

## Evaluación del cultivo *in vitro* de una cepa mexicana de *Ganoderma lucidum*

### Evaluation of *in vitro* cultivation of a Mexican strain of *Ganoderma lucidum*

Julio César Hernández-Rosas\*, José Alfredo Sánchez Meraz\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.97143

#### RESUMEN

La cepa mexicana CP-145 de *Ganoderma lucidum* debido a la importancia medicinal que ha presentado últimamente, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y medio de cultivo sobre el crecimiento micelial óptimo en diferentes rangos de pH. Los tratamientos correspondieron en la utilización del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y extracto de malta agar (EMA), con dos niveles de temperatura (25 y 28 °C) y seis rangos de pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5). El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo, analizados con el paquete REPEATED MEASURE y el efecto tiempo con PROC MIXED de SAS. Como resultado se obtuvieron que el efecto de la temperatura y medios de cultivo en los diferentes rangos de pH, presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). El crecimiento micelial óptimo de la cepa mexicana de *G. lucidum* fue en el medio de cultivo EMA en los rangos de pH de 4.0 y 4.5 con 8.3 y 8.2 cm respectivamente. De igual forma, en los rangos de pH 4.0 y 4.5 se obtuvieron los crecimientos miceliales óptimos a temperatura de 25 °C con 8.1 y 8.0 cm respectivamente. El cual concluyó esta investigación que el crecimiento micelial óptimo de la cepa mexicana fueron a pH 4.0 y 4.5, temperatura de 25 °C y medio de cultivo EMA.

**Palabras clave:** crecimiento micelial, medio de cultivo, temperatura.

#### ABSTRACT

The Mexican strain CP-145 of *Ganoderma lucidum* due to the medicinal importance it has presented lately, the present investigation had as objective to evaluate the effect of temperature and culture medium on the optimal mycelial growth in different pH ranges. The treatments corresponded to the use of potato dextrose agar (PDA) and malt extract agar (EMA), with two temperature levels (25 and 28 °C) and six pH ranges (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5). The experimental design was completely randomised with repeated measures over time, analysed with the REPEATED MEASURE package and the time effect with PROC MIXED of SAS. As a result, the effect of temperature and culture media in the different pH ranges showed significant differences ( $P \leq 0.05$ ). The optimal mycelial growth of the Mexican strain of *G. lucidum* was in the EMA culture medium in the pH ranges of 4.0 and 4.5 with 8.3 and 8.2 cm respectively. Similarly, in the pH ranges 4.0 and 4.5 the optimum mycelial growth was obtained at 25 °C with 8.1 and 8.0 cm respectively. This research concluded that the optimal mycelial growth of the Mexican strain was at pH 4.0 and 4.5, temperature of 25 °C and EMA culture medium.

**Key words:** mycelial growth, culture medium, temperature.

**Recibido:** Junio 8 de 2021 **Aprobado:** Diciembre 20 de 2021

\* M.C. en Agroecosistemas Tropicales, Instituto de Tecnología de los Alimentos, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón, Oax. México, email: juliocesar@unca.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0003-0838-518X>.

\*\* Dr. en Ganadería. Instituto de Tecnología de los Alimentos, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón, Oax. México, email: jasanchez@unca.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0001-8129-5135>.

