



No. 13-036699-00000-0000

Fecha: 2013-02-22 16:40:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: PROCESO PARA POTENCIAR LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS
DE GANODERMA LUCIDUM Y SU ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.

SOLICITANTE: UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA (UDEA) / ASOCIACION DE
BANANEROS DE COLOMBIA (AUGURA).

DIRECCION: Calle 67 No. 53-108 y Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9 Medellín –
Colombia.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 Febrero de 2013

P2013/000041



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

P2013/000041

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA (UDEA) /
ASOCIACIÓN DE BANANEROS DE COLOMBIA (AUGURA)

Dirección: Calle 67 No. 53-108 y Calle 3 Sur No. 41-
65. Piso 9 Medellín - Colombia.

Nacionalidad o Domicilio: Colombia

Lugar de Constitución: Colombia

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☒

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 890980040-8
890900746-7

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: (1) John Jairo Mira Castillo; (2) Paola Andrea Zapata Ocampo;
(3) Lucía Atehortúa Garcés; (4) Liuda Johana Sepúlveda Arango; (5) Diego
Fernando Rojas Vahos.

Dirección: (1) Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9; (2), (3), (4) y (5) carrera 53 No. 61-30

Nacionalidad o Domicilio: Medellín -Colombia

5

Título (54) PROCESO PARA POTENCIAR LA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS
DE GANODERMA LUCIDUM Y SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

6

Clasificación Internacional (51) _____

7

Prioridad

SI ☐ NO ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ otro ☐ cual _____

9

Comprobante de pago No. 13- Fecha _____

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de 10 Reivindicaciones.

☐

Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. Adjunto copia simple.

☐

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.

☐

Certificado de la fecha de presentación de la solicitud prioridad expedida por la autoridad correspondiente y una copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.

☐

Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Resumen.

☒

Descripción de la invención.

☒

Una o más reivindicaciones.

☐

Dibujos y/o planos necesarios.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

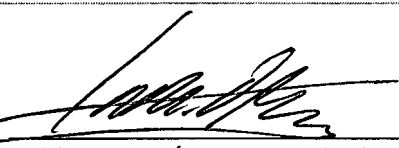
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

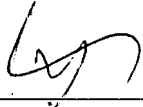
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0018359
		Bogotá D.C., Febrero 22 de 2013 - 16:35:24

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS					NI 830.122.870
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	6063	21/01/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	6064	21/01/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	13834	12/02/2013		320.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-036699- -00000-0000

Fecha: 2013-02-22 16:40:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-36699-0		
2	1		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Anecon 1 CD

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ASSIGNMENT

CESION

Lucía Atehortúa Garcés
Paola Andrea Zapata Ocampo
Liuda Johana Sepúlveda Arango
Diego Fernando Rojas Vahos

by means of this document assign(s) worldwide,
to

por medio de la presente cedo(cedemos)
a nivel mundial, a

Universidad de Antioquia

a University organized under a special
autonomous legal regulation and the laws of

un ente universitario autónomo con régimen
especial, organizado bajo las leyes de

Colombia,

domiciled in

domiciliada en

Calle 67 No. 53 – 108, Bloque 16, Oficina 104, Medellín (Colombia)

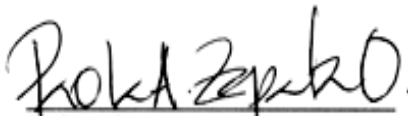
(hereinafter referred to as the "ASSIGNEE"),
all my (our) rights, including those of priority,
title and interest in and to my (our) invention for
a new and useful improvement entitled and as
fully set forth and described in:

(de ahora en adelante el "CESIONARIO"),
todos mis (nuestros) derechos, incluyendo los de
prioridad, título e interés sobre mi (nuestra)
invención tal como describe en:

**Proceso para potenciar la producción de sustancias de *Ganoderma*
lucidum y su actividad antifúngica**

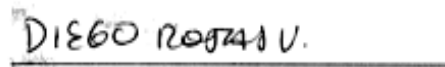
Done and signed in Medellín, on the 20th day of
February 2013

Dado y firmado en Medellín, el 20 de febrero de
2013


Paola Andrea Zapata Ocampo
C.C. 43.840.804 de Itagüí


Lucía Atehortúa Garcés
C.C. 32.450.553 de Medellín


Liuda Johana Sepúlveda Arango
C.C. 48.975.143 de Medellín


Diego Fernando Rojas Vahos
C.C. 15.385.665 de La Ceja

Proceso para potenciar la producción de sustancias de *Ganoderma lucidum* y su actividad antifúngica

1. Campo de la Invención

5

La presente invención se refiere a un nuevo proceso para potenciar la producción de sustancias con actividad antifúngica obtenidas a partir de *Ganoderma lucidum*, composiciones que contienen dichas sustancias antifúngicas y su uso como inhibidores del crecimiento micelial y germinación de ascosporas de hongos, entre ellos los de *Mycosphaerella fijiensis*.

10

1.1 Estado de la Técnica

El documento US2008/138875 describe un método para incrementar la producción de biomasa de microorganismos, entre ellos *Ganoderma lucidum* a partir del micelio a muy bajo costo. El proceso se lleva a cabo en un sistema cerrado que comprende una fuente de luz que emite diferentes longitudes de onda para obtener un incremento en la biomasa, sin embargo no se menciona un aumento en los metabolitos primarios y/o secundarios, ni tampoco actividad antifúngica.

20

La publicación “Efecto de los campos eléctricos sobre la producción de biomasa micelial del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*” (*Actual Biol* 2010. 32 (92): p. 5-17) evalúa el efecto de campos eléctricos, tales como corriente alterna, corriente continua, corriente pulsada e intensidad del campo, sobre el crecimiento del hongo *Ganoderma lucidum* bajo condiciones de cultivo sumergido, con el objetivo de optimizar su producción de biomasa.

25

La publicación “Production of Biomass, Polysaccharides, and Ganoderic Acid using Non-conventional Carbon Sources under Submerged Culture of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*” (*International Journal of Medicinal Mushrooms* 2012. Vol.14. I. 2 p. 197-203), menciona el efecto de las diferentes fuentes de carbono no convencionales en el cultivo de *Ganoderma lucidum*, para la producción simultánea de

30

biomasa micelial, ácidos ganodéricos y polisacáridos, utilizando las fuentes no convencionales de carbono para minimizar los altos costos de los medios de cultivo actuales. La publicación no revela un proceso para aumentar la obtención de extractos o metabolitos de *Ganoderma lucidum* ni su actividad antifúngica.

5

2. Descripción

El control biológico estricto se define como el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas y enfermedades y es uno de los métodos más utilizados para
10 contrarrestar el uso de agroquímicos. En los últimos años, se han utilizado como alternativa eficaz, los compuestos naturales obtenidos a partir de microorganismos y plantas, los cuales tienen ventajas sobre los productos químicos comerciales, por ser menos nocivos, tanto al ecosistema como a la población mundial y porque la propia microflora los biodegrada *in situ*.

15

Las amplias propiedades medicinales de *Ganoderma lucidum*, han despertado últimamente un creciente interés de todas las áreas a estudiar sus metabolitos y actividades biológicas. Entre los compuestos activos, reportados para este hongo se encuentran los polisacáridos tipo β -D-glucano, triterpenoides tipo lanostanos conocidos como ácidos ganodéricos,
20 proteínas y péptidos (1-4).

El hongo *Ganoderma lucidum*, es ampliamente reconocido por sus efectos benéficos en el hombre, no obstante, posee otras propiedades como es su capacidad para inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Physalospora piricola*, lo cual representa una alternativa interesante para el desarrollo de
25 productos para biocontrol (5, 6).

La Sigatoka negra o la raya negra del banano, es una enfermedad causada por el hongo Ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* (M. Morelet) forma sexual, heterotálica que en su estado anamórfico es *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton (7). Este hongo es un haploide hemibiotrófico, que se encuentra clasificado dentro de la clase
30 Dothideomycetes, orden Capnodiales y familia Mycosphaerellaceae. *Mycosphaerella*

fijiensis (y su anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*), es considerada la especie más devastadora del complejo llamado ‘*Sigatoka disease complex*’ (8).

Los primeros síntomas de la enfermedad son numerosos y al examinar las hojas en los diferentes estadios y compararlo con una hoja sana es posible observar el daño o deterioro
5 acumulado de los tejidos, observando que el cambio inicial se da alrededor del espacio aerífero y se va extendiendo hacia las células parenquimáticas y haces vasculares, finalmente el tejido en empalizada se degrada y toda la conformación estructural de la hoja se pierde (9).

El hongo *Mycosphaerella fijiensis*, llega a la hoja en ascosporas o conidias y luego
10 comienzan germinar hacia los estomas, los cuales son invadidos por el micelio hasta taparlos totalmente con las diferentes estructuras del hongo (9). En la hoja de la planta aparecen puntos pardos de 1 mm de diámetro los cuales se van desarrollando hasta finas rayas de color pardo rojizo de 2 a 3 cm de largo, visibles en el haz de la hoja, luego las manchas se unen y oscurecen hasta un color negro. Finalmente, las zonas muertas y negras
15 se secan y adquieren un color más pálido. Las hojas afectadas pueden morir en tres o cuatro semanas y el resultado es una defoliación rápida y severa (9).

El control y manejo de la enfermedad se encuentra enmarcado básicamente en prácticas culturales de deshoja, deshije, despunte y la aplicación intensiva de fungicidas químicos, entre ellos, inhibidores de la demetilación (DMIs), las aminas, los inhibidores de Qo
20 (QoIs), las anilino pirimidinas (APs), los benzimidazoles (BCMs), los fungicidas SDHI y las guanidinas especialmente en cultivos tecnificados. A pesar de los esfuerzos, el control de la enfermedad se hace cada vez más difícil, dada la capacidad del hongo de crecer y adaptarse exitosamente a las condiciones ecosistémicas de las zonas bananeras, haciendo más difícil la erradicación de la enfermedad.

25 Existe la necesidad de encontrar agentes y sustancias activas para el control biológico con diversidad de mecanismos antagónicos frente al patógeno, con los cuales sea viable realizar formulaciones comerciales para control de la enfermedad, y poder atacar desde diferentes frentes el agente patógeno.

Es bien sabido que gran parte de las sustancias o metabolitos obtenidos actualmente para procesos de control biológico, se obtienen a partir de cuerpos fructíferos (cultivo tradicional), y a escala de laboratorio, en donde en ocasiones no se tienen medios de cultivo optimizados para la producción de biomasa y bioactivos.

- 5 Con el objetivo de encontrar una nueva alternativa para el manejo de la sigatoka negra, mediante la implementación de técnicas de Control Biológico, obtención de extractos activos, los inventores desarrollaron un proceso optimizado para aumentar la producción de biomasa de *Ganoderma lucidum* y de sus sustancias activas antifúngicas como inhibidoras del crecimiento micelial y de la germinación de ascosporas de hongos, entre ellos,
10 *Mycosphaerella fijiensis*.

