

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y

AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



OBTENCIÓN DE CEPAS SILVESTRES DE *Ganoderma lucidum* Y LA CARACTERIZACIÓN DE UNA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

TRABAJO QUE CON EL CARACTER DE

TESIS

PRESENTA

C. DIEGO ROLANDO DOMÍNGUEZ LÓPEZ

PARA OPTAR POR EL GRADO LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Director: Dr. Conrado Soto Velazco

Zapopan, Jalisco, Mayo del 2012

AGRADECIMIENTOS

“El conocimiento aislado, aun si crece durante su incubación, no basta, si esté no es cosechado y compartido, perderá el valor de su fructificación. “

Agradezco a todas aquellas personas, que con su apoyo y colaboración contribuyeron a la exitosa conclusión de esta tesis.

A mi Madre, por enseñarme que la satisfacción se encuentra en mis propios progresos, que la dedicación y el esfuerzo siempre han de llevarme lejos, por guiarme y mantenerme recto, por ser más que nada la razón de este esfuerzo.

A mi tía Paz, por mantenerse firme y al tanto de mi desarrollo personal, escolar y laboral, por su apoyo y consejo constante.

A mis hermanos y familia, que han presenciado con interés y orgullo, mi evolución como estudiante, que ahora me convierte en Biólogo.

A todas las personas que siendo ajenas a mi familia, me apoyaron y alentaron a continuar con ahínco y perseverancia en este camino de arduo trabajo y basto conocimiento.

El Dr. Conrado Soto Velasco, por su guía y constante enseñanza; a él Dr. Ramón Rodríguez Masías por su incondicional apoyo, y a Cindy Alicia Martínez Martínez por su apoyo y colaboración.

A todos mis amigos por su apoyo moral y al muro por ser el lugar idóneo para el esparcimiento y creación de nuevas ideas.

Un guerrero toma su suerte, sea la que sea,
y la acepta con la máxima humildad.
Se acepta con humildad así como es,
no como base para lamentarse,
sino como base para su lucha y
su desafío.

Don Juan Matus

La presente
Investigación se desarrolló
en el Departamento de Botánica y
Zoología del Centro Universitario de
Ciencias Biológicas y Agropecuarias de
la Universidad
de Guadalajara
bajo la dirección
del Dr. Conrado
Soto Velazco

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
Características del genero <i>Ganoderma</i>	3
Características de la especie	3
Cultivos para la obtención de carpofóros de <i>G. lucidum</i>	4
Generalidades de los polisacáridos	7
Polisacáridos microbianos	8
Biosíntesis de los polisacáridos	9
II. JUSTIFICACION	10
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA	11
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
V. OBJETIVOS	13
VI. HIPOTESIS	14
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Recolección del material biológico	15
Aislamiento y preservación de las cepas silvestres de <i>G. lucidum</i>	15
Caracterización morfológica de la cepa G4 en medio sólido	16
Determinación de la tasa específica de crecimiento micelial en los tres medios de cultivo sólido	16
Determinación de la biomasa micelial en medios de cultivo sólido	18
Determinación de la biomasa micelial en medios de cultivo líquido	18
Cuantificación de la concentración de exopolisacáridos de <i>G. lucidum</i> en los medios de cultivo líquido	19
Prueba de fructificación de la cepa G4 de <i>G. lucidum</i>	20

VIII. RESULTADOS	22
Recolecta del material biológico	22
Aislamiento y preservación del material biológico	25
Caracterización morfológica de la cepa G4 en medios sólidos	26
Tasa específica de crecimiento micelial para cepa G4 de <i>G. lucidum</i> en medios de cultivo sólido	31
Determinación del peso seco micelial de la cepa G4 en medios de cultivo sólido	33
Determinación del peso seco micelial de la cepa G4 en medios de cultivo líquido	35
Cuantificación de la concentración de exopolisacáridos de <i>G. lucidum</i> en cultivo de células en suspensión	37
Prueba de fructificación de la cepa G4 de <i>G. lucidum</i>	46
IX. DISCUSIÓN	48
X. CONCLUSIONES	51
XI. LITERATURA CITADA	52
XII. ANEXOS	57

Resumen

Se recolectaron especímenes de *Ganoderma lucidum* de tres localidades de bosque de pino encino del estado de Jalisco. Se aislaron cinco cepas de esta especie para caracterizar la morfología del crecimiento micelial. Se seleccionó la cepa G4 por su rápido crecimiento micelial, textura algodonosa y más vigor. En los Medios de cultivo sólido se obtuvieron crecimientos algodonosos, fibrilosos y con placas costrosas de micelio. La coloración del micelio fue de blanco a amarillento de acuerdo al medio de cultivo. La biomasa se estimó de acuerdo al peso seco del micelio formado en los diferentes medios de cultivo sólido y líquido. La tasa de crecimiento micelial fue de 13 a 20 mm/día en los diferentes medios de cultivo sólido. Las diferentes concentraciones de exopolisacáridos en los medios de cultivo líquido que se obtuvieron van desde 0.425 a 0.77 g/l. Se utilizaron mezclas de aserrín de encino adicionado con celulosa y nitrógeno para la obtención de los cuerpos fructíferos. Se obtuvo una eficiencia biológica de 21.5 %.

I. Introducción

Los hongos constituyen un reino de la naturaleza independiente de las plantas y de los animales, ya que comparten características de ambos, es un grupo muy variado y polimórfico que se encuentra prácticamente en todos los ambientes, su nombre “fungus” significa florecimiento o excrecencia de la tierra aplicado por Tournefort en el siglo XVII (Basse, 1950). Este término coincide con el que los purépechas utilizaban para referirse a los hongos, “echeri uetsikuaro enganaka” que quiere decir nacido de la tierra (Mapes *et al.*, 1981). Otras comunidades indígenas en diversas regiones de la república Mexicana, dan nombres vernáculos a las diferentes especies y grupos de hongos, además de poseer amplio conocimiento en micofagia local. Así mismo, existe gran cantidad de hongos que han sido identificados, entre los cuales, muchos se consideran comestibles, por lo que la disponibilidad actual en técnicas de cultivo de hongos, ha sido de gran interés y se ha visto satisfactoriamente aceptada y aplicada por las comunidades rurales.

Se calculó que podrían existir entre 140,000 y 200,000 especies de hongos en el planeta, y que dada la gran diversidad que pueden encontrarse en México, se podría duplicar lo estimado (Guzmán, 2000). De las 150 especies conocidas de hongos comestibles de los cuales algunos contienen propiedades medicinales solo la mitad es cultivada, solo algunas especies con fines comerciales, mientras que la otra mitad se encuentra de manera silvestre (Chang, 1972). La importancia ecológica de esta actividad radica en la utilización y reciclaje acelerado de millones de toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales utilizados como sustrato en el proceso de cultivo (Chang, 1999; Kues y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004). Sin embargo, es poco conocido su gran potencial como alimento funcional con propiedades nutricionales y medicinales que promueven la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos ampliamente consumidos (Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

En México el consumo de hongos comestibles y medicinales data de la época prehispánica, esta tradición ubicada principalmente en el centro del país, también está presente de manera notable en algunas regiones del sureste del país, en este lugar el clima es templado y la vegetación local permiten la prosperidad del hongo de manera natural, en estos lugares se les considera como un recurso muy apreciado (Guzmán, 2000).

En México el interés por los hongos con propiedades medicinales en especial los que se refieren al género *Ganoderma*, ha crecido considerablemente, por lo que en diversas instituciones de investigación se han iniciado trabajos para el aislamiento y caracterización de cepas nativas de hongos medicinales con el fin de desarrollar los métodos adecuados para su cultivo (Soto-Velazco *et al.*, 2002).

En ciertas regiones de los países asiáticos, utilizan algunos hongos como base de su medicina tradicional. Los más conocidos en occidente son el Shiitake (*Lentinula edodes*) y el Reishi (*G. lucidum*). Este último, ha sido estudiado intensamente en los últimos años, por la gran cantidad de propiedades medicinales y compuestos bioactivos que se le atribuyen a los carpofóros, en los que se encuentran incluidos más de 119 tipos de triterpenos diferentes y varios tipos de polisacáridos (Hsieh y Yang, 2004). Investigaciones recientes demostraron el efecto a nivel molecular en la prevención y terapia del cáncer (Sliva, 2006). Así como la actividad en la protección del hígado, la hipoglucemia e inhibición en la agregación plaquetaria (Hsieh y Wu, 2002). Posee también la capacidad de regular la respuesta inmunológica (Lin *et al.*, 2005 y Soto-Velazco *et al.*, 2002). Además de su uso en la hipertensión y la neoplasia (Shiao *et al.*, 1992).

La creciente demanda que han generado los carpofóros de *G. lucidum* por sus comprobadas propiedades y para la obtención de sus metabolitos, ha creado la necesidad de encontrar alternativas a las desventajas que presenta el cultivo sólido convencional, tales como, tiempo de fructificación, dificultad para controlar las plagas, y elevados costos de los substratos. En el caso del cultivo de células en suspensión, los compuestos pueden obtenerse a partir del micelio (Kim *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2002). Por esto, se ve como una alternativa prometedora en la eficiente producción de sus valiosos bioactivos en tiempos y costos menores.

Características del genero *Ganoderma*

El género *Ganoderma* pertenecen al reino Fungí de la división Basidiomycota, orden Ganodermatales de la familia Ganodermataceae (Herrera y Ulloa, 1990 y Arora, 1986). Desarrollan el cuerpo fructífero sobre los troncos de arboles caducos o raíces muertas. Sus basidiomas son anuales o perenes en forma de repisa, pileados, sésiles y estipitados central o lateralmente. La superficie del píleo está cubierta por una costra resinosa lisa de color opaca a brillante, con una cutícula distintiva de color café en varios tonos a purpura oscuro, los poros son de pequeños a medianos con borde entero blanquecinos, ocráceos a color café. El sistema hifal es trimítico, las basidiosporas son truncadas de grande a muy grande (7-25 μm de longitud), amarillas a color café, ovoides a elipsoides con un delgado *perisporium*, *exosporium* ornamentado y *endosporium* muy grueso (Núñez y Ryvardeen, 2000; Herrera y Ulloa, 1990). Las especies de *Ganoderma* se encuentran entre los hongos que son capaces de crecer bajo condiciones elevadas de temperatura y humedad. Este género presenta distribución mundial y crece en una gran diversidad de climas incluyendo las zonas tropicales e incluso las templadas. El género *Ganoderma* actúa como parasito, saprobio y en ocasiones como parasito facultativo (Moncalvo y Ryvardeen, 1998).

Características de la especie

G. lucidum (Fr.)Karst forma basidiomas centrales o laterales con el estípite irregularmente cilíndrico, noduloso de color rojizo y lacado, con píleo flabeliforme de color pardo rojizo, protegidos por una capa cortical depreciable, brillante y lacada. Bajo ella se encuentra el contexto de color pardo ferruginoso y una capa ancha de tubos del mismo color, que se abren al exterior mediante poros blanquecinos al principio, pardo-ferruginoso al final de la maduración de las esporas. Las esporas son de color pardo, elipsoidales y truncadas, provistas de dos capas: un *exosporium* hialino y un *endosporium* pardo verrugoso.

G. lucidum crece como saprobio en tocones y árboles caducos como robles y otras maderas duras, nunca en pinos, se desarrolla de los 1000 a 2000 msnm (Stamets, 2000). Se encuentra distribuido por todo el mundo, en zonas tropicales y zonas templadas, incluido Norteamérica, Sudamérica, África, Europa y Asia (Arora, 1986). En el sur de Estados Unidos de Norteamérica y la costa del golfo de México se tienen la mayor cantidad de registros de esta especie (Gilbertson y Ryvardeen, 1986). El carpofóro es conocido en Japón como "Reishi" y en China "Língzhí" (Wagner *et al.*, 2003). Fang y Zhong a, b y c (2002) mencionan su uso como alimento sustentable y en la medicina tradicional durante más de 2000 años.

En la actualidad existen numerosos debates en cuanto a la clasificación taxonómica de *G. lucidum*, así algunos micólogos consideran que *G. lucidum* y *G. curtisii* son la misma especie debido a su apariencia similar y la similitud de sus hábitats, mientras que otros las consideran especies diferentes debido a que *G. curtisii* mantiene un brillante color amarillo y la restricción geográfica al sudeste de Estados Unidos. En "North American Polypores," Gilbertson y Ryvarden (1986), no consideran *G. curtisii* una especie separada de *G. lucidum*. Otro hongo que se le asemeja es *G. oregonense*, que al igual que *G. tsugae* crece en las coníferas y se encuentra en el noroeste del Pacífico y Nuevo México. *G. oregonense* puede alcanzar hasta 1 m de ancho y tiene un poco más grande las esporas que las de *G. lucidum* y *G. tsugae*. La taxonomía de las especies de *Ganoderma* no es clara y se considera que el género está en un estado taxonómico crítico (Ryvarden, 1994; Mendoza *et al.*, 2011). La clasificación de las especies de *Ganoderma* ha sido basada en descripciones morfológicas, fisiológicas y químicas (Takamatsu, 1998). Como resultado el concepto de especie en este género no está bien establecido ni aceptado universalmente (Gottlieb *et al.*, 2000).

Los diversos experimentos que se han llevado a cabo durante las últimas décadas han demostrado que la morfología y la cantidad de metabolitos presentes en los carpoforos de *G. lucidum* difieren de las condiciones del cultivo tales como: la zona en que se cultiva, la temperatura, la humedad relativa, la luminosidad, la disponibilidad y la cantidad de nutrientes para el desarrollo del hongo. Esto significa que un gran número de sinónimos existen debido al número de especies que han sido identificadas apoyándose en características morfo-descriptivas (Moncalvo, 2000; Chen, 1993; Steyaert, 1972 y 1975).

Cultivos para la obtención de carpoforos de *Ganoderma lucidum*.

La cultura China y Japonesa consideran a *G. lucidum* como el rey de los hongos medicinales, ya que está asociado con buena salud y longevidad. El cultivo de este hongo ha tomado especial interés en las últimas décadas gracias a la gran cantidad de propiedades medicinales que se le atribuyen. Naoil (1970) logró la producción en masa de los carpoforos y los procesos se han desarrollado rápidamente desde entonces (Mizuno, 1997). Los cultivos sólidos fueron ampliamente adoptados por los cultivadores para su producción comercial, el cual se lleva a cabo en madera leñosa o tocones de árboles, así como en mezclas de aserrín enriquecido con fuentes de carbono y nitrógeno (fig. 1) (Stamets, 2000). Una ventaja del uso de esta última técnica de cultivo es que el tiempo de producción es corto y los rendimientos son altos, además de esto los substratos

pueden ser modificados para obtener mejores resultados (Soto-Velazco *et al.*, 2002).

