



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA
REGIONAL

**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**

ISAAC TELLO SALGADO

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2010



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03 ANEXO

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

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Isaac Tello Salgado** alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **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** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Pue., a 29 de octubre de 2010

Isaac Tello Salgado

Firma

Mercedes Sobal Cruz

Vo. Bo. Profesora Consejera


La presente tesis titulada: **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**, realizada por el alumno **Isaac Tello Salgado**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ-CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:



DR. SEVASTIANOS ROUSSOS

H. Puebla de Zaragoza, octubre de 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

Isaac Tello Salgado
Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, 2010

Actualmente se estudia la capacidad funcional a nivel molecular de los hongos basidiomicetos como modificadores de la respuesta biológica, dada la efectividad de los productos examinados de activar al sistema inmunológico, sin embargo, el origen geográfico de estos recursos, principalmente son asiáticos y europeos. *Ganoderma* es reconocido por su eficiente actividad en el tratamiento de varias enfermedades, principalmente las anticancerígenas y antitumorales, crece de manera silvestre en el área central de México, una de las más importantes, debido a la convergencia de las regiones Neártica y Neotropical, lo cual da como resultado un amplia diversidad de recursos genéticos. En la presente investigación se aislaron 66 cepas del género *Ganoderma* producto de los recorridos a los Estados de Morelos, Puebla, México, Guerrero y Veracruz. Se obtuvieron 12 grupos representativos, identificados por sus características morfológicas. Al analizar los datos obtenidos a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso, se obtuvo su filogenia, identificando 7 grupos pertenecientes al género *Ganoderma*, los cuales mostraron valores de diferencias nucleotídicas y distancias genéticas mayores a 6 y 0.020%, respectivamente. Dentro del género *Ganoderma* se identificó a *G. lucidum*, subgénero *Ganoderma* complejo laqueado y a *G. applanatum* y *G. subamboinense* dentro del subgénero *Elfvigia* complejo no laqueado. Al examinar las características morfológicas del micelio cultivado en EMA+FB (extracto de malta agar más buffer de fosfatos) y BFS+BF (*Branflakes* sólido más buffer de fosfatos) se encontraron 3 densidades diferentes, 6 tipos de textura y 11 tonalidades de color para las 66 cepas. Las características microscópicas de las cepas cultivadas en caja Petri fueron la presencia de dos tipos de hifas, así como la presencia de clamidosporas. Se fructificaron 9 cepas, perteneciendo ocho al subgénero *Ganoderma* y una a *Elfvigia*, mostrando eficiencias biológicas del 3.96% al 8.11% y 4.77%, respectivamente. Se identificaron las condiciones óptimas del cultivo de *Ganoderma* spp, proponiendo un paquete tecnológico, elemento esencial en procesos de innovación para impulsar el desarrollo rural en México.

Palabras clave: Caracterización, cultivo, filogenia, *Ganoderma*, recurso genético.

DIVERSITY OF THE RESOURCES GENETICS MEXICANS OF THE FUNCTIONAL MUSHROOM *GANODERMA* (FUNGI, GANODERMATACEAE), WELL-KNOWN AS *REISHI* IN THE INTERNATIONAL MARKETS, AND THEIR RELEVANCE FOR THE REGIONAL DEVELOPMENT

Isaac Tello Salgado

Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, 2010

Nowadays the functional capacity in mushrooms is studied at molecular level in basidiomicetes like modifiers of biological response, due to the effectiveness of these products in activating the immunologic system. However, the geographical origin of these resources, are mainly Asian and European. *Ganoderma* is recognized by its efficient activity in the treatment of several illnesses, mainly the anti-cancer and anti-tumor. It grows wild in the central area of Mexico, one of the most important, due to the convergence of the regions Neartic and Neotropical, that gives a wide diversity of genetic resources. In the present study 66 strain of the genus *Ganoderma* were isolated from the States of Morelos, Puebla, Mexico, Guerrero and Veracruz. 8 representative groups were obtained, identified by mean to morphological characteristic. The DNA sequence variation in the internal transcribed spacer (ITS) region among 55 strains was investigated. The analysis of the ITS region clustered into seven distinct phylogenetic groups, showing values of differences nucleotide and distances genetics major to 6 and 0.020%, respectively. Molecular analysis revealed that the genus *Ganoderma* is composed of sugenus *Ganoderma*, which include *G. lucidum* (laccate complex), and subgenus *Elfvigia*, which include *G. applanatum* and *G. subamboinense* (non-laccate complex). Three different densities, 6 texture types and 11 color tonalities in the 66 strain were observed in the mycelium morphological characteristics when were grown on (EMA+PB) extract malt agar and phosphate buffer and (BFS+PB) *Branflakes* solid and phosphate buffer. The microscopic characteristics of the strains cultivated in Petri dishes, were the presence of two hyphae types, as well as chlamydo spores. 9 strains were cultivated and their biological efficiencies determined, eight strains belong to the subgenus *Ganoderma* (3.96 to 8.11%) and one to *Elfvigia* (4.77%). Identifying the good conditions of the cultivation of *Ganoderma* spp, the technological package, essential element in innovation processes was developed to impel the rural development in Mexico.

Words key: Characterization, cultivation, phylogeny, *Ganoderma*, genetic resource.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi esposa e hijo, por su apoyo incondicional durante mis estudios, ya que son parte fundamental y la razón principal de mi formación profesional, gracias por los consejos, el esfuerzo y por creer a cada momento en mí.

A las personas integrantes de mi Consejo Particular por su trabajo, esfuerzo, dedicación, tiempo y el apoyo que me brindaron, y sobre todo por la paciencia para conmigo.

Al Biól. Elizur Montiel Arcos, por su gran conocimiento teórico en hongos, así como en el campo, además, de los consejos, el esfuerzo y sobre todo el apoyo y amistad que me ha brindado.

A todos los compañeros, amigos y familia, quienes de alguna manera me han acompañado hasta hoy, aún en la distancia.

A los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados han financiado parte de mi formación.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades de los hongos.....	3
2.2 Morfología de los hongos.....	4
2.3 Reproducción.....	4
2.4 El género <i>Ganoderma</i>	6
2.5 Sistemática clásica de <i>Ganoderma</i>	6
2.6 Sistemática molecular del género <i>Ganoderma</i>	7
2.6.1 Contexto actual.....	9
2.7 Recursos genéticos.....	10
2.8 Regiones internas de transcripción (ITS).....	11
2.9 Análisis filogenético.....	12
2.9.1 Máxima parsimonia.....	13
2.9.2 Mínima evolución.....	13
2.10 Zona de estudio.....	14
2.11 Aspectos históricos del cultivo comercial de hongos comestibles a nivel mundial.....	14
2.12 Aspectos históricos del cultivo comercial de hongos comestibles en México.....	15
2.13 Producción mundial de hongos medicinales.....	15
2.14 Cultivo de <i>Ganoderma</i>	17
2.15 Parámetros de producción de compuestos bioactivos.....	17
2.16 Fermentación en fase sólida.....	18
2.17 Substancias bioactivas en especies de <i>Ganoderma</i>	19
2.18 Desarrollo rural y sostenible.....	19
2.19 Paquete tecnológico.....	20
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 Material biológico.....	27

7.2	Aislamiento y purificación de las cepas.....	27
7.3	Medios y condiciones de cultivo.....	27
7.3.1	Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.....	27
7.3.2	Medio de cultivo <i>branflakes</i> sólido más buffer de fosfatos (BFS+BF).....	28
7.3.3	Medio de cultivo extracto de malta agar más buffer de fosfatos (EMA+BF).....	28
7.3.4	Medio de cultivo completo para levaduras CYM.....	28
7.4	Velocidad de crecimiento.....	28
7.4.1	Tasa específica de crecimiento (μ) en medio sólido.....	28
7.5	Cinética de crecimiento.....	29
7.5.1	Cultivo en medio de cultivo sólido en caja Petri.....	29
7.6	Preparación del inóculo “semilla” para el cultivo en sustrato sólido.....	29
7.6.1	Preparación del grano.....	29
7.6.2	Esterilización.....	29
7.6.3	Inoculación de la “semilla”.....	29
7.6.4	Incubación.....	30
7.7	Preparación de las unidades de producción para cultivo en medio sólido....	30
7.7.1	Formulación COLPOS-17.....	30
7.7.2	Preparación del sustrato.....	30
7.7.3	Determinación del peso seco del sustrato y pH.....	30
7.7.4	Inoculación del sustrato estéril.....	31
7.7.5	Incubación de las unidades de producción.....	31
7.7.6	Fructificación de las unidades de producción.....	31
7.7.7	Manejo postcosecha de los cuerpos fructíferos.....	31
7.7.8	Determinación del rendimiento y eficiencia biológica.....	32
7.8	Análisis molecular.....	32
7.8.1	Cultivo micelial en medio líquido CYM.....	32
7.8.2	Liofilización.....	33
7.8.3	Extracción del ADN genómico de hongos filamentosos.....	33
7.8.4	Elaboración del gel de agarosa.....	34
7.8.5	Electroforesis del ADN.....	34
7.8.6	Cuantificación del ADN.....	34
7.8.7	Oligonucleótidos (<i>primers</i>) para PCR y secuenciación.....	34
7.8.8	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35

7.8.9 Purificación del producto del PCR.....	35
7.8.10 Secuenciación de los productos del PCR.....	35
7.8.11 Alineamiento de las secuencias.....	36
7.8.12 Inferencia filogenética.....	36
7.8.13 Análisis de máxima parsimonia.....	36
7.8.14 Análisis de mínima evolución.....	37
7.8.15 Análisis de distancia.....	37
7.8.15.1 Diferencias nucleotídicas (%)	37
7.8.15.2 Distancias genéticas.....	38
7.8.16 Reactivos para extracción del ADN.....	38
7.9 Análisis estadístico.....	39
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
9.1. Recolecta del material biológico.....	42
9.1.1 Recolecta de los cuerpos fructíferos y aislamiento de las cepas.....	42
9.2 Estudio filogenético.....	45
9.2.1 Extracción de ADN.....	45
9.2.2 Amplificación de la secuencia flanqueada por los <i>primers</i> ITS-1 e ITS-4.....	46
9.2.3 Análisis filogenético.....	47
9.2.3.1 Máxima parsimonia.....	47
9.2.3.2 Mínima evolución.....	54
9.2.3.3 Identificación de las especies.....	59
9.3 Caracterización del material biológico.....	63
9.3.1 Caracterización morfo-descriptiva de las cepas.....	63
9.3.2 Caracterización microscópica de las cepas.....	69
9.3.3 Cinética de crecimiento.....	74
9.4 Cultivo sólido en módulo de producción.....	78
9.4.1 Caracterización de las cepas en sustrato sólido.....	78
9.4.2 Fructificación de <i>Ganoderma</i> spp.....	78
9.4.3 Caracterización morfológica de los cuerpos fructíferos de <i>Ganoderma</i> spp.....	80
9.5 Diseño del paquete tecnológico del cultivo de <i>Ganoderma</i> spp.....	82
9.5.1 La estrategia.....	84

9.5.2 Paquete tecnológico.....	85
9.5.3 Actores de la estrategia.....	88
10 CONCLUSIONES.....	89
11 PERSPECTIVAS.....	91
12 LITERATURA CITADA.....	92
ANEXO A.....	102
ANEXO B.....	114
ANEXO C.....	125
ANEXO D.....	133
ANEXO E.....	141
ANEXO F.....	149
ANEXO G.....	152

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los <i>primers</i> para las regiones internas de transcripción ITS-1 e ITS-4.....	34
Tabla 2. Relación de cepas de <i>Ganoderma</i> registradas en el CREGENHC, del Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla, utilizadas en el presente estudio.....	43
Tabla 3. Características morfo-descriptivas del micelio en las 66 cepas de <i>Ganoderma</i>	65
Tabla 4. Características microscópicas del micelio en las diferentes cepas de <i>Ganoderma</i>	70
Tabla 5. Tasa específica de crecimiento (mm/día) de las 66 cepas de hongos pertenecientes a <i>Ganoderma</i>	74
Tabla 6. Producción (g/k de peso seco) y eficiencia biológica (EB) obtenidas empleando la formulación COLPOS-17.....	80
Tabla 7. Características morfológicas de los cuerpos fructíferos cosechados de especies de <i>Ganoderma</i>	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hongos medicinales <i>Lentinula</i> (izquierda) y <i>Ganoderma</i> (derecha) utilizados en la elaboración de té con propiedades funcionales.....	2
Figura 2. DNA ribosomal, muestra las regiones internas de transcripción y los espacios intergénicos.....	8
Figura 3. Diagrama general del diseño experimental a seguir en la presente investigación.....	41
Figura 4. Especímenes recolectados de <i>Ganoderma</i> , mostrando las principales características del género.....	42
Figura 5. ADN total de cepas de <i>Ganoderma</i> spp. Pozo 1 marcador de peso molecular ADN λ <i>Eco</i> RI y <i>Hind</i> III, (Roche, Alemania), pozos 2 y 3 marcador de peso molecular ADN λ (Roche, Alemania), 10 y 20 ng, respectivamente, los pozos 4 al 9 pertenecen a las cepas CP-406, CP-408, CP-62, CP-434, CP-446 y CP-388, respectivamente.....	45
Figura 6. Productos de la amplificación del PCR de cepas de <i>Ganoderma</i> spp. Pozos 1 y 11 marcador de peso molecular λ ADN <i>Eco</i> RI y <i>Hind</i> III, (Roche Alemania), pozos 2 al 4 cepas CP-406, CP-408, CP-62, CP-434, CP-446 y CP-388, respectivamente, pozos 9 y 10 marcador de peso molecular ADN λ (Roche, Alemania), 20 y 10 ng, respectivamente.....	46
Figura 7a. Filograma obtenido del análisis de las secuencias de la región ITS-1, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	49
Figura 7b. Filograma del análisis de las secuencias obtenidas de la región ITS-4, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas. los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	51
Figura 7c. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de la regiones ITS-1 + ITS-4, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	52

Figura 7d. Filograma obtenido de las secuencias de la región ITS-1, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de <i>Neighbor-Joining</i> y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	55
Figura 7e. Filograma obtenido de las secuencias de la región ITS-4, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de <i>Neighbor-Joining</i> y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	57
Figura 7f. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de <i>Neighbor-Joining</i> y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	58
Figura 7g. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de la región ITS-1 + secuencias externas, usando como grupo externo a <i>Fomitopsis palustris</i> , el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de máxima parsimonia y un <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.....	62
Figura 8. Características morfo-descriptivas del micelio del género <i>Ganoderma</i> spp. a) densidad, b) textura y c) color.....	64
Figura 9. Características morfológicas del micelio de <i>Ganoderma</i> spp. a) Clamidospora anclada al micelio, b) Clamidosporas ancladas al micelio color café vistas al microscopio óptico, objetivo de 10X, c) Conjunto de clamidosporas con forma globosa vistas al objetivo de 40X y d) Clamidosporas ancladas al micelio, tipo hifal monomítico, septado y ausencia de fíbulas.....	74
Figura 10. Filogenia de 51 cepas de <i>Ganoderma</i> spp., generada a partir de la región ITS-1 comparado con características morfológicas del micelio. TC= Tasa de crecimiento: ●= ≤ 9, ■= 7-9, ▲=5-7, ◆= ≥ 5. Densidad: ○= abundante, □= regular, △= escaso. Textura: ⊙= lanosa, ⊞= ligeramente lanoso, Δ= liso, ◇= ligeramente liso, ⊕= fibroso, ⊖= liso con invaginaciones. Clamidosporas: ☆= ausente, ★= presente, msnm= metros sobre nivel del mar.....	77
Figura 11. Cuerpos fructíferos cosechados en el módulo experimental de <i>Ganoderma</i> spp. A: CP-381, B: CP-382, C: CP-383, D: CP-388, E: CP-390, F:	

CP-387, G: CP-391, H: CP-392, I: CP-451, J: CP-444, K: CP-389 y L: CP-409.....	81
Figura 12. Diagrama de los elementos considerados en el diseño del paquete tecnológico.....	84

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, viven prácticamente en todos los ambientes y constituyen un grupo muy variable y polimórfico. Se encuentran clasificados dentro del reino fungí, este reino independiente derivada de la palabra “fungus”, aplicada por Tournefort en el siglo XVII, significa florecimiento o excrecencia de la tierra (Bessey, 1950). Este término coincide con la denominación que los purépechas utilizan para referirse a los hongos, “echeri uetsikuaru enganaka”, que quiere decir nacido de la tierra (Mapes *et al.*, 1981).

Guzmán (2000), estimó que podrían ser de 140,000 a 200,000 especies de hongos existentes en la Tierra. También, señaló que dada la gran biodiversidad de México y según lo estimado para el mundo, el número podría ser más del doble de lo calculado. Se conocen aproximadamente más de 150 especies de hongos comestibles, de las cuales sólo se cultiva la mitad de estas, la otra parte se encuentra de manera silvestre en el bosque y solamente unas cuantas especies de hongos son cultivados para el comercio (Chang, 1972). Las especies comestibles que han sido cultivadas, principalmente son aquellas que viven sobre troncos en descomposición y pocas son aquellas que se desarrollan en el suelo de praderas o bosques, debido a que los requerimientos para su cultivo involucran además de nutrientes, interacciones mutualistas (Guzmán *et al.*, 2002).

Los países asiáticos usan ciertos tipos de hongos como base de su medicina tradicional. Los más conocidos en occidente son el *shiitake* (*Lentinula edodes*), y el *reishi*, a este último lo llaman “el hongo de la longevidad”. El *reishi*, conocido científicamente como *Ganoderma lucidum*, ha sido usado en la medicina China tradicional por más de 2000 años. Estudios recientes dan cuenta de que todo hongo comestible es “beneficioso para el organismo humano” debido al aporte de carbohidratos, proteínas, vitaminas y elementos esenciales (Sánchez y Royse, 2001). La propia conformación de las hifas al ser ingeridas, aportan los beneficios de las fibras vegetales, con la gran ventaja de digerirse con mayor facilidad. Todo hongo produce proteínas, minerales, aminoácidos, carbohidratos, tiamina y una gran variedad de enzimas. Los oligosacáridos determinan, según estén presentes, en mayor o menor cantidad, que un hongo sea considerado benéfico medicinal. El *shiitake* es el más popular y el mejor estudiado de los hongos medicinales y se sigue realizando investigación acerca de su cultivo, así como de sus propiedades funcionales (Figura 1).