De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un proceso que comprende inicialmente una etapa de obtención *Ganoderma lucidum* en un medio de cultivo adecuado y condiciones ambientales específicas que generan un inesperado incremento en la producción de la biomasa en un menor tiempo.

- 15 Seguido del proceso de obtención se lleva a cabo una etapa de lisis celular para la extracción de los compuestos activos con el que se aumenta la concentración final de sustancias activas totales. Los extractos proteicos obtenidos mediante el proceso, fueron evaluados sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*, encontrando de manera inesperada, un efecto detrimental del fitopatógeno cuando
20 se potencia mediante el proceso de la invención.

- En otro aspecto, la presente invención implementa el uso de un dispositivo tecnológico para la expresión diferencial, cualitativa y cuantitativa de proteínas y de otras moléculas bioactivas de *Ganoderma lucidum*, seleccionadas del grupo que consiste en polisacáridos, triterpenoides, ácidos grasos y ácidos ganodéricos. La invención proporciona un aumento
25 inesperado en la producción de polisacáridos (intra y ex polisacáridos), triterpenoides, ácidos grasos y ácidos ganodéricos.

En aspecto adicional, la presente invención proporciona un extracto proteico, un extracto etanólico y un extracto rico en triterpenoides y ácidos grasos de *Ganoderma lucidum* que exhiben actividad antifúngica contra hongos, entre ellos, *Mycosphaerella fijiensis*. El extracto proteico comprende al menos una familia de proteínas del grupo de proteasas, peroxidasas, nucleasas, lacasas, inmunomonucleasas, fosfatasas, deshidrogenasas, sintasas, oxidasas, polimerasas y desmetilasas que exhiben inhibición sustancial contra *Mycosphaerella fijiensis*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación que comprende el extracto etanólico, el extracto rico en triterpenoides y ácidos grasos y el extracto proteico, o una o más proteínas del extracto proteico de *Ganoderma lucidum*, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de *Ganoderma lucidum* como hongo antagonista de crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso del extracto proteico y/o el extracto etanólico y/o el extracto rico en triterpenoides y ácidos grasos de *Ganoderma lucidum* para la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las ascosporas de patógenos, entre ellos *Mycosphaerella fijiensis*, en cultivos agrícolas convencionales y no convencionales.

3. Descripción detallada

3.1 Mantenimiento de la cepa de *Ganoderma lucidum* y conservación en caja de petri

La cepa de *Ganoderma lucidum* (donada por el Dr. ST. Chang al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Antioquia) fue mantenida en un medio de agar papa dextrosa (PDA) a 4°C (cepas de trabajo, primer repique de una cepa madre del laboratorio) (10–12).

Luego, cuadros de 1 cm de medio de cultivo y micelio, fueron transferidos a cajas de petri con medio MGL1 sólido, compuesto en (g/L): Harina de cebada 30,0g; extracto de levadura 3,0g; sacarosa 5,3g y agar-agar 8,0, ajustado a un pH $5,5 \pm 0,1$ (11, 12).

5 **3.2 Obtención de biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* bajo condiciones de cultivo sumergido utilizando diferentes sistemas de iluminación basado en LEDs.**

Discos de 1 cm de diámetro de micelio y agar fueron inoculados en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo, compuesto por MGL1 líquido: NaNO_3 80mg/L; KH_2PO_4 30mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg/L; KCl 10mg/L suplementado con 50g/L de harina de cebada a un pH $5,5 \pm 0,1$ (11, 12). Los medios inoculados fueron incubados a 100 rpm, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 días de cultivo. A partir de este pre-inóculo, se transfirió 1 gramo de biomasa y se inoculó en Erlenmeyers de 250 ml con 60 ml del mismo medio. Estos medios fueron incubados en agitación constante a 100 rpm, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, y tratados a diferentes condiciones de luz LED (blanco, azul, rojo, amarillo) para cada uno de los ensayos, durante 9 días de cultivo (11, 12).

4. **Obtención de los extractos a partir de la biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* cultivada bajo diferentes longitudes de onda basada en LEDs: proteínas, polisacáridos, ácidos ganodéricos, triterpenoides y ácidos grasos**

4.1 **Extractos proteicos**

4.1.1. **Extracto proteico sin el proceso de optimización**

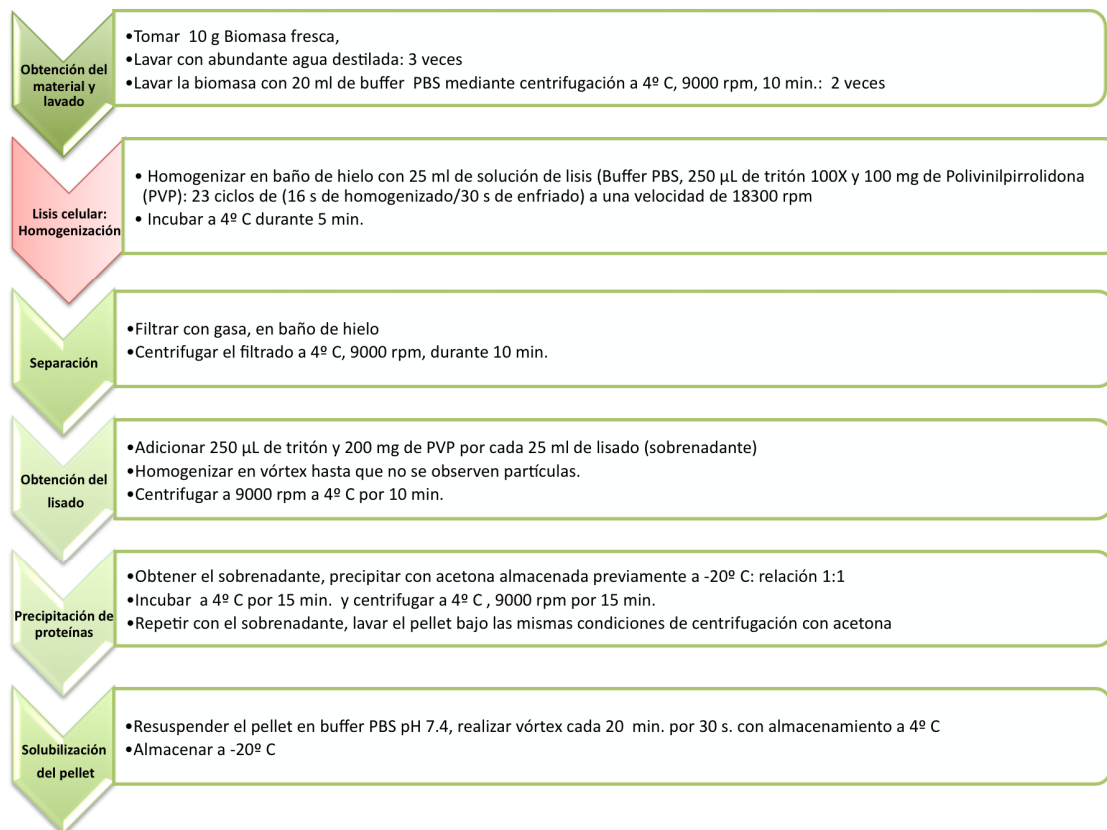
10 gramos de biomasa fresca de cada uno de los cultivos crecidos bajo diferentes condiciones de luz LED, fue lavada 3 veces con abundante agua destilada, luego fue lavada 2 veces con 20 mL de buffer fosfato PBS pH 7,4 por centrifugación a 4°C , 9000 rpm durante 10 min. (Boeco[®] U320R) (12). Posteriormente, la biomasa fue sonicada en baño de hielo con 25 ml de solución de lisis (Buffer PBS, 250 μL de tritón 100X y 100 mg de Polivinilpirrolidona (PVP)) realizando 5 ciclos (30 s. de sonicación y 30 s. de enfriamiento)

(Misomix Ultrasonic Model CI5), luego se dejó la muestra incubando a 4°C por 5 min. Posteriormente, la biomasa fue filtrada con gasa en baño de hielo y luego se centrifugó el filtrado a 4°C, 9000 rpm, durante 10 min. El sobrenadante recuperado fue tratado con 250 µL de tritón y 200 mg de PVP por cada 25 ml de lisado, todo fue homogenizado en un vórtex hasta no observarse partículas en la solución y se centrifugó nuevamente a 4°C, 9000 rpm, durante 10 min.

Finalmente, el sobrenadante recuperado fue adicionado con acetona, almacenada previamente a -20°C, en relación 1:1 incubando durante 1 h a 4°C. Luego se realizó una centrifugación a 4°C, 9000 rpm durante 15 minutos, se repitió este último paso de precipitación una vez más con el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado nuevamente con acetona previamente enfriada a -20°C y se realizó vórtex fuerte para la dispersión del pellet. Se realizó una centrifugación a 4°C, 9000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue descartado, y el pellet fue resuspendido en 3 ml de buffer PBS pH 7,4. Seguidamente los extractos proteicos provenientes de cada condición de luz fueron cuantificados por el método de Bradford, alicuotado y almacenado a -20°C (53–55).

4.1.2 Optimización de las condiciones de extracción de las proteínas de la biomasa micelial de *Ganoderma lucidum*

La metodología implementada para la obtención de los extractos proteicos a partir de la biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* se describe en el ítem anterior. Como se puede observar la metodología implementada hace uso de la sonicación como método de lisis celular, principalmente para la ruptura de la pared celular. Con el fin de optimizar la extracción de las proteínas del micelio, se procedió a evaluar inicialmente el efecto de dos procesos de lisis celular y la combinación de ambos (sonicación, homogenización y ambos), y posteriormente, se realizó una optimización de las condiciones de ruptura con el proceso seleccionado. La Gráfica 1 describe el proceso optimizado de obtención de los extractos proteicos de *Ganoderma lucidum*.



Gráfica 1. Protocolo optimizado de obtención del extracto proteico a partir de la biomasa micelial del hongo *Ganoderma lucidum* para los ensayos de actividad biológica.

5 4.1.3 Expresión cualitativa y cuantitativa de proteínas

Para este análisis se tomaron 10 µg de cada uno de los extractos proteicos de *Ganoderma lucidum*, provenientes de diferentes condiciones de cultivo, Blanco LED, Azul LED, Amarillo LED y Rojo LED, por triplicado y se corrió una electroforesis de una dimensión.

10 Luego, se escindieron todas las proteínas presentes en cada columna de una electroforesis 1D con el fin analizarlas por espectrometría de masas y su posterior análisis e identificación mediante la comparación de secuencias en las diferentes bases de datos utilizando MASCOT.

