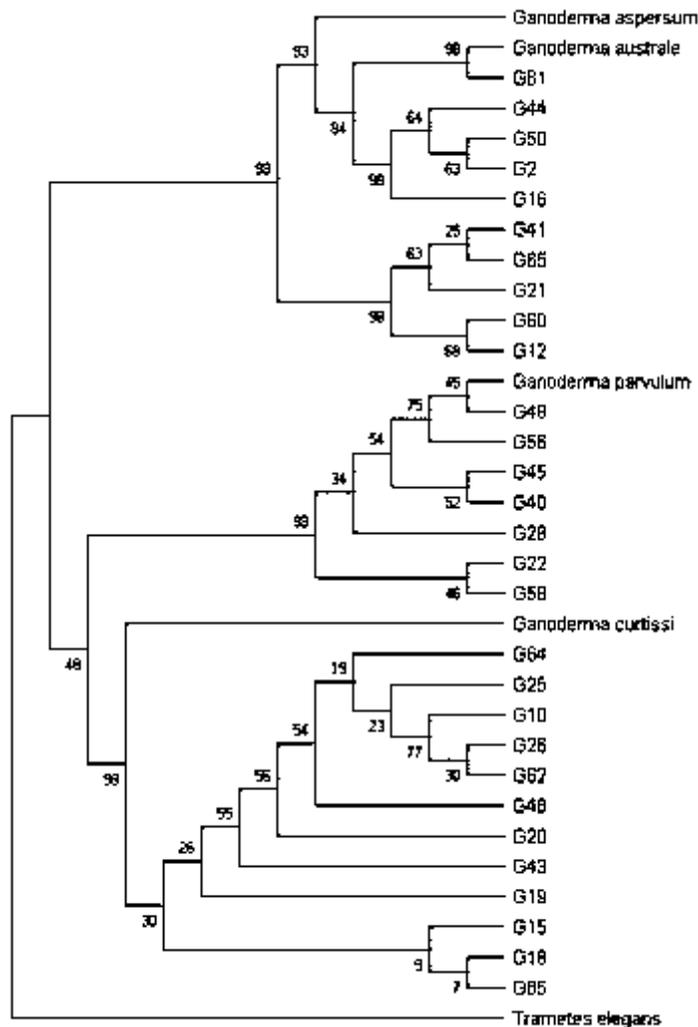


Figura 27. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del género *Ganoderma* codificantes para RPB2, se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 500 repeticiones en bootstrap. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join (NJ).