En resumen y como lo muestra la figura 1, primero se elaboran mezclas de aserrín con suplementos de nitrógeno y celulosa, posteriormente son llenadas bolsas con estas mezclas para después ser esterilizadas, por otro lado es preparado el inóculo que será distribuido uniformemente sobre el sustrato frío, el siguiente paso es llevar las bolsas una sala de incubación hasta que el micelio coloniza todo el sustrato. Enseguida se disminuye la temperatura y los altos niveles de dióxido de carbono hasta que se forman los basidiomas. Una vez alcanzada la madurez de los carpóforos son cosechados. El tiempo de cultivo desde la elaboración del inóculo hasta la obtención de los basidiomas varía de 90 a 120 días, que depende del método de cultivo (Stamets, 2000).

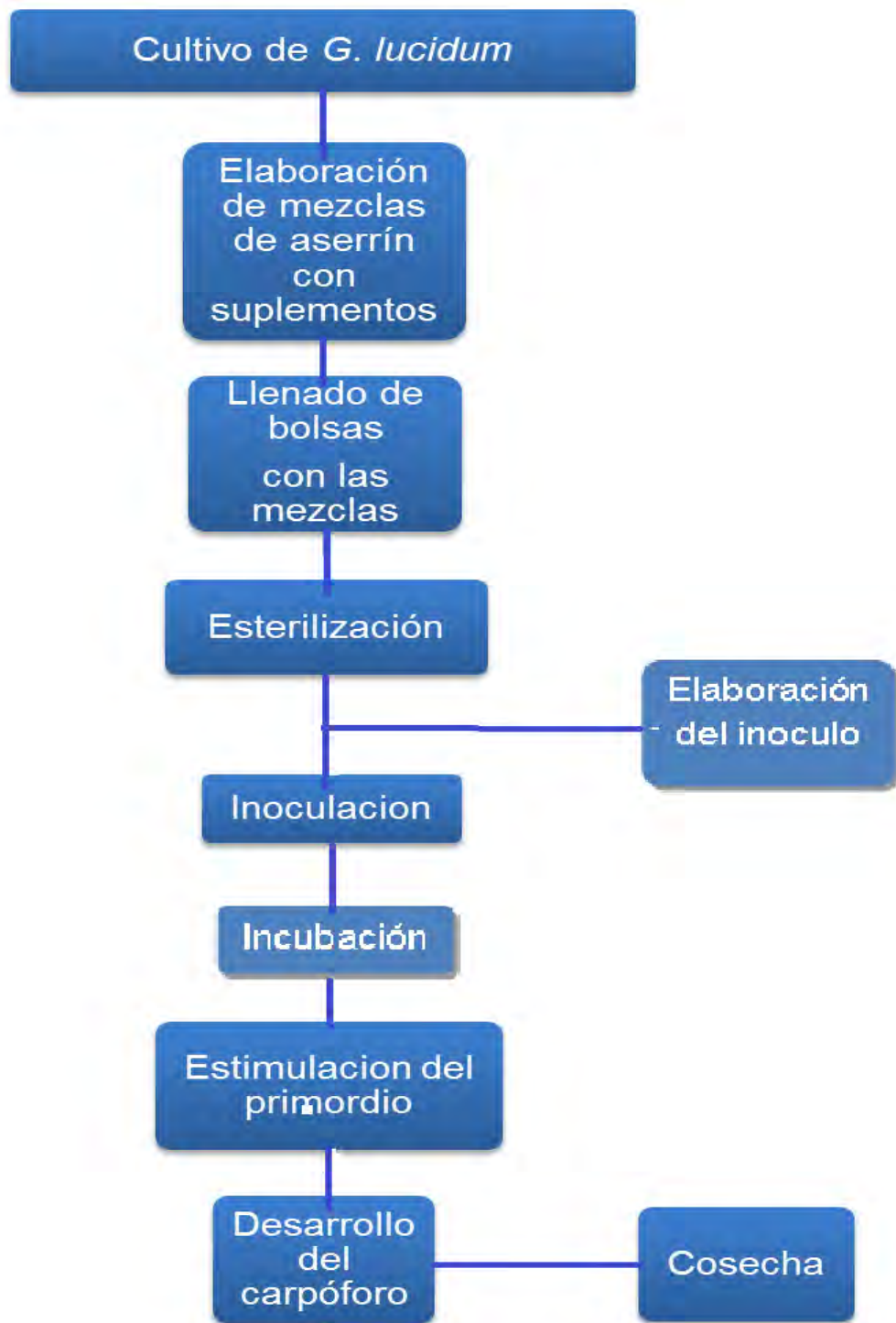


Figura 1. Diagrama de flujo para el cultivo de *G. lucidum* en mezclas de aserrín suplementado.

Generalidades de los polisacáridos

Los polisacáridos son macromoléculas de origen natural y están constituidos por material polimérico que puede disolverse o dispersarse en agua para formar soluciones, suspensiones viscosas o geles. Los polisacáridos se clasifican en tres grandes grupos (Glicksman, 1969 y Wells, 1977):

1. Naturales que provienen de exudados de árboles (arábica, tragacanto, etc.), extractos de plantas (pectina), extractos de semilla (güar, algarrobo), algas marinas (agar, alginatos, carragenina), almidones de cereales (maíz, sorgo), almidones de tubérculos (papa, tapioca), almidones animales (glucógeno), proteínas animales (gelatina, caseína), proteínas vegetales (soya) y polisacáridos microbianos (dextrana, xantana, β -glucanos, etc.).
2. Polisacáridos modificados o semisintéticos derivados de celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etc.), almidones (dextrinas, acetatos de almidón, etc.) y otros (metoxipectina, alginato de propilenglicol).
3. Finalmente los polisacáridos sintéticos que se derivan de petroquímicos tales como alcohol polivinílico, polímeros de óxido de etileno.

Sus usos han sido muy variados desde la antigüedad, debido principalmente a su capacidad de alterar las propiedades del flujo del agua, ya sea como viscosificantes, gelificantes o agentes suspensores. Sin duda los polisacáridos industriales más recientes en el mercado son los producidos por los microorganismos. Este hecho se fundamenta, principalmente, en que los polisacáridos de origen microbiano poseen propiedades *sui generis* que en algunos casos, superan en características funcionales a los polisacáridos de origen vegetal, de algas y sintéticos. Por otra parte el producirlos por vía microbiana presenta ventajas adicionales:

- Su producción no depende de condiciones climáticas ni de recolección.
- Puede producirse en zonas en las cuales las condiciones no permiten el desarrollo de polisacáridos naturales.
- Es factible el uso de varias materias primas regionales.
- Al no depender de materias primas estacionales ni de limitaciones en la recolección, la escala de producción depende solo del mercado.
- Se logra mayor uniformidad en las propiedades, pureza y características de calidad puesto que su biosíntesis es en general muy específica.

- Permite alterar potencialmente las características de los microorganismos productores con el fin de mejorar la producción o producir polisacáridos con propiedades específicas, esto no es posible con los demás polisacáridos naturales.

Entre las desventajas se cuenta con el alto costo de capital de las plantas de proceso, principalmente debido a los costos de adquisición e instalación del equipo de fermentación, y al uso intensivo de energía requerida por los fermentadores y equipos de producción.

Polisacáridos microbianos

Los microorganismos producen por lo menos tres tipos de polisacáridos: estructurales, como algunos constituyentes de la pared celular, intracelulares de reserva, como el glicógeno y extracelulares.

Los polisacáridos microbianos extracelulares son de dos tipos: los que forman una capa alrededor del microorganismo o capsulares, y aquellos se solubilizan en el medio de cultivo e incrementan, sustancialmente, la viscosidad del caldo de fermentación. Estructuralmente pueden ser de dos tipos: homopolisacáridos constituidos por la misma unidad manométrica estructural, y heteropolisacáridos la unidad monomérica formada por más de una azúcar. Desde el punto de vista industrial, los polisacáridos microbianos solubles tienen mayor potencial en vista de que pueden ser recuperados en concentraciones mayores a partir de caldo de cultivo (Kang y Cottrell, 1969; Evans *et al.*, 1979).

Los polisacáridos extracelulares son producidos para protección contra condiciones adversas (protección a sequedad, radiaciones, ataque de fagos y amibas), adhesión a superficies sólidas que permiten explotar concentraciones de iones en la superficie o servir como adhesivo a superficies sólidas e incremento de su patogenicidad los cuales destruyen la estructura defensiva de las plantas y facilitan la dispersión de la infección a través de los tejidos.

Biosíntesis de los polisacáridos

Los homopolisacáridos son sintetizados generalmente mediante una enzima de transglucosidación, la cual adiciona unidades monomérica eliminando agua entre un grupo hidroxilhemiacetálico, de una unidad, y un grupo hidroxilo disponible, de la otra unidad.

Los heteropolisacáridos son sintetizados mediante reacciones multienzimáticas dentro de la célula. Aunque no han sido totalmente dilucidadas las rutas biocinéticas, el proceso en general es: las unidades de oligosacáridos se sintetizan a partir de precursores, azúcares activados en forma de azúcar-nucleótidos-fosfatados, los cuales unen secuencialmente a un lípido isoprenoide que sintetizan las unidades monomérica que son transferidas a otro lípido isoprenoide para iniciar la polimerización. El lípido también sirve como acarreador del polímero formado a través de la membrana celular en el que es liberado (Sutherland, 1977).

II. Justificación

Por todas las propiedades que se le han comprobado al hongo *Ganoderma lucidum* y por la creciente demanda de los carpofóros para la obtención de los bioactivos de interés, así como las desventajas que muestran los métodos convencionales de cultivos sólidos, tales como el tiempo de fructificación, dificultad para controlar las plagas, además de los elevados costos de los substratos, surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas que nos permitan obtener los metabolitos de interés en un tiempo mucho menor y con un costo más bajo y de esta manera brindar solución a las desventajas que presenta el cultivo sólido tradicional. En el caso del cultivo de células en suspensión, los compuestos bioactivos se pueden obtener a partir del micelio. Por lo tanto, el cultivo sumergido de células de *G. lucidum* se ve como una alternativa prometedora para la producción eficiente de sus valiosos bioactivos en tiempos más cortos y costos más bajos.

III. Revisión de la literatura

Investigaciones que se han llevado a cabo recientemente en hongos con propiedades medicinales están enfocadas a determinar los métodos adecuados para la mayor producción de biomasa y exopolímeros en diferentes medios de cultivo (Kim *et al.*, 2002 y 2006; Tang y Zhong, 2002). También se ha demostrado que el control de la densidad de inoculación es relevante para el crecimiento celular, la morfología del micelio y la producción de ácidos ganodéricos y polisacáridos en *G. lucidum*, así un pellet pequeño tiene mayor producción de polisacáridos mientras que un pellet grande produce más ácidos ganodéricos en cultivos sumergidos (Fang *et al.*, 2002). Ramírez-Cadavid *et al* (2010) demostraron que corrientes alternas de 1.5 kV^{-1} aplicado al tercer día de la incubación del micelio aumenta considerablemente la producción de biomasa micelial, mientras que la adición de oxígeno al medio tiene un impacto favorable sobre la producción de biomasa y la biosíntesis de ácidos ganodéricos (Zhang *et al.*, 2010 y Zhong *et al.*, 2002).

El pH inicial de 3.5 a 6.5 y una concentración inicial alta de glucosa de 50 g/l en los medios de cultivo líquidos contribuyen a una elevada producción de polisacáridos y ácidos ganodéricos de *G. lucidum* (Fang y Zhong, 2002 b). Los ácidos grasos añadidos al medio de cultivo líquido, tales como el ácido oleico aumentan la concentración celular mientras que el ácido palmítico aumenta la producción de polisacáridos en el cultivos suspendidos (Yang y Kuo, 2000). Lee *et al.* (1999) demostraron que el fosfato de amonio tiene un efecto negativo en el crecimiento celular y la producción de exopolisacáridos, así concentraciones bajas o nulas de fosfato de amonio dan como resultado mayor producción de exopolisacáridos. Recientemente en México hay investigaciones dirigidas a estudiar la diversidad de los recursos genéticos de *G. lucidum* y su relevancia para el desarrollo rural (Tello, 2010).

IV. Planteamiento del problema

Los hongos desempeñan un papel muy importante en la naturaleza en especial los saprobios, ya que ayudan a degradar la materia orgánica y reincorporar los nutrientes al suelo, además de que algunos contienen potentes compuestos bioactivos tales como: ácidos, terpenos y polisacáridos β -glucanos, los cuales se han utilizado en la medicina tradicional y moderna por muchos países para el tratamiento y prevención del cáncer, también se ha demostrado que los polisacáridos β -glucanos tienen la capacidad de regular el sistema inmune.

Actualmente el cultivo comercial de *Ganoderma lucidum* representa una industria mundial en constante crecimiento, ya que los compuestos bioactivos purificados y aislados de los carpofóros son una alternativa confiable para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al humano tales como hipertensión, diabetes, glicemias, cáncer y algunas enfermedades producidas por virus. Las especies del género *Ganoderma* contienen diferentes niveles de compuestos bioactivos. *G. lucidum* es el que produce mayor cantidad de polisacáridos y ácidos ganodéricos, pero esto dependerá de las condiciones ambientales que afectan las características morfológicas, macroscópicas y microscópicas, así como también la conformación de los metabolitos y su actividad biológica, de ahí su dificultad de identificar las especies al momento de recolectarlas.

Los métodos del cultivo sólido de *G. lucidum* para la obtención de carpofóros han cambiado poco en los últimos años, se sigue sembrando en troncos de arboles caducos o bolsas con mezclas aserrín y otros materiales lignocelulósicos, pero estos métodos son tardados de 5 a 8 meses desde el aislamiento de la cepa. Además de los altos costos de los substratos, las dificultades para controlar las plagas y los ambientes artificiales óptimos para el desarrollo de los carpofóros. Por otro lado el cultivo sumergido de células de *G. lucidum* parece ser una alternativa más prometedora, ya que se pueden obtener los metabolitos secundarios de interés a partir del micelio, al reducir tiempos y espacios para su producción, el único inconveniente es el elevado costo de los reactivos biológicos utilizados en el laboratorio para la producción de los metabolitos secundarios de interés.