La metodología implementada en este trabajo, puede ser resumida en 5 pasos posteriores al corrido de las proteínas en el gel: (i) desteñir el gel, (ii) reducir los puentes disulfuro y alquilar los grupos sulfhidrilo resultantes, (iii) digerir las proteínas enzimáticamente con tripsina, (iv) extraer los péptidos resultantes y (v) analizarlos por espectrometría de masas (13–15). La técnica utilizada, permitió la cuantificación relativa de las proteínas encontradas, realizando comparaciones de los perfiles proteicos según las intensidades relativas de los cromatogramas de los iones extraídos en la digestión enzimática (16–19).

4.2 Extracto etanólico crudo

50 gramos de biomasa seca y pulverizada fue macerada en alcohol al 96% por 2 horas en ultrasonido (Misonix®). Luego el material fue filtrado y llevado a sequedad en rota evaporador, pesado y almacenado a 4°C para su posterior uso.

4.3 Extracción y cuantificación de Polisacáridos: IPS (Intrapolisacáridos) y EPS (exopolisacáridos)

Para la cuantificación de los IPS, se tomó 1g de biomasa micelial seca de *Ganoderma lucidum* y se resuspendió en 10 mL de agua. Esta mezcla se llevó a la autoclave para la extracción a alta temperatura; la solución caliente fue filtrada. Posteriormente la precipitación de los IPS fue realizada diluyendo el filtrado en 4 volúmenes de etanol al 96% a 4°C durante 1 h, seguido de una centrifugación a 4000 rpm. El pellet obtenido fue diluido en 5 mL de agua y utilizado para la cuantificación por el método Fenol-Acido Sulfúrico (FAS) validado (20). Para la extracción de EPS el medio filtrado se centrifugó a 2500 rpm a 25°C para eliminar los sólidos en suspensión, se tomaron 10 mL del sobrenadante y se adicionaron 4 volúmenes de etanol al 96%. A partir de paso se llevó a cabo el mismo protocolo que para la extracción de IPS con el fin de obtener el extracto de polisacáridos.

4.4 Extracción y cuantificación de ácidos ganodéricos (AG)

Para la cuantificación de los AG, el proceso básico seguido consistió en tomar una muestra de biomasa micelial seca (500 mg), a la cual se le adicionó 50% (v/v) etanol. Posteriormente se realizó una centrifugación a 2500 rpm x 15 min., el sobrenadante fue

secado por evaporación al vacío a 40°C, el residuo se resuspendió en agua y se extrajo con cloroformo. Los AG en cloroformo fueron extraídos con 5% de bicarbonato, a la fase acuosa básica se le adicionó 2M HCl hasta ajustar el pH a valores menores de 3 y por último se extrajo con cloroformo, el cual fue secado por evaporación al vacío a 40°C. El
5 residuo se redisolvió en etanol absoluto y se leyó a una absorbancia a 245 nm.

4.5 Extracción, caracterización y cuantificación relativa de triterpenoides y ácidos grasos

10 Se tomaron 100 g de biomasa liofilizada y 100 g del medio extracelular agotado liofilizado de cada uno de los tratamientos de luz LED y se sometieron a maceración con 200 ml de CH₂Cl₂ durante 5 días. Posteriormente se realizó remoción del solvente cada dos días, hasta que la prueba cualitativa de Liebermann Burchard, específica para Δ⁵-esteroles o esteroides que contengan dienos conjugados reales o potenciales, fuera negativa. Los extractos crudos
15 se concentraron a sequedad en un rotaevaporador.

Luego, 1 g de cada uno de los extractos fue saponificado para eliminar los ácidos grasos libres, como sigue: se adicionó al extracto 20 ml de una solución de KOH 1M en MeOH a 80°C durante 180 min, bajo condiciones de reflujo. Al resultado de la saponificación se le
20 adicionó 10 ml de H₂O y se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó con H₂O hasta pH neutro, para ser posteriormente recogida sobre sulfato de sodio anhidro y concentrada en rotavapor hasta sequedad.

La caracterización química de los extractos se realizó por cromatografía de gases acoplada
25 a espectrometría de masas (CG-EM). Las características del equipo son: HP6890, columna capilar ZB-5HT interno (30m, 0,25mm de diámetro interno y 25 μm de espesor), gas de arrastre He 4,5 a 1,1 mL/min., modo de inyección Splitless y temperatura del inyector 300°C. Este cromatógrafo está acoplado a un detector de masas 5973, con una fuente de ionización de 70eV.

30

El programa utilizado consistió en una rampa de calentamiento de 60°C durante 1 minuto y posteriormente a 7,4°C/min. hasta 310°C. Se inyectó 1 µL de cada una de los extractos a una 3mg/mL en CH₂Cl₂. Los componentes fueron identificados mediante comparación con la librería del equipo y para el caso de los componentes triterpenoidales, por el análisis y comparación con las bases de datos del Grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos de la Universidad Nacional de Colombia.

5. Aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* y obtención de cultivos monóspóricos para los ensayos

Los aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* se realizaron mediante la recolección de ascosporas a partir de material vegetal infectado (previamente diagnosticado en Cenibano-AUGURA y proporcionado por Cenibano al Laboratorio de Biotecnología Universidad de Antioquia) (21–23). Las lesiones presentes en las hojas clasificaron para un estadio 6 de la enfermedad según la escala de Fouré (1985) caracterizado por manchas foliares de color blanco grisáceo con puntos negros, que bajo el microscopio electrónico evidencian la presencia de pseudotecios para la dispersión de ascosporas y conidióforos para la liberación de conidias (23).

Las ascosporas se identificaron bajo un microscopio compuesto binocular en objetivo número 20, se seleccionaron una a una para ser transferidas a un medio PDA y se incubaron a 25±1°C hasta obtener la colonia denominada R1. Finalmente se realizó un repique, las colonias obtenidas fueron divididas y subcultivadas en medio PDA como aislamientos de trabajo R2 (24).

6. Ensayo de antagonismo con siembra a profundidad de *Mycosphaerella fijiensis*

Se inoculó un disco de 1 cm de diámetro de un cultivo R2 de *Mycosphaerella fijiensis*, previamente macerado en solución 0,9% NaCl, en cajas de Petri con el medio de cultivo MGL1 fundido a una temperatura de 37°C. Este cultivo se incubó por un periodo de 15 días en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, un disco de 1 cm de diámetro de

Ganoderma lucidum fue inoculado sobre el micelio crecido de *Mycosphaerella fijiensis* este cultivo dual se incubó por un período de 15 días en oscuridad a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron por triplicado con un control de crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* y un control de crecimiento de *Ganoderma lucidum*. Los cultivos se evaluaron
5 microscópicamente durante el transcurso del experimento, observando y comparando las hifas de cada uno de los hongos.

7. Ensayo de antagonismo en platos duales: ensayo de antagonismo por enfrentamiento de *Ganoderma lucidum* vs. *Mycosphaerella fijiensis*

10 Se inoculó un disco de 1.3 cm de diámetro de un cultivo R2 de *Mycosphaerella fijiensis*, en cajas de Petri que contenían medio de cultivo PDAL, a una distancia de 2 cm del borde de la caja y se incubó a temperatura ambiente durante 20 días, con el fin de proporcionarle todas las condiciones óptimas de crecimiento al fitopatógeno para su establecimiento y
15 colonización del sustrato.

Luego de transcurrido este tiempo se inoculó en cada medio de cultivo un disco de micelio de 1.3 cm de diámetro de *Ganoderma lucidum*, a una distancia de 4.5 cm de la colonia de *Mycosphaerella fijiensis* (26, 27, 33–36). Finalmente este cultivo dual se
20 incubo 26 días en oscuridad a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron por triplicado con un control de crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* y un control de crecimiento de *Ganoderma lucidum*. Los cultivos se evaluaron macroscópicamente durante el transcurso del experimento, utilizando una regla milimétrica para medir el radio de la colonia de *Mycosphaerella fijiensis* (26, 32). El porcentaje de inhibición se evaluó a los 15
25 días del antagonismo, según el modelo matemático descrito para este tipo de análisis el cual se define como $RG = (G/G1) \times 100$, donde G es la eficiencia en el crecimiento del tratamiento y G1 del control, obtenida a partir de la relación:

$$G1 = (FD/ID)$$

30 donde,

FD=Diámetro final de la colonia, ID=Diámetro inicial de la colonia (37).

Adicionalmente, se tomaron muestras de cada tratamiento, a las cuales se les realizó observación tanto en un microscopio de luz como en microscopio electrónico de barrido, con el fin de comparar las variaciones morfológicas del hongo fitopatógeno cuando estaba expuesto al hongo controlador (26, 27, 33–36). Las muestras fueron observadas inicialmente microscopio de luz con los objetivos de 40x y 100x (Nikon, Microscope eclipse 80i) y las imágenes fueron capturadas con un capturador de imagen Nikon Nis Elements BR 3.2. Se tomaron muestras del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* control y *Mycosphaerella fijiensis* antagonizado, se depositaron en un cubre objetos y se procedió a realizar una tinción con rojo congo al 5% (39).

Para la observación en microscopio electrónico de barrido SEM (Jeol, Modelo JSM 6490LV), se tomaron muestras del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* control y *Mycosphaerella fijiensis* antagonizado. Las muestras fueron fijadas mediante el protocolo FAA (45% de etanol 95%, 45% de ácido acético glacial, 10% formaldehído (44–48). Las muestras fueron secadas por liofilización y adheridas al portamuestra con cinta conductora y recubiertas con una película de oro al vacío en el sputtering por 2 minutos (Denton Vacuum, modelo Desk IV) (49–51).

Finalmente, se tomaron muestras del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* control y *Mycosphaerella fijiensis* antagonizado cuando estuvo bajo el efecto de *Ganoderma lucidum*, con el fin de determinar la viabilidad del micelio de *Mycosphaerella fijiensis*. Parte del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* antagonizado se repicó en nuevas cajas de petri con el medio PDAL, para observar el desarrollo del micelio y de las nuevas hifas de *Mycosphaerella fijiensis*. Además de lo anterior, se realizó la prueba de exclusión del azul tripano 0,8 mM en PBS, método ampliamente empleado para diferenciar entre una célula viva y una muerta, ya que el azul tripano es un colorante supravital que se incorpora a las células muertas. El micelio fue macerado en presencia del colorante y las muestras se observaron en objetivos de 40x y 100x (Nikon, Microscope eclipse 80i) y las imágenes fueron capturadas con un capturador de imagen Nikon Nis Elements BR 3.2.

8. Ensayos de la actividad antifúngica sobre la elongación del tubo germinal de las ascosporas

Para la realización de este ensayo, se realizó la recolección de ascosporas, donde a cada
5 caja de Petri que contenía agar agua 2%, se le adicionó el extracto a evaluar en cada una de
las concentraciones (Extracto etanólico: 0, 100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm y Extractos
proteicos: 0, 0,1 ppm, 1,0 ppm, 10 ppm). Además de lo anterior, se evaluó un extracto
proteico de 10 ppm + proteinasa K (E.C. 3.4.21.64) (56,57).