Los hongos son bajos en calorías, altos en proteínas, hierro, fibra, minerales y vitaminas. Contienen vitaminas B₁, B₂, B₆ y B₁₂, con altas cantidades de riboflavina y niacina. El consumo de *shii take* es una buena forma de prevenir las enfermedades y de tener buena salud (Martínez–Carrera *et al.*, 2004). Se ha encontrado que algunas especies comestibles son inhibidores del crecimiento de diferentes tipos de tumores y su uso se ha documentado en el tratamiento contra el cáncer de estómago, esófago, pulmón y próstata (Wasser y Weis, 1999). Extractos acuosos (de cocción y esencias) de hongos usados en la medicina tradicional China se han reconocido por ser eficaces en el tratamiento de varias enfermedades. Productos farmacéuticos importantes con aplicaciones médicas han sido extraídas de diferentes hongos, a saber: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae*, *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Tremella fusiformis*, *Trametes versicolor* y *Grifola frondosa* y, más recientemente de especies como *Phellinus* spp. y *Hericium erinaceus*, relacionadas con un largo historial de su uso en la medicina tradicional que data desde hace más de cuatro milenios (Mizuno *et al.*, 1995).



Figura 1. Hongos medicinales *Lentinula* (izquierda) y *Ganoderma* (derecha) utilizados en la elaboración de té con propiedades funcionales.

El estudio de los diferentes constituyentes de la pared celular de los hongos se ha extendido desde que se comprobó la existencia de una variedad de polisacáridos, provenientes de diferentes fuentes fúngicas, que tienen la capacidad de modular el sistema inmunológico. Farmacológicamente, éstos se clasifican como modificadores de la respuesta biológica. Los más activos parecen ser los β (1→3)D-glucanos, referidas en algunas ocasiones como β (1→3)(1→6)D-glucanos, por poseer ramificaciones en el carbono sexto de la cadena principal. Todas tienen como estructura común una cadena principal que consiste en unidades de glucosa unidas por enlaces β (1→3), a las cuales se enlazan otras unidades de β -D-glucosa mediante enlaces (1→6) bajo un patrón de sustitución aleatorio (Zhang *et al.*, 2002).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos que se encuentran en todos los biomas y sobre los más variados sustratos, incluyendo entre éstos a los mismos hongos. Así, se ha registrado la existencia de los hongos en áreas desérticas y tropicales, en zonas templadas e inclusive en ambientes acuáticos.

El desarrollo de la humanidad ha estado ligado al entendimiento y uso de los recursos de su entorno. En el caso de los hongos, dada la diversidad de tamaños (macroscópicos y microscópicos), su empleo ha sido tanto de manera consciente como inconsciente; sin embargo, no se tiene el total conocimiento sobre la identidad taxonómica de los organismos utilizados. Se estima que apenas se conoce 5% del total de los hongos existentes en el planeta y que esta proporción es mucho menor en las regiones tropicales. Hawksworth (1991), comentó que la tasa de descripción de nuevas especies alcanzaba 1,700 por año a principios de los años noventa, lo cual es notable aunque insuficiente tomando en consideración la cantidad de hongos que se estima existen en la naturaleza. Un análisis de la procedencia de los hongos (incluyendo líquenes), descritos en el período 1981–1990 indicó que 49% de ellos era de origen tropical.

Los hongos se pueden encontrar en vida libre o en asociaciones mutualistas con plantas, raíces de plantas vasculares, termitas, hormigas y con algunas especies de algas. Existen diferentes tipos de hongos, algunos son parásitos, requieren de un organismo vivo al que matan para cumplir su ciclo biológico; otros son simbióticos, viven asociados a las raíces de las plantas, como las micorrizas, en una relación de mutuo beneficio y otros son saprófitos, es decir, que viven sobre restos de plantas que terminan por degradar. En este caso, se trata de materia orgánica muerta que los hongos se encargan de transformarla en compuestos minerales más sencillos, contribuyendo a su mineralización junto con los otros microorganismos presentes en el suelo. Dentro de este grupo se encuentran los hongos comestibles (Araya, 2006).

Se distinguen de las plantas porque no almacenas su energía en forma de almidón, en su lugar almacenan otras polisacáridos como trehalosa y el glucógeno, polímero de la glucosa que los animales utilizan para almacenar energía por corto tiempo. La estructura de su cuerpo en

única, si bien los hay unicelulares como las levaduras, la mayoría de ellos están formados por conjuntos de hifas o micelio. En las hifas de los hongos inferiores el citoplasma es generalmente continuo, no está separado por septos, posee numerosos núcleos minúsculos, que se desplazan libremente por una corriente citoplasmática que también permite el transporte de elementos nutritivos al interior del micelio. Por el contrario, los hongos superiores tienen septos con perforaciones centrales que permiten el flujo del citoplasma (Herrera y Ulloa, 1990).

2.2 Morfología de los hongos

Un hongo es un organismo formado por un conjunto de filamentos casi microscópicos, llamadas hifas y son la unidad fundamental del hongo. Estos filamentos forman una masa algodonosa blanca que recibe el nombre de micelio, a partir de esta, se desarrollan los primordios que al madurar se convierten en las fructificaciones del hongo. Estas fructificaciones producen las esporas, necesarias para la permanencia de los hongos.

El cuerpo fructífero conocido como basidioma en los basidiomicetos, puede estar integrado por un sombrero o píleo que en su parte inferior presenta láminas o himenio, pie o estípite, anillo y un saco o volva. En el himenio se desarrollan las esporas y de acuerdo a la especie, además de láminas, también se puede observar en forma de venas, poros, dientes o aparentemente liso.

Las lluvias abundantes y temperaturas moderadas favorecen la aparición de los cuerpos fructíferos, los cuales se pueden recolectar en los bosques. Se recomienda no recolectar los especímenes jóvenes ya que no son tan aprovechables; además para conservar los ecosistemas debe permitirse que continúen su crecimiento e incluso que maduren, ya que también muchas especies comestibles son micorrízicas (asociación de raíz y hongo) lo que beneficia el desarrollo de los bosques.

2.3 Reproducción

Se refiere a la formación de nuevos individuos con características típicas de la especie. Hay dos formas en las que este proceso se lleva a cabo: la sexual y la asexual, ésta última llamada también somática o vegetativa ya que no involucra la fusión de esporas. Se puede dar por fragmentación del micelio, el cual al colocarse bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y substrato, da origen a un nuevo individuo. Esta forma de reproducción es muy

utilizada para multiplicar los hongos comestibles en el laboratorio, pues permite mantener las características de la cepa que se está cultivando (Herrera y Ulloa, 1990).

En otros casos, el micelio da origen a esporas asexuales por división mitótica; las cuales se denominan según el nombre de la estructura que las produce. A las que se forman por simple fragmentación del micelio se les conoce como artrosporas u oidios; a aquellas que se producen sobre hifas especializadas denominadas conidióforos, se les llama conidiosporas; a las que se producen dentro de estructuras en forma de saco (esporangio), esporangiosporas (Hawksworth *et al.*, 1983).

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos heterotálicos pasa por tres diferentes etapas de desarrollo, antes de que el hongo complete su ciclo de vida. Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan cuando entran en contacto con un substrato a una temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento. Dan origen a un micelio primario bien desarrollado conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleo generalmente haploide. En algunas especies donde únicamente hay un núcleo por compartimiento hifal se le llama monocarión. En la mayoría de los basidiomicetos, el micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. En ciertos tipos de hongos comestibles, puede formar esporas asexuales del tipo oidio que al germinar dan origen a micelio homocarión; los oidios funcionan como gametos masculinos y se unen a hifas de micelio compatible para formar el micelio heterocariótico, típico de la reproducción sexual. El micelio que presenta este tipo de estructura es frecuentemente identificado como heterocarión, y el que no las tiene como homocarión. Esto no es del todo verdadero, pues en un buen número de hongos, el heterocarión no las forma (Casselton, 1978).

Para que el cuerpo fructífero se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes de cada uno de los compartimentos que se fusionaron. Es a partir de estos, que por divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos y su posterior migración, hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra se forma el micelio heterocarión o dicarión, según sea el caso. A este tipo de micelio se le conoce como micelio secundario. En la mayoría de los casos, pero no en todos, este micelio presenta en cada septo una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula. Al estirarse una pequeña evaginación de la

hifa en donde ha de surgir un nuevo tabique transversal, y hacia ella se dirige uno de los dos núcleos. A continuación uno de los núcleos hijos se desplaza hacia abajo y el otro hacia la evaginación, que ha ido creciendo y prolongándose hacia abajo. El núcleo hijo que ha entrado hacia la evaginación, migra hacia la célula inmediatamente inferior, después de haberse fusionado con ella la evaginación o fibula. Al mismo tiempo, se han formado los tabiques transversales, que impiden la fusión de los cuatro núcleos. Concluye entonces la formación de la fibula, y cada hifa vuelve a tener dos núcleos de sexo diferente (Gerhardt *et al.*, 2000).

2.4 El género *Ganoderma*

Los hongos poliporaceos son clasificados por tener muchos poros pequeños en la parte inferior del cuerpo fructífero, los cuales contienen las esporas, y una apariencia leñosa o coriácea. Las especies de *Ganoderma* pertenecen al reino Fungi, división Basidiomycota, clase Homobasidiomycetes, orden Aphylloporales, familia Ganodermataceae y género *Ganoderma* (Chang, 1995; Wasser y Weis, 1999). Crecen sobre madera en descomposición absorbiendo los nutrientes a través de pequeños tubos conocidos como hifas, y desarrollan el cuerpo fructífero sobre troncos. Las especies de *Ganoderma* están entre los hongos que pueden crecer bajo condiciones elevadas de calor y humedad y, son usualmente encontrados en regiones tropicales y subtropicales (Moncalvo y Ryvarden, 1998).

2.5 Sistemática clásica de *Ganoderma*

El tipo de *Ganoderma* fue establecido por Karsten en 1881. Actualmente, el tipo de las especies se escribe como *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst 1981. Posteriormente, el género fue dividido en dos grupos distintos, los lacados con una capa fina cerosa y brillante en la superficie del cuerpo fructífero del complejo *Ganoderma lucidum* y, las especies no lacadas del complejo *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887, que refiere al los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvingia*, respectivamente. Desde entonces, los más de 250 nombres taxonómicos del género *Ganoderma* que han sido publicados, señalan que este género es morfológicamente complicado (Ryvarden, 2000). La taxonomía de las especies de *Ganoderma* no es clara y se considera que el género está en un estado taxonómico crítico (Ryvarden, 1994). La clasificación de las especies de *Ganoderma* han sido basadas 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).

Durante las últimas décadas, se ha demostrado que la morfología y las características del cultivo de las especies del mismo género pueden ser afectadas por las condiciones de crecimiento. 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). Ha sido demostrado que la forma del basidiocarpo es afectada por las condiciones del ambiente (Chen, 1993), el color y la forma de las basidiosporas también se ven afectados por la latitud y altitud en las que se desarrollan (Steyaert, 1972, 1975).

Dentro del género *Ganoderma*, han sido reportados más de 250 nombres taxonómicos en todo el mundo (Moncalvo *et al.*, 1994; Ryvarden, 1994), incluyendo *G. adpersum* (Schuizer) Donk 1969, *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1887, *G. australe* (Fr.) Pat. 1890, *G. boninense* Pat. 1890, *G. cupreum* (Sacc.) Bres. 1911, *G. incrassatum* (Brek.) Bres. 1915, *G. lipsiense* (Batsch.) G.F. Atk. 1908, *G. lobatum* (Schwein.) G.F. Atk. 1908, *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst 1981, *G. oerstedii* (Fr.) Torrend 1902, *G. oregonense* Murrill 1908, *G. pfeifferi* Bres. 1889, *G. platense* Speg. 1927, *G. resinaceum* Boud. 1890, *G. sessile* Murrill 1902, *G. sinense* J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979, *G. tormatum* (Pers.) Bres, 1912, *G. tsugae* Murrill 1902 y *G. weberianum* (Bres, &Henn, ex Sacc.) Steyaert 1972, entre otras. Sin embargo, en la mayoría de los reportes bibliográficos *Ganoderma lucidum* es la especie más sobresaliente.

2.6 Sistemática molecular del género *Ganoderma*

Alternativas recientes se han utilizado para la identificación de las especies de *Ganoderma*, incluyendo fragmentos polimórficos de restricción (RFLP's) (Miller *et al.*, 1999), análisis de secuencia (Hong *et al.*, 2002; Moncalvo *et al.*, 1995a, b; Smith y Sivasithamparam, 2000a) y electroforesis con isoenzimas (Gottlieb *et al.*, 1998; Gottlieb y Wright, 1999; Smith y Sivasithamparam, 2000b). El análisis filogenético de secuencias de aminoácidos y ADN son herramientas poderosas de alta resolución (Bruns *et al.*, 1991). Estas técnicas modernas han ayudado a clarificar la distribución de especies complejas, como el género *Ganoderma* (Hong *et al.*, 2002; Moncalvo *et al.*, 1995a, b; Gottlieb *et al.*, 1998; Gottlieb y Wright, 1999).

Los genes ribosomales (rDNA) han sido el foco de atención en la investigación para nuevas acercamientos taxonómicos en la sistemática molecular de los hongos. Estos genes (rDNA) se encuentran arreglados en unidades repetidas (tándem) y, cada una de estas unidades contiene los genes para la pequeña subunidad (18S), 5.8S y la subunidad grande (25-28S) del

ribosoma. Cada unidad esta separada por una o más espacios intergénicos (IGS) y, éstas regiones IGS pueden contener regiones que codifican para RNA 5S (Figura 2).

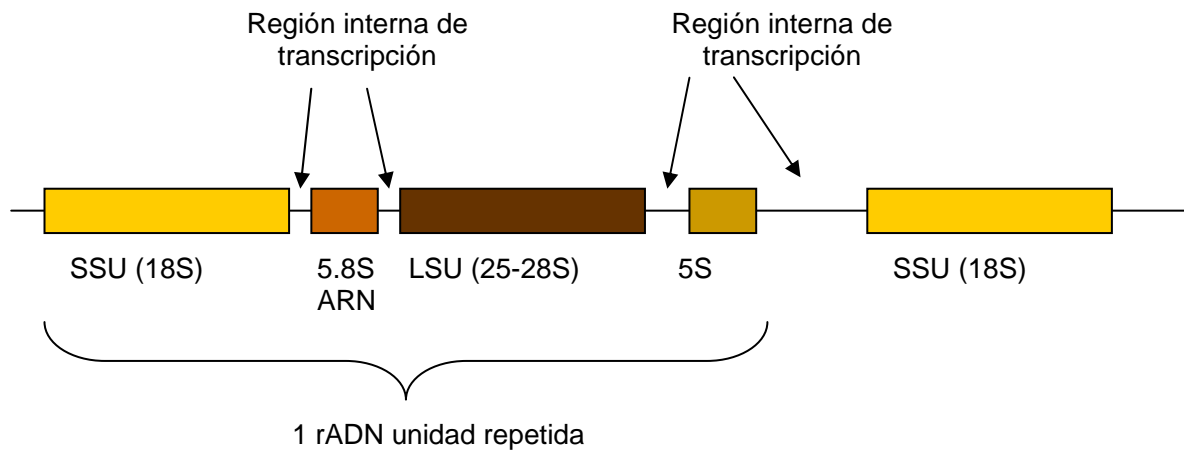


Figura 2. DNA ribosomal, muestra las regiones internas de transcripción y los espacios intergénicos.

Estas regiones que codifican para las subunidades 18S, 5.8S y 28S están altamente conservadas entre los hongos y muestran pocas diferencias en su secuencia entre organismos distantemente relacionados (Berbee y Taylor, 1992; Binder y Hibbett, 2001; Swann y Taylor, 1993, 1995). Dentro de cada unidad repetida, las regiones conservadas están separadas por dos regiones internas de transcripción (ITS), ITS-1 e ITS-2, las cuales presentan un tasa alta de divergencia genética (Moncalvo *et al.*, 1995b; Perlin y Park, 2001), y estas regiones son ampliamente secuenciadas para resolver problemas de filogenia en hongos. Las regiones variables de las secuencias en ambas subunidades 18S y 25S de los genes ribosomales han llevado a numerosos acercamientos moleculares que proporcionan una identificación rápida de especies fúngicas (Perlin y Park, 2001). La taxonomía molecular de la familia Ganodermataceae fue primero reportada por Moncalvo *et al.* (1995a,b). Ellos creían que la mayoría de las controversias asociadas con *Ganoderma* se podía resolver con el uso de técnicas moleculares, generar nuevos caracteres taxonómicos y ser usados como un método de clasificación.

Las regiones internas de transcripción (ITS) son probablemente las más importantes en la sistemática molecular de los hongos con respecto al género. Las regiones ITS en hongos son muy variables y por esta razón son útiles para distinguir entre especies. Los genes ribosomales se conservan fuertemente, los cuales están flanqueados por las regiones ITS, que son ideales para diseñar *primers* (iniciadores) universales y a su vez estos pueden ser

amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las secuencias son analizadas y comparadas para formar árboles filogenéticos. Hay reportes sobre el uso de las regiones ITS para distinguir entre especies del género *Ganoderma* y establecer sus relaciones taxonómicas (Gottlieb *et al.*, 2000; Moncalvo *et al.*, 1995a,b; Smith y Sivasithamparam, 2000a).

Estudios con datos moleculares han demostrado la monofilia de *Ganoderma* (Moncalvo *et al.*, 1995a,b; Smith y Sivasithamparam, 2000a), la cual incluye especies de superficie opaca (subgénero *Elfvigia*) y laqueadas (subgénero *Ganoderma*). Recientemente, Hong *et al.* (2002) encontraron a *Ganoderma colossus*, la especie tipo de *Tomophagus*, fuera del clado núcleo de *Ganoderma* y a *Amauroderma* como grupo hermano. Sin embargo, en esos estudios se han incluido pocas especies y aquéllas con características peculiares no han sido analizadas, por lo que su posición taxonómica no es clara. Por ejemplo, *Humphreya coffeatum*, *Ganoderma neurosporum* y *G. lignosum* han sido incluidas dentro de *Ganoderma* a pesar de sus características morfológicas distintivas.