Por lo anterior se requiere realizar un estudio que permita desarrollar técnicas que permitan obtener los bioactivos de interés a partir de métodos convencionales y con reactivos biológicos de bajo costo, utilizados cotidianamente, que permitan la obtención de los metabolitos y reducir los costos de producción de manera considerable, para que así este tipo de compuestos esté al alcance de toda la gente que lo requiera ya que es una alternativa en la medicina tradicional para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades que atacan al humano.

V. Objetivos

Generales

- Obtener cepas silvestres de *G. lucidum* del estado de Jalisco y su cultivo en aserrín para la obtención de carpofóros.
- Caracterizar una cepa nativa del estado de Jalisco para la producción de exopolisacáridos en cultivos sumergidos.

Particulares

- Analizar si existen diferencias en el crecimiento radial del micelio en tres medios de cultivos sólidos.
- Evaluar la formación de biomasa micelial en tres diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos.
- Evaluar seis medios de cultivo líquidos para la producción de exopolisacáridos.
- Cultivar una cepa nativa del estado de Jalisco para la obtención de carpofóros.

VI. Hipótesis:

Es posible la obtención de cepas silvestres de *G. lucidum* y su caracterización para la producción de exopolisacáridos.

VII. Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA de la Universidad de Guadalajara. Los esporomas fueron recolectados en recorridos por bosque de pino-encino del estado de Jalisco: una zona de recolecta fue situada en el bosque “La Primavera” que se ubica en la región central del estado, en los municipios de Tala, Tlajomulco de Zúñiga, El Arenal y Zapopan, es el bosque más cercano a la ciudad de Guadalajara, que se localiza al poniente de la misma. La otra zona de recolecta se encontró en el bosque de pino-encino de la Sierra de Quila, que se encuentra a 100 Km. de la ciudad de Guadalajara. Esta área natural protegida incluye los municipios de Ameca, Atengo, Cocula, San Martín Hidalgo, Tecolotlán y Tenamaxtlán.

Recolección del material biológico

El esporoma una vez localizado fue identificado por las características morfológicas típicas de la especie y cortado desde la base del estípite con una navaja filosa de tal manera de que el micelio no se dañara y así asegurar las futuras fructificaciones, después de que el material biológico se recolectó fue llevado de inmediato al laboratorio en canastas tapadas con una tela, que permitiera el intercambio gaseoso que siguen manteniendo los especímenes, además de disminuir en lo posible la deshidratación, ya que es necesario que logren llegar al laboratorio lo más frescos posibles, para así asegurar que el micelio permanezca viable y permita su aislamiento para la obtención de la cepa.

Aislamiento y preservación de las cepas silvestres de *G. lucidum*

Los basidiomas de *G. lucidum* fueron seleccionados y se limpiaron con una brocha para eliminar el exceso de hojas y tierra que pueden fungir como contaminantes externos. En total se seleccionaron cinco localidades con sus respectivos especímenes para su aislamiento micelial. Para el aislamiento del micelio y obtención de las cepas, se utilizó el método de cultivo de plecténquima. Fueron tomadas porciones pequeñas de este y se colocaron sobre la superficie de un medio de cultivo a base de harina de trigo integral, sacarosa y agar (HIT). La incubación se realizó a 28 ± 2 °C durante 10 días. El micelio obtenido fue visualizado al microscopio óptico para la identificación de las fíbulas que son características de los basidiomicetos y así descartar la presencia de un contaminante que se podría confundir con el crecimiento natural del micelio de la *G. lucidum*.

Finalmente se obtuvieron cinco cepas las cuales se numeraron con la siguiente nomenclatura G1, G2, G3, G4 y G5. Los especímenes G1, G2, G3 y G4 fueron recolectados en distintas zonas del bosque de pino-encino “La Primavera” y la cepa G5 fue recolectada en el bosque de pino-encino de la Sierra de Quila en el estado de Jalisco. Posteriormente las cepas fueron resembradas en tubos con medio de harina de trigo integral inclinado en tubos de ensaye. Una vez que creció el micelio de las cepas aisladas fueron introducidos en botes de aluminio y refrigerados a 4 °C para su preservación en el cepario del Laboratorio de Biotecnología para el Cultivo de los Hongos Comestibles.

Caracterización morfológica de la cepa G4 en medio sólido

De las cinco cepas aisladas se seleccionó la G4, ya que fue la que presentó mayor vigor, velocidad de crecimiento y formación de biomasa en comparación de las otras cepas aisladas.

Para la caracterización morfológica de la cepa G4, se tomo en cuenta el tipo de crecimiento micelial, la textura, densidad, apariencia y el color del micelio, además de la formación de biomasa en los tres medios de cultivo sólido utilizados. Las mediciones y observaciones morfológicas se llevaron a cabo en un periodo de tiempo de 30 días después de la incubación.

Determinación de la tasa específica de crecimiento micelial en tres medios de cultivo sólido.

La preparación de los medios de cultivo sólido y las resiembras de la cepa fueron realizadas dentro del laboratorio en estrictas condiciones de asepsia para evitar contaminaciones posteriores que interfieran con el crecimiento natural de la cepa, las cajas fueron inoculadas e incubadas a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 15 días. Se realizaron cuatro repeticiones de cada uno de los medios. En todos los casos se utilizó un diseño completamente al azar y los datos fueron procesados con el programa de computo Stat graphics 5.1 (2000) y la comparación de medias por el método de diferencia mínima significativa (DMS).

Medios de cultivos sólidos utilizados

HIT. El medio HIT se preparó con 5 g de harina de trigo integral, 5 g de sacarosa y 20 g de agar, en 1000 mL de agua destilada.

EMA. El medio EMA se preparó con 33.6 g de extracto de malta con agar de la marca Difco se agregó 1000 mL de agua destilada

PupaA.- El medio PupaA se preparó con 5 g de puré de papa deshidratado de la marca Verde Valle, 5 g de sacarosa y 20 g de agar disueltos en 1000 mL de agua destilada.

Cada una de las mezclas de ingredientes fue esterilizada a 121 °C por 15 min para después ser enfriada a temperatura ambiente y así de esta manera evitar que acumule agua por evaporación en las cajas al momento de ser cerradas ni forme grumos por enfriamiento acelerado. Posteriormente la solución fue vertida en cajas de Petri de 9 cm con 30 mL cada una.

La tasa radial de crecimiento (K_r) es utilizada como una forma directa de estimar la tasa específica de crecimiento (μ) y sus variaciones, (Sánchez y Royse, 2001) se calcula como sigue:

$$K_r = \mu w$$

Dónde:

K_r = tiempo expresado en días.

W = zona periférica de crecimiento expresado en mm.

μ = tasa específica de crecimiento expresado en mm/día.

Como lo muestra la siguiente fórmula:

$$\mu = w / K_r$$

Determinación de la biomasa micelial en medios de cultivo sólidos

Para la cuantificación de la biomasa se tomaron los micelios de cada una de las cajas, justo al día 15 de su incubación y fueron filtrados en papel filtro # 40 y se lavaron con agua bidestilada a 60 °C hasta retirar los excesos del medio de cultivo sólido. Los filtros con el micelio se colocaron en un horno de secado a 90 °C hasta obtener peso constante, el peso seco fue cuantificado en gramos (Scragg, 2002).

Determinación de la biomasa micelial en medios de cultivo líquidos

Medios de cultivo líquido utilizados:

HIT c/s. El medio HIT c/s se preparó con 5 g de Harina de Trigo Integral y 5 g de sacarosa en 1000 mL de agua destilada.

EM c/s. El medio EM c/s se preparó con 5 g de Extracto de Malta de la marca Difco, 5 g de Sacarosa y se agregó 1000 mL de agua destilada

Pupa c/s. El medio Pupa c/s se preparó con 5 g de Puré de papa deshidratada de la marca Verde Valle y 5 g de Sacarosa en 1000 mL de agua destilada.

100 mL de cada uno de los medios se colocaron en frasco de vidrio y se esterilizaron a 121 °C por 15 min.

Se hicieron 5 repeticiones de cada uno de los medios. Una vez fríos se inocularon con 3 pellets de 0.7 cm de diámetro y se mantuvieron en agitación constante a una velocidad de 90 rpm y temperatura de 28 ± 2 °C.

La biomasa del micelio obtenida fue filtrada en papel filtro del # 40 y lavada con abundante agua bidestilada a 60 °C hasta retirar los excesos del medio de cultivo. Los filtros con el micelio se colocaron en un horno de secado a 90 °C hasta obtener un peso constante. La biomasa micelial seca se registro en g/l (Scragg, 2002).

Cuantificación de la concentración de exopolisacáridos de *G. lucidum* formados en los medios de cultivo líquidos

Para la cuantificación de la concentración de exopolisacáridos se utilizaron seis medios de cultivo líquido que se prepararon como sigue:

HIT c/s. El medio HIT c/s se preparó con 5 g de Harina de Trigo Integral y 5 g de Sacarosa en 1000 mL de agua destilada.

EM c/s. El medio EM c/s se preparó con 5 g de Extracto de Malta de la marca Difco, 5 g de Sacarosa y se agregó 1000 mL de agua destilada

Pupa c/s. El medio Pupa c/s se preparó con 5 g de Puré de papa deshidratada de la marca Verde Valle y 5 g de Sacarosa en 1000 mL de agua destilada

HIT s/s. El medio HIT s/s se preparó con 5 g de Harina de Trigo Integral en 1000 mL de agua destilada.

EM s/s.- El medio EM s/s se preparó con 5 g de Extracto de Malta de la marca Difco y se agregó 1000 mL de agua destilada.

Pupa s/s.- El medio Pupa s/s se preparó con 5 g de Puré de papa deshidratada de marca Verde Valle, en 1000 mL de agua destilada.

100 mL de cada uno de los medios se colocaron en frasco de vidrio y se esterilizaron a 121 °C por 15 min.

Se hicieron 4 repeticiones de cada uno de los medios. Una vez fríos se inocularon con 3 pellets de 0.7 cm de diámetro y se mantuvieron en agitación constante a una velocidad de 90 rpm y temperatura de 28 ± 2 °C.

Una vez que se recuperó el micelio y se obtuvo la parte líquida, esta fue analizada para la cuantificación de exopolisacáridos. Se utilizó la técnica de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller, (1959), la cual determina la concentración de azúcares reductores. Las muestras se obtuvieron de los medios de cultivo líquidos inoculados y se tomaron al día 3, 6, 9, 12 y 15, con tres repeticiones cada una y un blanco para referencia en la lectura espectrofotométrica. En este trabajo se utilizó un espectrofotómetro modelo SPECTRO 23.

Obtención de la curva patrón de sacarosa

Se hizo una curva patrón por medio de diluciones de sacarosa en agua bidestilada en concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 g/l. Dicha curva se utilizó para cuantificar la concentración de exopolisacáridos en medios de cultivo líquido.

Prueba de fructificación de la cepa G4 de *G. lucidum*.

Obtención del inóculo

El inóculo fue previamente elaborado sobre granos de sorgo, los que se hidrataron y esterilizaron en frascos de vidrio con capacidad de 1 L y llenados a 2/3 de su capacidad. Enseguida con la ayuda de una navaja esterilizada se cortaron fragmentos del micelio de *G. lucidum* contenido en la caja de Petri, después se tomaron 8 fracciones de micelio y se depositaron en cada uno de los frascos con la semilla esterilizada y se distribuyeron homogéneamente con la ayuda de una aguja de disección. Posteriormente los frascos fueron incubados a 28 ± 2 °C en la oscuridad hasta que el micelio invadió toda la semilla del frasco. Después de 20 días el inóculo estuvo listo para ser transferido al sustrato.

Sustrato utilizado

Para la obtención de los basidiomas de *G. lucidum* (G4) se utilizó una mezcla de aserrín de encino (80%), adicionado con cascarilla de soya (15%) y de salvado de trigo (5%). El sustrato se humedeció hasta un 75 % con agua adicionada con 6.66 % de sacarosa.

Esterilización

La mezcla del sustrato se distribuyó en bolsas de polipapel con 800 g cada una, para después ser esterilizada a una temperatura de 121 °C durante 2 horas en autoclave. El sustrato una vez esterilizado se dejó enfriar a temperatura ambiente para su posterior inoculación. Se hicieron 10 replicas.

Inoculación e incubación

El sustrato esterilizado se mezcló homogéneamente con el 20 % del inóculo. Después se colocaron en un cuarto de incubación a 28 ± 2 °C el cual permaneció en oscuridad, con la finalidad de permitir el crecimiento micelial y su propagación sobre todo el sustrato.

*Estimulación de primordios del *G. lucidum**

Después de transcurridos 75 días de la incubación del micelio en el sustrato, las bolsas se pasaron a otra sala, en la cual se estimuló la formación de primordios. En este otro ambiente se descendió la temperatura y los niveles de CO₂, mientras que la humedad relativa se aumentó a 90 %. A los 90 días de la inoculación los carpoforos alcanzaron la madures, fueron cortados y pesados para la obtención del peso fresco.

Evaluación de la producción

La eficiencia biológica (E. b.) se evaluó de acuerdo a la formula propuesta por Tchierpe y Hartman (1977), la cual es la mas aceptada para evaluar la producción de los hongos a nivel experimental y comercial. Se basa en la cantidad de hongos frescos producidos, en proporción a la cantidad de materia seca del substrato empleado al momento de la inoculación, expresado en porcentaje:

$$E. b. = \frac{\text{Peso fresco de los hongos (g)}}{\text{Peso seco del substrato (g)}} \times 100$$

VIII. Resultados

Recolecta del material biológico

Los basidiomas recolectados se encontraron solo en encinos, sea en la base de tocones, en las raíces muertas o en arboles derribados en descomposición. También se logró observar que la mayor cantidad de estos se encuentra en zonas en las que se registraron incendios forestales recientes, como se puede observar en la figura 2 que ejemplifica la corteza quemada de los encinos.



Figura 2. Basidiomas de *G. lucidum* recolectados en los bosques de pino-encino del estado de Jalisco, que muestran las características propias de la especie. Nótese la corteza del encino quemada.

Las diferencias morfológicas de la especie son muy variadas, se encontraron especímenes que presentan el píleo laqueado desde coloración amarilla, color café rojizo, rojizo y anaranjado rojizo, todos con el estípite de color rojizo laqueado, brillante en su superficie. El himenio con poros de color blanco a blanquecino-amarillento. El tamaño de los cuerpos fructíferos también fue diferente con ejemplares muy pequeños con un píleo de apenas 3 cm hasta 30 cm (fig. 3).