10 Esta es usada principalmenete en este tipo de ensayos, como un control de que la actividad
encontrada si corresponda a la actividad de una o varias proteínas del extracto y no a otras
sustancias que pueden ser extraídas en el proceso. Para este fin, se adicionó la enzima al
extracto proteico crudo a una concentración final de 20 mg/mL. Los extractos fueron
incubados a 37°C por 1 hora haciendo vortex cada 10 minutos, luego los extractos fueron
15 centrifugados a 9000 rpm, 4°C durante 15 min., el sobrenandante liofilizado de cada uno de
los extractos fue utilizado para realizar los ensayos de actividad (59, 60).

Finalmente, luego de realizada la descarga de ascosporas durante 45 minutos en cada uno
de los medios suplementados con los extractos, se retiraron las hojas y se incubaron los
20 medios por 48 horas a $25\pm1^{\circ}\text{C}$. Las ascosporas se midieron con micrometro y se registró la
longitud de los tubos germinativos (Nikon Stage Micrometer), bajo un microscopio
compuesto binocular en objetivo número 20 (Nikon, Microscope eclipse 80i). Todos los
ensayos se realizaron por triplicado, midiendo 60 ascosporas por tratamiento, en al menos
cinco campos de descarga (59, 60). Se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos
25 tomando como blanco las ascosporas que se desarrollaron en agar agua.

Todos los resultados fueron analizados en Statgraphics XV.I. Para el ensayo del extracto
etanólico se realizó un ANOVA de una sola vía, donde el factor evaluado fue la
concentración del extracto. Para los extractos proteicos se llevó a cabo un diseño de una
30 sola vía con bloques, donde se evaluó el efecto de diferentes extractos proteicos a diferentes
concentraciones. Para cada modelo se realizaron las pruebas ANOVA y post-ANOVA,
con el fin de evaluar los supuestos.

9. Evaluación de la actividad fungicida de los extractos de *Ganoderma lucidum*: Inhibición del crecimiento micelial en formato de microplatos

9.1 Evaluación de la actividad fungicida de los extractos proteicos de *Ganoderma*

5 *lucidum*

Para la obtención de los extractos proteicos se procedió con el protocolo de extracción de proteínas optimizado (Gráfica 2). Luego, el pellet de proteínas fue resuspendido en 1 mL de buffer PBS pH 7.4, 200 µL de DMSO y 200 µL de glicerol. Los extractos proteicos de cada LED fueron cuantificados por el método de Bradford (Bio-Rad proteína assay®) (61).

10 A partir de soluciones stock, se adicionaron 100 µL de cada uno de los extractos proteicos de *Ganoderma lucidum* para una concentración final en el plato de 500, 250, 125 y 100 ppm. Los extractos fueron diluidos en buffer fosfato PBS pH 7,4.

Los microplatos inoculados con *Mycosphaerella fijiensis* y tratados con los diferentes extractos fueron incubados. Se realizaron las lecturas según la Norma Estándar. Cada
15 concentración se evaluó en 3 repeticiones, con tres réplicas del experimento (63, 64). Luego se realizó la determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento para cada concentración de cada extracto proteico utilizado (65–67).

9.2 Evaluación de la actividad fungicida de los extractos ricos en triterpenoides y 20 ácidos grasos de *Ganoderma lucidum*

Para la obtención de los extractos triterpénicos se procedió con el protocolo descrito en el ítem 4.3. Luego, los extractos fueron preparados a una concentración de 100.000 ppm y fueron disueltos en una mezcla 1:1 de etanol: DMSO. Los microplatos fueron inoculados con *Mycosphaerella fijiensis* según las condiciones previamente establecidas. Luego, a
25 partir de las soluciones stock se realizaron diferentes diluciones en el microplato, con el fin de evaluar la actividad antifúngica de los extractos a concentraciones finales de 5000, 4000, 3000, 2000 y 1000 ppm, según la Norma Estándar. Cada concentración se evaluó en 3 repeticiones, con tres réplicas del experimento (63, 64). Luego se realizó la determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento para cada concentración de cada concentración
30 de extracto utilizado (65–67).

10. Ensayo de actividad antifúngica de los extractos mediante la técnica de difusión en agar: Extractos proteicos y extractos ricos en triterpenoides y ácidos grasos.

Con el fin de corroborar la actividad antifúngica de cada uno de los extractos, se procedió a evaluar dicha actividad en caja de petri utilizando el método de difusión en placa; para tal fin, fueron dispensados 20 mL de medio PDA para un espesor final de 4 mm. Se hizo una siembra a profundidad luego de homogenizar los inóculos, cada plato fue inoculado con 2×10^4 fragmentos miceliales de *Mycosphaerella fijiensis*. Luego con un sacabocados de 0,5 mm de diámetro interno, se procedió a realizar pozos en los cuales se depositaron 10 o 20 μL de cada uno de los extractos, además del control positivo de inhibición con Mancozeb y un control negativo de una mezcla de etanol:DMSO 1:1. Los platos fueron incubados a condiciones de oscuridad, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 días.

EJEMPLOS

11. Expresión cualitativa y cuantitativa de proteínas y otros bioactivos (polisacáridos, triterpenoides, ácidos ganodericos y ácidos grasos) utilizando un dispositivo tecnológico basado en diferentes longitudes de radiación electromagnética.

11.1 Proteínas

En el presente trabajo, se obtuvo una lista de masas moleculares medidas por espectrometría de masas, que fueron sometidas al programa de análisis proteómico MASCOT para su comparación con las diferentes proteínas de las bases de datos, donde se logró obtener un listado de 34 proteínas, las cuales tienen diferentes grados de expresión bajo las diferentes condiciones lumínicas, en los diferentes extractos analizados, y esto permitió realizar una serie de comparaciones y demostrar que la condición de luz a la cual se somete el hongo para su crecimiento, si influye en la producción y expresión de proteínas en un momento determinado. La Tabla 1 muestra el listado de las proteínas identificadas, indicando inicialmente sus características físico-químicas.

Tabla 1. Proteínas identificadas en los extractos de *Ganoderma lucidum* y algunas características importantes.

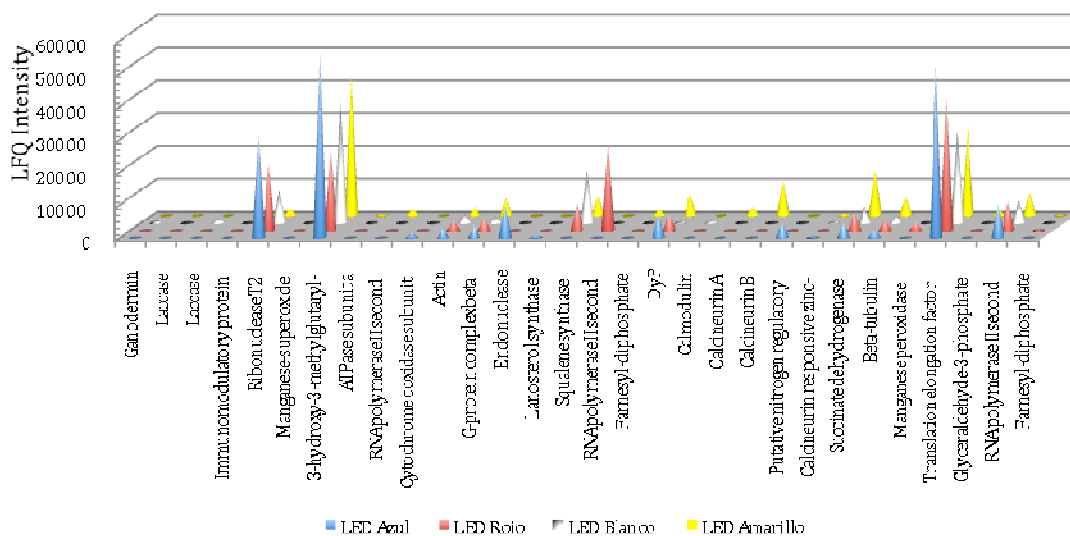
N°	Nombre de Entrada	Nombre de la proteína	Longitud (aa)	Peso (kDa)	Punto Isoeléctrico (pI)
1	GANOD_GANLU	Ganodermin*	27,0	2,72	10,28
2	Q710F5_GANLU	Laccase	299	32,03	5,03
3	B5G553_GANTS	Laccase	521	56,42	5,46
4	LZ8_GANLU	Immunomodulatory protein Ling Zhi-8	111	12,51	5,09
5	A6P7J5_GANLU	Ribonuclease T2	304	33,49	4,89
6	D7F2S3_GANLU	Manganese-superoxide dismutase	142	15,45	8,76
7	B2KX91_GANLU	3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase	1226	13,11	8,23
8	B3XZ37_GANLU	ATPase subunit a	175	19,31	8,94
9	B3XZA5_GANLU	RNA polymerase II second largest subunit	287	32,76	8,20
10	B6UPH5_GANLU	Cytochrome c oxidase subunit 2	72	7,78	4,79
11	Q2HPQ0_TRIHA	Actin	257	28,83	5,24
12	C7EWL6_GANLU	G-protein complex beta subunit	313	34,90	5,79
13	Q8HE45_GANLU	Endonuclease	264	31,03	8,54
14	D7NJ68_GANLU	Lanosterol synthase	726	82,87	6,33
15	A0SJQ5_GANLU	Squalene synthase	467	54,01	7,09
16	D8UZT0_9PEZI	RNA polymerase II second largest subunit	351	39,68	6,13
17	D8Q297_SCHCM	Farnesyl-diphosphate synthase	347	39,82	5,65
18	G0X8C9_GANLU	DyP	488	53,19	7,7
19	E7E161_GANLU	Calmodulin	149	16,88	4,20
20	E7E162_GANLU	Calcineurin A	339	37,02	5,34
21	E7E163_GANLU	Calcineurin B	161	18,19	4,67
22	F6M3U4_GANLU	Putative nitrogen regulatory protein	265	28,92	9,65

23	G1ECM7_GANLU	Calcineurin responsive zinc-finger CRZ1	639	69,21	8,79
24	G3LGR3_GANLU	Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	245	28,00	8,9
25	B8K207_GANLU	Beta-tubulin	120	13,34	5,87
26	C0IMT8_GANLU	Manganese peroxidase	364	38,11	4,61
27	Q4PS64_GANTS	Translation elongation factor 1-alpha Q4PS64 Elongation factor 1-alpha	379	41,43	8,73
28	Q0GZR4_GANLU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	337	36,06	6,45
29	B3XZA5_GANLU	RNA polymerase II second largest subunit	287	32,76	8,20
30	B4YA15_GANLU	Farnesyl-diphosphate synthase	360	41,01	5,34
31	B5G551_GANLU	Laccase	520	56,26	5,16
32	B5G552_GANLU	Laccase	520	56,295	5,09
33	B6E1X1_GANLU	Lanosterol 14-alpha-demethylase	180	21,026	6,8
34	Q0GZR4_GANLU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	337	36,067	6,45

*Corresponde a un péptido.