2.6.1 Contexto actual

Durante las últimas décadas, se ha demostrado que la morfología y las características del cultivo de las especies del mismo género pueden ser afectadas por las condiciones de crecimiento. 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). Se ha demostrado que la forma del basidiocarpo es afectada por las condiciones del ambiente (Chen, 1993), el color y la forma de las basidiosporas es afectado por la latitud y altitud en las que se desarrollen (Steyaert, 1972, 1975).

Se han descrito 8 géneros dentro de la familia: *Amauroderma*, *Elfvigia*, *Ganoderma*, *Haddowia*, *Humphreya*, *Magoderma*, *Tomophagus* y *Trachyderma* (Karsten, 1881, Murrill 1905 y Steyaert, 1972). Algunos de estos géneros no han sido aceptados y las especies se siguen considerando dentro de *Ganoderma*. *Elfvigia* es aceptado a nivel de subgénero de *Ganoderma*. *Trachyderma* se considera como un nombre inválido (Moncalvo y Ryvardeen, 1994) y, *Tomophagus* es considerado como sinónimo de *Ganoderma* por la mayoría de los autores.

De acuerdo con la estructura de la superficie del píleo, Steyaert (1975), estableció cuatro subgéneros (*Ganoderma*, *Elfvigia*, *Plecoderma*, *Anamixoderma*) y dividió el subgénero

Ganoderma en dos secciones (*Ganoderma* y *Characoderma*). Ryvardeen (1991), considera a las especies laqueadas como del complejo *G. lucidum* y las especies opacas como del complejo *G. applanatum*, los cuales han sido denominados como los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvlingia*, respectivamente. Sin embargo, Zhao y Xhang (2000), argumentaron en base a evidencia molecular sobre 4 géneros incluyendo a *Ganoderma*, *Amauroderma*, *Haddwia* y *Humphreya*. *Ganoderma* consiste en subgénero *Ganoderma* el cual incluye sección *Ganoderma* y la sección *Phaenema*, subgénero *Elfvlingia* y subgénero *Trachydera*.

Un tema que concierne a la clasificación de *Ganoderma* es que frecuentemente la evolución morfológica y los niveles moleculares están muy dispares en el tiempo, lo que propicia un patrón de discordancia entre ellos (Gottlieb y Wright, 1999). Además, el género es relativamente joven en términos de evolución y el proceso de especiación es complejo (Moncalvo *et al.*, 1995b; Ryvardeen, 1991), y algunos grupos que recientemente divergieron monofiléticamente pueden no alinear con uno o más taxa morfológicamente distintos entre ellos y esto a su vez puede diferir la clasificación basada en características tales como el tamaño del cuerpo fructífero y su forma, microestructura de la piel del sombrero, dimensiones de las esporas, distribución geográfica y lugar de origen (Buchanan, 2001). El conocimiento de la fisiología y magnitud de variación del ADN de especies de *Ganoderma* aún es solamente parcial (Gottlieb *et al.*, 2000) y las recientes bases de datos de las secuencias de especies de *Ganoderma* solo incluyen cerca de 300 taxa (Moncalvo, 2000). Es claro que un gran número de secuencias es requerido para sustentar investigaciones preliminares y validar las hipótesis filogenéticas.

2.7 Recursos genéticos

El término recurso genético proviene del vocablo latín *recursos* (acción de acudir a una persona o cosa) con el fin de obtener algún beneficio o satisfacción de tal acción. En el caso de los “hongos”, el hombre como ser heterótrofo se ha visto en la necesidad de recurrir a éstos de manera cotidiana para satisfacer sus necesidades de alimentación y como medicina. No obstante el concepto de recurso genético no está definido, si no que depende en gran medida del nivel y amplitud cultural de los grupos humanos involucrados en su definición. Al respecto Zimmerman (1951), señaló que: “el conocimiento es en verdad el creador de todos los recursos y que en buena parte éstos son creaciones del hombre”.

De acuerdo con Parra (1979), “cualquier parte de la naturaleza se convierte en un recurso cuando la sociedad le encuentra un uso, descubre la manera de hacerlo disponible, desarrollar los medios para emplearlo y aplica la fuerza de trabajo necesaria para obtenerlo. Según Bassols (1979), “los recursos naturales de una nación no son estáticos sino dinámicos, es decir se van conociendo, ampliando y utilizando la acción del hombre se traduce también en la destrucción de dichos recursos, en la erosión acelerada de los suelos, en la contaminación ambiental, etc. de acuerdo a la etapa de desarrollo, económico, social y técnico en que dicha sociedad se encuentre”.

En base a estos razonamientos podemos decir que la humanidad emplea a las diferentes especies y estructura (en ocasiones una misma especie puede tener distinto uso), la primera y la más importante utilidad que el hombre ha atribuido a los recursos fúngicos existentes en su entorno ecológico que es el de la obtención de alimentos. Así pues, con el avance cultural, tecnológico, social y económico se definieron nuevas necesidades y nuevas formas de usos, así una vez consolidada la tecnología de hongos como actividad humana participativa en la generación de satisfactores e inclusive en cantidades excedente se plantea la industrialización, siendo una de las principales fuentes de demanda de materias fúngicas para su ulterior transformación, generalmente como alimento y recientemente como alimento funcional o nutracéutico.

2.8 Regiones internas de transcripción (ITS)

Las regiones ITS son probablemente las regiones más importantes en estudios de sistemática molecular, útiles para resolver especies dentro de un género hablando de los hongos. Los genes ribosomales altamente conservados los cuales flanquean las regiones ITS pueden ser amplificados por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los fragmentos son posteriormente secuenciados y analizados para formar árboles filogenéticos. Las regiones ITS en hongos son altamente variables y por esta razón son útiles para distinguir entre especies del mismo género (Moncalvo *et al.*, 1995a). En contraste con la secuencia nucleotídica de las regiones codificantes del rDNA mitocondrial, las cuales no ofrecen suficiente variación en su secuencia y esto dificulta realizar una buena distinción entre especies, por ejemplo de *Ganoderma* (Moncalvo, 2000) y, por lo tanto no son usadas en nivel de género. Hay diversos reportes en donde se utilizan las regiones ITS para establecer relaciones taxonómicas entre especies de *Ganoderma* (Gottlieb *et al.*, 2000; Montalvo *et al.*, 1995a,b; Smith y Sivasithamparam, 2000a).

Dentro de las regiones ITS hay segmentos específicos que presentan mayor variabilidad que otros segmentos. Moncalvo *et al.* (1995a), observaron que la frecuencia de sustitución nucleotídica fue similar en ambas regiones ITS pero encontró que las variaciones fueron mayormente localizadas en la región central de la ITS-1 y cerca de la terminación del ITS-2. También reportaron una divergencia nucleotídica usualmente en las regiones del ITS-2 entre taxa recientemente divergidas. Esto también fue observado por Gottlieb *et al.* (2000), quienes reportaron un bajo nivel de resolución en las ramas filogenéticas internas al utilizar la región ITS-1.

2.9 Análisis filogenético

Los objetivos de la taxonomía son dar una clasificación lógica de un grupo de taxa, y los datos moleculares ofrecen un conjunto de caracteres para tomar estas decisiones taxonómicas, (Buchanan, 2001). El uso de programas filogenéticos para analizar los datos moleculares pueden darnos como resultado filogramas (árboles evolutivos genéticos) que exhiban grupos monofiléticos, unidos a un ancestro común (Buchanan, 2001). La práctica para realizar los análisis filogenéticos puede ser concebida como una indagación para obtener un modelo correcto como una aproximación del árbol correcto (Brinkman y Leipe, 2001).

Los métodos para realizar inferencias filogenéticas generalmente son clasificadas en tres grupos principales: método de distancias, máxima probabilidad y máxima parsimonia (Nei, 1996, Nei y Kumar, 2000). En el método de distancias, una distancia evolutiva es estimada usando todos los pares de secuencias, para obtener un árbol filogenético (filograma) (Nei, 1996, Nei y Kumar, 2000). En el método de máxima probabilidad, se maximiza la probabilidad y es llevada a cabo para cada topología por separado y la topología con la más alta probabilidad es escogida como una aproximación del verdadero árbol topológico (Nei, 1996, Nei y Kumar, 2000). En el método de máxima parsimonia y bajo la hipótesis que los cambios mutacionales ocurren en todas direcciones entre los cuatro nucleótidos, se considera un grupo de secuencias de nucleótidos así como la secuencia del grupo ancestral y una topología hipotética es inferida. El número más pequeño de sustituciones nucleotídicas que explique los procesos evolutivos para obtener una topología es computarizada. Así la topología que requiera de un menor número de pasos es escogida para obtener el mejor árbol (Nei, 1996; Nei y Kumar, 2000).

Hay muchas revisiones sobre métodos estadísticos desarrollados para realizar diferentes modelos y que explican como estos modelos pueden afectar a un grupo de datos (Brinkman y Leipe, 2001; Nei, 1996). A pesar de que han sido ideados numerosos algoritmos filogenéticos, procedimientos y programas de computo, su fiabilidad es en muchos casos dependiente de la estructura y el tamaño de muestra (Brinkman y Leipe, 2001). El campo del análisis filogenético es controversial. Algunos debates se han resumido en algunas revisiones (Saitou, 1996; Swafford *et al.*, 1996). De importancia particular es la emisión del análisis filogenético utilizando un gran número de datos moleculares (Graybeal, 1998; Hillis, 1996; Poe, 1998), que sugieren que la fiabilidad estadística es susceptible al tamaño de muestra (Bremer, 1994; Farris *et al.*, 1996; Felsenstein, 1985; Sanderson y Donoghue, 1989). En contraste con las evidencias que varios estudios mencionan es que el tamaño de muestra generalmente incrementa la precisión filogenética (Hillis, 1996; Moncalvo *et al.*, 2000).

2.9.1 Máxima parsimonia

Para el método basado en el análisis de los caracteres discretos, se aplicó el criterio de parsimonia, en el cual cada posición en la secuencia fue tratada como carácter con cuatro estados alternativos desordenados (T, C, G, A). El principio de la parsimonia aplicado a la evolución sostiene que la explicación más probable de un grupo de datos es la que requiere el menor número de cambios evolutivos entre los estados de los caracteres. Aplicado a la sistemática filogenética, el criterio de parsimonia conduce a la elección del cladograma que explica la filogenia de un grupo con el menor número de cambios, es decir, con la menor homoplasia posible (Hillis *et al.*, 1996). Aunque este principio implica que todos los cambios en los caracteres originales tienen la misma probabilidad de ocurrencia, se ha comprobado que las secuencias varían siguiendo un patrón evolutivo. En particular, se sabe que para los genes que codifican para proteínas, las posiciones del codón evolucionan a diferente tasa, por ejemplo, la tercera posición del codón es la más variable, ya que muta con mayor velocidad en comparación con las otras posiciones. En el caso de los tipos de sustitución en un sitio, se sabe que las transversiones son más comunes que las transiciones.

2.9.2 Mínima evolución

El criterio de mínima evolución considera que las mejores hipótesis filogenéticas son aquellas que minimizan las diferencias entre las distancias genéticas y las medidas sobre una topología hipotética. Bajo este criterio los individuos cercanamente emparentados tendrán menos diferencias en sus secuencias que los individuos que se encuentren menos relacionados (Nei y

Kumar 2000). Las relaciones evolutivas con este enfoque se evaluaron con el método de agrupamiento de Neighbor-joining (NJ). Neighbor-joining es un método heurístico que se utiliza para encontrar el árbol óptimo bajo el criterio de mínima evolución. El principal fundamento de este método es el de los grupos vecinos, que se definen como dos taxa conectados por un simple nodo (Nei y Kumar 2000).

2.10 Zona de estudio

El Eje Neovolcánico Transversal (ENT) es una de las regiones mexicanas con mayor diversidad y número de endemismos. Esta región parece proveer un mosaico de ambientes, hábitats y microhábitats con elementos de insularización para un importante número de especies sedentarias, dando como resultado un intrincado patrón de distribución (Rzedowski y Rzedowski, 1989).

El ENT atraviesa el país de costa a costa por su parte central, desde el golfo de México hasta el océano pacífico, entre los paralelos 17° 30' y 20° 25' longitud Norte y los meridianos 96° 20' y 105° 20' longitud Oeste. Los bosques de pino-encino y pino-abeto son característicos de esta cadena volcánica (Rzedowski, 1978), siendo estos además, los hábitats que poseen la mayor densidad de especies hongos. En el caso particular para *Ganoderma* se sabe que crece en bosques subtropicales y de encino ya sea sobre troncos de árboles podridos o vivos, utilizando a especies a parte de los encinos tales como *Jacaranda*, *Casuarina*, *Fresno* y *Eucalipto* (Guzmán, 1980).

2.11 Aspectos históricos del cultivo comercial de hongos comestibles a nivel mundial

Los hongos comestibles han sido uno de los manjares predilectos del hombre desde la más remota antigüedad, siendo Europa, Mesoamérica y el sureste de Asia las tres principales regiones del mundo con hábitos micófagos (Guzmán, *et al.*, 1993). Los primeros cultivos de hongos comestibles se han registrado a partir de los siglos VII y X en China con *Auricularia* y *Flammulina velutipes*, respectivamente. En el siglo XI se cultivó *Lentinula edodes* comercialmente conocido como *shiitake*, para autoconsumo en Japón. En Francia (1600), se inició el cultivo comercial de *A. bisporus* (Lange) Imbach; y en el siglo XX el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Además de los países ya mencionados también se pueden citar como productores de *Agaricus* spp. a Corea del Sur, Estados Unidos, Inglaterra, Irlanda, Taiwan, España, Holanda, Italia y México, por mencionar algunos (Chang y Miles, 1990; Guzmán *et al.*, 1993). A partir de las tecnologías generadas principalmente por los países europeos y

asiáticos, se ha desarrollado una gran industria mundial que se ha transferido principalmente a los países con tradición micofaga como México (Chang y Miles, 1989; Martínez-Carrera *et al.*, 1995).

2.12 Aspectos históricos del cultivo comercial de hongos comestibles en México

El término comestible, hace referencia a aquellos organismos que son agradables en sabor y textura, los cuales no afecten la salud por presencia de ciertos compuestos químicos, además de garantizar una completa satisfacción biológica. En México, el cultivo de hongos comestibles se inició desde mediados de la década de los 30's, sin embargo, la actual industria en el país data de apenas 40 años, cultivando solamente el champiñón, con técnicas y cepas extranjeras y a partir de 1974 empezó con las setas blancas (*P. ostreatus*) (Martínez-Carrera *et al.*, 1991). Teniendo México fuertes raíces étnicas relacionadas con los hongos, resulta práctico cultivar los hongos silvestres no micorrísicos comunes en determinadas regiones del país, como son las especies de *Pleurotus*, altamente apreciadas por los campesinos, siguiendo tecnologías de fácil adaptación. Cultivar hongos comestibles en residuos agro-industriales o esquilmos, ha demostrado sus bondades tanto en países altamente industrializados como en los subdesarrollados del sureste de Asia (Quimio, 1986) y siendo México un país esencialmente agrícola en el que se producen millones de toneladas anuales de esquilmos y residuos agrícola-industriales, se incrementa el potencial para cultivar los hongos en tales desechos, como lo demostraron Mata y Martínez-Carrera (1988).

2.13 Producción mundial de hongos medicinales

Las aplicaciones de técnicas analíticas modernas se han utilizado para establecer bases científicas, esclareciendo las observaciones empíricas que se realizaron hace siglos. Por lo tanto, esta surgiendo el mercado mundial para productos farmacéuticos y funcionales. El término funcional se usa para una nueva clase de compuestos que se pueden extraer tanto del micelio como del cuerpo fructífero del hongo, capaces de proporcionar beneficios a la salud y ayudar a prevenir, tratar o aliviar enfermedades. Los hongos funcionales pueden poseer propiedades tanto nutritivas como medicinales, siendo aquellas que son utilizadas como suplemento alimenticio, principalmente, para fortalecer el sistema inmunológico, prevenir y tratar el cáncer, diabetes, SIDA y enfermedades cardiovasculares y parasitarias.

Los datos sobre el mercado mundial son difíciles de encontrar y las cifras se relacionan solamente con la producción en Asia. El mercado mundial de los hongos medicinales se ha

estimado en 3.9 billones de dólares Americanos solo para 1995, representando el mercado de tónicos y medicinas (Chang, 1996). Durante la década pasada, su crecimiento ha sobrepasado en forma consistente el desarrollo rápido de hongos comestibles. Mientras que la demanda de hongos medicinales está concentrada en Asia, su atractivo está aumentando en Europa y en Norte América donde no hay el conocimiento del saber como (*Know how*) ni tradición. El rey de los hongos medicinales es *Ganoderma lucidum*. El interés comercial en *G. lucidum* está creciendo, esta especie está asociada en la cultura China con buena salud y longevidad. En 1995, el valor en el mercado mundial de los productos de *G. lucidum* se estimó en 1.6 billones de dólares. El valor por comparación de los tónicos y nutraceuticos de *Ganoderma* en los Estados Unidos de América es solo de 10 millones de dólares. El mercado Europeo, latinoamericano y africano no existe.

Japón que tiene una larga tradición en el uso de hongos medicinales ha identificado a *Agaricus blazei*, un hongo ordinario de Brasil, como efectivo en el tratamiento del cáncer. Después de identificar los compuestos activos, la industria japonesa perfeccionó las técnicas de cultivo. El mercado ha tenido tanto éxito que el cultivo se expandió de Brasil a Corea y China, puesto que hay no solamente recibe más apoyo, sino que se produce a precios más competitivos (Chang, 1996).