Figura 3. Diferentes tamaños de los ejemplares recolectados y la coloración de los píleos de color amarillo a café rojizo.

Además se puede observar en la figura 4 las diferencias morfológicas en cuanto a coloración, forma y tamaño de los basidiomas recolectados incluso dentro de un mismo micro hábitat y dependientes del mismo substrato. Nótese también la corteza del encino quemada.



Figura 4. Diferencias morfológicas de la especie que crecían sobre un mismo substrato y se logra apreciar la corteza del encino quemada.

Aislamiento y preservación del material biológico

De las recolectas realizadas se seleccionaron cinco ejemplares. En total se obtuvieron 5 cepas, las cuales se numeraron como G1, G2, G3, G4 y G5. Se eligió una de estas la G4 para su caracterización morfológica micelial, el crecimiento y formación de la biomasa, así como la producción de exopolisacáridos, ya que fue la cepa que presentó un rápido crecimiento micelial, textura algodonosa y más vigor (fig. 5). Todas las cepas se encuentran preservadas en el cepario del Laboratorio de Biotecnología para el Cultivo de Hongos del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA de la Universidad de Guadalajara, en un medio de cultivo HIT a temperatura de 4 °C en tubos de vidrio cubiertos con botes de aluminio.

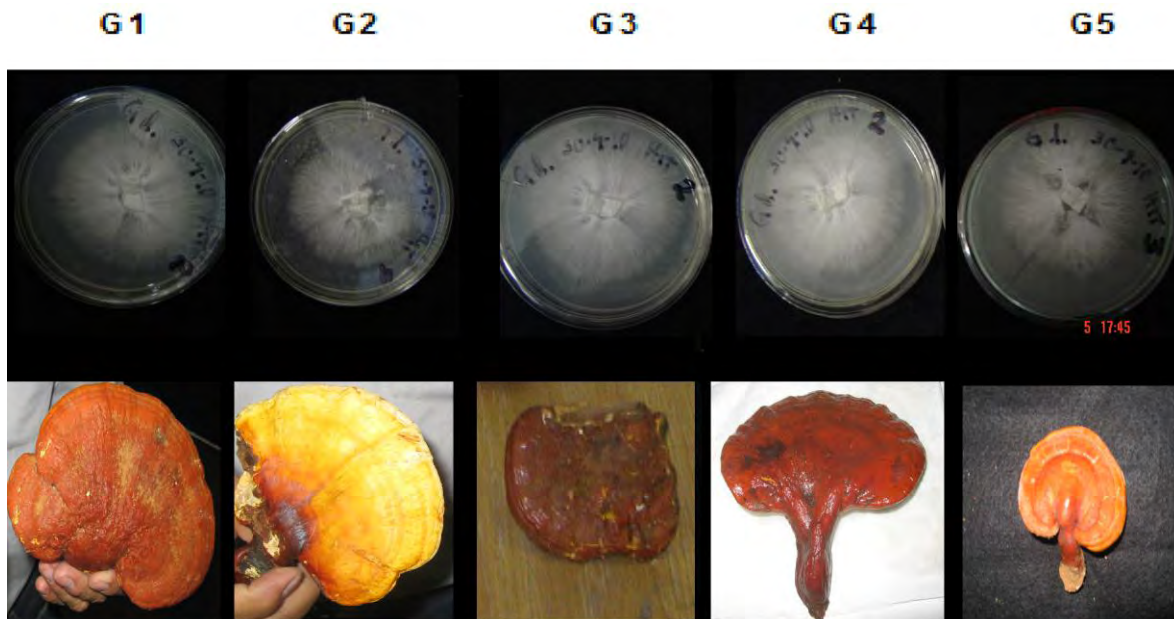


Figura 5. Cepas aisladas a partir de carpofóros silvestres de *G. lucidum* de los bosques de pino-encino del estado de Jalisco, enumeradas como G1, G2, G3, G4 y G5, nótese el micelio de G4 más vigoroso, algodonoso y con un crecimiento más rápido.

Caracterización morfológica de la cepa G4 en medio sólido

La cepa G4 presentó un crecimiento micelial diferente en los tres medios de cultivo sólido (PupaA, HIT y EMA,), también se encontró diferencias en la textura y color del micelio conforme aumenta el tiempo de incubación. Se puede observar un micelio fibriloso más marcado en el medio PupaA, la formación de costras o placas de micelio muy engrosadas en el medio HIT y tonalidades diferentes en la coloración en EMA, como se puede apreciar en la figura 6 y 7.

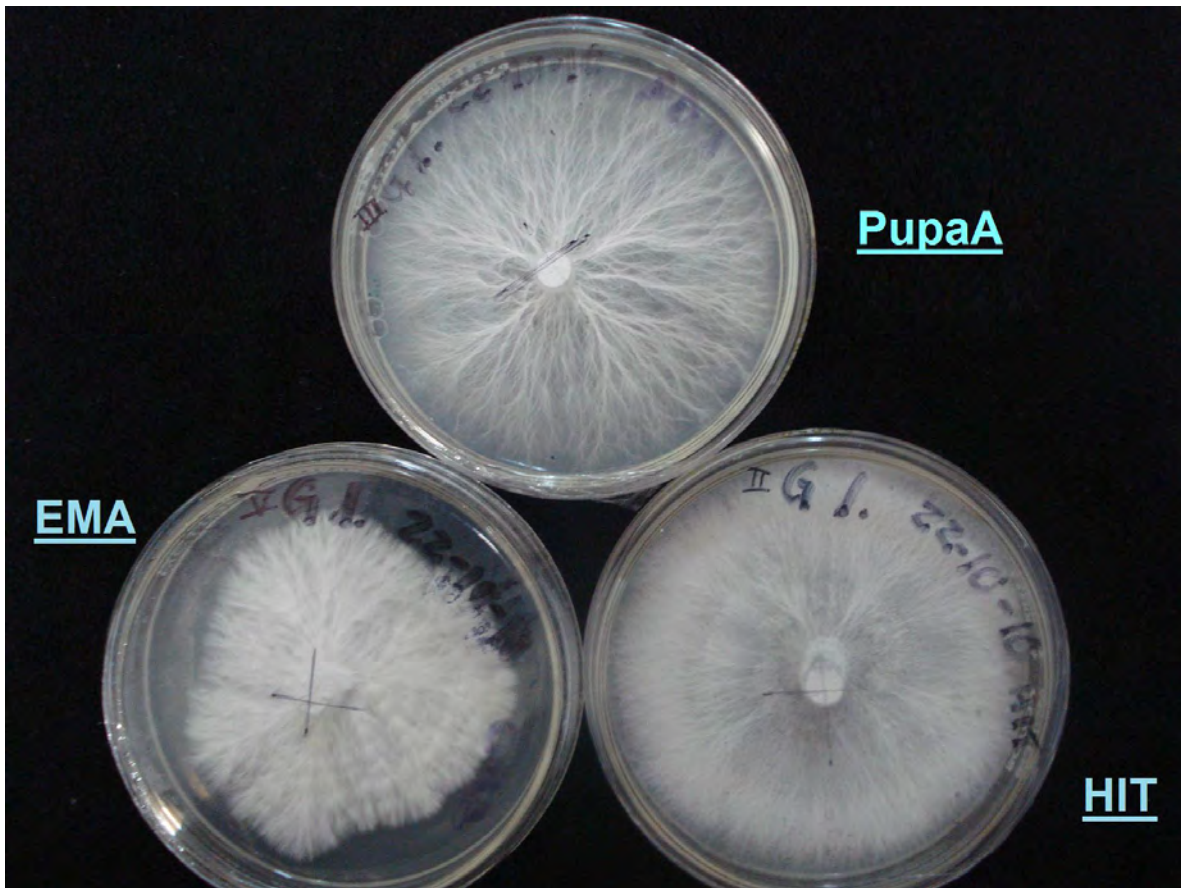


Figura 6. Crecimiento micelial de G4 en los tres diferentes medios de cultivo sólido (PupaA, HIT y EMA) a los 15 días de incubación, se pueden observar las diferentes texturas y las velocidades de crecimiento del micelio.

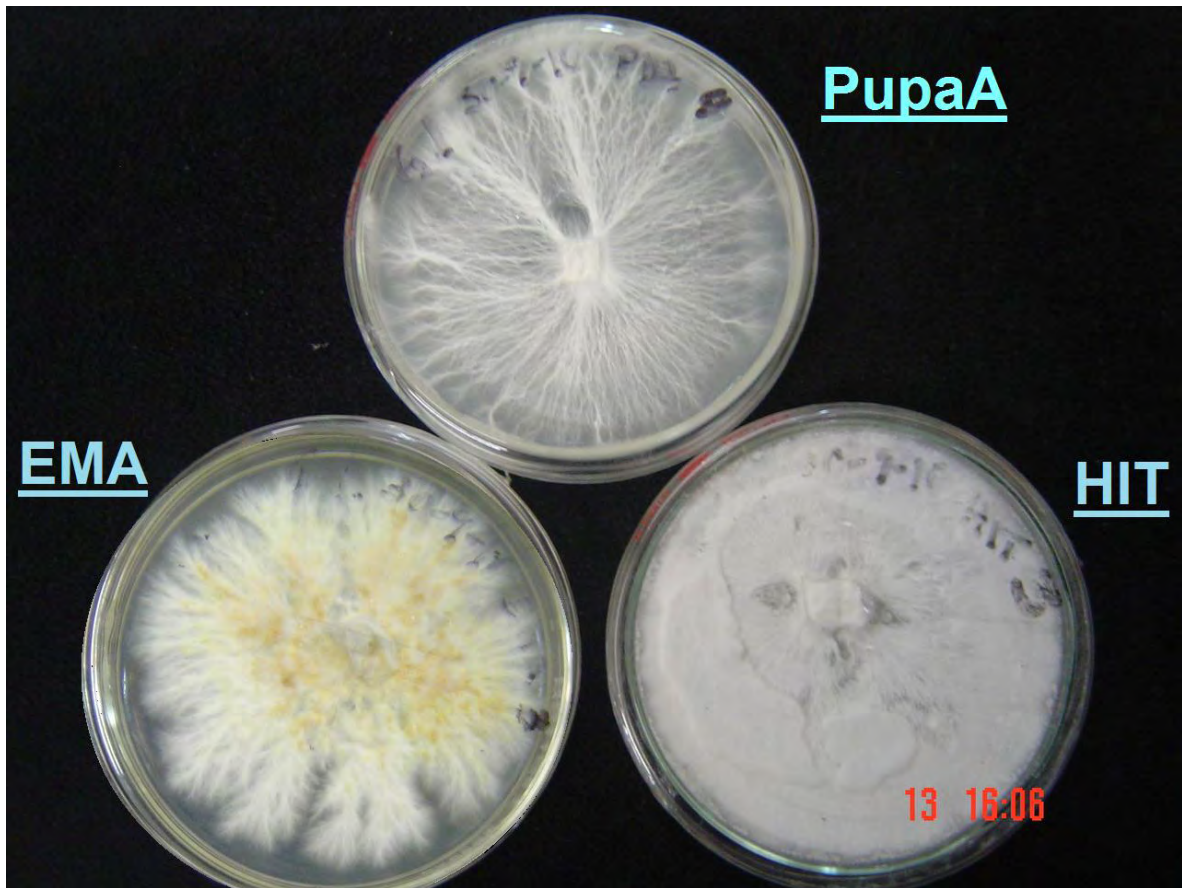


Figura 7. Crecimiento micelial en los tres medios de cultivo sólido (PupaA, HIT y EMA) a los 30 días de su incubación, se puede observar las diferentes texturas y coloraciones del micelio.

El micelio en el medio de cultivo de PupaA fue el que presentó un crecimiento más acelerado, respecto a los otros dos medios de cultivo, por lo que logró la invasión micelial en toda la caja de Petri al octavo día de la incubación. En cuanto a las características morfológicas, se observó, que a pesar de su acelerado crecimiento hubo una muy marcada fibrosidad y permanencia en la coloración blanca durante toda la incubación como lo muestra la figura 8.

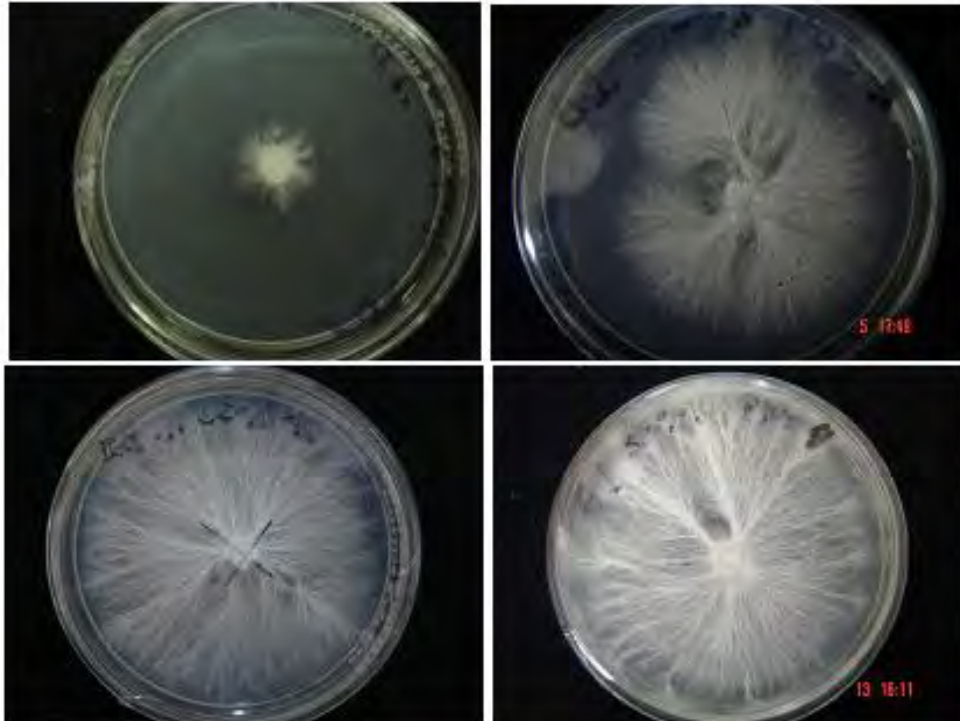


Figura 8. Las diferentes etapas de crecimiento micelial en el medio de cultivo PupaA, desde su incubación hasta el día 30.