De manera diferencial se puede observar la influencia de la longitud de onda basada en LEDs en el perfil de proteínas de *Ganoderma lucidum*, según su nivel de expresión, en términos de intensidad, obtenidos mediante la espectrometría de masas. La Gráfica 2, ilustra estos niveles de expresión de manera comparativa para cada una de las proteínas identificadas.

Se observó que la mayor intensidad (*LFQ intensity*), que se puede interpretar como la mayor concentración de las diferentes proteínas identificadas, se presentan en el LED amarillo, seguido por el LED Azul, luego LED rojo y finalmente la condición de LED blanco. Esto demuestra que si existe un efecto diferencial cuando el hongo es expuesto a diferentes longitudes de onda, lo que finalmente se traduce en la producción de mayor o menor cantidad de biomasa y obtención de metabolitos primarios o secundarios tipo polisacáridos y ácidos ganódericos.



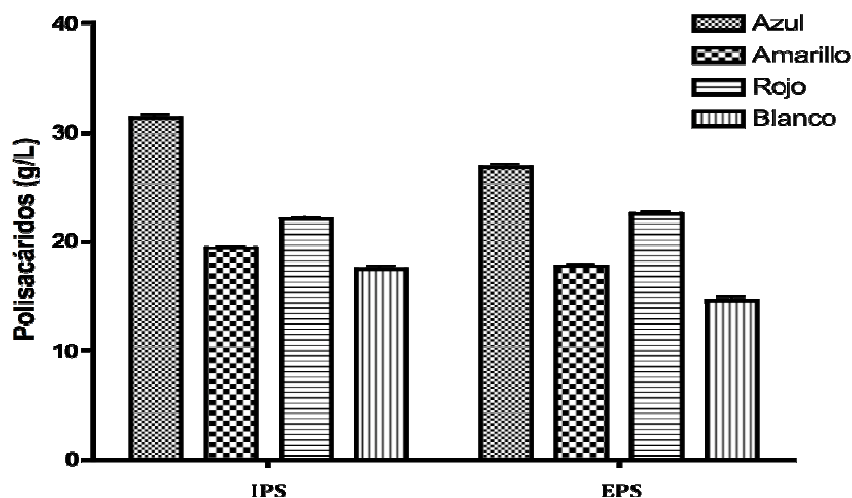
Gráfica 2. Proteínas de *Ganoderma lucidum* identificadas en los diferentes extractos cuando fue cultivado bajo diferentes condiciones de luz LED, donde se puede observar su expresión diferencial.

5

11.2 Cuantificación de polisacáridos (IPS y EPS)

Luego de realizar las diferentes evaluaciones utilizando diferentes condiciones de luz, se determinó que la mejor condición de luz para la producción de IPS y EPS es la luz azul LED, con diferencias significativas sobre las demás condiciones, con $p < 0.05$ (Gráfica 3).

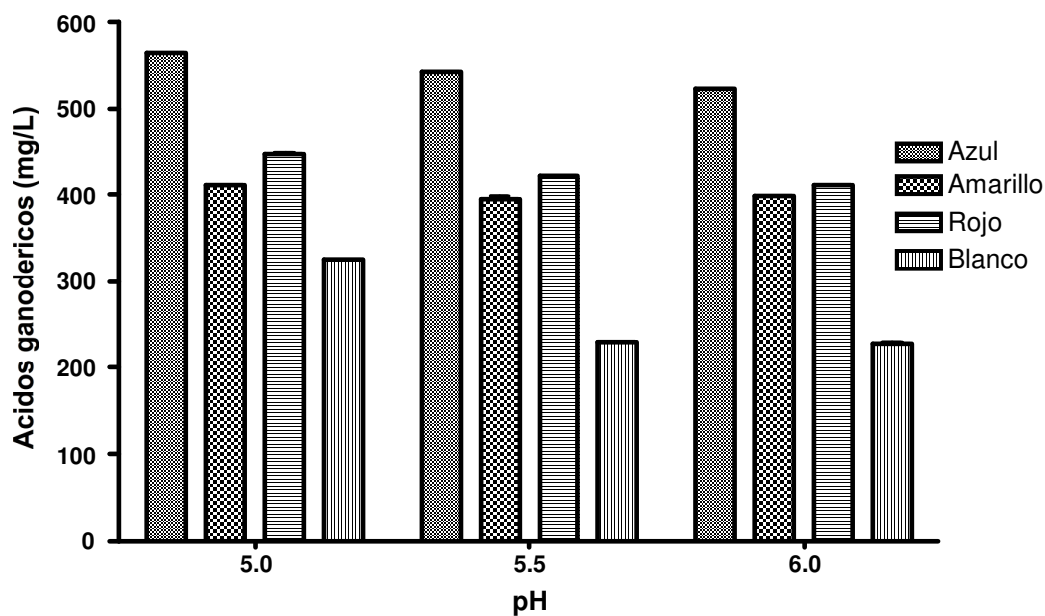
- 10 Los valores obtenidos para **IPS** fueron: para la luz azul LED **31.32±1,24 g/L**, seguido de la luz roja LED con 22,34±1,24 g/L, la luz amarilla 19,23±1,24 g/L y finalmente la luz blanca LED con 17,42±1,24 g/L. Los valores obtenidos para **EPS** fueron: para la luz azul LED **29±2,31 g/L**, seguido de la luz roja LED con 22,33±2,31 g/L, la luz amarilla 18,54±2,31 g/L y finalmente la luz blanca LED con 16,03±2,31 g/L.



Gráfica 3. Obtención de poliscáridos (IPS y EPS) de *Ganoderma lucidum* cuando fue cultivado bajo diferentes condiciones de luz LED.

11.3 Cuantificación de ácidos ganodéricos (AG)

- 5 Se determinó que la mejor longitud de onda para la producción de AG fue la longitud de onda que corresponde a la luz azul a un pH de 5,0 con un valor $p > 0.05$, obteniendo para la luz azul LED $563,9 \pm 11,63$ mg/L, seguido de rojo LED con $447,1 \pm 11,63$ mg/L, amarillo LED con $411,0 \text{ mg/L} \pm 11,63$ y finalmente blanco con $228,8 \text{ mg/L} \pm 11,63$ (Gráfica 4).



- 10 **Gráfica 4.** Obtención de AG de *Ganoderma lucidum* cuando fue cultivado bajo diferentes condiciones de luz LED y de pH.

11.4 Caracterización química y cuantificación relativa de los extractos ricos en triterpenoides y ácidos grasos

Tabla 2. Porcentaje de abundancia relativa de cada uno de estos compuestos en los extractos de *Ganoderma lucidum*, cultivado bajo diferentes condiciones de luz LED.

Compuesto	Intracelulares (% Abundancia relativa)				Extracelulares (% Abundancia relativa)			
	Amarillo LED	Azul LED	Blanco LED	Rojo LED	Amarillo LED	Azul LED	Blanco LED	Rojo LED
Ácido palmítico	7,60	Tz	31,20	16,40	14,36	9,94	2,92	5,72
Palmitato de etilo	1,70	27,70	7,90	7,80	5,88	9,75	13,85	3,31
Linoleato de etilo	12,20	39,50	11,70	23,50	32,43	29,19	33,97	10,94
Oleato de etilo	14,10	17,60	5,20	8,80	10,12	26,61	15,23	3,82
22E-ergosta 5,7,9 (22), tetraen 3 β -ol	1,30	Tz	0,35					
Ergosta 5,7,22 trien 3 β -ol	2,20		1,02					
Ergosta-5-3 β -ol		Tz						
Estigmast-5-3 β -ol	1,10	2,20	0,40	2,20			tz	
26,26 – dimetil 5, 23 ergostadien 3 β -ol			Tz					
Estigmast-4 en-3- one	2,30	4,30	0,70	2,80	2,51	1,42	tz	5,71
Estigmast-5,24(28)- dien-3 β -ol	0,96							
Estigmast-4,24(28)- dien-3-one	0,78				0,83		tz	1,53
5 α -Estigmast-3-one		Tz					Tz	
(22R,24S)- 22,24Dimetilcoleste rol								2,52
Total de ácidos grasos	7,6	Tz	31,20	16,4	14,3	9,0	2,9	5,7
Total de ésteres de ácidos grasos	28,0	84,8	24,8	40,1	48,4	65,5	62,8	18,9
Total de triterpenoides	8,6	6,5	2,5	5,1	3,33	1,5	0	9,7

12. Ensayo de antagonismo en platos duales

La Tabla 3, ilustra el crecimiento de cada uno de los hongos cuando se encuentran cultivados de manera individual o medio control y cuando estan co-cultivados. Para *Ganoderma lucidum* control se encontró una velocidad de crecimiento de 0,2983 cm/día, y en el co-cultivo de 0,281 cm/día. Para *Mycosphaerella fijiensis* se determinó que la velocidad de crecimiento en el control fue de 0,1287 cm/día y en el co-cultivo de 0,059 cm/día. Lo anterior evidencia que *Ganoderma lucidum* disminuye un poco su velocidad de crecimiento en el co-cultivo, sin embargo es capaz de colonizar todo el sustrato en el mismo tiempo, mientras que en el caso de *Mycosphaerella fijiensis*, la afectación es mayor, demostrando ser el organismo antagonizado en el proceso.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* comparando el crecimiento del aislamiento antagonizado frente al control.

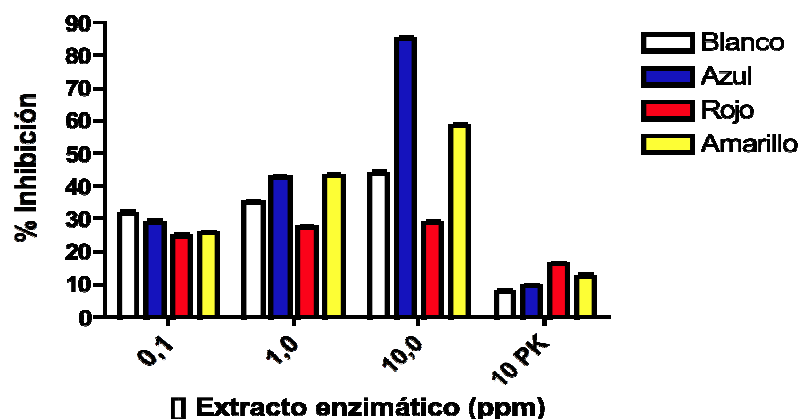
Ensayo	Media del diámetro de las colonias (cm)			% de Antagonismo
	Día			
	1	8	15	
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> antagonizada	2.439	2.528	2.581	85,1
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> control	2.411	2.686	2.997	Control

13. Inhibición de la germinación de ascosporas utilizando diferentes extractos obtenidos a partir de la biomasa micelial de *Ganoderma lucidum*

13.1 Extracto proteico crudo

La evaluación del efecto de los extractos proteicos de *Ganoderma lucidum* se realizó con un ANOVA de una sola vía bloqueado, donde el factor evaluado fue el extracto proteico de los diferentes LEDs y el bloque fue la concentración del extracto. Con los resultados obtenidos del análisis de varianza y las pruebas de ajuste al modelo (independencia, normalidad e igualdad de varianzas), se observó que se presentó un efecto sobre la germinación de ascosporas debido al tipo de extracto y su concentración, con un valor $p < 0,05$.