## INTRODUCCIÓN

El género *Ganoderma*, pertenecen al Phylum Basidiomycota, Orden Aphyllophorales y Familia Ganodermataceae (Alexopoulos *et al.*, 1996). *G. lucidum* por las propiedades medicinales que le atribuyen a nivel mundial, ha sido aislada y preservada en medios de cultivo comerciales para la obtención de crecimientos miceliales óptimos (Stamets 1993; Biley *et al.*, 2000; Singh, 2007). Investigaciones por Jayasinghe *et al.* (2008), evaluaron cepas silvestres coreanas de *G. lucidum* en medio PDA por 10 días, obteniendo el rango de pH 5 a 9 con 87.0 a 66.7 mm de diámetro a temperaturas de 25 y 30 °C respectivamente y en medios de cultivo glucosapeptona, extracto de levadura-malta, medio completo, PDA, Lilly y Hamada obtuvieron crecimientos miceliales favorables 87.0 mm de diámetro promedio. Veena y Pandey (2011), determinaron que el aislamiento óptimo de una cepa hindú de *G. lucidum* fue en medio de cultivo EMA en pH 4.0 a 6.5 y una temperatura de 30 °C. Pooja-Kapoor y Sharma (2014), evaluaron diferentes cepas de *G. lucidum* en medio EMA por 7 días se obtuvieron a pH 5.0 y temperaturas de 25 y 30 °C con 83.0 y 85.0 mm de diámetro respectivamente y 173.33 mg de biomasa. Investigaciones realizadas por Rolim *et al.* (2014), indican que las cepas brasileñas de *G. lucidum* en PDA no mostró variaciones en el crecimiento micelial en rangos de pH 4.0 a 8.0, no obstante, si requiere una temperatura de 28 °C. En cuanto a Singh *et al.* (2015), al evaluar el efecto de la temperatura y pH de *G. lucidum* en medio PDA a 12 días de incubación, encontraron que el máximo crecimiento micelial fue de 4.5 cm de diámetro con pH 5.5 y temperatura de 30 °C. No obstante, Joshi y Sagar (2016) encontraron que el mejor medio cultivo fue extracto de malta agar (EMA) con crecimiento de 81.0 mm de diámetro a 25 °C, en comparación con otros medios de cultivo comerciales. Shilpi Rawat (2018) evaluó diferentes factores para el crecimiento micelial óptimo de *G. lucidum* y obtuvo como resultado que el medio de cultivo favorable fue EMA y PDA con 7.64 y 5.64 cm, temperatura de 25 y 20 °C con 8.72 y 7.34 cm y pH 5.0 y 6.0 con 7.45 y 7.75 cm de diámetro respectivamente. Ian *et al.* (2019), se basaron en identificar una cepa fúngica eficaz y versátil para la bioingeniería de micelios, lo cual obtuvieron para *G. lucidum* que a 22 °C en medio de cultivo PDA fue 9.03 cm de diámetro y en medios PDA y SDA a temperaturas de 30 y 37 °C los crecimientos miceliales fueron solo de 1 cm de diámetro, concluyendo que el efecto temperatura influyó en el crecimiento micelial. Nguyen *et al.* (2019), investigaron las condiciones óptimas del crecimiento micelial y obtención de cuerpos fructíferos de la cepa GA3 Ling Zhi de *G. lucidum*, obteniendo el mejor crecimiento micelial de 83.68 mm y tasa de crecimiento

de 9.29 mm/día con el tratamiento PGA suplementado con extracto de salvado de arroz, la temperatura óptima fue 30 °C con 90.0 mm y conforme disminuía el crecimiento micelial también, en cuanto al pH no generó efecto al crecimiento micelial siendo superiores a 80.0 mm en el rango 4 hasta 12 durante los 9 días de incubación. Cortina-Escribano *et al.* (2020), evaluaron el efecto del crecimiento micelial de cepas de *G. lucidum* sobre diferentes sustratos maderables y medios de cultivo y obtuvieron que en los medios de cultivo EMA y PDA presentaron los mejores crecimientos miceliales con 8.5 cm de diámetro a 25 °C después de 24 días. Los estudios previos realizados a nivel mundial con cepas de *G. lucidum*, indican diferentes comportamientos de crecimiento micelial bajo condiciones similares de pH, temperatura y medio de cultivo. Es este contexto, la cepa mexicana CP-145 de *G. lucidum*, han reportado que su cuerpo fructífero tiene gran potencial en la salud humana por los metabolitos secundarios generados, los efectos prebióticos, la acción hipercolesterolemia y ha sido utilizado como primer caso clínico en México con una paciente diabética tipo 2 (Meneses *et al.*, 2016; Martínez-Carrera *et al.*, 2016). Es por ello, que la presente investigación planteó como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y medio de cultivo sobre el crecimiento micelial en diferentes rangos de pH de una cepa mexicana de *G. lucidum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

La cepa *Ganoderma lucidum* fue aislada por el Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, México por tejido de un basidioma colectado en un árbol muerto en el estado de Morelos, México a 2300 m de altitud. La cepa evaluada en el presente estudio, se encuentra depositada en el Cepario de Hongos del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, México, con el registro CP-145 (Meneses *et al.*, 2016). Ésta se mantuvo en medio papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon®) a 28 °C por 7 días.