Por otro lado en el medio de cultivo de HIT se pudo apreciar un crecimiento micelial y llegó a invadir toda la caja de Petri al noveno día de la incubación. También presentó una textura micelial fibrosa al principio, lisa con formación de costra o placas de micelio al final de la incubación, además se observó una coloración blanca durante toda su etapa de crecimiento como lo muestra la figura 9.

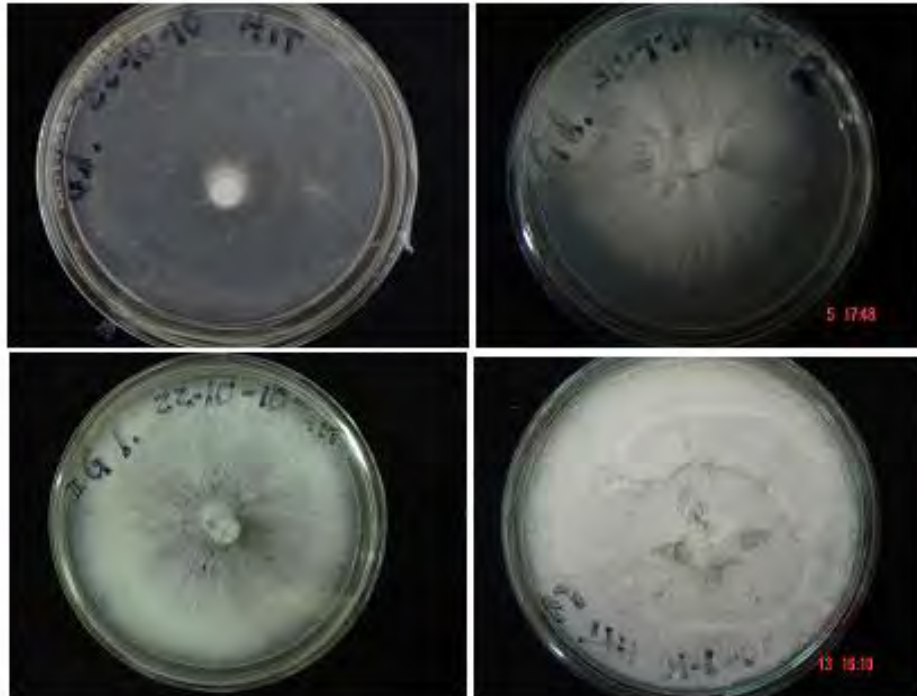


Figura 9. Diferentes etapas de crecimiento micelial en HIT como medio de cultivo desde su incubación hasta el día 30.

Para el medio de cultivo de EMA se observó un crecimiento micelial lento, sin alcanzar la invasión en toda la caja de Petri durante el tiempo de incubación, además en las características morfológicas y como lo muestra la figura 10, se observó abundante formación de biomasa con aspecto algodonoso, ligeramente fibriloso, de coloración blanca al principio, el cual se tornó posteriormente blanquecino, con tonalidades amarillentas hasta el final de su incubación.

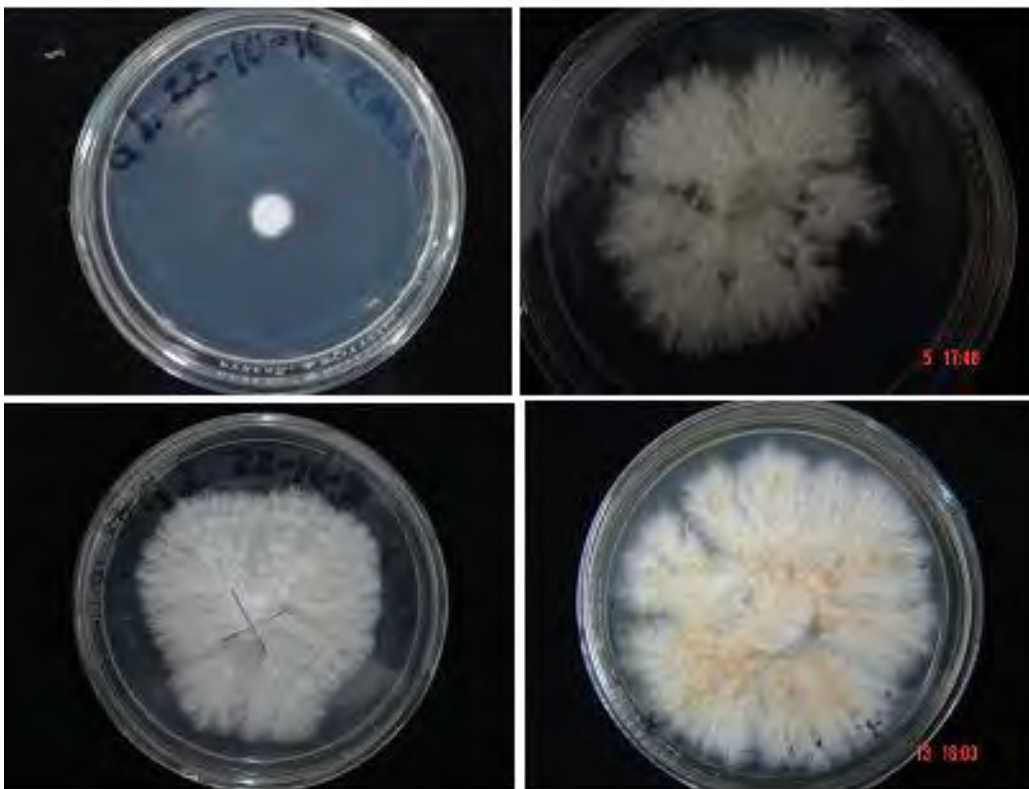


Figura 10. Diferentes etapas de crecimiento micelial en EMA como medio de cultivo desde su incubación hasta el día 30.

Tasa específica de crecimiento micelial para cepa G4 de *G. lucidum* en medios de cultivo sólido

En el gráfico 1 se muestran los resultados obtenidos para crecimiento micelial en mm/día, se puede observar los diferentes efectos de el medio sobre el crecimiento del micelio. En los medios PupaA y HIT se aprecia un desarrollo más acelerado con una tasa específica de crecimiento micelial (TECM) de 20.73 mm/día y 18.18 mm/día respectivamente, en comparación del medio EMA que presentó un crecimiento más tardío con una TECM de 13.09 mm/día.

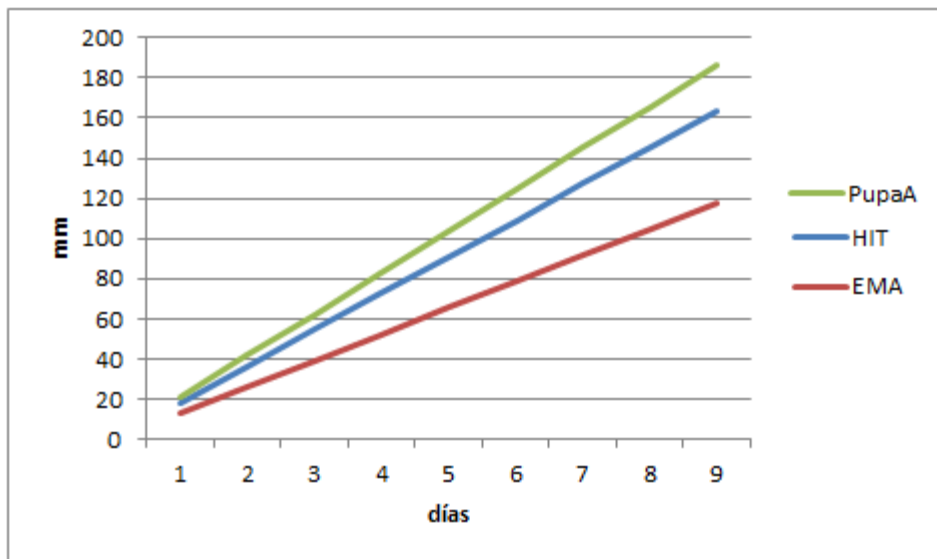


Gráfico 1. Tasa específica de crecimiento micelial de la cepa G4 en los medios de cultivo de PupaA, HIT y EMA, se puede observar los niveles más altos en PupaA y los más bajos en EMA.

El análisis de varianza y la prueba de medias por el método de diferencia mínima significativa (DMS) (Stat Graphics Plus ver 5.1, 2000) aplicado para TECM con un 95 % de confiabilidad que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos del medio de cultivo de PupaA y HIT, como se puede observa en el gráfico 2.

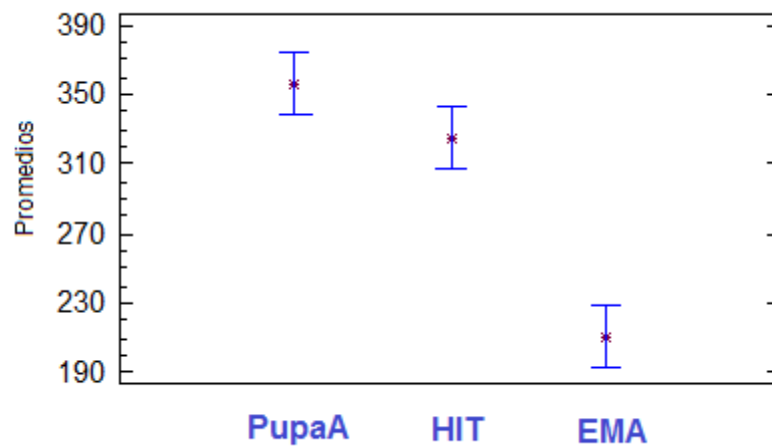


Gráfico 2. Comparación de las medias para tasa específica de crecimiento micelial de *G. lucidum* en los tres medios de cultivo sólido de PupaA, HIT y EMA. DMS ($P < 0.05$).

Determinación del peso seco micelial de la cepa G4 en los medios de cultivo sólido.

En el gráfico 3 se muestran los resultados que arrojó el análisis de peso seco micelial de la cepa G4 en g/l para los tres medios de cultivo sólido. El medio EMA fue el que presentó mayor formación de micelio con 9.71 g/l, seguido por del medio HIT, que obtuvo 8.99 g/l de biomasa micelial y por ultimo PupaA que presentó 7.24 g/l de peso seco micelial.

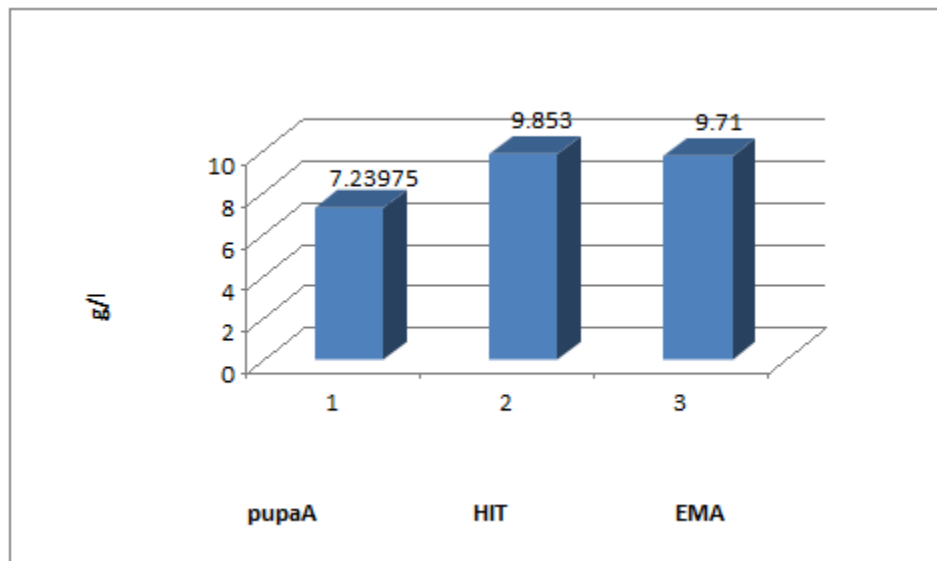


Gráfico 3. Peso seco micelial de la cepa G4 en los medios sólidos PupaA, HIT y EMA.

El análisis de varianza y la prueba de medias por el método DMS aplicado a la producción de peso seco de la cepa G4 en los medios de cultivo sólidos muestran que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos de PupaA y EMA, como lo muestra el gráfico 4.

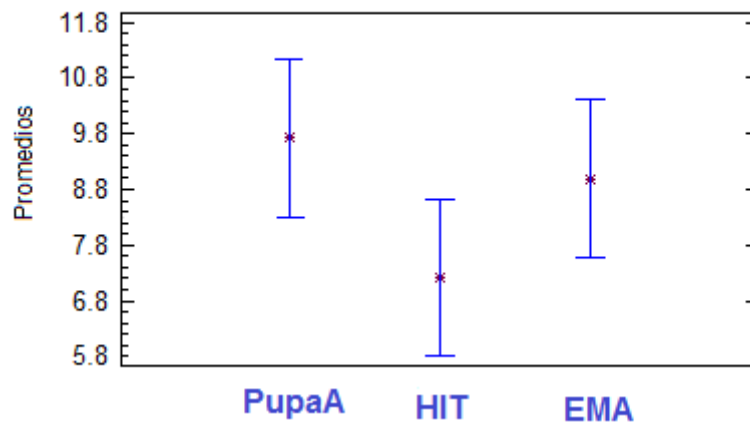


Gráfico 4. DMS para tasa específica de crecimiento micelial de *G. lucidum* en los tres medios de cultivo sólido de PupaA, HIT y EMA ($P > 0.05$).

Determinación de peso seco micelial de la cepa G4 en medio de cultivo líquido.

De igual manera, en el gráfico 5 se muestran los resultados que arrojó el análisis de peso seco micelial de la cepa G4 en g/l para los tres medios de cultivo líquidos con sacarosa. Se observa que el medio de Pupa c/s formó mayor cantidad de biomasa con 3.51 g/l, seguido del medio HIT c/s con una formación de micelio de 2.85 g/l y en menor escala el medio EM c/s con 2.77 g/l de peso seco micelial.