Los análisis indicaron que el extracto del LED azul, a 10 ppm presentó un porcentaje de inhibición del $84,95 \pm 0.89\%$, seguido del porcentaje de inhibición del extracto del LED amarillo a 10 ppm con $58,52 \pm 0.89\%$ (Gráfica 5).



- 5 **Gráfica 5.** Figura que ilustra los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición de la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, para cada extracto y su concentración.

Además de lo anterior, se pudo observar que el tratamiento con 10 ppm de cada extracto digerido con la proteinasa K (10 PK), disminuye el porcentaje de inhibición de manera significativa a $7,6 \pm 0.89\%$. Esto sugiere que el efecto observado sobre la ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* se debe a una proteína o a un complejo de proteínas, que son digeridas con la enzima y por ende no se presenta actividad (59, 60).

13.2 Extractos etanólicos

- 15 Se evaluó el efecto de la concentración del extracto etanólico sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, donde se determinó que existe un efecto de inhibición significativo producido por el extracto etanólico sobre la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, y que este es dependiente de la concentración, con un valor $p < 0.05$. Se observó la formación de tres
- 20 grupos homogéneos, significativamente diferentes, donde la concentración de 10000 ppm del extracto etanólico, presentó el mayor porcentaje de inhibición con un $98,4 \pm 0,51\%$.

14. Evaluación de la actividad fungicida de los extractos de *G. lucidum* sobre *M. fijiensis* en microplatos.

14.1 Extractos proteicos sin el proceso de extracción optimizado

Se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial para el porcentaje de Inhibición, donde se puede observar que tanto el factor LED, la concentración de los extractos y su interacción, tienen un efecto sobre el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* con un valor $p < 0.05$, donde se observó que teniendo como base el control con 0% de inhibición, Mancozeb a una concentración de 0.3 ppm, presenta un 72% de inhibición, valor que es superado por los diferentes extractos, excepto por el blanco, a concentraciones desde 100 ppm. Además, se corrobora que la actividad observada se debe a una o varias proteínas del extracto ya que cuando este fue tratado con proteinasa K, no se presentó la actividad antifúngica, aún a una concentración de 1000 ppm.

Mediante modelos logísticos (regresiones no lineales) se estableció la relación entre el logaritmo de la concentración de cada antifúngico (eje x) vs el porcentaje de inhibición (eje y) obteniendo así las respectivas ecuaciones, para el análisis de la EC_{50} para cada tratamiento a 5 concentraciones, con el fin de determinar la concentración necesaria de cada extracto para reducir el crecimiento de la población en un 50% a nivel *in vitro*. La Tabla 4 muestra la EC_{50} para los extractos proteicos obtenidos bajo diferentes condiciones de luz LED, obtenida al graficar el Logaritmo de la concentración vs. Porcentaje de Inhibición.

Tabla 4. EC_{50} para cada tratamiento, donde se muestra el ajuste de los datos a la ecuación Log (inhibidor) vs. Respuesta.

Datos	Rojo	Amarillo	Blanco	Azul
Log(Inhibidor) vs. Respuesta				
EC_{50} (ppm)	114,28 $\pm$ 1,02	94,41 $\pm$ 1,07	295,80 $\pm$ 1,11	11,32 $\pm$ 1,07
R^2 (Ajuste a la ecuación)	0,9993	0,9945	0,9924	0,9938

En la tabla anterior se observa que la respuesta del hongo fitopatógeno en los tratamientos de los extractos obtenidos bajo el LED rojo y el LED amarillo son similares, con EC_{50} de $114,288 \pm 1,02$ y $94,406 \pm 1,07$ ppm, respectivamente. El extracto blanco fue el menos efectivo con una EC_{50} de $295,8 \pm 1,11$ ppm, mientras que la respuesta obtenida con el extracto del LED azul es la mas potente, con una EC_{50} de $11,32 \pm 1,07$ ppm, la cual se encuentra muy por debajo de los demás tratamientos.

14.2. Actividad fungicida de los extractos proteicos optimizados de *Ganoderma lucidum*

Con el fin de determinar cuál es el mejor extracto proteico para la inhibición del crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*, se realizó un análisis estadístico mediante un diseño factorial categórico. El análisis de varianza ANOVA multifactorial para el porcentaje de inhibición, muestra que tanto el factor LED, la concentración de los extractos y su interacción, tienen un efecto sobre el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* con un valor $p < 0.05$. Posteriormente, se realizó el análisis de la EC_{50} para cada tratamiento a las 4 concentraciones, con el fin de determinar la concentración necesaria de cada extracto para reducir el crecimiento de la población en un 50% a nivel *in vitro*.

Como se puede observar en la Tabla 5, la EC_{50} se encuentra muy por debajo de las dosis ensayadas, por lo cual se puede concluir que estos nuevos extractos proteicos que fueron extraídos bajo el protocolo optimizado, son más potentes, permitiendo aducir esta respuesta a que se lograron extraer, en mayor concentración, las proteínas activas. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos al graficar el Logaritmo de la concentración vs. Porcentaje de Inhibición y el ajuste al modelo.

25

Tabla 5. EC_{70} y EC_{95} para cada tratamiento, donde se muestra que los datos se ajustaron a la ecuación Log (Inhibidor) vs Respuesta.

Datos	Amarillo	Azul	Blanco	Rojo
Log (Inhibidor) vs. Respuesta				
EC_{70} (ppm)	$149,6 \pm 0,08$	-	$421,7 \pm 0,12$	$100,46 \pm 1,12$
EC_{95} (ppm)	-	$158,49 \pm 1,85$	-	$251,18 \pm 1,12$
R^2 (Ajuste a la ecuación)	0,9992	0,9964	0,9967	0,9921

Nota: Se resalta el mejor tratamiento.

Como se puede observar el extracto proveniente del LED azul continúa siendo el más activo, donde se puede ver que el porcentaje de inhibición mínimo que genera el extracto es del 73%, respuesta muy superior a la encontrada con los extractos antes de la optimización de la extracción. Realizando un análisis de la IC₉₅ se puede observar que sólo el extracto del LED azul y el extracto del LED rojo alcanzan esa potencia de 158,49 ± 1,85 ppm y 251,19 ± 1,12 ppm, respectivamente.

Como se puede observar en los tratamientos anteriores, existe inhibición del crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis* cuando se trata con los diferentes extractos proteicos y se logra observar que los extractos rojo y azul presentan la mayor inhibición comparado con los demás tratamientos y el control de crecimiento; además se puede observar la actividad de Mancozeb como fungicida de control, donde el crecimiento del hongo es completamente inhibido. Estos resultados se encuentran en concordancia con el ensayo de microdilución y con los ensayos de germinación de ascosporas, donde el extracto azul presenta siempre la mayor actividad.

14.3 Actividad fungicida de los extractos ricos en triterpenoides y de ácidos grasos

En la Tabla 6 se puede observar como los extractos ricos en triterpenoides y ácidos grasos presentan inhibición del crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*. La mayor inhibición se presenta con los tratamientos provenientes de los extractos del LED azul, seguido por los tratamientos de los extractos con el LED amarillo. Para los extractos provenientes de LED blanco y rojo no se encontró una inhibición de crecimiento significativa con respecto a un control de crecimiento sin extractos.

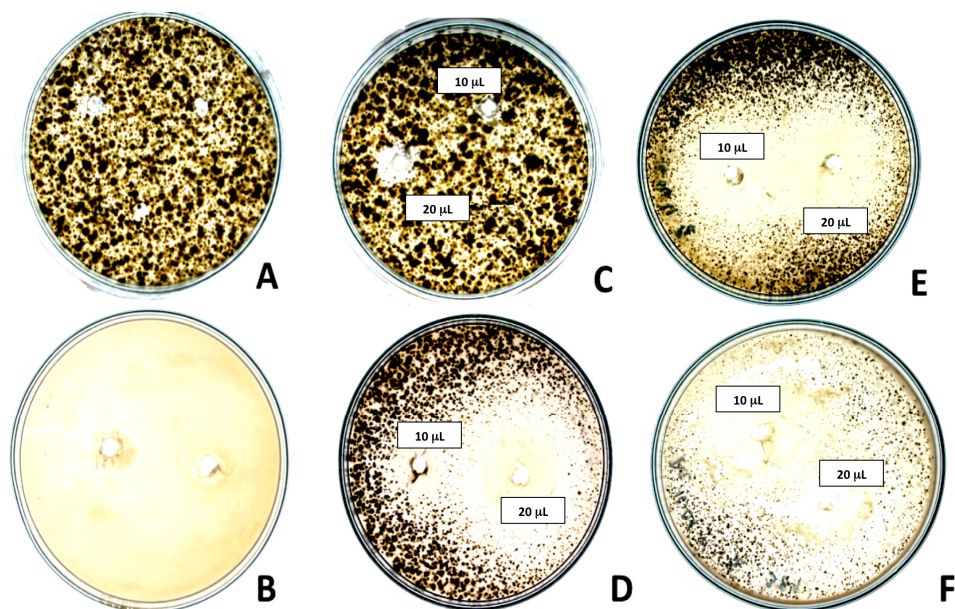
Tabla 6. Extractos intracelulares. EC₅₀ para cada tratamiento, donde se muestra que los datos se ajustaron a la ecuación Log (Inhibidor) vs Respuesta.

Datos	Rojo Intracelular	Amarillo Intracelular	Blanco Intracelular	Azul Intracelular
Log(Inhibidor) vs. Respuesta				
EC ₅₀ (ppm)	NA	103250 ±75,64	NA	4563 ±35,78
R ² (Ajuste a la ecuación)	---	0,9932	--	0,9932

NA. No aplica porque los extractos no fueron activos

15. Ensayo de difusión en agar

Finalmente y buscando corroborar lo observado en los microplatos, se procedió a evaluar la capacidad antifúngica de los extractos mediante la técnica de difusión en caja. La Gráfica 6 muestra los resultados obtenidos a este nivel, donde se depositaban diferentes cantidades de cada uno de los extractos a la mayor concentración, 500 ppm, utilizando 10 µL o 20 µL por pozo.