Los productos contra el cáncer derivados de los hongos se usan en forma más amplia en Asia que en Estados Unidos. De hecho, en 1987 cuando las diez drogas principales contra el cáncer de mayor venta en Estados Unidos y Japón fueron comparadas, no había una sola droga común en las dos listas, pero PSK (polisacárido K) era la primera y Lentinan estaba en octava en la lista japonesa. El establecimiento durante la década pasada de veintitrés compañías de procesamiento de hongos medicinales en Singapur es un ejemplo de la prominencia y del potencial de los hongos medicinales. Aunque Singapur no tiene cultivo de hongos, han desarrollado un nicho interesante en la importación de hongos medicinales de la región, principalmente de China, su procesamiento y mercadeo para la comunidad china. Los extractos de *Ganoderma lucidum* son especialmente populares y su uso va en aumento en pacientes que hayan estado sometidos a tratamiento de quimioterapia o que haya estado tomando antibióticos durante periodos prolongados. A diferencia de la mayoría de los productos farmacéuticos, estos compuestos biológicamente activos extraídos de hongos medicinales tienen una toxicidad baja, aun en dosis altas. Vistos ampliamente como tónicos, se sabe ahora que pueden mejorar la calidad de la salud humana (Chang y Buswell, 1996).

El único inconveniente es el alto costo de compra. Una cápsula que contenga uno a dos gramos de *Ganoderma lucidum* tiene un costo de un dólar americano. Como un tratamiento intensivo se propone tres a seis cápsulas diarias, el tratamiento está realmente reservado a pacientes afortunados. Por otra parte se espera que el cultivo eficiente de los hongos medicinales y la extracción de los principios activos lleven a una disminución del precio. La elasticidad del precio de los hongos es tal que una disminución del precio daría como resultado inmediato un aumento masivo en el consumo apoyando además la hipótesis de que el mercado crecería en forma consistente en la próxima década.

2.14 Cultivo de *Ganoderma*

El cultivo artificial de la producción en masa del cuerpo fructífero de *Ganoderma* en sustratos sólidos fue llevado a cabo exitosamente en 1970 por Y. Naoi (Mizuno, 1997) y, los procesos se desarrollaron rápidamente desde entonces. El cultivo sólido artificial fue ampliamente adoptado por los cultivadores para su producción comercial, el cual se lleva a cabo en madera leñosa y troncos de árbol (Mayzumi *et al.*, 1997; Naoi, 1997) y, en bolsas de aserrín y botellas (Chang y Miles, 1989; Quimio, 1986; Tong y Chen, 1990). Una ventaja del uso de las dos últimas técnicas de cultivo es que el tiempo de producción es corto y los rendimientos son altos (Chang y Miles, 1989). Además de esto, los sustratos pueden ser modificados para obtener mejores resultados. Triratana *et al.* (1991), investigaron que *Ganoderma* puede crecer en sustratos de maderas duras, así como desechos agrícolas.

Los métodos artificiales de cultivo involucran típicamente cinco etapas: 1) elaboración del inóculo, 2) siembra, 3) formación del primordio, 4) desarrollo del cuerpo fructífero y 5) cosecha (Chen y Yu, 1999; Stamets, 1993). En términos básicos, el inóculo es distribuido en el sustrato estéril, e incubado hasta que el micelio coloniza el sustrato. Después de esto, se disminuyen la temperatura y los altos niveles de dióxido de carbono hasta la formación del píleo. Una vez que se tiene el largo del cuerpo fructífero deseado es cosechado. El ciclo de cultivo desde la elaboración del inóculo hasta la obtención del carpóforo varía de 90 a 120 días (Stamets, 1993), dependiendo de los métodos de cultivo utilizados.

2.15 Parámetros de producción de compuestos bioactivos

Estudios recientes se han enfocado a investigar el efecto que tienen tanto la composición del medio de cultivo así como las condiciones de crecimiento en la producción intracelular y extracelular de compuestos bioactivos de *G. lucidum* (Fang *et al.*, 2002; Fang y Zhong,

2002a,b,c; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999; Tang y Zhong, 2002; Yang *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2002). Cuando los metabolitos son producidos en pequeñas cantidades es una ventaja a favor si el medio de cultivo puede ser manipulado para asegurar su extracción y a su vez, mantener intacta la capacidad de los compuestos bioactivos que son producidos.

La mayoría de los compuestos bioactivos, biológicamente reportados para especies de *Ganoderma* pueden ser atribuidos a dos grupos principales de metabolitos, los polisacáridos o ácidos ganodéricos, así como triterpenos. Estas dos clases de metabolitos han sido frecuentemente utilizados en investigaciones como marcadores para determinar el efecto de las condiciones de cultivo (factores bióticos y abióticos) sobre la producción de metabolitos. Se ha demostrado que un eficiente crecimiento micelial no asegura una alta producción de polisacáridos (Sone *et al.*, 1985; Tang y Zhong, 2002). Se ha observado que la fuente de carbono juega un papel muy importante en el crecimiento micelial y la producción de polisacáridos (Kim *et al.*, 2002). Tang y Zhong (2002), observaron que mientras la sacarosa es apropiada para la producción de polisacáridos extracelulares, no lo es para el crecimiento celular, por lo que la lactosa fue una fuente de carbono apropiada para el crecimiento celular y la producción de polisacáridos. Park *et al.* (1994), reportaron alta producción de biomasa y su estrecha relación con la producción de polisacáridos unidos a proteínas (gluco-proteínas) en *Trametes versicolor*. También han reportado que una alta producción de polisacáridos extracelulares es dependiente del pH del medio de cultivo (Wang y McNeil, 1995) y, que la disminución del pH en el medio incrementa su producción intra y extra celular de polisacáridos en cultivo sumergido (Fang y Zhong, 2002b). La adición de oxígeno en el medio también mostró un efecto marcado en la producción de polisacáridos y ácido ganodérico (Zhong *et al.*, 2002).

2.16 Fermentación en fase sólida

Recientemente, se han desarrollado estudios sobre la producción de enzimas pépticas, utilizando la fermentación en medio sólido, sobre diferentes sustratos: bagazo de caña de azúcar (Carrizales, 1983); salvado de trigo (Ghildyal *et al.*, 1981; Qadeer *et al.*, 1985; Budiartman y Lonsane, 1987). Sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio, en cultivo sólido sobre soporte. La inducción de estas enzimas en cultivo sumergido ha sido estudiada utilizando diferentes fuentes de carbono (Tuttobello y Mill, 1961). La composición del medio de cultivo es un factor importante ya que influye sobre la diversidad y la cantidad de las enzimas pépticas. El estudio de la

producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos, impregnados sobre un soporte inerte permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos en relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua, la liberación de calor (Oriol, 1987), así como la influencia de la transferencia de gases. Por otra parte, la recuperación de metabolitos en éstas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado (Roussos, 1985). Al contrario, en cultivos sólidos en los cuales el soporte es también el substrato, es difícil evaluar la influencia de un sólo factor sobre el comportamiento de un microorganismo ya que en gran parte, estos substratos son muy complejos y dada su composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivo sólido, composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua.

2.17 Substancias bioactivas en especies de *Ganoderma*

Muchos compuestos bioactivos han sido aislados y purificados de este hongo, tales como polisacáridos, triterpenos, esteroides, lectinas y proteínas; sin embargo, los dos primeros compuestos han sido mayormente investigados. Algunos de estos inhiben el crecimiento de células cancerígenas *in vitro*, otras tienen actividad antiviral *in vitro*, o presentan otra actividad *in vivo* relacionada con aspectos de salud. Esas sustancias pueden ser utilizadas como materia prima para el desarrollo de agentes terapéuticos químicos en el tratamiento contra el cáncer u otras enfermedades (Mizuno *et al.*, 1995). Además, los modos de acción de estos compuestos están siendo investigados (Eo *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002; Lei y Lin, 1992; Zhang *et al.*, 2002).

2.18 Desarrollo rural y sostenible

El término desarrollo significa primordialmente un incremento en la cantidad de bienes y servicios que produce una sociedad, pudiendo ser ésta tan pequeña como una empresa familiar o tan grande como una empresa industrial, una ciudad, una comunidad, un área agrícola, un estado, un país o el mundo entero.

En la naturaleza el desarrollo tiene objetivos muy claros: a nivel individual el objetivo es la madurez sexual y la reproducción; a nivel de especie el objetivo es adaptarse y constituir, ocupar y defender un nicho; a nivel de ecosistema el objetivo es llegar al clímax, que es el estado en el cual el ecosistema optimiza el uso de los recursos de clima, suelo y topografía y se autosostiene. El desarrollo rural es el resultado de una serie de transformaciones

cuantitativas que se producen en el seno de la población rural y que, al conjugarse producen con el tiempo una elevación del nivel de vida. Es decir, el desarrollo implica al mismo tiempo un progreso económico que se apoya sobre el progreso técnico, y en progreso de las personas, de las comunidades, de las regiones y de las naciones.

El cultivo de hongos comestibles es un ejemplo claro del desarrollo sostenible, ya que en esta actividad las fases del crecimiento de los hongos comestibles mantienen una armonía con la naturaleza, tanto interna (los productores de hongos comestibles) como externa (pequeñas áreas que se ocupa para cultivar hongos comestibles), además de requerir poca cantidad de agua para producir un kilo de hongos comestibles (28 litros) en cortos períodos de tiempo en comparación con otros productos alimenticios como la carne, que se necesita 100, 000 litros para obtener 1 kg de carne. El material de desecho después del cultivo de hongos comestibles puede ser usado para alimento de animales, o para lombricomposta y, finalmente ser utilizados para fertilizantes de granos de cereales.

2.19 Paquete tecnológico

En la actualidad, tanto en México como en el resto de los países de América Latina y el Caribe, existe gran preocupación por la falta de atención de los gobiernos en la planeación y disposición de los recursos financieros para llevar a cabo de manera adecuada el desarrollo tecnológico y, lograr la autosuficiencia alimentaria. La investigación orientada a la solución de problemas, se ha venido llevando a cabo principalmente en instituciones de enseñanza como lo son: centros de investigación públicos, universidades, institutos y en menor medida en las empresas.

Un elemento esencial para la innovación tecnológica que fomente el desarrollo social es la integración del paquete tecnológico. Para unos, la tecnología está asociada exclusivamente con el saber cómo (Know-how), o con la información contenida en patentes, manuales, fórmulas, planos, diagramas, etc. Para otros, la tecnología se encuentra simplemente integrada a la maquinaria y a los equipos empleados en la producción. La tecnología engloba todas estas ideas y algo más, ya que es "un paquete de conocimientos organizados de distintas clases (científico, técnico, empírico, etc.) provenientes de diversas fuentes (descubrimientos científicos, otras tecnologías, libros, manuales, patentes, etc.) a través de métodos diferentes (investigación, desarrollo, adaptación, copia, expertos, etc.)" Dicha definición es, entonces, lo que nos lleva a hablar del paquete tecnológico (Sabato y Mackenze, 1982; Giral y González,

1980). Resulta conveniente aclarar algunas expresiones comúnmente utilizadas para designar ciertos tipos de tecnología, que han creado más confusión que entendimiento del fenómeno. La calificación que se da a la tecnología dependerá del criterio con el que ésta se contemple, que podrá ser social, económico, técnico, ecológico o de otra índole.

Por tecnología de producto se entiende la parte del paquete tecnológico relacionada con las normas, las especificaciones y los requisitos generales de calidad y presentación que debe cumplir un bien o servicio. Si deseáramos armar un paquete en el que la tecnología de producto fuera predominante, tendríamos que concentrarnos en la información relativa a la descripción y los dibujos del producto, a los manuales de uso, aplicación y mantenimiento del mismo, a las fórmulas y composiciones, a las especificaciones de las materias primas, a instructivos de ensamble, tolerancias, etc., así como a cuestiones de propiedad industrial tales como patentes y marcas. La tecnología de equipo se refiere a la parte del paquete tecnológico relacionada con las características que deben poseer los bienes de capital necesarios para producir un bien o servicio. En este caso, la parte medular de la tecnología se encuentra integrada a la maquinaria de producción, concentrándose el conocimiento tecnológico en la información sobre la fabricación del equipo, sus especificaciones, manuales de uso y mantenimiento, listas de refacciones, etc. La tecnología de equipo se refiere a la parte del paquete tecnológico relacionada con las características que deben poseer los bienes de capital necesarios para producir un bien o servicio. En este caso, la parte medular de la tecnología se encuentra integrada a la maquinaria de producción, concentrándose el conocimiento tecnológico en la información sobre la fabricación del equipo, sus especificaciones, manuales de uso y mantenimiento, listas de refacciones, etc. La tecnología de proceso es la parte del paquete tecnológico relacionada con las condiciones, procedimientos y formas de organización necesarios para combinar insumos, recursos humanos y bienes de capital de la manera adecuada para producir un bien o servicio. Este tipo de tecnología está normalmente asociada con los manuales de proceso, los manuales de planta, los cálculos de rendimientos, los balances de materia y energía, el arreglo físico del equipo (*lay-out*), los manuales de operación, etc. Por último, la tecnología de operación es aquella que se refiere a las normas y procedimientos aplicables a las tecnologías de producto, de equipo y de proceso, y que son necesarias para asegurar la calidad, la confiabilidad, la seguridad física y la durabilidad de la planta productiva y de sus productos. Este tipo de tecnología exige una fuerte incidencia de conocimientos que son fruto de la experiencia, y comprende la información contenida en los manuales de planta, los manuales de operación, las bitácoras y las sutilezas de operación

proporcionados por expertos, por lo que se vincula con la prestación de asistencia técnica (Sabato y Mackenze, 1982; Giral y González, 1980).

En consecuencia, es muy importante reiterar que cualquier paquete tecnológico tiene elementos de los cuatro tipos de tecnología antes referidos. Sin embargo, existen paquetes que dependen preponderantemente de alguno o algunos de ellos, limitándose la incidencia de los otros a un nivel menor.

El paquete tecnológico lo integran diversos elementos en distintas proporciones según sea el caso:

- Conocimientos científicos.
- Información técnica externa a la organización.
- Ingeniería básica.
- Protección de la propiedad intelectual.
- Capacitación técnica del personal.
- Procuración de equipos.
- Construcción y arranque de planta.
- Ajuste del paquete a condiciones de operación reales.
- Adecuación del producto a los requerimientos del mercado.

La ingeniería básica es la información contenida en los diagramas de flujo; los balances de materia y energía; las especificaciones generales y los criterios de diseño de proceso; el diseño y la selección de equipos básicos; las consideraciones preliminares de obra civil, mecánica y eléctrica; la especificación de servicios auxiliares, y los arreglos generales de flujo y distribución de materiales. La ingeniería básica, en suma, contiene y resume los elementos medulares de la tecnología. Va más allá de la simple agregación de los conocimientos generados en la experimentación de laboratorio o de planta piloto, y frecuentemente ha sido una de las áreas más deficitarias en cuanto a la capacidad de las firmas de ingeniería en nuestros países (Araoz, 1978; Perri, 1971).

Es un hecho que la tecnología necesaria para la producción de bienes o servicios se incorpora al sector productivo mediante operaciones económicas: ya sea por producción directa- como ocurre en toda unidad económica que utilice la tecnología que ella misma produce- ya sea por comercio- cuando la unidad económica adquiere tecnología ofrecida por otros. Esta

tecnología tiene, en consecuencia, un precio y es, desde la perspectiva de la estructura productiva, una mercancía que, como cualquier otra, tiene un valor de uso y un valor de cambio. El valor de uso de una tecnología producida para realizar un determinado propósito está determinado por lo adecuadamente que esa tecnología cumpla con dicho propósito. El valor de cambio de esa misma tecnología se mide por la proporción en que su valor de uso se cambia por el valor de uso de otra mercancía, ya sea directamente, ya sea por medio de dinero (Perri, 1971).

La elaboración de un paquete es el resultado de la participación de todos o algunos de los elementos de una cadena institucional compuesta por los siguientes eslabones:

- Universidades.
- Institutos y centros de investigación y desarrollo.
- Empresas.
- Empresas de servicios tecnológicos.
- Organizaciones financieras.
- Organizaciones gubernamentales.

Todos estos agentes proporcionan los elementos potenciales ideales para que todas las partes del paquete se identifiquen, se construyan y se integren. Así, por ejemplo, el Colegio de Postgraduados en específico el *Campus* Puebla puede ser fuente del conocimiento tecnológico de base, mientras que los centros tecnológicos pueden encargarse de desarrollar la ingeniería básica requerida para realizar la idea.

La tecnología de hongos comestibles involucra diferentes operaciones, cada una debe ser llevada a cabo adecuadamente para el aseguramiento del éxito. El éxito o fracaso nos lleva a las mejores o peores cosechas. El objetivo principal de los productores e investigadores de hongos comestibles es incrementar la producción en una superficie destinada a esta actividad, en un período de tiempo dado, con el uso de cepas altamente productivas, con ciclos de producción cortos, con varias cosechas y con buenas eficiencias biológicas.

La infraestructura científica que sería el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla; la innovación tecnológica con la integración de las técnicas desarrolladas en esta investigación

al paquete de producción de hongos medicinales; estos dos elementos dan como resultado la fase de iniciación y, el proceso de transferencia, que consiste en el ajuste técnico que sería la innovación tecnológica por medio de la capacitación a los miembros de organizaciones o cooperativas de la región, lo cual nos indicara la posible adopción de la innovación tecnológica realizada en esta investigación.

3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los hongos macromicetos juegan un papel importante en la medicina tradicional y moderna de muchos países, ya que contienen novedosos y potentes productos de uso farmacéuticos, tales como; ácidos, terpenos y polisacáridos β -glucanos, los cuales se han utilizado en la prevención y tratamiento del cáncer. Está demostrado que los polisacáridos de origen fúngico tienen la capacidad de regular al sistema inmune, mostrando un papel importante la especie y las condiciones de cultivo para la actividad biológica esperada.

Los extractos y productos purificados del género *Ganoderma* se caracterizan por su actividad para el tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer y diabetes, principalmente. Algunos metabolitos del género *Ganoderma* (Fungí, Ganodermataceae) son utilizados en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, hipertensión, diabetes y glicemias, sin embargo, la actividad final depende de la especie que se emplee. Un problema del género *Ganoderma* es la dificultad de identificar las especies al momento de su recolección, ya que las características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, la conformación de los metabolitos y su actividad biológica varían, dependiendo de las condiciones ambientales en que se desarrollan.