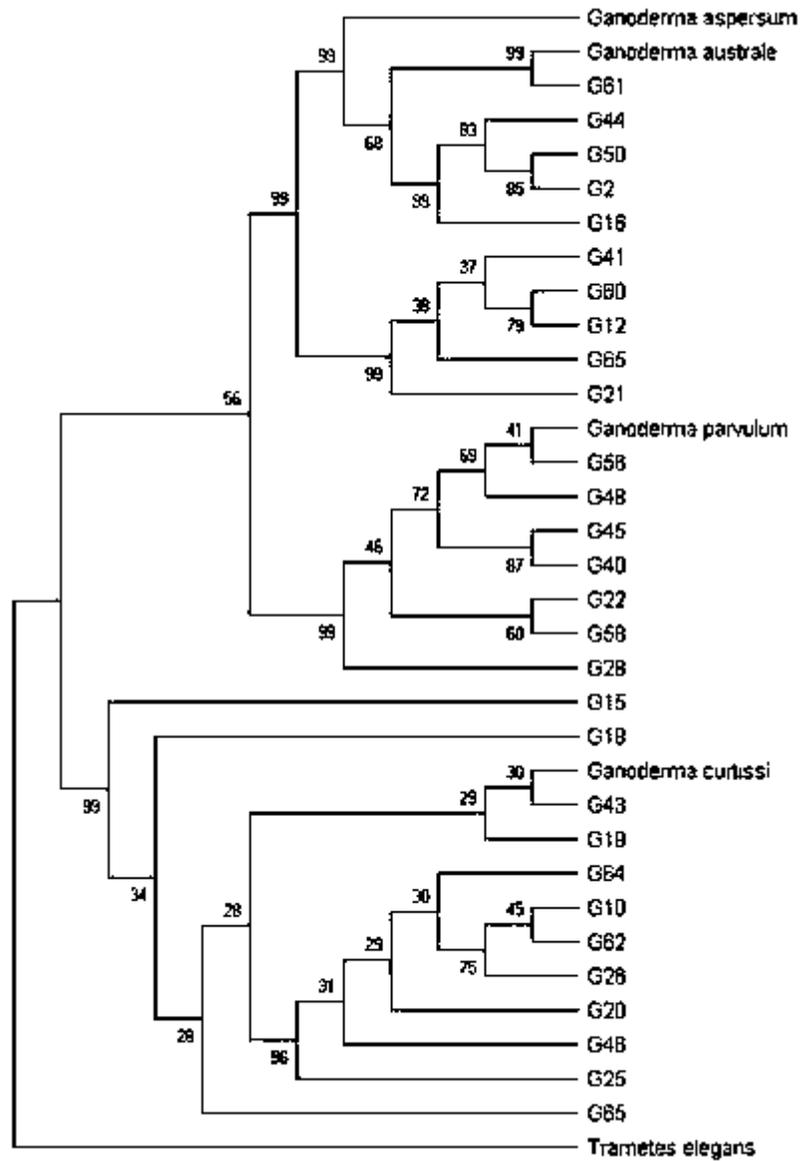


Figura 28. Árbol de Máxima Parsimonia de las secuencias del género *Ganoderma* para la región amplificada RPB2. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) con el nivel de búsqueda 1 mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Con 500 repeticiones bootstrap.

Arboles Concatenados con los primers RPB2 y EF-1 α

El análisis filogenético de arreglos concatenados a partir de secuencias de ADN de multilocus conservados RPB2 y EF-1 α se realizó con base a caracteres moleculares y un modelo de sustitución General Time Reversible (GTR), el árbol producto del análisis de máxima Verosimilitud presento una resolución de 5 grupos monofiléticos, de los cuales dos *Ganoderma curtisii* y *Ganoderma australe* agruparon la mayoría las cepas, y *Ganoderma adspersum* y *Ganoderma parvulum* no se alinearon con ningún cepa, y las cepas G60, G41, G12, G61 y G21 no se alinearon con ningún grupo monofilético, Figura 29.