Gráfica 6. Evaluación de los diferentes extractos utilizando la prueba de difusión en agar, donde cada plato fue inoculado con *Mycosphaerella fijiensis* a una concentración de 2×10^4 fragmentos de micelio/mL (A) control de crecimiento (B) Control con Mancozeb (C) Plato tratado con extracto blanco, con halo de inhibición pequeño en el pozo de 10 µL (D) Plato tratado con extracto Amarillo, con halo de inhibición en el pozo con 10 µL y con 20 µL (E) Plato tratado con extracto Rojo, con halo de inhibición en el pozo con 10 µL y con 20 µL (F) Plato tratado con extracto Azul, con halo de inhibición en el pozo con 10 µL y con 20 µL.

Como se puede observar en los tratamientos anteriores, existe inhibición del crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis* cuando se trata con los diferentes extractos proteicos o los extractos ricos en triterpenoides y se logra observar que los extractos rojo y azul presentan la mayor inhibición comparado con los demás tratamientos y el control de crecimiento; además se puede observar la actividad de Mancozeb como fungicida de control, donde el crecimiento del hongo es completamente inhibido. Estos resultados se encuentran en concordancia con el ensayo de microdilución y con los ensayos de germinación de ascosporas, donde el extracto azul presenta siempre la mayor actividad.

16. Composiciones Agroquímicas

A partir de la biomasa y los extractos de *Ganaoderma lucidum* obtenidos de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar composiciones que comprenden *Ganoderma lucidum* y/o alguno de sus extractos, junto con vehículos, portadores y coadyuvantes
5 aceptables para aplicaciones agroquímicas, así como el uso de dichas composiciones en el control y/o el combate de fitopatógenos.

Las composiciones de acuerdo a la presente invención pueden proveerse en cualquier forma apropiada, por ejemplo, en forma de un polvo, de una solución, de una suspensión, de gránulos, entre otros.

10

17. BIBLIOGRAFIA

1. Wasser, S. P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides., *Applied microbiology and biotechnology* 60, 258–74.
- 15 2. Asatiani, M., Kachlishvili, E., Khardziani, T., Metreveli, E., Mikiashvili, N., Songulashvili, G., Tsiklauri, N., Wasser, S., and Elisashvili, V. (2008) Basidiomycetes as a source of antioxidants, lectins, polysaccharides, and enzymes, *Journal of Biotechnology* 136, 7–17.
- 20 3. Akavia, E., Beharav, a, Wasser, S. P., and Nevo, E. (2009) Disposal of agro-industrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*., *Waste management (New York, N.Y.)*, Elsevier Ltd 29, 1622–7.
4. Lewinsohn, D., Nevo, E., Hadar, Y., Wasser, S., and Beharav, A. (2000) Ecogeographical variation in the *Pleurotus eryngii* complex in Israel, *Mycological*
25 *Research* 104, 1184–1190.
5. Wang, H., and Ng, T. B. (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*., *Peptides* 27, 27–30.
6. Xu, X., Yan, H., Chen, J., and Zhang, X. (2011) Bioactive proteins from mushrooms., *Biotechnology advances*, Elsevier Inc. 29, 667–74.

7. Deighton, F. (1976) *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif., and *Cercoseptoria* Petr., *Mycological Papers* 140, 1–168.
8. Churchill, A. C. L. (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control., *Molecular Plant Pathology*, Wiley Online Library 12, 307–328.
9. Cenibanano. (2009) Proyecto especial Sigatoka (AUGURA, Ed.) 1ra edición, pp 6–25, AUGURA, Medellin-Colombia.
10. Leskosek-Cukalovic, I., Despotovic, S., Lakic, N., Niksic, M., Nedovic, V., and Tesevic, V. (2010) *Ganoderma lucidum* — Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties, *Food Research International* 43, 2262–2269.
11. Zapata, P., Rojas, D., and Atehortua, L. (2012) Production of biomass, polysaccharides and ganoderic acid using non-conventional carbon sources under submerged culture of the *Ganoderma lucidum*, *International Journal of Medicinal Mushrooms* In press.
12. Zapata, P., Rojas, D., Ramirez, D., Fernandez, C., and Atehortua, L. (2009) Effect of Different Light-Emitting Diodes on Mycelial Biomass Production of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), *International Journal of Medicinal Mushrooms* 11, 93–99.
13. Panchaud, A., Affolter, M., and Kussmann, M. (2012) Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects., *Journal of proteomics*, Elsevier B.V. 75, 3546–3559.
14. Penque, D., Simoes, T., and Amado, F. (2011) Proteomics advances in the last decade: What is next?, *Journal of proteomics* 75, 1–3.
15. Jiang, L., He, L., and Fountoulakis, M. (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *Journal of Chromatography A* 1023, 317–320.
16. Harder, A. (2008) Sample preparation procedure for cellular fungi, *Methods in molecular biology* 425, 265–273.

17. Dong, H., Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Kubicek, C. P., and Allmaier, G. (2009) Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry., *Analytical and bioanalytical chemistry* 395, 1373–83.
- 5 18. Yin, Q. Y., De Groot, P. W. J., De Koster, C. G., and Klis, F. M. (2008) Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins., *Trends in microbiology* 16, 20–6.
19. Lau, B. F., Aminudin, N., and Abdullah, N. (2011) Comparative SELDI-TOF-MS profiling of low-molecular-mass proteins from *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden grown under stirred and static conditions of liquid fermentation., *Journal of microbiological methods*, Elsevier B.V. 87, 56–63.
- 10 20. DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry* 28, 350–356.
- 15 21. Stover, R. H. (1983) The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, *Fruits* 38, 625-628.
22. Fouré, E., Grisoni, M., and Zurfluh, R. (1984) Les cercosporiosis du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains B *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et de quelques caractéristiques biologiques de la maladie de rales noires au G, *Fruits* 39, 365-377.
- 20 23. Fourée, E. (1985) Les cercosporiosis du bananier et leurs traitements. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon, *Fruits* 40, 393–399.
- 25 24. Madrigal, R., Arroyo, T., Astua, T., and Monreri, S. (2012) List of Monitoring Methods, *FRAC (Fungicide Resistance Action Committee)* 1, 1–3.
25. McDonald, J. H. (2009) Handbook of Biological Statistics Second edi., pp 127–202, Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, USA.

26. Ortiz, A., and Orduz, S. (2001) In vitro evaluation of Trichoderma and Gliocladium antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*, *Mycopathologia* 150, 53-60.
27. Viveros, J., and Castaño, J. (2006) Evaluación in vitro de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, *In Vitro* 14, 37-50.
28. Etebu, E., Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F., Ayibo, D., and Kalio, L. (2005) Efecto de la luz y aeración sobre la esporulación y crecimiento lineal de *Mycosphaerella fijiensis*, *Infomusa* 14, 24-25.
29. Jacome, L. H., and Schuh, W. (1993) Effect of Temperature on Growth and Conidial Production in-Vitro, and Comparison of Infection and Aggressiveness in-vivo among Isolates of *Mycosphaerella-Fijiensis* Var *Difformis*, *Tropical Agriculture* 70, 51-59.
30. Pineda, F., Uribe, S., Saldarriaga, Y., and Calle, J. (2003) Susceptibilidad de *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) de V estadio de desarrollo a la acción de *Beauveria* spp., *Entomotrópica* 18, 163-168.
31. Mira, J. J. (2004) Caracterización mediante métodos biológicos, de aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, resistentes y sensibles a fungicidas utilizados en su manejo químico en la zona de Urabá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
32. Donini, L. P., Bernardi, E., and Do Nascimento, J. S. (2006) Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos, *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 995-999.
33. Elad, Y., and Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*, *European Journal of Plant Pathology*, Springer 105, 177-189.
34. Mazurkiewicz-Zapałowicz, K., and Kołodziejczyk, L. (2009) Antagonistic interactions between saprotrophic fungi and geohelminths. 1. Saprotrophic fungi in the biological control of phytopathogenic geohelminths, *Wiadomości Parazytologiczne* 55, 1-8.
35. Reyes, Y., Martínez, B., and Infante, D. (2008) Evaluation of the antagonistic activity of thirteen *Trichoderma* spp., *Protección Vegetal* 23, 112-117.

36. Viveros, J. (2001) In vitro evaluation of Trichoderma and Gliocladium antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*, *Mycopathologia* 150, 53-60.
37. Silva, A., Rodrigues, A., Bacci, M., Pagnocca, F. C., and Bueno, O. C. (2006) Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi., *Mycopathologia* 162, 115-119.
38. Ceballos, I. C. (2009) Selección de bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la filosfera de cultivares de musa en el Urabá Antioqueño, con potencial antagonístico contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Universidad Nacional Colombia.
39. Slifkin, M., and Cumbie, R. (1988) Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi., *Journal of Clinical Microbiology* 26, 827-830.
40. Riveros, A. S., Giraldo, C. I., and Gamboa, A. (2003) Microbiological control of black leaf streak disease, *Seven* 287-296.
41. Mehrabi, R. Signaling pathways involved in pathogenicity and development of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*.
42. Jacome, L. H., Schuh, W., and Stevenson, R. E. (1991) Effect of Temperature and Relative Humidity on Germination and Germ Tube Development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, *Phytopathology* 81, 1480-1485.
43. Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R., and Escalant, J. V. (2002) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas : present status and outlook, *Network* (Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R., and Escalant, J. V, Eds.) First edit., pp 71–212, San Jose de Costa Rica.
44. Honma, Y., Nakabayashi, I., Tamaoki, D., Kasahara, H., Ishioka, N., Shimazu, T., Kasahara, H., Yamada, M., Karahara, I., and Kamisaka, S. (2003) Optical microscopy of *Arabidopsis* seedlings fixed in non-fresh FAA using Kennedy Fixation Tubes., *Uchu Seibutsu Kagaku* 17, 307-308.
45. Müller, W. H., Van Aelst, A. C., Humbel, B. M., Van Der Krift, T. P., and Boekhout, T. (2000) Field-emission scanning electron microscopy of the internal cellular organization of fungi., *Scanning* 22, 295-303.

46. Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., Dai, Y., and Wang, X. (2009) Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro., *Current Microbiology* 59, 584-592.
- 5 47. Beveraggi, A., Mourichon, X., and Salle, G. (1995) Comparative-Study of the First Stages of Infection in Sensitive and Resistant Banana Plants with *Cercospora-Fijiensis* (*Mycosphaerella-Fifiensis*), Responsible for Black Leaf Streak Disease, *Canadian Journal of Botany* 73, 1328-1337.
48. Jing, H.-C., Lovell, D., Gutteridge, R., Jenk, D., Korniyukhin, D., Mitrofanova, O. P.,
10 Kema, G. H. J., and Hammond-Kosack, K. E. (2008) Phenotypic and genetic analysis of the *Triticum monococcum*-*Mycosphaerella graminicola* interaction., *New Phytologist* 179, 1121-1132.
49. Masaphy, S., Levanon, D., Tchelet, R., and Henis, Y. (1987) Scanning Electron
15 Microscope Studies of Interactions between *Agaricus bisporus* (Lang) Sing Hyphae and Bacteria in Casing Soil, *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1132-1137.
50. Inbar, J., and Chet, I. (1992) Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers., *Journal of Bacteriology* 174, 1055-1059.
51. Zielecka, M., and Wenda, M. (2011) Progress in Organic Coatings Antimicrobial
20 additives for architectural paints and impregnates, *Scanning Electron Microscopy* 72, 193-201.
52. Campos Muñoz, A. (2010) Cell therapy with chondrocytes. Evaluation of cell viability in cultures, *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* 127, 269-281.
- 25 53. Semighini, C. P., and Harris, S. D. (2010) Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi., *Methods in Molecular Biology* 638, 269–279.
54. Chung, W. T., Lee, S. H., Kim, J. D., Park, Y. S., Hwang, B., Lee, S. Y., and Lee, H. Y. (2001) Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines., *Journal of bioscience and bioengineering* 92,
30 550-555.