En la actualidad son más evidentes los daños causados por la alteración del ambiente, lo cual pone en riesgo a todo organismo presente en un ecosistema dado, propiciando su disminución consecutiva hasta su desaparición. La diversidad de organismos tanto de diferentes especies como de la misma, ofrecen alternativas que salvaguardan el equilibrio ecológico, postulándose como recurso genético útil y manipulable. El aislamiento, caracterización, mantenimiento y confinamiento genético de los hongos resulta un elemento esencial para el diseño de estrategias capaces de resolver problemas de carácter social, principalmente de salud y alimentación.

Por lo tanto, se requiere realizar un estudio filogenético de diversas cepas de *Ganoderma* aisladas de diferentes regiones de México, determinar las condiciones óptimas de crecimiento en cultivo sólido, así como el diseño estratégico para la transferencia de tecnología, proponiendo un paquete tecnológico que sirva como modelo a seguir por las familias del medio rural interesadas en la producción de los hongos funcionales, garantizando fuentes alternativas de productos comerciales, ya que el cultivo de estas especies por parte de los productores generaría ganancias económicas en varios niveles sociales, aportando alternativas para la generación de empleos y aprovechamiento racional de los recursos naturales.

4 HIPÓTESIS

Ha: Existen diferencias morfológicas y genéticas entre especies del género *Ganoderma*.

Ha: El diseño del paquete tecnológico del cultivo de *Ganoderma* spp. como estrategia, puede impulsar el desarrollo agrícola regional, el cual representa novedosas alternativas para la obtención de productos con valor agregado.

5 OBJETIVO GENERAL

Identificar molecularmente las especies nativas del hongo funcional *Ganoderma* de la región central de México, además de caracterizar su fisiología en cultivo sólido y desarrollar un paquete tecnológico innovador para fortalecer al sector rural.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolectar y aislar cepas nativas de *Ganoderma*.
- Identificar las especies recolectadas, utilizando técnicas moleculares.
- Establecer el cultivo sólido de especies potenciales usando subproductos agrícolas y forestales.
- Diseñar un paquete tecnológico para el cultivo de *Ganoderma* spp.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se realizaron recorridos en distintos estados de México visitando principalmente lugares con vegetación de pino-encino con la finalidad de recolectar especímenes de *Ganoderma*, los cuales fueron incluidos en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGEHC) del Colegio de Postgraduados, CP-387, CP-434, CP-444, CP-445, CP-446, CP-447, CP-449, CP-452, CP-453, CP-477, CP-145, CP-205, CP-367, CP-377, CP-476, CP-510, CP-511, CP-512, CP-513, CP-514 y CP-532. Otras cepas fueron donadas de instituciones como el Instituto Nacional de Ecología (INECOL) CP-472, CP-473, CP-474 y CP-475, Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG) CP-469, CP-470 y CP-471 y, principalmente por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Cobioch-UAEMor) CP-38, CP-42, CP-62, CP-66, CP-381, CP-382, CP-383, CP-384, CP-385, CP-386, CP-388, CP-389, CP-390, CP-391, CP-392, CP-393, CP-394, CP-395, CP-396, CP-397, CP-398, CP-399, CP-400, CP-401, CP-402, CP-403, CP-404, CP-405, CP-406, CP-407, CP-408, CP-409, CP-435, CP-448, CP-450, CP-451, CP-454 y CP-455, obteniendo un total de 66 cepas las cuales se mantienen en medio de cultivo BFS.

7.2 Aislamiento y purificación de las cepas

El aislamiento realizado en todos los ejemplares recolectados fue de tipo vegetativo. Limpiando el carpóforo con una brocha se retiró el material de cobertura adherido para disminuir la presencia de contaminantes externos. El micelio obtenido se resembró de manera consecutiva en medio de cultivo hasta obtener un cultivo puro y se visualizó al microscopio óptico detectando la presencia de fíbulas, característica que se tomó en cuenta para tener la certeza de que la cepa aislada se trataba de un basidiomiceto y no de una contaminación. Las cepas obtenidas se integraron al cepario CREGEHC del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados *Campus Puebla*.

7.3 Medios y condiciones de cultivo

7.3.1 Buffer de fosfatos 60 mM pH 6

El buffer de fosfatos (BF) se preparó como sigue; (g/l): 119.99 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 141.96 de Na_2HPO_4 . Para preparar la solución se utilizaron 250 ml de Na_2HPO_4 y posteriormente el pH se ajustó con aproximadamente 1500 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

7.3.2 Medio de cultivo *branflakes* sólido más buffer de fosfatos (BFS+BF)

El medio de cultivo BFS+BF se preparó como sigue (g/l): 15 de sacarosa, 18 de agar agar (BIOXON, México), 20 de *branflakes*, todo esto se aforó a 1000 ml de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6. La solución fue esterilizada en autoclave por 20 min a 129°C. Posteriormente, el medio se vertió en cajas de Petri, aproximadamente 30 ml por caja y se incubó a 30°C por 48 horas antes de utilizarlas para verificar que los medios estuvieran libres de contaminantes.

7.3.3 Medio de cultivo extracto de malta agar más buffer de fosfatos (EMA+BF)

El medio de cultivo extracto de malta agar, se compone de lo siguiente (g/l): 13 de medio de cultivo extracto de malta (BIOXON, México), 18 de agar agar (BIOXON, México), todo esto se aforó a 1000 ml. La solución se esterilizó en autoclave por 20 min a 129°C. Posteriormente, el medio de cultivo se incubó durante 48 horas antes de utilizarse confirmándose la ausencia de contaminantes.

7.3.4 Medio de cultivo completo para levaduras (CYM)

El medio de cultivo completo para levaduras (CYM), presenta la siguiente composición (g/l): 20 de dextrosa anhidra (J.T. Baker, México), 2 de peptona de carne (BIOXON, México), 2 de extracto de levadura (BIOXON, México), 0.5 de sulfato de magnesio 7-hidratado en cristal (J.T. Baker, México), 0.46 de fosfato de potasio monobásico cristal (J.T. Baker, México) y 2 de fosfato de potasio dibásico en polvo (J.T. Baker, México), las cantidades son aforadas a 1000 ml. La solución se esterilizó en autoclave por 20 min a 129°C. Posteriormente, el medio de cultivo se incubó durante 48 horas antes de utilizarse.

7.4 Velocidad de crecimiento

7.4.1 Tasa específica de crecimiento (μ) en medio sólido

La tasa radial de crecimiento (k_r) se utiliza frecuentemente como una forma indirecta de estimar la tasa específica de crecimiento (μ) y sus variaciones, calculándose como sigue:

$$k_r = \mu w$$

la cual indica que K_r está en relación directa con la (μ) y con (w), siempre y cuando ésta permanezca constante (Sánchez y Royse, 2001). En donde: k_r es el tiempo expresado en días, w es la zona periférica de crecimiento expresado en milímetros (mm) y μ es la tasa específica de crecimiento expresado en mm/día, como lo muestra la formula siguiente:

$$\mu = \frac{w}{k_r}$$

7.5 Cinética de crecimiento

7.5.1 Cultivo en medio de cultivo sólido en caja Petri

La cinética se realizó en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con 10 ml de medio BFS+BF y EMA+BF, como se indica en las secciones 7.3.2. y 7.3.3. respectivamente. Se colocó un fragmento de micelio en el centro de la caja y fueron incubadas a $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, hasta que el micelio cubrió completamente el medio de cultivo. Las cinéticas se realizaron dos veces, con cinco réplicas y fue registrado el diámetro ocupado por el micelio cada 24 horas.

7.6 Preparación del inóculo “semilla” para el cultivo en sustrato sólido

7.6.1 Preparación del grano

Para preparar la semilla, los granos de trigo se hierven en agua por 20 minutos hasta que se hidratan sin romperse. Posteriormente, los granos de trigo se dejan hidratar por otros 20 minutos, después de este tiempo son removidos del calor y distribuidos en una tina para eliminarle el exceso de humedad. Una vez que los granos tienen la humedad adecuada, se agregan 4 gramos de cal y 12 gramos de yeso por cada kilogramo de trigo en peso seco. Una vez homogenizado se colocan en bolsas de polipropileno de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A*) y se cierran con una ayuda de pinzas permitiendo la entrada de aire.

7.6.2 Esterilización

Las bolsas con los granos de trigo se esterilizan en una autoclave u olla de presión a 121°C con 1.05 kg./cm^2 de presión ó 15 libras/pulg², durante 1 hora y media. Las bolsas se enfrían a temperatura ambiente antes de ser inoculadas.

7.6.3 Inoculación de la “semilla”

El proceso de obtención de semilla para inóculo consta de tres pasos; en el primer paso se hizo crecer el hongo en caja Petri sobre medio de cultivo BFS y se incubo por 5 días a $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, en el segundo paso el cultivo micelial se crece en frascos de vidrio con aproximadamente 250 g de granos de trigo estéril previamente preparados, como se indica en la sección 7.6.1, incubándose por 9 días a $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, a este cultivo se le llama cultivo maestro, finalmente en el tercer paso, los granos de trigo cubiertos con micelio del cultivo maestro se distribuyen en bolsas de polipropileno de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp.*

E.U.A) con semilla de trigo estéril previamente preparada, como se indica en la secciones 7.6.1 y 7.6.2, incubándose hasta que el micelio cubra al 100% la semilla, a este cultivo se le llama F1 o semilla para siembra. La inoculación se hace en condiciones estériles en una campana de flujo laminar marca (VECO, México).

7.6.4 Incubación

Las bolsas de polipropileno de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp.* E.U.A) con grano inoculado se incuban a una temperatura de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ sin moverlas, hasta que el micelio haya cubierto completamente todos los granos.

7.7 Preparación de las unidades de producción para cultivo en medio sólido

7.7.1 Formulación COLPOS-17

La composición de la formulación COLPOS-17 se preparó de acuerdo a Sobal *et al.*, (2010), pesando lo siguiente (kg en peso seco): 1.280 de bagazo de caña de azúcar, 2.970 de salvado de trigo, 6.430 de aserrín de encino, 1.230 de aserrín de *Bursera*, 2.720 de olote de maíz, 0.450 de carbonato de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ y 1.800 de sulfato de calcio $[\text{CaSO}_4]$, para alcanzar el 64.4 % de humedad se agregaron 26 litros de agua.

7.7.2 Preparación del sustrato

Para preparar el sustrato de la formulación COLPOS-17 se homogenizaron en una tina mezcladora hasta que la humedad se alcanzó en todo el sustrato, posteriormente se pesaron 2600 gramos de sustrato húmedo en bolsas de polipropileno de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp.* E.U.A) con filtro y fueron esterilizadas en autoclave por una hora y media a 121°C . Posterior a la esterilización, las unidades se dejaron enfriar por 12 horas antes de su utilización.

7.7.3 Determinación del peso seco del sustrato y pH

Con el fin de conocer el peso seco del sustrato al momento de ser preparado y después de esterilizarlo, se tomaron 100 gramos de la preparación del sustrato, registrando su peso húmedo. Posterior a su desecación, en un horno (Felisa, México) durante un período de 24 horas a 90°C el peso del sustrato sin esterilizar y después de esterilizarlo fue nuevamente registrado.

Para determinar el potencial de hidrogeno (pH) del sustrato antes de ser esterilizado y después de ser esterilizado se utilizó una relación 1:1 de sustrato y agua destilada previamente esterilizada (HYCEL), para la lectura del pH se utilizó un potenciómetro (*Conductronic*) el cual fue previamente calibrado desde un pH básico con buffer de sulfato pH 7 hasta un pH ácido con buffer de biftalato pH 4 (J:T: Backer, México). Para cada lectura se registraron 3 repeticiones homogenizando la mezcla previo a la lectura.

7.7.4 Inoculación del sustrato estéril

Una vez estéril el sustrato, se inoculó con granos de trigo previamente inoculados con el micelio, preparados como se indica en la secciones 7.6.1., 7.6.2. y 7.6.3. A las bolsas con 2600 g de sustrato estéril se les agregó aproximadamente 250 g de inóculo y se dispersó por toda la bolsas de polipropileno de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp.* E.U.A) tratando de homogenizar completamente la mezcla, las bolsas fueron selladas con un sellador termo electrónico (*Impulse Sealer*, UL), para evitar la entrada de contaminación. En este paso del proceso a las bolsas inoculadas se les nombran unidades de producción.

7.7.5 Incubación de las unidades de producción

Las unidades de producción fueron incubadas en un cuarto con ciclos de 13 horas luz y 9 horas de obscuridad con una temperatura máxima de 25°C y una mínima de 15°C durante 90 días hasta que se observó la presencia de primordios sobre el sustrato.

7.7.6 Fructificación de las unidades de producción

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las unidades de producción se transfirieron al modulo de fructificación. La parte superior de la bolsa fue retirada con ayuda de tijeras y las unidades de producción se mantuvieron por 45 días con un rango de temperatura de 23°C y 14°C con una humedad relativa superior al 60% hasta que los cuerpos fructíferos alcanzaron el estadio adulto. Finalmente, los cuerpos fructíferos fueron cosechados desprendiéndolos desde la base del sustrato y fueron procesados.

7.7.7 Manejo poscosecha de los cuerpos fructíferos

A los cuerpos fructíferos cosechados se les registró el peso fresco por unidad de producción en una balanza analítica (OHAUS, E.U.A), describiendo las características macroscópicas como largo y ancho del píleo, color y presencia de laca; largo y ancho del estípite, color, forma, apariencia de la textura y presencia de laca; ancho del himenio, color y número de

poros por centímetro cuadrado; color, tamaño y forma de las esporas. Además, se registró su peso seco, para lo cual, los cuerpos fructíferos fueron colocados sobre charolas en un horno (Felisa, México) durante un periodo de 24 horas a 90°C y fueron nuevamente pesados en balanza analítica (OHAUS, E.U.A). Finalmente, los cuerpos fructíferos fueron almacenados en bolsas de polipapel.

7.7.8 Determinación del rendimiento y eficiencia biológica

La producción de los carpóforos se determinó mediante la siguiente fórmula, expresada en peso en gramos del cuerpo fructífero por kilogramo de sustrato en peso seco (g/k Ps):

$$Y = X/S$$

es decir, el rendimiento (Y) es el promedio de los cuerpos fructíferos o biomasa (X) de cada unidad de producción multiplicado por 1000 entre el peso seco del sustrato (S) (Sánchez y Royse, 2001). Por otra parte, la eficiencia biológica (EB) y tasa de producción (TP) se calcularon de acuerdo a Royse (1985), en donde, la eficiencia biológica es el resultado del peso fresco de carpóforos producidos (Pf Cf) entre el peso seco del sustrato utilizado multiplicado (Ps S) por 100 es decir:

$$EB= (Pf Cf / Ps S) \times 100$$

y la tasa de producción es el resultado de la división de la eficiencia biológica y el ciclo total de producción (Ct P) o sea:

$$TP= EB/ Ct P$$

7.8 Análisis molecular

7.8.1 Cultivo micelial en medio líquido CYM

El cultivo del micelio para la extracción de ADN se realizó en caja de Petri de 5 cm de diámetro con 19 ml de medio de cultivo CYM. El medio de cultivo fue inoculado con fragmentos de micelio de 0.5 cm y se incubaron de manera estática a 27°C ± 3°C, hasta que el micelio cubrió completamente el medio de cultivo. Las cajas fueron monitoreadas diariamente para descartar contaminación. Una vez que el micelio cubrió completamente el medio de cultivo, el micelio fue cosechado con espátulas estériles y colocado sobre papel

filtro estéril. Con ayuda de toallas absorbentes se retiró el exceso de medio de cultivo en el micelio, depositando la biomasa en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles. Posteriormente, el micelio contenido en los tubos eppendorf fue congelado en nitrógeno líquido y liofilizado, como se indica en la sección 7.8.2.

7.8.2 Liofilización

La liofilización del micelio se realizó mediante en un aparato Freeze Dry System / Frezone 4.5 (LABCONCO), los tubos eppendorf con el micelio congelado en nitrógeno líquido se colocaron en gradillas para su liofilización. Esta se realizó por 24 horas a -45°C y 127×10^{-3} mbar de presión de vacío, posterior al tiempo de liofilización los tubos eppendorf con el micelio seco fue almacenado hasta su posterior utilización.

7.8.3 Extracción de ADN genómico de hongos filamentosos

La extracción del ADN se realizó por el método descrito por Challen *et al.* (1995). Este método consiste, de manera general, en 5 pasos: 1) lisis celular y digestión de proteínas, 2) digestión de ARN, 3) precipitación de proteínas, 4) precipitación de ADN y 5) hidratación del ADN.

Brevemente, el método consistió en moler el micelio liofilizado hasta obtener un polvo fino (ver sección 7.8.2) y se agregaron 650 μl del buffer A (ver sección 7.8.16). Para la eliminación del ARN se adicionan 5 unidades de RNasa A (QIAGEN, USA), aproximadamente 3 μl , y se mezcló por inversión, una vez homogenizado se incubó a 70°C por 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min en microcentrifuga (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) a temperatura ambiente a 13,000 rpm. Al mismo tiempo se equilibró una columna QIAGEN usando (1ml) de buffer QBT (QIAGEN, USA).

Posteriormente, se agregó el sobrenadante producto de la centrifugación a la columna equilibrada, permitiendo que fluya a través de la columna. Una vez eluido el sobrenadante, se lavó la columna con 1 ml de buffer QC cuatro veces y se eluyó el ADN con 700 μl de buffer QC dentro de un tubo eppendorf estéril. Para la precipitación del ADN se agregó 700 μl de propan-2-ol, mezclando por inversión y se dejó reposar por dos minutos, a continuación se centrifugó a temperatura ambiente por 20 min a 13,000 rpm. El *pellet* se limpió por inversión con 500 μl de etanol al 70% y se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a 13,000 rpm. Al final el *pellet* se seca en un horno a 30 ó 45°C por aproximadamente 30 min. El *pellet* de ADN, se resuspendió en 20 μl de TE pH 8 preparado como se indica en la sección 7.8.16 o

agua para PCR y se colocó en baño maría a 55°C por 30 min ó hasta que el *pellet* quedó totalmente incorporado a la solución acuosa. Finalmente, se evaluó la calidad del ADN por el método de Sambrook y Russell (2001).