### Medios de cultivo

Para determinar el crecimiento micelial de *G. lucidum*, se cortó con un horador de corcho 5 mm de diámetro de micelio de las cajas Petri mantenidas en medio PDA a 28 °C por 7 días. Primero se colocaron 25 mL de medio PDA o extracto de malta agar (EMA) (Difco®) fundido en cada caja Petri estéril de 9 cm de diámetro. Los medios PDA y EMA previamente fueron ajustados a pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 con la adición de HCl o NaOH a 1M (Amin *et al.*, 2011). Una vez solidificado los medios en condiciones de esterilidad, se inocularon colocando al centro de cada caja Petri los implantes de 5 mm de diámetro (Jayasingue *et al.*, 2008). Las cajas ino-

**Tabla 1.** Efecto de los medios de cultivo en los diferentes niveles de pH sobre el crecimiento micelial (diámetro en cm) y tasa de crecimiento (cm/día) de *G. lucidum* en medio PDA y EMA.

Error estándar 0.0364

Medias con diferente literal son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

pH	Medios de cultivo	Días				Tasa de crecimiento
		3	6	9	12	
4.0	PDA	1.421 <sup>uv</sup>	3.448 <sup>pqr</sup>	5.197 <sup>kl</sup>	6.955 <sup>cd</sup>	0.551
	EMA	1.605 <sup>u</sup>	4.590 <sup>no</sup>	7.314 <sup>bc</sup>	8.325 <sup>a</sup>	0.701
4.5	PDA	1.445 <sup>uv</sup>	3.780 <sup>p</sup>	5.147 <sup>kl</sup>	6.855 <sup>def</sup>	0.563
	EMA	1.513 <sup>uv</sup>	3.757 <sup>p</sup>	6.804 <sup>def</sup>	8.267 <sup>a</sup>	0.643
5.0	PDA	1.285 <sup>uv</sup>	3.491 <sup>pq</sup>	4.698 <sup>mno</sup>	6.333 <sup>gh</sup>	0.515
	EMA	1.406 <sup>uv</sup>	3.470 <sup>pqr</sup>	5.497 <sup>ij</sup>	7.640 <sup>b</sup>	0.573
5.5	PDA	1.285 <sup>uv</sup>	3.100 <sup>rst</sup>	4.439 <sup>o</sup>	6.490 <sup>feg</sup>	0.494
	EMA	1.540 <sup>uv</sup>	3.185 <sup>qrs</sup>	5.584 <sup>i</sup>	6.889 <sup>de</sup>	0.559
6.0	PDA	1.198 <sup>v</sup>	3.142 <sup>qrs</sup>	4.836 <sup>lmn</sup>	6.033 <sup>h</sup>	0.490
	EMA	1.379 <sup>uv</sup>	2.742 <sup>t</sup>	5.322 <sup>ijk</sup>	6.362 <sup>gh</sup>	0.509
6.5	PDA	1.244 <sup>uv</sup>	3.299 <sup>qr</sup>	5.002 <sup>klm</sup>	6.057 <sup>h</sup>	0.503
	EMA	1.512 <sup>uv</sup>	2.849 <sup>st</sup>	4.762 <sup>mno</sup>	6.532 <sup>efg</sup>	0.513

culadas fueron incubadas a 25 o 28 °C por 12 días en condiciones de oscuridad. Se realizaron 3 réplicas por temperatura, a diferentes niveles de pH y medio de cultivo. Durante el período de incubación, se midió el diámetro de crecimiento micelial (cm) cada tres días; para ello se trazaron 2 ejes cartesianos sobre la tapa de la caja Petri, tomando como inserción el centro del implante (Gaitán-Hernández, 2005). Se determinó el diámetro micelial (cm) y la tasa de crecimiento micelial (cm/día) se determinó de acuerdo a Nguyen *et al.* (2019), empleando el diseño experimental completamente al azar, analizados con REPEATED MEASURE y el efecto tiempo con PROC MIXED de SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento micelial óptimo de *G. lucidum*