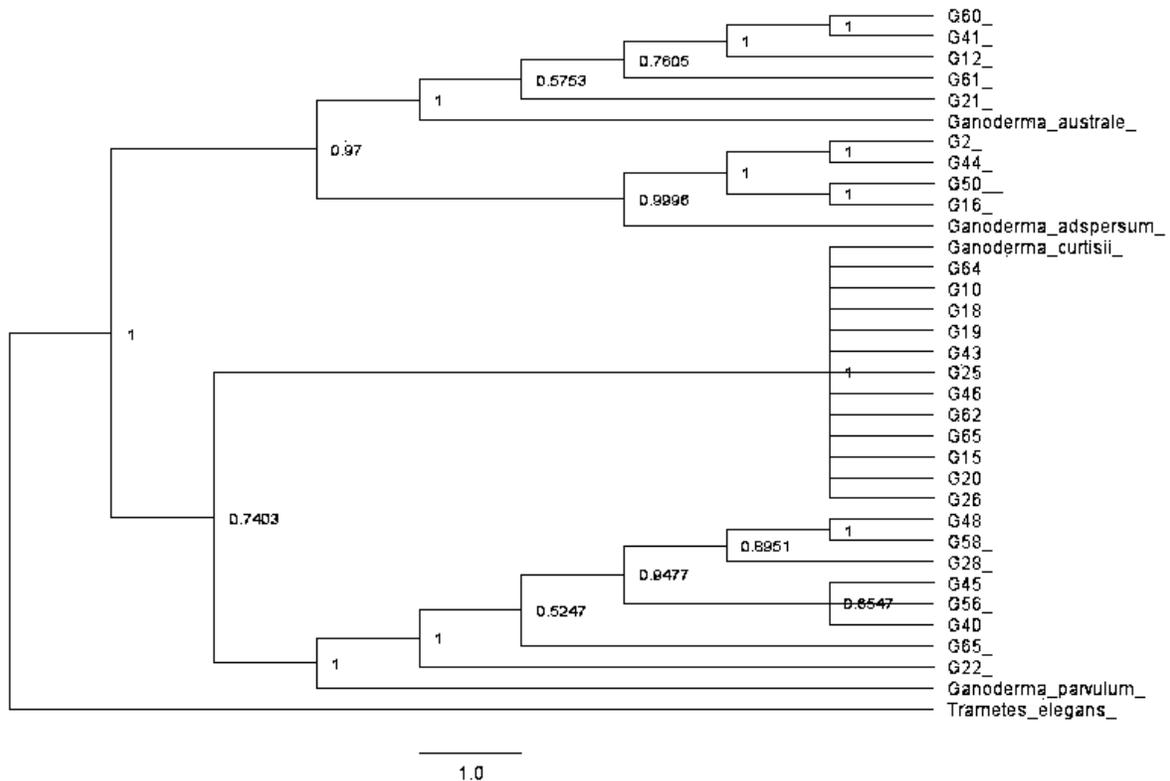


Figura 29. Árbol de Máxima Parsimonia de las secuencias concatenadas de los genes RPB2 y EF-1 α del género *Ganoderma*. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) con nivel de búsqueda 1 mediante la adicción aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Con 500 repeticiones bootstrap.

Discusión

Los datos que se generan de la secuencia de ADN proporcionan una identificación de especies más precisa (Cao *et al.*, 2012, Yang & Feng 2013, Pawlik *et al.*, 2015). Los análisis filogenéticos realizados por otros autores han demostrado que se ha producido una extensa convergencia o paralelismo de características morfológicas durante la evolución de *Ganoderma* (Hong y Jung 2004, Moncalvo 2005). Zheng *et al.* (2009) mencionan que *Ganoderma* posee una interhibridación específica y los antecedentes genéticos son relativamente poco claros y no se ha evaluado la distancia genética entre las especies de *Ganoderma*. Teng (1934), fue el primer autor en reportar al género *Ganoderma* por primera vez en China, posteriormente más investigadores estudiaron extensamente este género y se registraron alrededor de 100 especies (Zhao & Zhang 2000; Wu & Dai 2005; Cao *et al.*, 2012).

Para el caso de *Ganoderma sinense* fue descrito originalmente en China por Zhao *et al.* (1979), y se caracterizó por medio de técnicas morfológicas, por ello esta especie se ha confundido con *G. lucidum* (Curtis) P. Karst., *G. japonicum* (Fr.) y *G. orbiforme* (Fr.) pero investigaciones más recientes y con ayuda de técnicas moleculares las han distinguido como *G. sinense* lo que sustenta que las técnicas moleculares juegan un papel crucial para la identificación de especies (Pegler y Yao 1996; Wang *et al.*, 2014).

En la presente investigación los esporomas con los cuales se trabajó para la identificación molecular se observó una gran variabilidad de formas, texturas y coloraciones entre cada una de las muestras lo que confirma lo reportado por Aubin-Horth y Renn (2009), ellos mencionan la gran plasticidad fenotípica es el desarrollo de diferentes fenotipos de un solo genotipo, dependiendo del entorno de desarrollo de *Ganoderma*, lo que concuerda con lo obtenido en nuestra investigación ya que tenemos recolectas de diferentes zonas con diferentes características agroclimatológicas y en algunos casos resultaron ser la misma especie. Aubin-Horth y Renn (2009), sugieren que esta es una característica extensa de la vida que se observa en varios rasgos y a menudo se afirma que es el resultado de la selección natural, la plasticidad fenotípica incluye una perspectiva ecológica y evolutiva, sin embargo, el desarrollo reciente en la tecnología de expresión génica a gran escala hace que sea factible estudiar la plasticidad desde una perspectiva molecular. Sin embargo, la plasticidad fenotípica en hongos

macroscópicos ha sido poco estudiada y solo se han descrito aspectos generales (Ramírez-López *et al.*, 2013). Se ha insistido en reportes sobre el desarrollo de los esporomas que está influenciado por la interacción de factores intrínsecos (genéticos y fisiológicos) y extrínsecos (ambientales) (Moore-Landecker 1996; Moore *et al.*, 2008, 2011).

En general, se puede corroborar que la taxonomía de *Ganoderma* es incierta debido a la alta plasticidad fenotípica de los esporomas a nivel macroscópico y la uniformidad de características microscópicas de acuerdo con Sankaran *et al.* (2005), esto por la comparación de los resultados obtenidos en la presente investigación ya que se identificó a *G. adspersum*, *G. parvulum*, *G. australe* y *G. curtisii* en contraste con las especies identificadas por su morfología presentada en las muestras. Tal es el caso de lo reportado Gottlieb y Wright (1999) mencionan alta plasticidad fenotípica en características micro y macroscópicas en la morfología de especies sudamericanas de *Ganoderma*. Wu y Dai (2005) reportan que la morfología de las especies de *Ganoderma* varía mucho debido a la influencia del clima, la nutrición, la vegetación y el entorno geográfico y no está asociada con el material genético de una especie en particular pero si del mismo género. Por lo que en este estudio encontramos similitudes a lo reportado por estos autores, además de los aportes de Wu y Dai (2005), basados en una fuerte evidencia molecular, describieron 20 especímenes de *G. sinense* que tienen diferentes características macromorfológicas entre sí basados en análisis combinados con los primers LSU, SSU, RPB2 y EF1 α , estos últimos concuerdan con los utilizados en el presente trabajo.