7.8.4 Elaboración del gel de agarosa

La matriz de agarosa se preparo utilizando un gramo de agarosa grado analítico (Promega-E.U.A) y disuelta en buffer TAE 1X preparada como se indica en la sección 7.8.16. La solución fue homogenizada con ayuda de un horno de microondas con un ciclo de 45 segundos y, tres ciclos de 15 segundos, la solución agitó manualmente entre cada ciclo para favorecer la homogenización. Finalmente, a la solución se agregó bromuro de etidio (10 mg/ml) y se vertió en una placa para geles de agarosa y se dejo solidificar hasta su utilización.

7.8.5 Electroforesis del ADN

El ADN genómico se transfirió en una matriz de agarosa al 1% por un período de tiempo de 140 min a 70 voltios. Para la visualización del ADN se utilizó un transiluminador de luz UV en un aparato Gel Doc 2000 (BIORAD, USA).

7.8.6 Cuantificación del ADN

El ADN fue cuantificado con ayuda de un aparato Gel Doc 2000 (BIORAD, USA). Como marcador de peso molecular conocido se utilizó ADN del macrófago λ sin digerir utilizando 10 y 20 ng por microlitro.

7.8.7 Oligonucleótidos (*primers*) para PCR y secuenciación

Para amplificar las secuencias precedidas por las regiones ITS-1 e ITS-4 se utilizaron *primers* específicos de la región pequeña 5.8s de los genes ribosomales (rADN). La secuencia de los *primers* ITS-1 e ITS-4 se encuentran en la tabla 1.

Región	Secuencia	Referencia
ITS-1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> (1990)

7.8.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gene ribosomal se utilizó un termociclador (GeneAmp, PCR System 2400, PERKIN ELMER) y se realizaron con las siguientes condiciones: un ciclo de preparación de 30 segundos a 94°C, después, una etapa de 30 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, seguido por 45 segundos para el alineamiento de los *primers* a 50°C, y 5 minutos para la extensión de la cadena a 72°C, finalmente 1 ciclo de término de 5 minutos a 72°C, posterior a los ciclos la reacción se mantiene a 4°C hasta su utilización.

La reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 200 µl, el cual contenía 25 µl de PCR AmpliTaq Gold® Master Mix 2X (Roche), 5 µl del *primer* ITS-1 10 µM y 5 µl del *primer* ITS-4 10 µM y 40 ng de muestra del ADN en un volumen de 5 µl para después ajustar el volumen de la reacción con agua para PCR hasta 50 µl.

7.8.9 Purificación del producto del PCR

La purificación del producto de PCR se realizó de acuerdo al protocolo de purificación de QIAquick PCR (QIAGEN, USA). El método consistió en tres pasos principales, en el primer paso para eliminar restos de aceite o buffer en el que fue resuspendida, la muestra se lavó con 5 volúmenes iguales de buffer PB y se pasó a través de la columna QIAquick centrifugando a temperatura ambiente por 1 minuto a 13.000 rpm, posteriormente el eluyente se eliminó, en el siguiente paso la muestra se lavó con 0.75 ml de buffer PE para eliminar residuos de la reacción, centrifugando a temperatura ambiente por 1 minuto a 13.000 rpm y se eliminó el eluyente, para eliminar completamente el eluyente nuevamente se centrifugó a temperatura ambiente por 1 minuto a 13.000 rpm, finalmente, la muestra se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 ml usando de 30 a 50 µl de buffer EB centrifugando a temperatura ambiente por 1 minuto a 13.000 rpm, finalmente la muestra se visualizó en gel de agarosa al 1%, preparado como se indica en las secciones 7.8.4. y 7.8.5.

7.8.10 Secuenciación de los productos del PCR

Los productos de PCR fueron secuenciados tanto de la región ITS-1 e ITS-4 obteniendo la secuencia de la cadena doble del ADN ribosomal. La secuenciación se realizó en los Servicios de Tecnología de ADN Seq Wright Inc, Houston, EUA. Las muestras fueron enviadas en tubos eppendorf de 1.5 ml y selladas con cinta parafilm. Las secuencias consenso obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 han sido incluidas en el anexo A-1.

7.8.11 Alineamiento de las secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas a partir de los *primer* ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso ITS-1 + ITS-4 fueron alineadas por medio del método *CrustalW*, en el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). El alineamiento de las secuencias incluyó al grupo externo *Fomitopsis palustris* con número de acceso del EBI (EUO2464), el cual fue usado como raíz de los árboles en el estudio filogenético. Los huecos en el alineamiento de las secuencias fueron tomados en cuenta para incrementar su similitud entre ellas. Con el fin de asegurar que las posiciones de las bases fueran homólogas, las secuencias fueron alineadas de manera automática dando el mismo peso filogenético a los eventos de transición y transversión. Los alineamientos de las secuencias obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso de ambos han sido incluidos en el anexo B (B-1, B-2 y B-3), respectivamente.

7.8.12 Inferencia filogenética

La inferencia filogenética se realizó considerando las secuencias como dos tipos de caracteres alternativos: como caracteres discretos en donde cada sitio tiene cuatro posibles estados A, T, C, G y como caracteres continuos donde se obtiene un valor de distancia genética entre las secuencias completas. Los análisis filogenéticos se generaron con los criterios de máxima parsimonia y mínima evolución utilizando el método de agrupamiento de *Neighbor-joining*, por medio del programa de MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). En ambos métodos, las bases nucleotídicas que no se resolvieron o que se perdieron y los huecos o bases que no existen dentro de la secuencia fueron evaluadas como eliminación de bases con la opción *pairwise deletion*. Para estimar la confiabilidad de las relaciones filogenéticas se evaluó la robustez o soporte estadístico (*bootstrap*) de las ramas, realizando 1000 réplicas. Para los análisis de máxima parsimonia se realizó una búsqueda heurística con intercambio de ramas en los árboles generados con diez repeticiones de árboles generados al azar.

7.8.13 Análisis de máxima parsimonia

Tomando en cuenta los supuestos del método de máxima parsimonia, los análisis filogenéticos fueron realizados usando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Los análisis de máxima parsimonia (MP) se obtuvieron de la secuencia ITS-1 e ITS-4 y su secuencia consenso de ambos ITS-1 + ITS-4. Las bases nucleotídicas que no se resolvieron o que se perdieron y los huecos o bases que no existen dentro de la secuencia fueron evaluadas como eliminación de bases con la opción *pairwise deletion*. Para los análisis se realizó una

búsqueda heurística usando CNI por sus siglas en inglés *Close Neighbourhood Interchange*, con intercambio de ramas en los árboles generados con diez repeticiones de árboles generados al azar. Un árbol consenso estricto fue generado a partir de los resultados. Para estimar la confiabilidad de las relaciones filogenéticas se evaluó la robustez o soporte estadístico (*bootstrap*) de las ramas, realizando 1000 replicas. También los datos perdidos y los huecos se evaluaron con eliminación completa de las bases con la opción *complete deletion* (Datos no mostrados).

7.8.14 Análisis de mínima evolución

Los análisis de *Neighbor-joining* (NJ) se obtuvieron de la secuencia ITS-1 e ITS-4, así como la secuencia consenso de ambos ITS-1 + ITS-4. Las bases nucleotídicas que no se resolvieron o que se perdieron y los huecos o bases que no existen dentro de la secuencia fueron evaluadas como eliminación de las bases con la opción *pairwise deletion*. Para evaluar los datos se utilizó el modelo de Tamura-Nei. Un árbol consenso estricto fue generado a partir de los resultados. Para estimar la confiabilidad de las relaciones filogenéticas se evaluó la robustez o soporte estadístico (*bootstrap*) de las ramas, realizando 1000 réplicas. También los datos perdidos y los huecos se evaluaron con eliminación completa de las bases con la opción *complete deletion* (Datos no mostrados).

7.8.15 Análisis de distancia

Para confirmar las relaciones filogenéticas obtenidas con los métodos de máxima parsimonia y *Neighbor-joining* (NJ) se evaluaron los porcentajes de diferencias nucleotídicas y de distancias genéticas de las secuencias derivadas de las regiones ITS-1 e ITS-4, así como de la secuencia consenso de ambas, los análisis fueron realizados usando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

7.8.15.1 Diferencias nucleotídicas (%)

Los análisis se obtuvieron de la secuencia ITS-1 e ITS-4 y de la secuencia consenso de ambos ITS-1 + ITS-4. Las bases nucleotídicas que no se resolvieron o perdidas y los huecos o bases que no existen dentro de la secuencia fueron evaluadas como eliminación de las bases con la opción *pairwise deletion* ya que este aporta mayor información al momento de realizar el análisis. Para evaluar los datos se utilizó el modelo de número de diferencias para nucleótidos. Las matrices fueron generadas a partir de las secuencias. También los datos perdidos y los huecos se evaluaron con eliminación completa de las bases con la opción

complete deletion. Las matrices de distancias obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso de ambos han sido incluidas en el anexo C (C-1, C-2 y C-3) respectivamente.

7.8.15.2 Distancias genéticas

Las distancias genéticas fueron calculadas utilizando el modelo evolutivo de Tamura-Nei. El cálculo de las distancias con este método facilita la comparación de los niveles de divergencia entre poblaciones. Los análisis de distancias se obtuvieron de la secuencia ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso de ambos ITS-1 + ITS-4. Las bases nucleotídicas que no se resolvieron o perdidas y los huecos o bases que no existen dentro de las secuencia fueron evaluadas como eliminación de las bases con la opción *pairwise deletion* ya que este aporta mayor información al momento de realizar el análisis. Para evaluar los datos se utilizó el modelo de Tamura-Nei. Las matrices fueron generadas a partir de las secuencias. También los datos perdidos y los huecos se evaluaron con eliminación completa de las bases con la opción *complete deletion*. Las matrices obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso de ambos han sido incluidas en el anexo D (D-1, D-2 y D-3).

7.8.16 Reactivos para extracción de ADN

- **(50X) Buffer (TAE)**. El volumen final de la solución fue de 1000 ml.
242 g de Tris base (SIGMA- U.S.A)
57 ml de ácido acético glacial (MERCK- Alemania)
100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
- **(10X) Buffer (TE)**. La solución fue aforada a 500 ml y se esterilizó a 121°C por 20 minutos.
50 ml de Tris-HCl (pH 8.0)
10 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
440 ml de H₂O destilada
- **EDTA (0.5 M)**. Para disolver el EDTA se utilizaron perlas de NaOH para ajustar el pH a 8.0.
- **Buffer A**. El volumen final de la mezcla fue de 20 ml.

8 ml de KCl 1 M estéril
2 ml de EDTA 0.5 M
1 ml de TRITON al 20%
9 ml de H₂O pol

- **Triton X-100 (20%)**

20 ml de Triton X-100
80 ml de H₂O

- **(6X) Buffer de carga tipo III.** La solución se filtró para esterilizarla.

Azul de bromo fenol al 0.25%
Xileno CY y FF al 0.25%
Glicerol al 30%

7.9 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias estadísticas entre tratamientos, se realizó un diseño experimental con un análisis estadístico completamente al azar (anexo F), en el que se observan las diferencias significativas de la velocidad de crecimiento entre los medios de cultivo. El análisis estadístico completamente al azar, se realizó a un nivel de significancia (α) del 0.05%; para la comparación de medias se siguió el criterio de la prueba de Tukey.

8 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para desarrollar los objetivos propuestos se diseñó la siguiente estrategia experimental (**Figura 3**). Se realizaron recolectas de especímenes del género *Ganoderma* y se aislaron las cepas. Las cepas obtenidas se caracterizaron midiendo tasa de crecimiento radial, tipo de micelio, color del micelio y, velocidad de crecimiento específica. Una vez que se caracterizaron las cepas cuantitativa y cualitativamente, se realizó el análisis filogenético e identificación de las especies. Desarrollada la filogenia y caracterización de las cepas, se seleccionaron cepas de los principales grupos para realizar su caracterización en varios niveles. Posteriormente, se realizó la caracterización en cultivo sólido analizando parámetros como ciclo de producción de los carpóforos, eficiencia biológica y caracterización de los hongos cultivados. Una vez cubiertos los puntos anteriores se diseñó un paquete tecnológico como estrategia para transferir la tecnología del cultivo de *Ganoderma* spp. a los productores interesados en cultivar especies con potencial medicinal o brindando otra alternativa de producción a los productores del sector rural y privado.

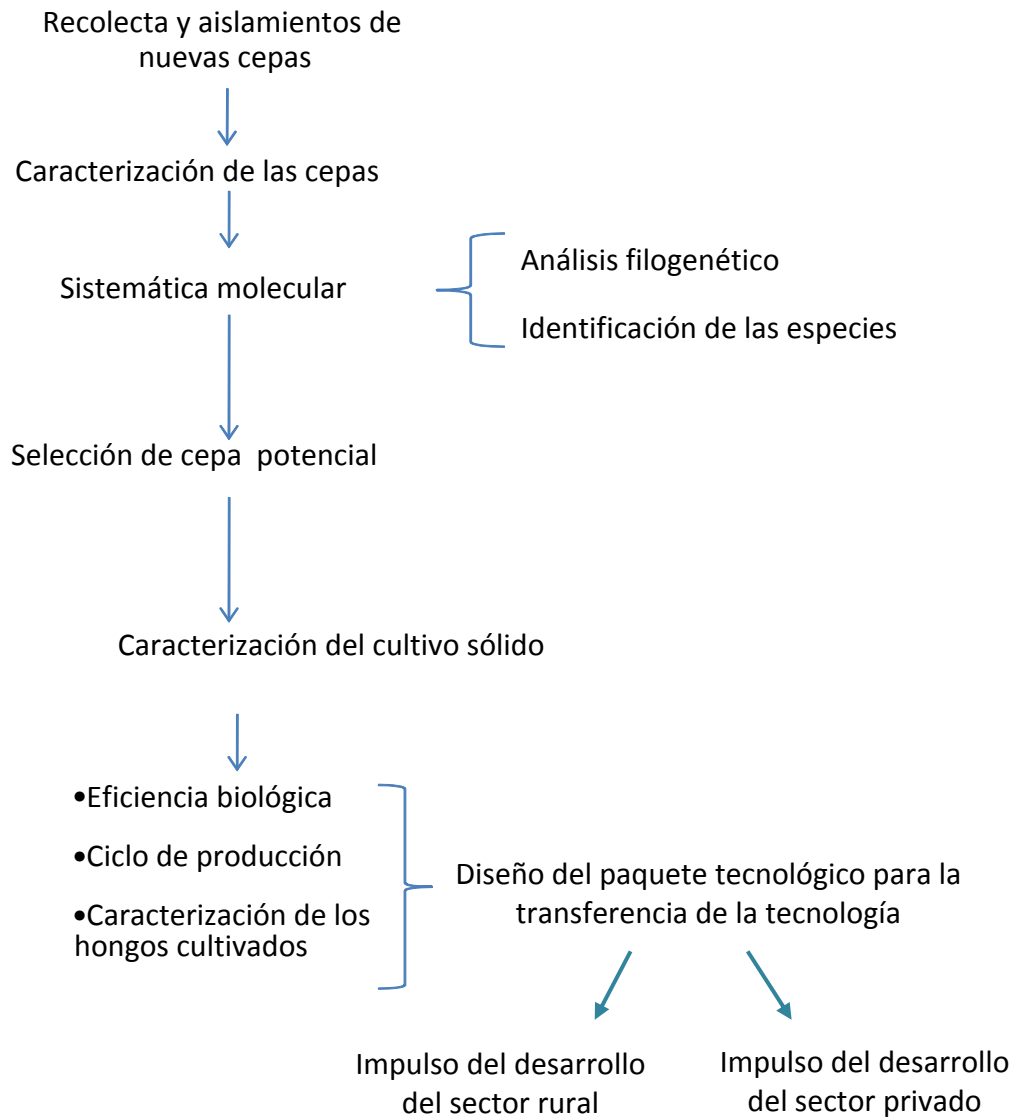


Figura 3. Diagrama general del diseño experimental a seguir en la presente investigación.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Recolecta del material biológico

9.1.1 Recolecta de los cuerpos fructíferos y aislamiento de las cepas

Con la finalidad de obtener cepas de *Ganoderma* se realizaron recorridos a los estados de: Morelos, Puebla, México, Guerrero y Veracruz, aislando 15 cepas. Los carpóforos recolectados se encontraron en un hábitat de bosque mesófilo de montaña, predominando la vegetación de pino-encino, sin embargo, el sustrato principal fueron tocones de árboles de encino en descomposición los cuales habían sido talados. Los ejemplares fueron identificados por las características típicas que presenta el género *Ganoderma*.

En la figura 4 se muestran algunos de los ejemplares representativos de *Ganoderma*. Por otra parte, 51 cepas fueron donadas de distintas instituciones, tales como el Instituto de Ecología de Xalapa, la Universidad Autónoma de Guadalajara, y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Centro de Investigaciones Biológicas). Las cepas fueron incorporadas al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGEHC) del Colegio de Posgraduados Campus Puebla (Tabla 2).



Figura 4. Especímenes recolectados del género *Ganoderma*, mostrando las principales características del género.

Las muestras están representando principalmente a los estados que conforman el Eje Neovolcánico Transversal (ENT), una de las regiones mexicanas con mayor diversidad y número de endemismos debido a la diferencia de altitud, clima, microclima y, vegetación que se encuentran en esta área, elementos de insularización para un importante número de diferencias genéticas inter e intra especies. Diferentes autores han reportado para México 9 especies para el género *Ganoderma* (Guzmán 1963; Castillo *et al.*, 1969; García *et al.*, 1998; Murrill 1908), identificadas como *Ganoderma applanatum*, *G. areolatum*, *G. curtisii*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. oregonense*, *G. sessiliforme* y *G. subincrustatum*, siendo la especie *lucidum* mayormente representada en 12 estados del país.