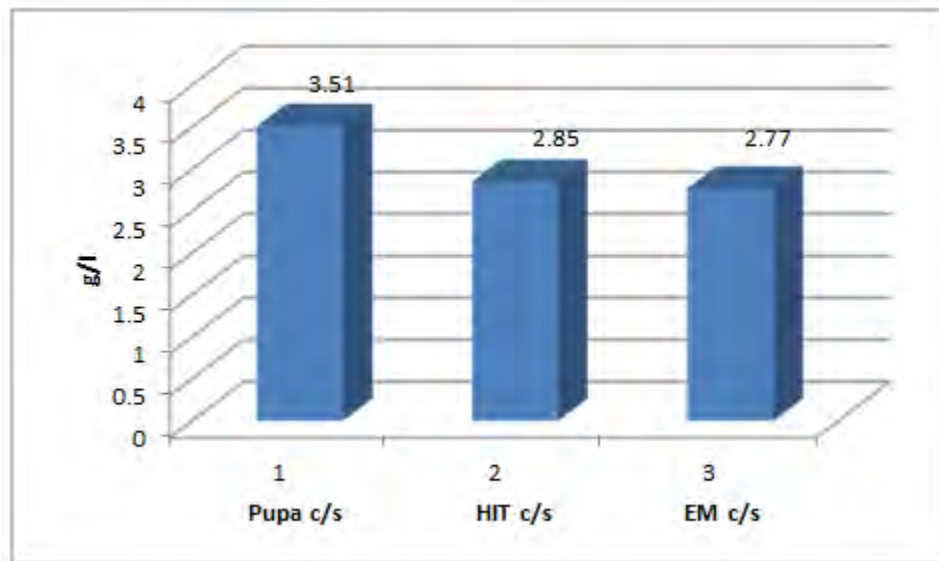


Gráfico 5. Variación en el peso seco de la biomasa micelial de *G. lucidum* en los tres medios de cultivo líquidos con sacarosa.

El análisis de varianza y la prueba de medias por el método de DMS aplicado a la biomasa formada en los medios de cultivo líquido, muestra que no hay diferencia estadística significativa entre los medios de cultivo HIT c/s y EM c/s como lo muestra el gráfico 6.

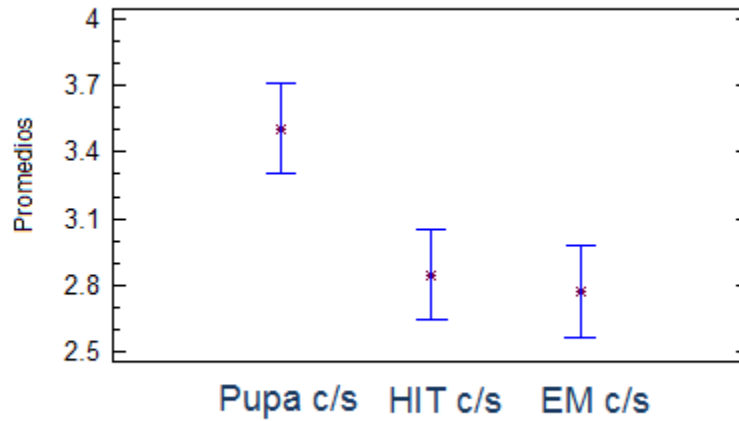


Gráfico 6. DMS para tasa específica de crecimiento micelial de *G. lucidum* en los tres medios de cultivo líquido de Pupa c/s, HIT c/s y EM c/s ($P < 0.05$).

Cuantificación de la concentración de exopolisacáridos de *G. lucidum* en cultivo de células en suspensión

En el gráfico 7 se muestran los resultados que arrojó el análisis para la elaboración de la curva de calibración para la determinación de la concentración de azúcares reductores en medios de cultivo líquido, expresados como exopolisacáridos, hecha por medio de diluciones de sacarosa en agua bidestilada en concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 g/l.

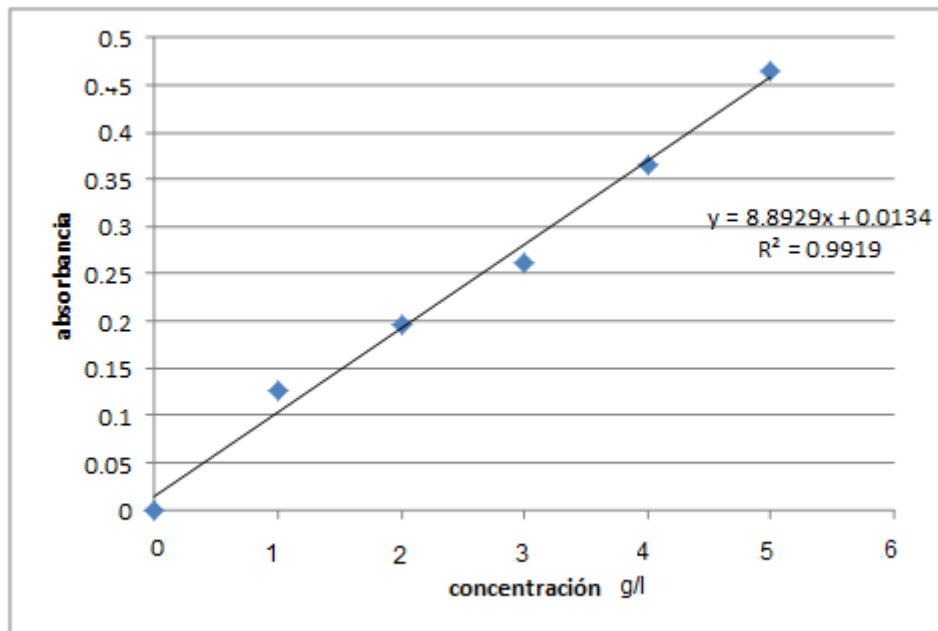


Gráfico 7. Curva patrón elaborada para la determinación de la concentración de azúcares reductores en medios de cultivo líquido, expresados como exopolisacáridos.

En el gráfico 8 se muestran los datos de los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de Pupa c/s. La concentración inicial fue de 0.45 g/l, en la medición del día 3 la concentración aumentó a 0.61 g/l, para después bajar en el día 6 a 0.544 g/l, en el día 9 la concentración había bajado considerablemente a 0.27 g/l, hacia la medición del día 12 los niveles descendieron a 0.216 g/l y por ultimo en la medición del día 15 la concentración aumentó a 0.425 g/l.

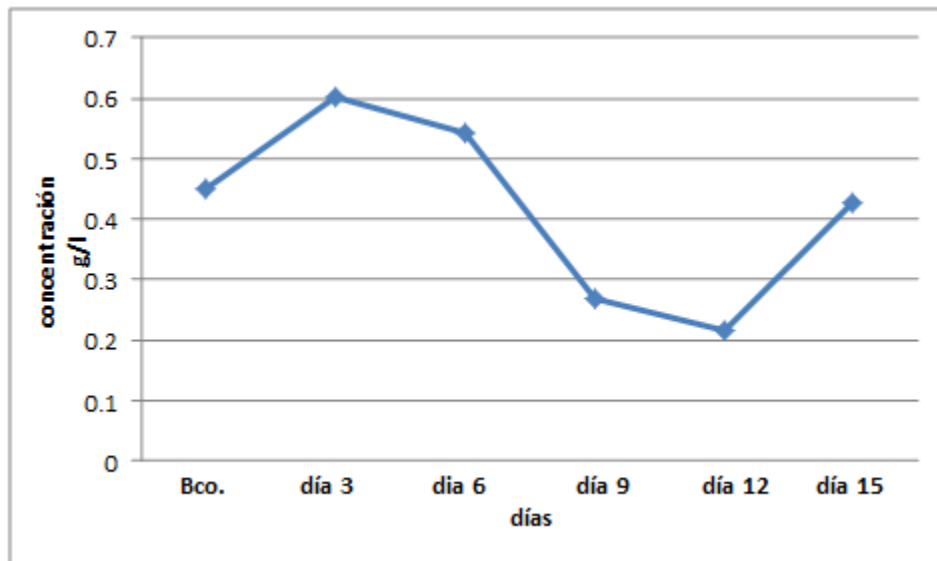


Gráfico 8. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de Pupa c/sacarosa.

En el gráfico 9 se muestra los datos de los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido HIT c/s, la concentración inicial fue de 0.50 g/l en la medición del día 3 la concentración disminuyó a 0.248 g/l, para después en el día 6 subir a 0.348 g/l, en el día 9 la concentración había bajado a 0.304 g/l, hacia la medición del día 12 los niveles descendieron a 0.262 g/l y por ultimo en la medición del día 15 la concentración aumentó a 0.582 g/l.



Gráfico 9. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de harina de trigo integral c/sacarosa.

En el caso del medio de cultivo de EM c/s los datos en los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos se muestran en el gráfico 10 en el que se aprecia la concentración inicial de 0.701 g/l, en la medición del día 3 la concentración disminuyó a 0.589 g/l, en el día 6 los niveles descendieron a 0.555g/l, para el día 9 la concentración permaneció casi en los mismos niveles de concentración con 0.556 g/l, para la medición del día 12 los niveles aumentaron a 0.751 g/l y por ultimo en la medición del día 15 la concentración descendió a 0.682 g/l.

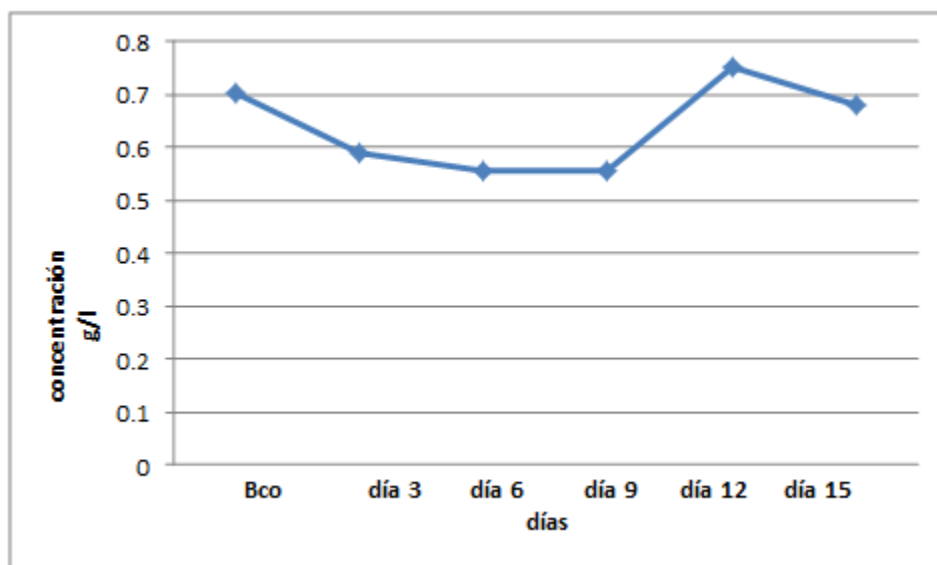


Gráfico 10. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de EM c/s.

Para el caso del medio de cultivo líquido de Pupa s/s los datos en los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos se muestran en el gráfico 11. La concentración inicial fue de 0.224 g/l, en la medición del día 3 la concentración aumentó a 0.356 g/l, en la siguiente medición del día 6 su nivel aumentó 0.379 g/l, para el día 9 la concentración subió a 0.403 g/l, para la medición del día 12 los niveles siguieron en disminución a 0.326 g/l y por ultimo en la medición del día 15 la concentración aumento a 0.595 g/l.



Gráfico 11. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de papa.

En el gráfico 12 se muestran los datos de los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de HIT s/s, al día 12 de la incubación donde se aprecia la concentración inicial de 0.247 g/l, en la medición del día 3 la concentración aumentó a 0.377 g/l, después en el día 6 hubo un incremento de 0.498 g/l, en el día 9 la concentración había bajado a 0.429 g/l, para la medición del día 12 los niveles aumentaron a 0.519 g/l y por ultimo en la medición del día 15 la concentración de exopolisacáridos disminuyó a 0.425g/l.

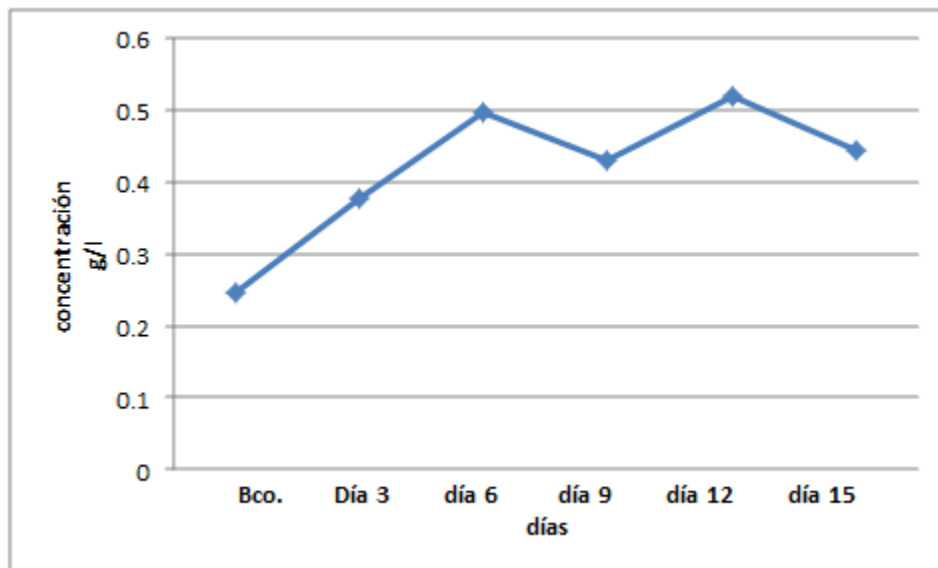


Gráfico 12. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de HIT s/s.

En el gráfico 13 se muestra los datos de los diferentes niveles de concentración de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de EM s/s, la concentración inicial fue de 0.410 g/l, en la medición del día 3 los niveles bajaron a 0.390 g/l, en el día 6 la concentración había aumentado considerablemente a 0.632 g/l, la medición del día 9 arrojó un resultado menor con 0.462 g/l, en el día 12 la concentración aumentó nuevamente a 0.573 g/l y por ultimo el día 15 se obtuvo una concentración de exopolisacáridos de 0.770 g/l.