55. Campos Ziegenbein, F., Hanssen, H.-P., and König, W. A. (2006) Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*., *Phytochemistry* 67, 202-211.
56. Jang, K.-J., Han, M.-H., Lee, B.-H., Kim, B.-W., Kim, C.-H., Yoon, H.-M., and Choi, Y.-H. (2010) Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells., *Journal of acupuncture and meridian studies*, Korean Pharmacopuncture Institute 3, 24-31.
57. Shimizu, M., and Wariishi, H. (2005) Development of a sample preparation method for fungal proteomics., *FEMS Microbiology Letters* 247, 17-22.
58. Muñoz, K., Bravo, K., Zapata, P., and Londoño, J. (2007) Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización, *Scientia et Technica XIII*, 161-164.
59. Bajorath, J., Hinrichs, W., and Saenger, W. (1988) The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium., *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 176, 441-447.
60. Phansri, K., Sarnthima, R., Thammasirirak, S., Boonchalee, P., and Khammuang, S. (2011) Antibacterial Activity of *Bauhinia acuminata* L. Seed Protein Extract with Low Hemolytic Activity Against Human Erythrocytes, *Chiang Mai Journal of Science* 38, 242-251.
61. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical biochemistry* 72, 248-54.
62. Rodríguez, A. (2010) Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum*, *Planta*, Universidad de Extremadura.
63. CLSI. (2009) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard — Second Edition, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 28, 1-35.
64. Espinel-Ingroff, A., Canton, E., and Peman, J. (2009) Updates in antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *Current Fungal Infection Reports* 3, 133-141.

65. Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. R., and Gray, A. I. (2007) Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts., *Methods* 42, 325-329.
- 5 66. Mesa, A. M., Saez, J., Blair Trujillo, S., and Arango, E. (2007) Actividad antiplasmodial de extractos de la planta *Calophyllum lucidum*, *Scientia et Technica Año 13*, 217-219.
67. Hall, G., and Parshall, S. (2002) Use of the concentration gradient diffusion assay (Etest) for susceptibility testing of anaerobes, fungi, and *Mycobacterium* spp., *Clinical Microbiology Newsletter* 24, 105-109.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener sustancias con actividad antifúngica contra
5 *Mycosphaerella fijiensis* que incluye los siguientes pasos:

- a- inocular *Ganoderma lucidum* en un medio de cultivo adecuado;
- b- obtener una biomasa bajo condiciones ambientales específicas; y
- c- obtener de la biomasa un extracto proteico.

10

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1 donde el medio de cultivo adecuado contiene una fuente de carbono compleja, macroelementos, microelementos o una mezcla de los mismos.

15 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 donde el medio de cultivo adecuado está seleccionado del grupo que consiste en NaNO₃; KH₂PO₄; MgSO₄.7H₂O; KCl; harina de cereales y una mezcla de los mismos dentro de una matriz sólida, semisólida o líquida, en sistemas manuales o mecánicamente automatizados.

20 4. Un procedimiento según la Reivindicación 1 donde las condiciones ambientales específicas incluyen, radiación electromagnética, temperatura, sistemas de iluminación, agitación y pH.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 4 donde la radiación electromagnética
25 proviene de un dispositivo tecnológico con una superficie reflectora que emite una longitud de onda en el rango de 300 a 800 nm.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 5 donde la longitud de onda que proviene del dispositivo tecnológico está en el rango de 400 a 550 nm.

30

7. Un procedimiento según la Reivindicación 4 donde la longitud de onda de la radiación electromagnética genera expresión diferencial, cualitativa y cuantitativa de proteínas y de otras moléculas bioactivas, seleccionadas del grupo que consiste en polisacáridos, triterpenoides, ácidos ganodéricos y ácidos grasos.
- 5
8. Un procedimiento según la Reivindicación 1 donde la obtención del extracto proteico comprende las etapas de:
- a. lavar la biomasa con un buffer adecuado mediante centrifugación;
 - 10 b. homogenizar con solución de lisis en varios ciclos;
 - c. dejar en reposo y filtrar;
 - d. centrifugar y separar el lisado;
 - e. adicionar un surfactante no iónico y un polímero hidrosoluble al lisado y homogenizar;
 - 15 f. dejar en reposo y centrifugar;
 - g. adicionar un solvente orgánico hasta obtener un precipitado; y
 - h. disolver el precipitado con buffer adecuado.
9. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde la solución de lisis se selecciona
- 20 del grupo conformado por un buffer de fosfatos; un surfactante no iónico; un polímero hidrosoluble y una mezcla de los mismos.
10. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde el buffer adecuado es un buffer de fosfatos con un pH entre 5,0 y 9,0.
- 25
11. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde el surfactante no iónico es un derivado de oxido de polietileno.
12. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde el polímero hidrosoluble es
- 30 polivinilpirrolidona.

13. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde la homogenización y la centrifugación se lleva a cabo a una temperatura entre 0 y 40°C.
14. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde se realizan entre 5 y 50 ciclos de homogenización con solución de lisis.
15. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde la homogenización y la centrifugación se llevan a cabo en intervalos de tiempo entre 0,1 y 30 minutos.
16. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde la velocidad de homogenización está entre de 5000 y 25000 rpm.
17. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde la velocidad de centrifugación está entre de 6000 y 15000 rpm.
18. Un procedimiento según la Reivindicación 8 donde se adiciona un solvente orgánico en una relación v/v de 1:1, 2:1, 3:1, 1:3 o 1:2 con respecto al lisado.
19. Un procedimiento según la Reivindicación 1 donde el extracto protéico adicionalmente se caracteriza mediante espectrometría de masas.
20. Un extracto proteico de *Ganoderma lucidum*, que comprende al menos una familia de proteínas seleccionado del grupo que consiste de: proteasas, peroxidasas, nucleasas, lacasas, inmunomonucleasas, fosfatasas, deshidrogenasas, sintasas, oxidasas, polimerasas, desmetilasas o una mezcla de las mismas.
21. Un extracto proteico de *Ganoderma lucidum* según la Reivindicación 20, que exhibe actividad antifúngica.
22. Un extracto proteico de *Ganoderma lucidum* donde la actividad antifúngica tiene un efecto significativamente mayor cuando la biomasa se obtiene bajo un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.

23. Un extracto proteico de *Ganoderma lucidum* según la Reivindicación 20 que exhibe inhibición sustancial contra *Mycosphaerella fijiensis*.
24. Una familia de proteínas del extracto de *Ganoderma lucidum* según la
5 Reivindicación 20 que exhibe inhibición sustancial contra *Mycosphaerella fijiensis*.
25. Una formulación que comprende una o más proteínas del extracto proteico de *Ganoderma lucidum*, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 10 26. Un procedimiento para obtener el extracto etanólico de *Ganoderma lucidum* que comprende las etapas de:
- a- inocular *Ganoderma lucidum* bajo condiciones ambientales adecuadas;
 - b- obtener una biomasa;
 - 15 c- macerar la biomasa con etanol al 96% v/v
 - d- extraer y solubilizar con ultrasonido;
 - e- filtrar;
 - f- evaporar el solvente; y
 - g- disolver en un buffer adecuado.
- 20
27. Un procedimiento según a la Reivindicación 26 donde el buffer adecuado es un buffer de fosfatos con pH entre 5,0 y 9,0.
28. Un extracto de *Ganoderma lucidum* que comprende triterpenoides y ácidos grasos y
25 exhibe actividad antifúngica.
29. Una formulación que comprende un extracto de *Ganoderma lucidum* según la Reivindicación 28, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 30 30. Un extracto etanólico de *Ganoderma lucidum* que exhibe actividad antifúngica.

31. Un extracto etanólico de *Ganoderma lucidum* que exhibe inhibición sustancial de *Mycosphaerella fijiensis*.
32. Una formulación que comprende un extracto etanólico de *Ganoderma lucidum*,
5 junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
33. Un procedimiento para obtener el extracto protéico de una biomasa que comprende las etapas de:
- 10 a. lavar la biomasa con un buffer adecuado mediante centrifugación;
b. homogenizar con solución de lisis en varios ciclos;
c. dejar en reposo y filtrar;
d. centrifugar y separar el lisado;
e. adicionar un surfactante no iónico y un polímero hidrosoluble al lisado y
15 homogenizar;
f. dejar en reposo y centrifugar;
g. adicionar un solvente orgánico adecuado hasta obtener un precipitado;
h. disolver el precipitado con buffer adecuado.
- 20 34. Uso de *Ganoderma lucidum* para la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.
35. Uso del extracto proteico de *Ganoderma lucidum* para la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.
25
36. Uso del extracto etanólico de *Ganoderma lucidum* para la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.
37. Uso de una o más proteínas del extracto protéico de *Ganoderma lucidum* para la
30 inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

38. Uso del extracto proteico de *Ganoderma lucidum* para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos agrícolas convencionales y no convencionales.

5 39. Uso del extracto proteico de *Ganoderma lucidum* para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos de musáceas.

40. Uso de una o más proteínas del extracto protéico de *Ganoderma lucidum* para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos agrícolas convencionales y no convencionales.

10

41. Uso del extracto etanólico de *Ganoderma lucidum* para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos agrícolas convencionales y no convencionales.

15

RESUMEN

La presente invención se refiere a un nuevo proceso para potenciar la producción de sustancias con actividad antifúngica obtenidas a partir de *Ganoderma lucidum*, utilizando
5 un dispositivo tecnológico para la expresión diferencial, cualitativa y cuantitativa de proteínas y de otras moléculas bioactivas seleccionadas del grupo que consiste en polisacáridos, triterpenoides, ácidos grasos y ácidos ganodéricos. Las composiciones que contienen dichas sustancias presentaron actividad antifúngica e inhibidora del crecimiento micelial y germinación de ascosporas de hongos, entre ellos los de *Mycosphaerella*
10 *fijiensis*, principal agente patógeno causal de la enfermedad Sigatoka negra en cultivos de banano y plátano.