Se ha sugerido que la distribución de *Ganoderma* inicia desde los trópicos (Moncalvo, 1995a, b). En este estudio la distribución de las especies principalmente se localiza entre las regiones Neo tropical y Neártica, observándose una gran plasticidad fenotípica, indicando la existencia de especiación y creación de grupos jóvenes. Hipótesis de Rivarden, (1991) lo ha sugerido utilizando evidencia molecular. Un gran número de especies de *Ganoderma* laqueadas han sido descritas principalmente de los trópicos y se ha especulado que los trópicos actúan como bombas para generar taxa debido a las condiciones óptimas resultando en una gran diversidad (Jablonski, 1993).

Tabla 2. Relación de cepas de *Ganoderma* registradas en el CREGENHC, del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, utilizadas en el presente estudio.

No.	Nombre científico	Procedencia	msnm	Origen	Sustrato	Registro
1	<i>G. sp.</i>	Puebla	2800	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-387
2	<i>G. applanatum</i>	Puebla	3100	Este trabajo	<i>Pinus</i> sp.	CP-434
3	<i>G. curtisii</i>	Guerrero	2500	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-444
4	<i>G. sp.</i>	Guerrero	2500	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-445
5	<i>G. sp.</i>	Guerrero	2500	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-446
6	<i>G. applanatum</i>	México	3200	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-447
7	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-449
8	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-452
9	<i>G. subamboinense</i>	Morelos	2000	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-453
10	<i>G. applanatum</i>	Puebla	3200	Este trabajo	<i>Pinus</i> sp.	CP-477
11	<i>G. curtisii</i>	Morelos	2000	CREGENHC	Madera en descomposición	CP- 145
12	<i>G. lucidum</i>	Puebla	3000	Este trabajo	-----	CP-205
13	<i>G. sp.</i>	Puebla	3100	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-367
14	<i>G. sp.</i>	Morelos	2100	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-377
15	<i>G. lucidum</i>	Jalisco	1700	Este trabajo	<i>Quercus</i> sp.	CP-476

16	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G01	<i>Quercus</i> sp.	CP-381
17	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G03	<i>Quercus</i> sp.	CP-382
18	<i>G. lucidum</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G06	<i>Quercus</i> sp.	CP-383
19	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G13	<i>Quercus</i> sp.	CP-384
20	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G23	<i>Quercus</i> sp.	CP-385
21	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G25	<i>Quercus</i> sp.	CP-386
22	<i>G. subamboinense</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G11	<i>Quercus</i> sp.	CP-388
23	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G36	<i>Quercus</i> sp.	CP-389
24	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G37	<i>Quercus</i> sp.	CP-390
25	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G38	<i>Quercus</i> sp.	CP-391
26	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G39	<i>Quercus</i> sp.	CP-392
27	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G40	<i>Quercus</i> sp.	CP-393
28	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G41	<i>Quercus</i> sp.	CP-394
29	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G42	<i>Quercus</i> sp.	CP-395
30	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G43	<i>Quercus</i> sp.	CP-396
31	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G44	<i>Quercus</i> sp.	CP-397
32	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G45	<i>Quercus</i> sp.	CP-398
33	<i>G. resinaseum</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G46	<i>Casuarina</i> sp.	CP-399
34	<i>G. sessile</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G47	<i>Ficus</i> sp.	CP-400
35	<i>G. sp.</i>	Morelos	2100	Cobioch-UAEMor-G48	<i>Quercus</i> sp.	CP-401
36	<i>G. lobatum</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G49	<i>Spathodea campanulata</i>	CP-402
37	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G02	<i>Quercus</i> sp.	CP-403
38	<i>G. sp.</i>	Morelos	2300	Cobioch-UAEMor-G15	<i>Quercus</i> sp.	CP-404
39	<i>G. subamboinense</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G20	<i>Quercus</i> sp.	CP-405
40	<i>G. sp.</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G50	<i>Quercus</i> sp.	CP-406
41	<i>G. lucidum</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G51	<i>Quercus</i> sp.	CP-407
42	<i>G. sp.</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G52	<i>Quercus</i> sp.	CP-408
43	<i>G. curtissi</i>	Morelos	1800	Cobioch-UAEMor-G53	<i>Quercus</i> sp.	CP-409
44	<i>G. sp.</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G54	<i>Spathodea campanulata</i>	CP-38
45	<i>G. sp.</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G55	<i>Spathodea campanulata</i>	CP-42
46	<i>G. sp.</i>	Morelos	1200	Cobioch-UAEMor-G56	<i>Spathodea campanulata</i>	CP-62
47	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G57	<i>Pinus</i> sp.	CP-66
48	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G12	<i>Quercus</i> sp.	CP-435
49	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G62	<i>Quercus</i> sp.	CP-448
50	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G64	<i>Quercus</i> sp.	CP-450
51	<i>G. sp.</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G65	<i>Quercus</i> sp.	CP-451
52	<i>G. lucidum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G14	<i>Quercus</i> sp.	CP-455
53	<i>G. applanatum</i>	Morelos	2000	Cobioch-UAEMor-G68	<i>Pinus</i> sp.	CP-454
54	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	INECOL-768	-----	CP-472
55	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	INECOL-769	-----	CP-473
56	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	INECOL-772	-----	CP-474
57	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	INECOL-795	-----	CP-475
58	<i>G. lucidum</i>	Jalisco	1800	UAG-100	-----	CP-469

59	<i>G. lucidum</i>	Jalisco	1800	UAG-102	-----	CP-470
60	<i>G. lucidum</i>	Jalisco	1800	UAG-103	-----	CP-471
61	<i>G. sp.</i>	Morelos	2800	Este trabajo	<i>Quercus sp.</i>	CP-510
62	<i>G. sp.</i>	Morelos	2800	Este trabajo	<i>Quercus sp.</i>	CP-511
63	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	Este trabajo	-----	CP-512
64	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	Este trabajo	-----	CP-513
65	<i>G. sp.</i>	Veracruz	0	Este trabajo	-----	CP-514
66	<i>G. colossus</i>	Morelos	2800	Este trabajo	<i>Casuarina sp.</i>	CP-532

CP= Cepario del Colegio de Postgraduados. CREGENHC = Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles. CobiocH-UAEMor= Cepario del Corredor Biológico Chichinautzin, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. INECOL= Cepario del Instituto de Ecología de Xalapa. UAG= Cepario de la Universidad Autónoma de Guadalajara. ----- = Sin datos

9.2 Estudio filogenético

9.2.1 Extracción de ADN

Se analizó el ADN genómico de las cepas estudiadas, obteniendo diferentes calidades y concentraciones. En la figura 5 se muestran únicamente seis de las 66 extracciones del ADN correspondientes a los 66 especímenes aislados, el resto se encuentran en el anexo A2. En la mayoría de las cepas analizadas se observó el ADN genómico en la parte superior del gel así como la presencia de otros materiales, posiblemente sea ADN degradado u material genético extracromosomal.

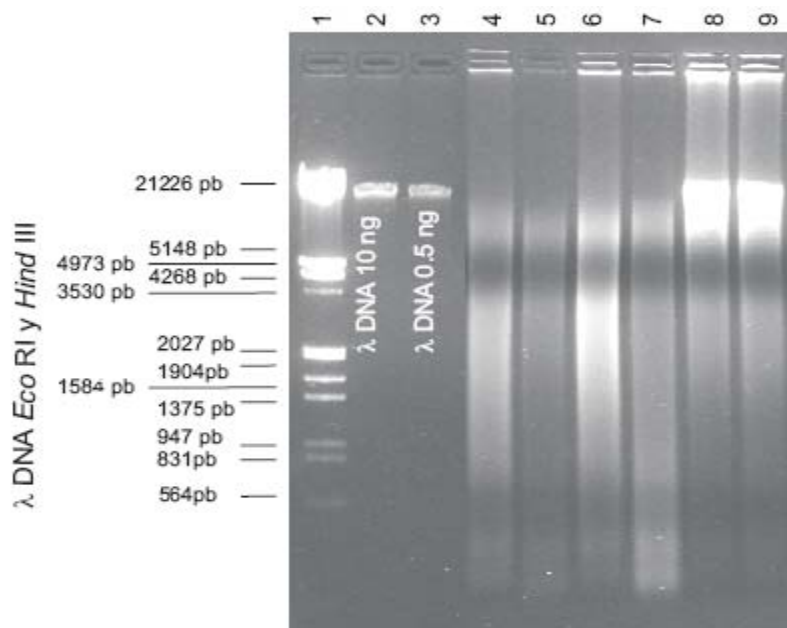


Figura 5. ADN total de cepas de *Ganoderma* spp. Pozo 1 marcador de peso molecular ADN λ *Eco* RI y *Hind* III, (Roche, Alemania), pozos 2 y 3 marcador de peso molecular ADN λ (Roche, Alemania), 10 y 20 ng, respectivamente, los pozos 4 al 9 pertenecen a las cepas CP-406, CP-408, CP-62, CP-434, CP-446 y CP-388, respectivamente.

9.2.2 Amplificación de la secuencia flanqueada por los *primers* ITS-1 e ITS-4

En la figura 6 se observa el gel de agarosa mostrando el producto de amplificación de la región pequeña 5.8s del gene ribosomal rADN de solo seis cepas de las 66 estudiadas, el resto se encuentran en el anexo A2. Se obtuvieron los 66 productos de PCR por duplicado, sin embargo, solo se logró secuenciar 49 taxa, (CP-205, CP-367, CP-377, CP-381, CP-382, CP-383, CP-384, CP-385, CP-386, CP-387, CP-388, CP-389, CP-390, CP-392, CP-394, CP-395, CP-396, CP-397, CP-398, CP-399, CP-400, CP-401, CP-403, CP-404, CP-405, CP-408, CP-409, CP-434, CP-435, CP-444, CP-445, CP-446, CP-447, CP-448, CP-449, CP-450, CP-451, CP-452, CP-453, CP-454, CP-469, CP-471, CP-472, CP-473, CP-474, CP-476, CP-512, CP-513 y CP-514) a partir de la región ITS-1 y 48 taxa, (CP-145, CP-381, CP-382, CP-383, CP-384, CP-385, CP-386, CP-387, CP-388, CP-389, CP-391, CP-394, CP-395, CP-396, CP-397, CP-398, CP-399, CP-400, CP-401, CP-403, CP-405, CP-406, CP-407, CP-408, CP-409, CP-434, CP-435, CP-444, CP-445, CP-446, CP-447, CP-449, CP-450, CP-451, CP-452, CP-453, CP-454, CP-455, CP-469, CP-470, CP-471, CP-472, CP-473, CP-474, CP-476, CP-512, CP-513 y CP-514) a partir de la región ITS-4.

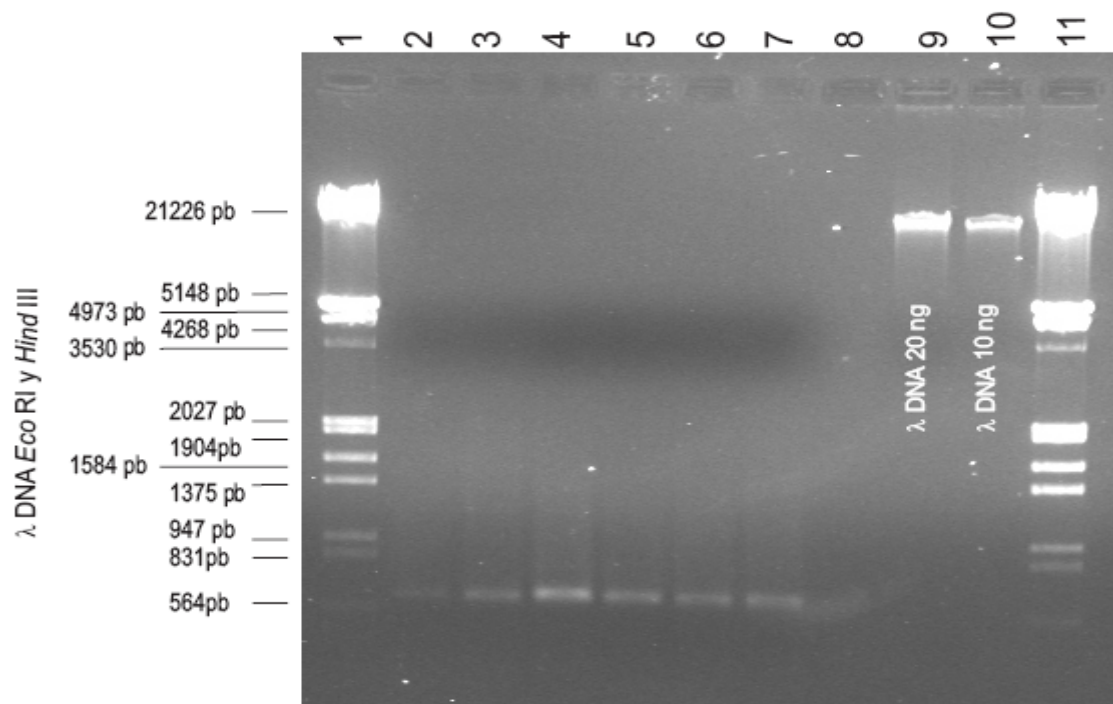


Figura 6. Productos de la amplificación del PCR de cepas de *Ganoderma* spp. Pozos 1 y 11 marcador de peso molecular λ ADN *Eco* RI y *Hind* III, (Roche, Alemania), pozos 2 al 4 cepas CP-406, CP-408, CP-62, CP-434, CP-446 y CP-388, respectivamente. Pozos 9 y 10 marcador de peso molecular ADN λ (Roche, Alemania), 20 y 10 ng, respectivamente.

El producto de PCR de los aislamientos correspondió a un solo fragmento de aproximadamente 650 pb (Figura 6), resultados similares fueron observados por Moncalvo *et al.* (1995a) y Gottlieb *et al.* (2000).

9.2.3 Análisis filogenético

En los análisis individuales de las secuencias obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 se utilizaron 55 taxa, sin embargo, para el análisis de las secuencias consenso solo 41 taxa de las que se obtuvo la secuencia por ambas regiones (ITS-1 e ITS-4) fueron incluidas. Las secuencias de 590 nucleótidos alineados derivados de la región ITS-1 mostraron 103 sitios parsimoniosamente informativos, 206 sitios conservados y 367 sitios variables. Para la región ITS-4 104 sitios fueron parsimoniosamente informativos, 185 sitios conservados y 382 sitios variables de un total de 585 nucleótidos alineados. Para la secuencia consenso de la región ITS-1 + ITS-4 se obtuvo un total de 626 nucleótidos alineados de los cuales 92 sitios fueron parsimoniosamente informativos, 256 sitios conservados y 359 sitios variables. La frecuencia de los sitios variables fue similar en ambas regiones así como en la secuencia consenso, pero la variación fue mayormente localizada en la región central en los alineamientos en la región ITS-1 y en la región final para el alineamiento para la región ITS-4. Resultados similares fueron observados por Moncalvo *et al.* (1995a).

9.2.3.1 Máxima parsimonia

El método de máxima parsimonia sólo considera caracteres cladísticamente informativos, los cuales son sitios en el alineamiento con menos de dos tipos diferentes de nucleótidos cada uno representado dos veces (Kumar *et al.*, 2007). Para las secuencias alineadas usando la región ITS-1 se usaron 103 sitios en el análisis de parsimonia, para la región ITS-4 se utilizaron 104 sitios y para la combinación de ambas regiones se utilizaron 92 sitios parsimoniosos.

Para el análisis de máxima parsimonia que es un método basado en el análisis de los caracteres discretos, se investigó el uso de la opción *pairwise deletion* y *complete deletion*, ya que tanto las inserciones como las deleciones pueden aportar información relevante al momento de interpretar los resultados (Nei, 1996). Los árboles consenso producidos por ambos modelos mostraron la misma topología y sólo mostraron diferencias en el soporte estadístico (resultado no mostrado). El árbol consenso estricto usando *pairwise deletion* mostró mejor soporte estadístico que con la opción de *complete deletion*. Los árboles

evolutivos producidos de las secuencias obtenidas por las regiones ITS-1 e ITS-4 y la secuencia consenso obtenidas de las regiones ITS-1 + ITS-4 se muestran en la figura 7a, figura 7b y figura 7c, respectivamente.

El análisis de parsimonia se basó en una búsqueda heurística produciendo 312 árboles más parsimoniosos con el grupo de datos obtenidos a partir de la región ITS-1, mostrando un índice de consistencia de 0.923747 y en un índice de retención de 0.935837. Dentro del árbol consenso estricto generado, figura 7a, se generaron 7 grupos. Del grupo 1 al grupo 3 el soporte estadístico fue bajo con un valor del 0%, para el grupo 4 y 5, aunque se obtuvieron valores estadísticos altos de 83% y 55% respectivamente, para las ramas internas, al analizar los datos del porcentaje de variación nucleotídica los valores entre los primeros cinco grupos fue menor al 6%, valor permitido para la variación interespecífica para especies de *Ganoderma* (Moncalvo *et al.*, 1995a), [Anexo C-2]. El grupo 6 se resolvió del grupo 5 con un valor de 27%. Dentro del grupo 6 con el análisis de variación nucleotídica se resolvieron los subgrupos 6.1 y 6.2 con valores del 11% entre ambos, tratándose posiblemente de especies diferentes. De la misma manera el grupo 6 se diferenció del grupo 7 con un valor de 42%. Dentro del grupo 7 se diferenciaron cuatro subgrupos mostrando valores de variación nucleotídica del 40% para el subgrupo 7.1 y 7.2 para las cepas CP-388 y CP-447, 15% entre los subgrupos 7.2 y 7.3 para las cepas CP-454 y CP-398, y un 10% entre los subgrupos 7.3 y 7.4 correspondientes a las cepas CP-389 y CP-446. El soporte estadístico entre los subgrupos del grupo 6 y 7 fueron altos, lo cual indicó la estabilidad y el soporte de cada rama establecida. Un soporte estadístico bajo fue observado en cepas cercanamente relacionadas. Moncalvo *et al.* (1995a), observaron bajos soportes estadísticos para especies cercanamente relacionadas.