El crecimiento micelial óptimo por la cepa mexicana de *G. lucidum* en los diferentes medios de cultivo, temperaturas y niveles de pH a los 12 días de incubación presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) y se muestran en

el Cuadro 1 y 2. El efecto del pH de la cepa mexicana si influye, siendo específico en 4.0 y 4.5, el cual difiere con el resto de las cepas de estudio. En cuanto al efecto del medio de cultivo para la cepa CP-145 de *G. lucidum* mostró que en EMA con pH 4.0 y 4.5 fueron los crecimientos miceliales óptimos con 8.325 y 8.267 cm respectivamente a los 12 días. Por lo tanto, los resultados obtenidos por Veena y Pandey (2011), Pooja-Kapoor y Sharma (2014), Shilpi Rawat (2018) concuerda con lo obtenido por la cepa mexicana siendo el efecto del medio de cultivo favorable para el crecimiento micelial.

En cuanto al efecto de la temperatura, el crecimiento micelial óptimo de la cepa CP-145 de *G. lucidum*, fue a 25 °C en los pH 4.0 y 4.5 con 8.129 y 8.034 cm y tasas de crecimiento micelial de 0.695 y 0.635 cm respectivamente. Con base en los resultados de temperatura a 25 °C de la cepa mexicana, concuerda con los autores Jaysinghe *et al.* (2008), Joshi y Sagar (2016), Shilpi Rawat (2018) y Cortina-Escribano *et al.* (2020), pero bajo otras condiciones establecidas.

**Tabla 2.** Efecto de la temperatura en los diferentes niveles de pH sobre el crecimiento micelial (diámetro en cm) y tasa de crecimiento (cm/día) de *G. lucidum* en medio PDA y EMA.

Error estándar 0.0364

Medias con diferente literal son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

pH	Temperatura	Días				Tasa de crecimiento
		3	6	9	12	
4.0	25 °C	1.549 <sup>rs</sup>	4.575 <sup>kl</sup>	7.422 <sup>b</sup>	8.129 <sup>a</sup>	0.695
	28 °C	1.477 <sup>rs</sup>	3.462 <sup>no</sup>	5.090 <sup>ij</sup>	7.151 <sup>bcd</sup>	0.557
4.5	25 °C	1.494 <sup>rs</sup>	3.737 <sup>mn</sup>	6.761 <sup>e</sup>	8.034 <sup>a</sup>	0.635
	28 °C	1.464 <sup>rs</sup>	3.801 <sup>mn</sup>	5.190 <sup>hij</sup>	7.087 <sup>bcd</sup>	0.572
5.0	25 °C	1.367 <sup>rst</sup>	3.675 <sup>mn</sup>	5.292 <sup>ghi</sup>	7.052 <sup>bcd</sup>	0.561
	28 °C	1.324 <sup>rst</sup>	3.286 <sup>o</sup>	4.904 <sup>jk</sup>	6.921 <sup>de</sup>	0.527
5.5	25 °C	1.222 <sup>st</sup>	2.579 <sup>p</sup>	4.935 <sup>ijk</sup>	6.332 <sup>f</sup>	0.478
	28 °C	1.603 <sup>r</sup>	3.706 <sup>mn</sup>	5.087 <sup>ij</sup>	7.046 <sup>cde</sup>	0.576
6.0	25 °C	1.087 <sup>t</sup>	2.179 <sup>q</sup>	4.510 <sup>l</sup>	5.004 <sup>ij</sup>	0.410
	28 °C	1.490 <sup>rs</sup>	3.705 <sup>mn</sup>	5.649 <sup>s</sup>	7.391 <sup>bc</sup>	0.589
6.5	25 °C	1.228 <sup>st</sup>	2.294 <sup>pq</sup>	4.264 <sup>l</sup>	5.466 <sup>gh</sup>	0.430
	28 °C	1.528 <sup>rs</sup>	3.854 <sup>m</sup>	5.500 <sup>gh</sup>	7.124 <sup>bcd</sup>	0.589