La especie de *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., esta reportada como degradador de madera y se asocia a las raíces y tronco de *A. mangium* en Sumatra (Glen *et al.*, 2009); Pege *et al.* (2017) rechazan la sinonimia propuesta por Wang *et al.* (2014) para *G. mastoporum* y *G. orbiforme* incluso como sus propios datos muestran una alta variación de las secuencias de ADN entre *G. boninense* / *orbiforme* y *G. mastoporum* / *G. cupreum* en la palma aceitera. *Ganoderma australe* no es la excepción dentro del género *Ganoderma* ya que representa un complejo de especies diverso que se extiende a través del hemisferio norte como en el sur (Moncalvo y Buchanan 2008). Ryvardeen (2004), menciona que *G. parvulum* es neotropical. Mientras que Torres *et al.* (2012) y Gomes-Silva *et al.* (2011) Reportan registros de *G. parvulum* en Brasil, Belice, Bolivia, Surinam, Nicaragua, Costa Rica, Perú y Venezuela pero no en México. Sin

embargo, en la base de datos GenBank solo existen registros de muestras de Brasil y Guyana Francesa, por lo que sería necesario obtener datos para otras regiones geográficas y de los países donde han sido reportadas para poderlas comparar entre sí. *G. adspersum* se ha registrado casi exclusivamente en maderas duras (Nicolotti *et al.*, 1992; Gottlieb *et al.*, 1998; Schwarze y Ferner, 2003; Bernicchia, 2005; Lasserre *et al.*, 2010). De acuerdo con lo reportado anteriormente Schwarze y Ferner, (2003), mencionan en su investigación que *Ganoderma adspersum* puede penetrar zonas de tejido intactas ósea tejido sano de madera, como consecuencia también se puede confundir con *Ganoderma applanatum* de la cual solo se sabe que descompone maderas muertas, por ello la identificación correcta del agente causal es importante para una evaluación confiable de los riesgos potenciales que causan las infecciones en árboles. Esta tarea no es fácil, al tratar de distinguir no solo a *G. adspersum* entre las demás especies, sino en general en todos los miembros del género *Ganoderma* con base de los caracteres morfológicos como esporomas o cultivos miceliales, etc., porque puede llegar a una confusión inmensa (Peterson, 1987; Leonard, 1998; Moncalvo, 2000; Terho *et al.*, 2007; Kaliyaperumal y Pudupalayam, 2008). Por lo tanto, los métodos moleculares son útiles para separar especies de *Ganoderma* (Moncalvo, 2000; Guglielmo *et al.*, 2008) como se muestra en la presente investigación.

IV. Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos en la identificación molecular de las 30 muestras de *Ganoderma* spp se concluyó lo siguiente:

Se identificaron cuatro especies pertenecientes al género *Ganoderma*: *G. australe*, *G. curtisii*, *G. parvulum* y *G. adspersum*.

El iniciador de codifica para RPB2, presento una resolución superior al iniciador EF-1 α , entre las especies de *Ganoderma*.

En el árbol concatenado solamente se alinearon las especies *G. australe*, *G. curtisii*, sin embargo las especies *G. parvulum* y *G. adspersum* no se alinearon con ninguna cepa.

V. Bibliografía

Agudelo V. D., Uribe Echeverry P. T., Betancur Pérez J. F. 2019. De novo assembly and annotation of the *Ganoderma australe* genome. Genomic. doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.008

Badotti F., De Oliveira F.S., Garcia C.F., Vaz A.B.M., Fonseca P.L.C... Nahum L.A ... Góes-Neto A. 2017. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi), BMC Microbiol. 17 (1) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>.

Badotti, F. Camargos, P. L. Ribeiro, L. T. Trindade, D. 2018. ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. Brazilian Journal of Botany. 1-9 pp.

Baldauf, S.L., Palmer, J.D., 1993. Animals and fungi are each others closest relatives—congruent evidence from multiple proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11558–11562.

Bernicchia A., 2005. Polyporaceae s.l. Edizioni Candusso, Savona, Italy, 808 Pp.