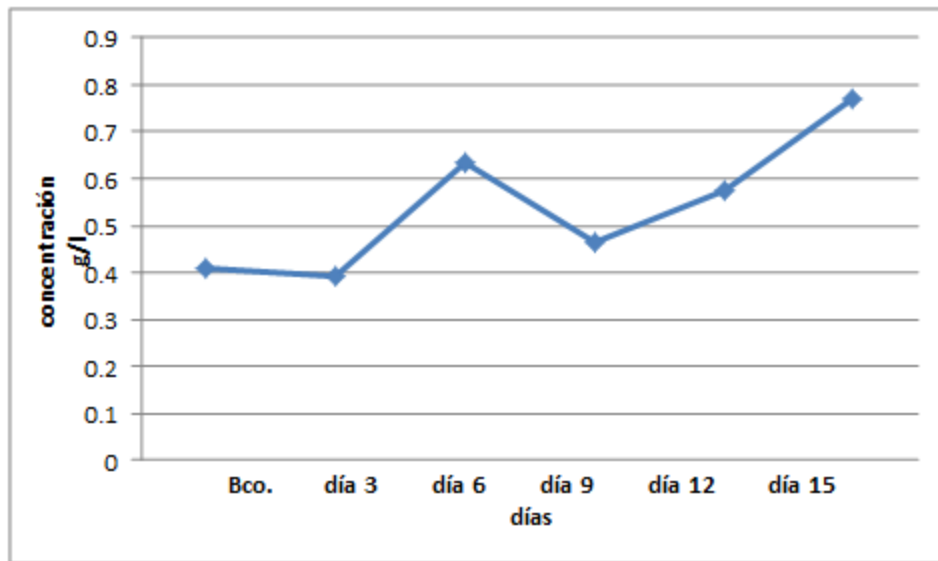


Gráfico 13. Cinética de producción de exopolisacáridos en el medio de cultivo líquido de extracto de malta.

En el gráfico 14 se muestra un comparativo de los niveles máximos de concentración de exopolisacáridos para los seis diferentes medios de cultivo líquido en g/l, se puede apreciar que los niveles mas altos fueron obtenidos en los medios de EM c/s y EM s/s, a diferencia de los niveles mas bajos que fueron logrados en los medios HIT s/s y Pupa c/s.

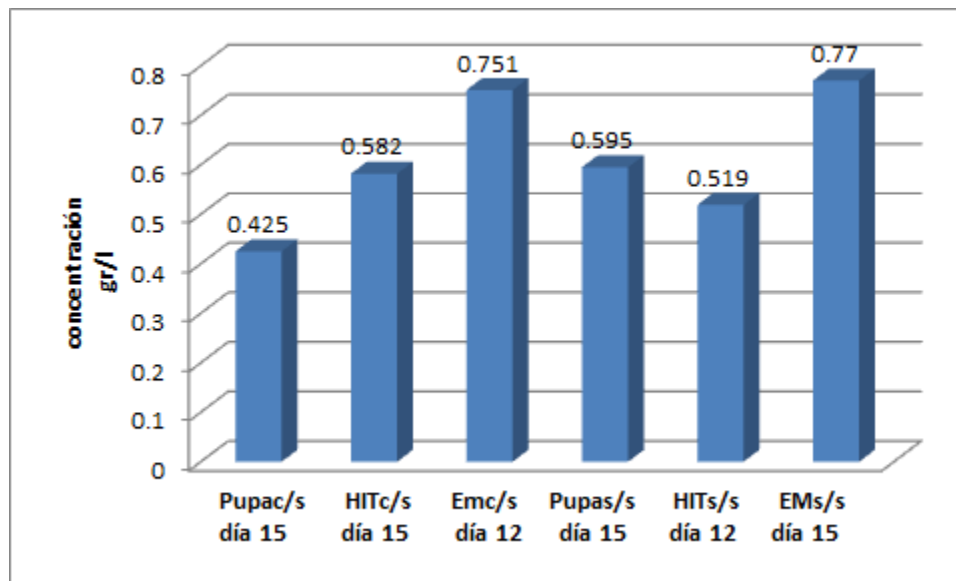


Gráfico 14. Comparativo de los niveles máximos de concentración de exopolisacáridos alcanzados en los diferentes días para los seis medios de cultivo líquido.

Por otro lado el análisis de varianza y la prueba de medias por el método de DMS aplicado para las concentraciones de exopolisacáridos en los diferentes medios de cultivo de células en suspensión nos arrojó que no hay diferencias estadísticas significativas entre los medios HIT c/s y Pupa s/s, así como tampoco existe esta diferencia entre los medios Pupa c/s y HIT s/s como lo muestra el gráfico 15.

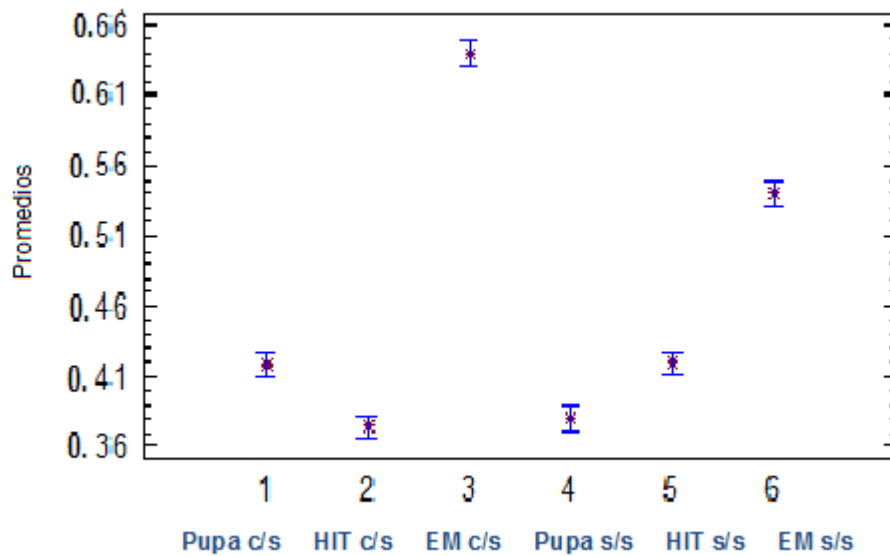


Gráfico 15. DMS con un 95 % de confiabilidad para concentración de exopolisacáridos en los seis medios de cultivo líquido; 1 Pupa c/s, 2 HIT c/s, 3 EM c/s, 4 Pupa s/s, 5 HIT s/s y 6 EM s/s ($P < 0.05$).

Prueba de fructificación de la cepa G4 de *G. lucidum*.

La bolsas inoculadas con la cepa G4 de *G. lucidum* lograron la colonización del micelio en la totalidad de la bolsa a los 65 días de su incubación, que fue cuando comenzaron a aparecer los primeros primordios. El desarrollo de los cuerpos fructíferos desde la formación de los primordios hasta carpoforos bien desarrollados o maduros fue de 90 días. De estas mezclas se obtuvo una eficiencia biológica de 21.5 %.



Figura 11. Cuerpos fructíferos obtenidos de la cepa G4 de *G. lucidum* de los bosques de pino-encino del estado de Jalisco.



Figura 11. Basidiomas obtenidos de la cepa G4 de *G. lucidum* de los bosques de pino-encino del estado de Jalisco, nótese las diferentes coloraciones, tamaños y formas de los basidiomas obtenidos.



Figura 12. Carpofóros obtenidos de la cepa G4 donde se aprecia la coloración de los poros, que es característica de la especie.

IX. DISCUSIÓN

Stamets (2005) mencionó que *Ganoderma lucidum* se desarrolla ampliamente por todo el mundo como saprobio en muchas especies de madera dura, también en coníferas, especialmente en las de edad madura, en el presente trabajo se observó que los basidiomas encontrados en los recorridos por los bosque de pino-encino se desarrollan como saprobios y solo en los *Quercus* spp. También se apreció que crecen en zonas que predomina la vegetación de encinos y que recientemente han sido reforestadas con pino y aunque algunos alcanzan tamaños grandes no se pudo ver el crecimiento de basidiomas en estos ejemplares ni siquiera en los de edad madura, esto también coincide con lo reportado por Gilbertson y Ryvarden (1986), otra observación realizada fue que la mayor cantidad de basidiomas se localizó en los lugares con suelos arenosos aunado a incendios recientes, por lo que sugiere que estos estimulan la formación de los cuerpos fructíferos.

Rodríguez *et al.*, (1997) reportaron para cepas de *G. lucidum* nativas del estado de Jalisco, que muestran características morfológicas diferentes en los medios de cultivo utilizados, sugieren al medio HIT como el mas apropiado para el desarrollo de la cepa, ya que presentó una mayor velocidad de crecimiento radial, así como un micelio denso y algodonoso de color blanco; conforme se desarrolla el micelio presentó coloración amarillenta. Para el medio EMA reportaron un crecimiento lento con micelio ralo y descolorido que difieren con lo obtenido en esta investigación, ya que la textura del micelio fue diferente en el medio HIT que presentó un micelio fibriloso al principio, liso con formación de costra o placas de micelio al final de la incubación, además se observó una coloración blanca durante toda su etapa de crecimiento y para el medio EMA se observó abundante formación de biomasa con aspecto algodonoso, ligeramente fibriloso, de coloración blanca al principio, el cual se tornó posteriormente blanquecino, con tonalidades amarillentas hasta el final de su incubación.

Por otro lado Tello (2010) reporta para cepas nativas de los estados de Morelos, Puebla, Guerrero, Veracruz y Jalisco, a EMA+BF (Extracto de Malta+buffer) como el medio sólido optimo para el cultivo del micelio en especies de *Ganoderma*, reportó un crecimiento micelial abundante con tonalidades en el micelio que van desde amarillenta a café, que concuerda con lo observado en este trabajo para el medio de cultivo de EMA, estas coloraciones se cree que son por la falta de algún nutriente que promueve la formación de metabolitos secundarios que se manifiestan en coloraciones amarillenta a café, además se observó que la cepa en este medio envejece rápido, contrario a lo que presentó el medio de PupaA, que aunque presentó un crecimiento micelial acelerado con una marcada fibrosidad, la

coloración blanca permaneció durante toda la etapa de crecimiento y el tiempo de vida del micelio en la caja de Petri fue mayor, por lo que se sugiere a PupaA como el mejor medio de cultivo para la preservación de la cepa .

En cuanto a la tasas específica de crecimiento micelial en medio sólido Tello (2010) menciona valores mínimos de 2.60 mm/día y máximos de 10.34 mm/día en un medio de EMA+BF, en el presente trabajo se obtuvieron valores mínimos en el medio EMA con 13.09 mm/día y máximos para los medios de PupaA y HIT con 20.73 mm/día y 18.18 mm/día respectivamente, por lo que se sugiere a PupaA como el medio óptimo para la obtención de las cepas en tiempos más cortos.

Para la formación de biomasa micelial en medios líquidos Ramírez-Cadavid *et al.* (2010) reportaron un máximo de 35.64 g/l⁻¹ en un medio de cultivo con 50 g/l⁻¹ de una fuente de carbono compleja y una corriente alterna de 1.5 kV cm⁻¹, que concuerda con lo obtenido en esta investigación para el medio de cultivo de Pupa c/s que presentó una formación de biomasa de 35.10 g/l⁻¹, se sugiere a este medio como el más apropiado para la obtención de biomasa micelial.

Tang y Zhong (2002) reportan niveles máximos de biomasa micelial de 22 g/l⁻¹ para medios de cultivo de extracto de levadura con 40 g/l⁻¹ de fuentes de carbono, en el presente trabajo se obtuvo un mayor rendimiento en los tres medios de cultivo utilizados con valores de 35.1 g/l⁻¹, 28.5 g/l⁻¹ y 27.7 g/l⁻¹ para Pupa c/s, HIT c/s y EM c/s respectivamente.

Torres *et al.* (2011) y Zhang *et al.* (2011) para *G. lucidum*, obtuvieron un valor máximo de biomasa micelial de 31 g/l y 29.8 g/l respectivamente en medios de cultivo líquidos adicionados con aproximadamente un nivel 10 veces mayor de fuentes de carbono que las utilizadas en este trabajo, por lo que se sugiere que las fuentes de carbono juegan un papel muy importante en la formación de la biomasa.

En cuanto a la formación de exopolisacáridos Tang y Zhong (2002) reportaron concentraciones de entre 0.81 ± 0.04 y 1.25 ± 0.03 g/l⁻¹, evaluados entre los días 12 al 16 de su incubación en cultivo sumergido con el medio antes mencionado lo cual difiere con lo encontrado en este trabajo ya que se obtuvieron niveles más altos que van desde 0.425 g/l hasta 0.770 g/l, evaluados entre los días 12 y 15 de su incubación.

Kim *et al.* (2006) reportaron una concentración máxima de exopolisacáridos de 4.7 g/l en un medio de cultivo compuesto de 20 g/l de fuentes de carbono que difiere con los resultados encontrados en este trabajo, ya que los valores máximos encontrados fueron de 0.770 g/l en un medio de cultivo de EM sin fuentes de

carbono adicionales, por los que se sugiere al medio de EM s/s como el óptimo para la formación de exopolisacáridos.

Guo *et al.* (2009) reportaron para *Phellinus linteus* concentraciones máximas de exopolisacáridos de 0.86 ± 0.01 g/l a los 8 días de su incubación en un medio de cultivo con 33 g/l de fuentes de carbono, que concuerda con lo que se encontró en este trabajo para el medios de cultivo de EM c/s y EM s/s a los días 12 y 15 de su incubación.

Zapata *et al.* (2007) reportaron para *Grifola frondosa* una concentración de exopolisacáridos en cultivo líquido de 6.53 ± 0.14 g/l con un aproximado de 50 g/l de fuentes de carbono, que difiere con lo reportado en este trabajo, ya que los valores máximos no alcanzan 1 g/l, por lo que se sugiere que las fuentes de carbono juegan un papel muy importante en la biosíntesis de exopolisacáridos.

En lo que se refiere al cultivo sólido de *G. lucidum* para la obtención de carpóforos, Soto-Velazco *et al.* (2002) obtuvieron una eficiencia biológica inferior a el 10 % para cepas nativas del estado de Jalisco, en el presente trabajo se logró una eficiencia biológica superior al 20 %, por lo que se sugiere las mezclas de aserrín de encino adicionado con celulosa y nitrógeno para el cultivo del *Ganoderma*.

Iclal E. (2009) obtuvo una eficiencia biológica de 13 a 20 % para cultivos con diferente cantidad de proteína y fuentes de carbono, que difiere de lo que se logró en este trabajo para cepas nativas, por lo que se cree que la variabilidad genética de la especie juega un papel importante en los cultivos para la obtención de los cuerpos fructíferos.

Son muy pocos los estudios enfocados al tipo de substrato, suelo y otras condiciones ambientales que elige *G. lucidum* para su desarrollo de manera natural, por lo que se sugiere que estudios encaminados en este tema son de vital importancia para preservar las zonas que se desarrolla y así salvaguardar también el germoplasma silvestre de este hongo, ya que cumplen con un papel muy importante como descomponedores de la madera muerta y por supuesto la importancia de sus compuestos bioactivos.