## CONCLUSIONES

Se concluye que la cepa mexicana CP-145 de *G. lucidum* se estableció bajo las condiciones de pH 4.0 y 4.5, temperatura de 25 °C y medio de cultivo EMA para su crecimiento micelial. Por lo tanto, la tasa de crecimiento micelial obtenida es inferior a los reportado por otros autores. Por lo tanto, se recomienda establecer medios de cultivo suplementados con pH ácidos para obtener crecimientos miceliales óptimos y similares a otras cepas *G. lucidum*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGEN-HCFM) del Colegio de Postgraduados Campus Puebla, México por la donación de la cepa 145 de *Ganoderma lucidum*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C. J., Mims C. W., Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology*. Fourth ed. New York. 869 p.
- Amin F., Bhatti H. N. and Rehman S. (2011). Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. 10 (28): 5514-5523.
- Biley V. T., Solomko E. F. and Buchalo A. S. (2000). Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In: Van Griensven LJLD, ed. 15<sup>th</sup> International Congress Science, Cultivation of edible fungi, Masstricht, Balkena, Rotterdam. Pp. 779-782.
- Cortina-Escribano M., Veteli P., Linnakoski R., Vanhanen H. (2020). Effect of wood residues on the growth of *Ganoderma lucidum*. *Karstenia*. 58 (1): 16-28.

- Gaitán-Hernández R. (2005). Evaluación *in vitro* del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología* 21:77-84.
- Ian F., Aisha F., Ash A., Pauline F. (2019). Effect of temperature and growth media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* Strains. *Cohesive Journal of Microbiology & Infectious Disease*. 2 (5): 1-5.
- Jayasinghe C., Imtiaj A., Hur H., Lee G. W., Lee T. S. and Lee U. Y. (2008). Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*. 36 (1): 28-33.
- Joshi M. and Sagar A. (2016). Culturing and spawnings strategies for cultivation *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8 (2): 326-328.
- Martínez-Carrera D., Larqué-Saavedra A., Palacio A. T., Torres N., Meneses M. E., Cruz M. S., Almora P. M., Quintero M. B., Uribe H. E., Tello-Salgado I., Bernabé-González T., Sánchez W. M. y Mayett Y. (2016). Contribución de los hongos comestibles, funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. In: Martínez-Carrera, D. y Ramírez Juárez J. (Eds.), Ciencia, Tecnología e innovación en el sistema agroalimentario de México. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México. Pp.581-640.
- Meneses M. E., Martínez-Carrera D., Torres N., Sánchez-Tapia M., Aguilar-López M., Morales P., Sobal M., Bernabé T., Escudero H., Granados-Portillo O. y Tovar A. R. (2016). Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *Plos One*. 11 (7): 1-20.
- Nguyen B. T. T., Ngo N. X., Le V. V., Nguyen L. T., Kana R. and Nguyen H. D. (2019). Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* strain GA3. *Vietnam Journal of Science Technology and Engineering*. 61 (1): 62-67.
- Pooja-Kapoor and Sharma B. M. (2014). Studies on different growth parameters of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 3 (4): 1515-1524.
- Rolim L. N., Sales-Campos C., Cavalcanti M. A. Q. and Urben A. F. (2014). Application of Chinese Jun-Cao technique for the production of Brazilian *Ganoderma lucidum* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57 (3): 367-373.
- Shilpi Rawat. (2018). Isolation and evaluation of *Ganoderma lucidum* from Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*. 7 (03): 472-479.
- Singh J., Singh S., Kumar A. and Singh F. (2015). Effect of temperature and pH on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr. Karst). *International Journal of Tropical Agriculture*. 33 (2): 1279-1282.
- Singh R. P., Verma R. C., Arora R. K., Mishra K. K., Bhanu C. and Singh M. (2007). Medicinal mushrooms of Uttaranchal with reference to *Ganoderma*, *Auricularia* and *Cordycaps sinensis*. In: Mushroom Biology and Biotechnology, eds Rai RD, Singh SK, Yadav MC and Tewari RP. *Mushroom Society of India*. Pp. 321-324.
- Stamets, P. C. (1993). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Mycomedia, Olympia. Washington. 552 p.
- Veena S. S. and Pandey M. (2011). Paddy straw as a substrate for the cultivation of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. in India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13 (4): 397-400.