Bridge P. D., Roberts P. J., Spooner B. M., Panchal G. 2003. On the unreliability of published DNA sequences. New Phytologist 160:4348 DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00861.x.

Brown, S. P., Jumpponen, A. 2014. Contrasting primary successional trajectories of fungi and bacteria in retreating glacier soils. Molecular Ecology 23: 481-197.

Cao, Y., Wu, S.H., Dai, Y.C., 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom Lingzhi. Fungal Divers. 56, 49–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0178-5>.

Cenis J.L., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acid Research 20, 23–80 Pp.

Chen, S., Xu J., Liu C., Zhu Y., Nelson D.R., Zhou S., Sun C. (2012). Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, Nat. Commun 913–919, <https://doi.org/10.1038/ncomms1923>.

Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids. Research* 32:1792–1797.

Gardes M., Bruns T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>

Glen M, Bougher NL, Francis AA, Nigg SQ, Lee SS, Irianto R, Barry KM, Beadle CL, Mohammed CL. 2009. *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australas Plant Pathol* 38(4):345–356. <https://doi.org/10.1071/AP09008>

Gomes-Silva, A., Ryvardeen, L. y Baptista, T. 2011. New records of Ganodermataceae (Basidiomycota) from Brazil. *Nova Hedwigia* 92 (1–2): 83–94 Pp.

Gottlieb A.M., B.O Saidman and J.E. Wright, 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* 102, 415–426 Pp.

Gottlieb AM, Ferrer E, Wright JE. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104:1033–1045.

Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.

Hibbett, D.S., 1996. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 13, 903–917.

Hibbett, D.S., Gilbert, L.B., Donoghue, M.J., 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407,506–508.

Jargalmaa S., Eimes J.A., Park M.S., Park J.Y., Oh S.Y., Lim Y.W. 2017. Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation, *Peer J.* 5 e 3596, <https://doi.org/10.7717/peerj.3596>.

Jung P. E., Fong J. J., Park M. S., Oh S. Y., Kim C., Lim Y. W. 2014. Sequence validation for the identification of the white-rot fungi *Bjerkandera* in public sequence databases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1301-1307 DOI 10.4014/jmb.1404.04021.

Kaliyaperumal M. and T.K. Pudupalayam, 2008. *Ganoderma australe* from southern India. *Microbiological Research* 163, 286–292.

Kaliyaperumal M., Kalaichelvan P.T. 2008. *Ganoderma australe* from southern India, Microbiol. Res. 163 (3) 286–292, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.003>.

Kües U, Nelson D.R., Liu C., Yu G.J., Zhang J., Li J., ... Sun H. 2015. Genome analysis of medicinal *Ganoderma* spp. with plant-pathogenic and saprotrophic life-styles, Phytochemistry 114 18–37, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.019>.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignments. Brief Bioinform. 5, 150–163.

Lasserre B., E. Motta, L. D’Amico, M. Scirè and M. Marchetti, 2010. Utilizzo del Resistograph® per l’individuazione di diverse tipologie di alterazione del fusto di abete bianco in Alto Molise. Forest@ 7, 190-198 [online: 2010-10-13] URL: <http://www.sisef.it/forest@/?doi=10.3832/efor0638-007>

Leonard A.C., 1998. Two *Ganoderma* species compared. Mycologist 12, 65–68 Pp.

Levy S.E y Myers R.M. 2016. Advancements in next-generation sequencing, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 17 (1) (2016) 95–115, <https://doi.org/10.1146/annurevgenom-083115-022413>.

Liu D., Gong J., Dai W., Kang X., Huang Z., Zhang H.M., ... Xiong X. 2012. The genome of *Ganoderma lucidum* provide insights into triterpene biosynthesis and wood degradation, PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036146>.

Liu Y. J., Whelen S, Hall B. D. (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Molecular Biology and Evolution 16: 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>

Matheny P. B. (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe, Agaricales). Molecular Phylogenetics and Evolution 35: 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.11.014>

Moncalvo J. M., Wang H. F., Wang H.H., Hseu R. S., 1994. The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM, eds. Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology. Vancouver: International Mycological Congress, 31-44.

Moncalvo J.M., 2000. Systematic of *Ganoderma*. In: *Ganoderma* Disease of Perennial Crops. (J. Flood, P.D. Bridge, M. Holderness, ed.), CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 23–45 Pp.

Moore D, Robson GD, Trinci APJ 2011. 21st century guidebook to fungi. New York: Cambridge University Press. 639 p.