X. CONCLUSIONES

1. En la recolecta del material biológico se observó que la mayor cantidad de basidiomas se localizaban en lugares con suelos arenosos aunados a incendios recientes, esto sugiere que dichas condiciones estimulan la formación de los cuerpos fructíferos.
2. En cuanto a los medios de cultivo, se recomienda PupaA como óptimo para la obtención y preservación de las cepas, ya que mantuvo en el micelio su coloración blanca durante toda la etapa de crecimiento, y el tiempo de vida de este en la caja de Petri, fue mayor, contrario a lo que se observó en EMA, medio en el que la cepa envejece con mayor rapidez. Es también aconsejable el uso de PupaA en la disminución de tiempos para la obtención de cepas, dado que presentó la tasa específica de crecimiento micelial más acelerada.
3. Se sugiere a Pupa c/s en el caso de cultivo de células en suspensión, como el medio más apropiado para la obtención de biomasa micelial.
4. Es recomendable el uso de EM s/s y EM c/s como los medios de cultivo líquido más indicados en la formación de exopolisacáridos. Otros autores obtuvieron una mayor concentración de exopolisacáridos con fuentes de carbono más elevadas, por lo que se sugiere que las fuentes de carbono juegan un papel determinante en la biosíntesis de exopolisacáridos.
5. Se cree que la variabilidad genética de la especie juega un papel importante en los cultivos para la obtención de los cuerpos fructíferos y se sugiere las mezclas de aserrín de encino adicionado con celulosa y nitrógeno para la obtención de estos.

Literatura:

Arora, D. 1986. Mushrooms demystified. California. 2^{da} edition. Library of Congress Catalog Number 79-8513, Berkeley, USA. 574-577 pp.

Bassey, E. A. 1950. Morphology and taxonomy of fungi. Blakiston, Filadelfia. Tomado de: Guzmán, *et al.*, 2002. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional, México. D. F. 245 pp.

Chang, S. T. 1972. The Chinese Mushroom *Volvariella volvacea*. The Chinese University Press, Hong Kong.

Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int. Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 1-7.

Chang, S. T. y P. G. Miles. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact. CRC Press, Boca Raton. 451 pp. 3 Duke

Chen, C. S. 1993. Methods for inducing various morphological fruiting body of *Ganoderma tsugae* (Murr). *Transactions of the Mycological Society of the Republic of China* 8: 9-16.

Evans, C. G. T., R. G. Yeo y D. C. Ellwood. 1979. Continuous Culture Studies in the Production of Extracellular Polysaccharides by *Xanthomonas juglandis*, en R. C. W. Berkeley, G. M. Goodway y D. C. Ellwood, eds., *Microbial Polysaccharides and Polysaccharides*. Nueva York: Academic Press, pp. 51-68.

Fang, Q. H. y J. J. Zhong, 2002a. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 18: 51-54.

Fang, Q. H. y J. J. Zhong, 2002b. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37: 769-7474.

Fang, Q. H. y J. J. Zhong, 2002c. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10: 61-65.

Fang, Q. H., Y. J. Tang y J. J. Zhong, 2002. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37: 1375-1379.

- Gilbertson, R.L. y Ryvarden L. 1986. North American Polypores, vol. 1 fungi flora, Osla.
- Glisckman, M. 1969. Gum Technology in the Food Industry. Nueva York. Academic Press, Holman. W. E. Kelzan XC. A Drilling Fluid System with Rheology Control. Houston, Texas.
- Gottlieb, A. M., E. Ferrer, y J. E. Wright. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. Mycological Research 104: 1033-1045.
- Guo, X., X. Zou y M. Sun. 2009. Effects of phytohormones on mycelial growth and exopolysaccharide biosynthesis of medicinal mushroom *Pellinus linteus*. Bioprocess Biosyst eng 32:701-707.
- Guzmán G. 2000. Tropical Fungi of México. Diversity and distribution. Symposium Tropical Mycology, Abril 25-29, Liverpool.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. 1ra edición., Fondo de Cultura Económica. México D. F., pp. 52-64, 283-329.
- Hsieh, T. C. y J. M. Wu. 2002. Mechanism of action of herbal supplement PC-SPES: elucidation of effects of individual herbs of PC-SPES on proliferation and prostate specific gene expression in androgen-dependent LNCaP cells. International Journal of Oncology 20: 583-588.
- Hsieh, C. y F. Yang. 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. Bioresour. Technol 91(1): 105-109.
- Iclal E. 2009. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. African Journal of Agricultural Research 4: 11 pp. 1331-1333.
- Kang, K. S. y I. W. Cottrell. 1969. Polysaccharides, en H. J. Pepler y D. Periman, eds. Microbial Technology. Vol. 1. Nueva York: academic Press, pp. 417-481.
- Karsten, P. 1865-1870. Fungi Fenniae Exsiccati Sampling af Finska Svampar. Nos. 1.1000. 1981. Enumeratio boletinearum et. Polyporearum fenicarum. Systemate novo dispositarum. Reviews Mycology (Toulouse) 3: 16-19.
- Kim, S. W., H. J. Hwang, J. P. Park., Y. J. Cho, C. H. Song y J. W. Yum. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Letters in Applied Microbiology 34: 56-61

- Kim, H., Park M. y J. Yun. 2006. Culture pH affects exopolysaccharides production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134: 249-262
- Kues, U. y Y. Liu. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology* 54: 141-152
- Lee, K. M., S. Y. Lee y H. Y. Lee. 1999. Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 726-731.
- Lin, Y. L., Y. C. Liang, S. S. Lee y B. L. Chiang. 2005. Polysaccharide purified from *Ganoderma Lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-KB and p38 mitogen-activate protein kinase pathways. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 533-543.
- Mapes, C., G. Guzmán, y J. Caballero. 1981. *Etnomicología Purépecha. El conocimiento y usos de los hongos en la Cuenca de Pátzcuaro, Michoacán. Cuadernos de trabajo, Series Etnobiologicas.*
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez y Y. Mayett. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El Shiitake. Colegio de Posgraduados, Campus Puebla, *Biología de Hongos comestibles*. 48 pp.
- Mendoza G., Guzmán G., Ramírez-Guillén F., Luna M. y A. Trigos. 2011. *Ganoderma oerstedii* (Fr.) a tree parasite species in México: Taxonomic description, rDNA Study, and review of its medical applications. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13(6): 545-552.
- Miller, G. L. 1959. Use of DNS for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Mizuno, T. 1997. Studies on bioactive substances and medicinal effect of Reishi, *Ganoderma lucidum*. In *proceedings 1st International Symposium Ganoderma lucidum*. (Ed.) toyo-igaku-sha Co., Ltd., Tokyo, Japan. pp. 121-127.
- Moncalvo, J. M. 2000. Systematics of *Ganoderma*. pp 23-45 In *Ganoderma Diseases of Perennial Crops* (Eds.) J. Flood, P. D. Bridge and M. Holderness. CABI Bioscience, Egham, UK. *Aetaceae. Fungi Flora*, Oslo.
- Moncalvo, J. M. y L. Ryvarden. 1998. Nomenclature of *Ganodermateceae*. *Synopsis Fungorum* 11: 1-109.

Naoil, Y. 1997. Artificial cultivation of "Reishi" to harvest the highest-quality *Ganoderma lucidum*. In Proceedings of the 1st International Symposium *Ganoderma lucidum*. Tokyo, Japan. pp. 160-162

Nuñez M. y L. Ryvardeen. 2000. East Asian Polypores. Ganodermataceae and Hymenochaetaceae. Volumen 1 synopsis fungorum 13, fungiflora, Oslo, Norway, pp 40-50.

Ramírez-Cadavid, D., R. Galindo-Muñoz, P. Zapata-Ocampo, D. Rojas-Vahos, C. Fernández-Ossa y L. Atehortúa-Garcés. 2010. Efecto de los campos eléctricos sobre la producción de biomasa micelial del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* ((W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Ganodermataceae)). Actualidades en Biología 32 (92): 5-17.

Rodríguez R., C. Soto-Velazco, S. Fausto y J. Álvarez de la Cuadra. 1997. Perspectivas de la producción del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* en el estado de Jalisco México. VI congreso Nacional de Micología IX Jornadas Científicas Tapachula, Chiapas.

Ryvardeen, L. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma*? pp. 19-24. In: Systematics, Phytopathology and Pharmacology, 5th International Mycological Congress (Eds.) P. K. Buchanan, R. S. H Seu and J. M. Moncalvo. Dep. Agric. Chem. National Taiwan University, Taipei, China.

Sánchez, J. E. y D. Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El Colegio de Frontera Sur; Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores. 290 pp.

Scragg, A., 2002. Biotecnología para Ingenieros. Sistemas Biotecnológicos en Procesos Tecnológicos. Instituto Wolfson de Biotecnología de la Universidad de Sheffield. Editorial LIMUSA. Pp. 191-194.

Shiao, M. S., K. R. Lee, L. J. Lin y C. T. Wang. 1992. Food photochemicals for cancer prevention. (Eds). Huang, M. T., Rosen, R. T., American Chemical Society: Washington DC, 1994; pp 342–354.

Soto-Velazco, C., M. C. López, E. Vázquez Valls y I. Álvarez. 2002. Cultivation of *Ganoderma lucidum* and its effect on the production of lymphocytes. In: Sánchez *et al.* (Eds). Mushroom Biology and Mushroom Products Word Society for Mushroom biology and mushroom products. Cuernavaca, México. pp. 379-382.

Sliva, D. 2006. *Ganoderma lucidum* in cancer. Leukemia Research 30: 767-768.

Stat graphics Plus ver 5.1. 2000.

Steyaert, R. L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria. Persoonia 7: 55-118.

- Steyaert, R. L. 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. Transactions of the British Mycological society 65: 451-467.
- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushroom. 3rd. edition. Ten Speed Pres, Olympia, WA. Berkeley, California.
- Stamets, P. 2005. Mycelium Running. 1rd. edition. Ten Speed Pres, Olympia, Berkeley, California.
- Sutherland, I. W. 1977. Microbial exopolysaccharides synthesis. Extracellular Microbial Polysaccharides (Eds.)P. A. Sanford y A. Laskin. In Washington D. C. American Chemical Society, pp. 40-57 (Symposium Series, 45).
- Takamatsu, S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. In Applications of PCR in Mycology (Eds.) P. Bridge, D. Arora, C. Reddy and R. Elander. CAB. International. pp. 125-152.
- Tang, Y. J. y J. J. Zhong 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. Enzyme and Microbial Technology 31: 20-28.
- Tchierpe, H. J. y K. Hartman. 1977. A comparison of different growing methods. Mushroom. Journal. 60: 404-416.
- Tello, I. 2010. Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *Ganoderma* (Fungi, Ganodermataceae), conocido como Reishi en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional. Colegio de Postgraduados campus Puebla. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Torres, A., Quintero J. y Atehortua L. 2011. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Revista. Columbiana de Biotecnología. 13: 1103-109.
- Wagner, R., D. A. Mitchell y G. L. Sasaki. Amazonas M. y M. Berovic. 2003. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. Food Technology and Biotechnology 41(4): 371-382.
- Wells, J. 1977. Extracellular Microbial Polysaccharides, a Critical Overview, en P. A. Sanford y A. Laskin, eds., Extracellular Microbial Polysaccharides. Washington D. C. American Chemical Society, pp. 299-313 (Symposium Series, 45).

Yang, F., Y. y S. Kuo. 2000. Effect of fatty acids on the micelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 295-301.

Zhang W., Y. Tang y J. Zhong. 2010. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33: 683-690. tr

Zapata, P., D. Rojas., C. Fernández., D. Ramírez., G. Restrepo., V. Orjuela., M. Arroyave., T. Gómez y L. Atehortúa. 2007. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. Medellín Colombia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología. Universidad de Antioquia.

Zhong, J. J., Q. H. Fang, y Y. J. Tang. 2002. Enhanced production of valuable metabolites in submerged cultures of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* by manipulation of oxygen supply. *Journal Plant Biotechnology* 4: 109-115.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Tabla ANOVA para Tasa específica de crecimiento micelial según el medio de cultivo.

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	58559.3	2	29279.7	42.85	0.0000	
Intra grupos	8199.14	12	683.262			
Total (Corr.)	66758.5	14				

Anexo 2. Tabla ANOVA para biomasa en medio sólido según tratamiento

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	12.8828	2	6.44139	2.07	0.1822	
Intra grupos	28.0137	9	3.11263			
Total (Corr.)	40.8964	11				

Anexo 3. Tabla ANOVA para biomasa en medio líquido según Tratamiento

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	1.31099	2	0.655496	9.98	0.0052	
Intra grupos	0.591331	9	0.0657034			
Total (Corr.)	1.90232	11				

Anexo 4. Tabla ANOVA para comparación de biomasa en medio líquido y sólido según Tratamiento

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	202.718	5	40.5436	25.51	0.0000	
Intra grupos	28.605	18	1.58917			
Total (Corr.)	231.323	23				

Anexo 5. Tabla ANOVA para Exopolisacáridos según Medio

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0.00166643	5	0.000333285	339.51	0.0000	
Intra grupos	0.00001178	12	9.81667E-7			
Total (Corr.)	0.00167821	17				

Anexo 6. Preparación del reactivo DNS (ácido-dinitrosalicílico)

1. En un matraz Erlen Meyer se agregó 250 mL de agua destilada para la preparación de 355 mL finales de solución de reactivo de DNS.
2. Se disolvieron poco a poco los siguientes reactivos en el mismo orden:

Compuesto	g/l
NaOH	5
DNS	5
Fenol	1
Bisulfito de sodio	0.25
Tartrato de Na y K	100

3. Una vez disueltas todas las sales, la solución se pasó a un matraz aforado y se completó a los 500 mL con agua destilada.

Numero de Tubo	Concentración g/l	Absorbancia 550 nm
1	0	0.0745
2	0.01	0.1255
3	0.02	0.1960
4	0.03	0.2620
5	0.04	0.3660
6	0.05	0.4655

Anexo 7. Substrato utilizado para la fructificación

A una muestra de aserrín de encino de 2.8 kg se le adiciono 525 gr de cascara de soya y 175 gr de salvado de trigo en peso seco y se dejó remojar con 7.5 litros de agua con 5 gr de sacarosa durante 2 días.