Mount David W. 2013. Bioinformatics, sequence and genome analysis. *Inf. Model.* 53 (9) 1689–1699, <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Nicolotti G., M. Negri and N. Anselmi, 1992. Incidence and biology of *Ganoderma* species causing decline of trees in northern Italy. *Petria* 2, 159–170 Pp.

Nilsson R. H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K. H., Kõljalg U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLOS ONE* 1:e59 DOI 10.1371/journal.pone.0000059.

Nilsson, R. H. Tedersoo, L. Abarenkov, K. Ryberg, M. Kristiansson, E. Hartmann, M. Schoch, C. L. Mylander, J. A. A. Bergsten, J. Porter, T. M. Jumpponen, A. Vaishampayan, P. Ovaskainen O. Hallenberg, N. Bengtsson-Palme, J. Eriksson, K. M. Larsson, K. H. Larsson, E. Kõljalg, U. 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys* 4: 37-63.

O'Donnell, K.L., Ward, T.J., Lutzoni, F., Benny, G.L., 2001. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* 93, 286–296.

Osuji C., Mowobi G. G., Abubakar S., Nweke O. 2015. Extraction of Good Quality Genomic DNA from Dry woody Mushroom Samples for Molecular Analysis: A Case Study of *Ganoderma lucidum*. *Translational Medicine and Biotechnology. Bi-Monthly, Volume-03, Issue05.* <https://www.researchgate.net/publication/334634945>.

Page D. E., Glen M., Puspitasari D., Rimbawanto A. D. y Mohammed C. 2017. Sexuality and mating types of *Ganoderma philippii*, *Ganoderma mastoporum* and *Ganoderma australe*, three basidiomycete fungi with contrasting ecological roles in south-east Asian pulpwood plantations. *Australasian Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0531-y>

Paterson, R.R.M., 2007. Internal amplification controls have not been employed in diagnostic fungal PCR hence potential false negative results. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1–10 Pp.

Paterson, R.R.M., 2008. Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR. *Curr. Enzyme Inhib.* 4, 46–59 Pp.

Peterson J.E., 1987. *Ganoderma* in Northern Europe. *Mycologist* 1, 62–67 Pp.

Quail M., Smith M.E., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., ... Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers, *BMC Genomics* 13 (1) (2012) 341, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>.

Rehner, S.A., Buckley, E., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97, 84–98.

Richter C, Wittstein K, Kirk P, Stadler M, 2015. An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity* 71: 1–15.

Roger, A.J., Sandbloom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H., 1999. An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16, 218–233.

Ryvarden L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. Oslo: Fungiflora.

Schoch C. L, Seifert K., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Fungal Barcoding Consortium. 109:6241-6246. DOI 10.1073/pnas.1117018109.

Schwarze F.W.M.R. and D. Ferner, 2003. *Ganoderma* on trees - Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal* 27, 59–77 Pp.

Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research, *Mol. Ecol* 1794–1805, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver-sion 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.

Terho M., J. Hantula and A.M. Hallaksela, 2007. Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki city. *Forest Pathology* 37, 420–432 Pp.

Torres, M., Guzmán, L. y Gugliota, A. 2012. *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon* 121: 93–132.

Vilgalys R. 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 160:4-5 DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00894.x.

Wang, Z., Binder, M., Dai, Y.C., Hibbett, D.S., 2004. Phylogenetic relationships of *Sparassis* inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA and RNA polymerase sequences. *Mycologia* 96, 1015–1029

Weber, C. F. Vilgalys, R. Kuske, C. R. 2013. Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization varies with soil horizon. *Frontiers in Microbiology* 4: 78 doi: 10.3389/fmicb.2013.00078.

White, T. J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

Yao, Y.J., Wang, X.C., Wang, B., 2013. Epitypification of *Ganoderma sichuanense* J.D. Zhao & X.Q. Zhang (Ganodermataceae). *Taxon* 62, 1025–1031. <http://dx.doi.org/10.12705/625.10>.

Zhang, N., Blackwell, M., 2002. Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycol. Res.* 106, 148–155.

Zhou, L.-W., Cao, Y., Wu, S.-H., Vlasák, J., Li, D.-W., Li, M.-J., and Dai, Y.-C. 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114:7-15.

Zhu Y., Xu J., Sun C., Zhou S., Xu H., Nelson D.R., Chen S. 2015. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*, *Sci. Rep.* 5 (May), 1–14, <https://doi.org/10.1038/srep11087>.