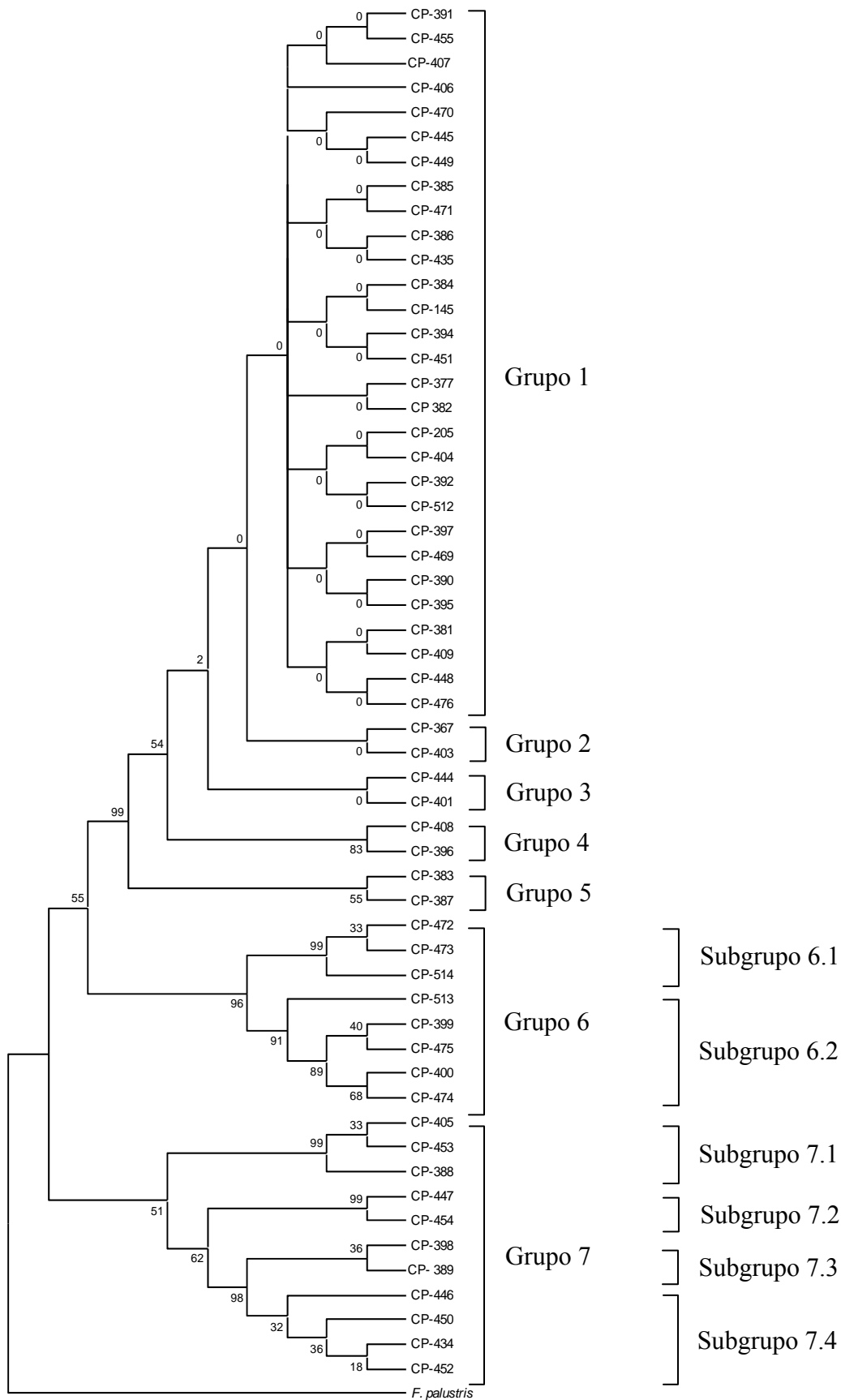


Figura 7a. Filograma obtenido del análisis de las secuencias de la región ITS-1, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

A partir de la región ITS-4 el análisis de parsimonia se realizó con una búsqueda heurística produciendo 69 árboles más parsimoniosos con el grupo de datos obtenidos, mostrando un índice de consistencia de 0.898608 y un índice de retención de 0.904494. Dentro del árbol consenso estricto generado (Figura 7b), se generaron 11 grupos. Dentro del grupo 1 se resolvieron los subgrupos 1.1 y 1.2 habiendo una diferencia nucleotídica del 11% entre las cepas CP-513 y CP-514; entre el grupo 1 y el grupo 2 se obtuvo una diferencia nucleotídica del 34% correspondiente a las cepas CP-473 y CP-388; entre el grupo 2 y el grupo 3 se obtuvo un porcentaje de diferencia nucleotídica de 29, cepas CP-453 y CP-398; en el grupo 3 y 4 la diferencia nucleotídica fue del 35%, dentro del grupo 4 se resolvieron tres subgrupos, las diferencias nucleotídicas entre estos subgrupos fue de 50% y 34%, valores entre los subgrupos 4.1-4.2 y 4.2-4.3. Los valores del soporte estadístico para los cuatro grupos, del 1 al 4 fueron altos, superando el 50% para la mayoría de ellos. Para el grupo 4 y 5 se obtuvo una diferencia del 37% entre las cepas CP-450 y CP-145; el grupo 5 y el grupo 6 se diferenciaron con un valor del 9%, cepas CP-403 y CP-455; dentro del grupo 6 se separaron dos subgrupos con una diferencia de nucleótidos del 11% subgrupo 6.1 y 6.2 pertenecientes a las cepas CP-512 y CP-406; el porcentaje de diferencia entre los grupos 6 y 7 fue del 8% entre las cepas CP-383 y CP-392; del grupo 7 al grupo 11 se observaron diferencias nucleotídicas inferiores al 6%. Los valores de soporte estadístico del grupo 5 al grupo 11 fueron bajos no rebasando el 50%, no resolviéndose filogenéticamente estos grupos.

A partir de las secuencias consenso obtenidas de las regiones ITS-1 + ITS-4 en análisis de parsimonia basado en una búsqueda heurística se generaron 87 árboles más parsimoniosos, mostrando un índice de consistencia de 0.907080 y un índice de retención de 0.919231. Dentro del árbol consenso estricto, figura 7c, se obtuvieron 6 grupos. Del grupo 1 se resolvieron tres subgrupos. Para el subgrupo 1.1 y 1.2 se obtuvo una diferencia nucleotídica del 11%, cepas CP-514 y CP-513, en el subgrupo 1.2 y 1.3 la diferencia de nucleótidos fue del 7% cepas CP-513 y CP-399, para los subgrupos 1.3 y 1.4 la diferencia nucleotídica fue del 51% entre las cepas CP-400 y CP-405; el grupo 1 y el grupo 2 se resolvieron con un 36% de diferencia nucleotídica; dentro del grupo 2 se resolvieron los subgrupos 2.1 y 2.2 con una diferencia del 29% entre las cepas CP-454 y CP-389; el grupo 2 y el grupo 3 mostraron un 40% de diferencias nucleotídicas entre las cepas CP-452 y CP-384; del grupo 3 al grupo 6 no se obtuvieron porcentajes de variación nucleotídica superiores al 6% pudiéndose tratar de un complejo de la misma especie.

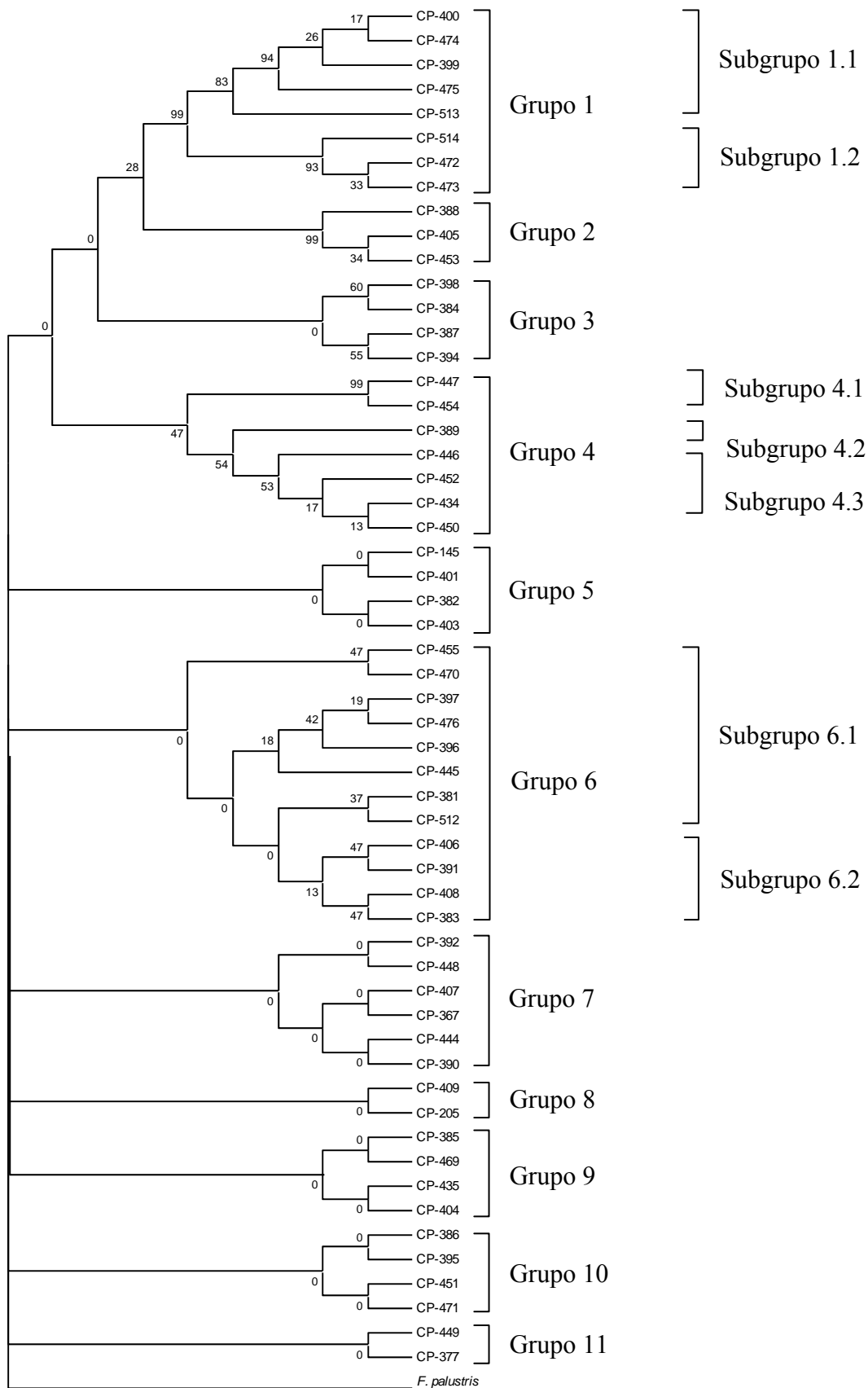


Figura 7b. Filograma del análisis de las secuencias obtenidas de la región ITS-4, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

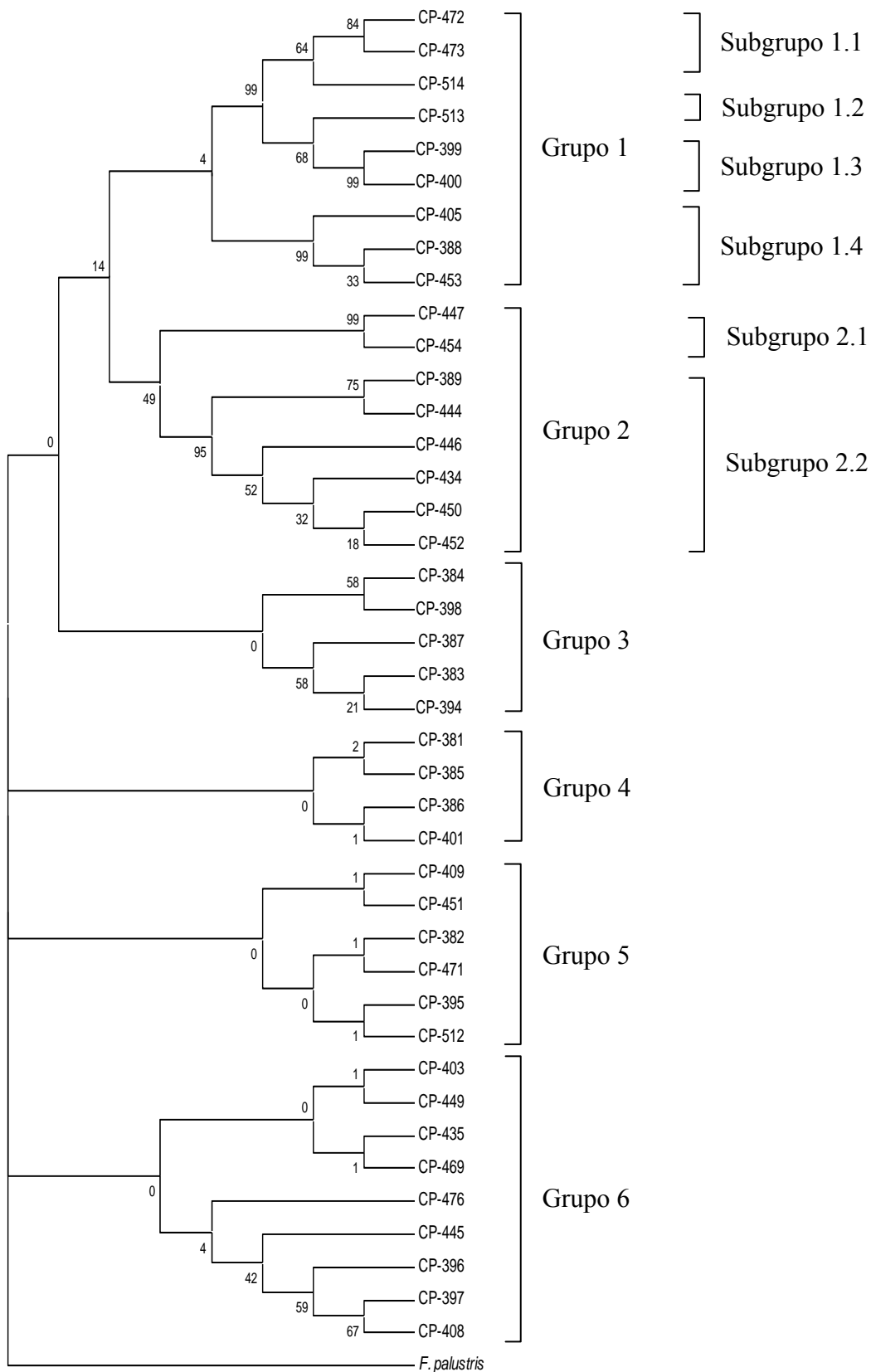


Figura 7c. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el análisis de máxima parsimonia y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

A pesar del uso de las secuencias producidas por las regiones ITS-1 e ITS-4 y su secuencia consenso, los árboles obtenidos mantienen la misma topología, lo cual indica la solidez del verdadero árbol filogenético. Aplicado al razonamiento de máxima parsimonia que sostiene que el mejor árbol es aquel que involucra menor número de pasos, al analizar las secuencias obtenidas por la región ITS-4 se obtuvieron 69 árboles más parsimoniosos, indicando un menor número de cambios posibles en las secuencias. Al analizar los valores de variación nucleotídica para discriminar entre especies y tomando como valor intraespecífico un porcentaje mayor a 6, la variación fue alta entre grupos y subgrupos, resolviendo once especies diferentes. Sin embargo, los valores de bootstrap fueron bajos en la mayoría de los subgrupos no teniendo un buen soporte estadístico las ramas generadas para cada grupo.

Para el grupo de los datos obtenidos por la región ITS-1 y aunque el número de árboles parsimoniosos fue de 312, los valores de variación nucleotídica fueron altos resolviendo siete especies diferentes. Un dato importante fue el alto valor de bootstrap entre grupos dando un mejor soporte estadístico entre estos, asegurando su mejor agrupación y resolución de las especies en cada grupo. Al analizar los datos consenso a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4 en número de árboles más parsimoniosos fue de 87, resolviendo siete especies las cuales fueron fuertemente soportados con valores de bootstrap mayores del 70%, sin embargo, los valores de variación nucleotídica en la mayoría de los grupos y subgrupos fueron relativamente bajos. Quizás esto se deba al número de diferencias entre los sitios parsimoniosamente informativos que contienen las secuencias obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4, no mostrando una buena resolución entre los grupos y subgrupos.

Los altos valores de variación nucleotídica en las secuencias producidas por la región ITS-4 y los bajos valores de la región ITS-1 también fueron reportados por Moncalvo *et al.* (1995a), quienes discuten que la variación nucleotídica para los datos obtenidos por la región ITS-4 se debió, a que ésta región evoluciona más rápidamente que la región ITS-1, además de que la región ITS-4 fue útil para diferenciar entre especies en proceso de especiación, mientras que la región ITS-1 mostró mayor estabilidad nucleotídica, dando un mayor valor al árbol obtenido.

9.2.3.2 Mínima evolución

También se realizó un análisis utilizando otro modelo evolutivo. El modelo incluye el método de distancia de *Neighbor-Joining* que considera el criterio de mínima evolución, en donde las mejores hipótesis filogenéticas son aquellas que minimizan las diferencias entre las distancias genéticas y las medidas sobre una topología hipotética. Bajo este criterio los individuos cercanamente emparentados tendrán menos diferencias en sus secuencias que los individuos que se encuentren menos relacionados (Nei y Kumar, 2000). Análisis preliminares usando este modelo produjo árboles topológicamente similares a los obtenidos en máxima parsimonia, mostrando diferencia solamente en el soporte estadístico. Los árboles evolutivos producidos por las secuencias obtenidas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4 y las secuencias consenso ITS-1 + ITS-4 se muestran en las figuras 8a, figura 8b y figura 8c, respectivamente. Esto indicó que la topología de los árboles fue muy similar a los árboles evolutivos correctos.

La reconstrucción filogenética para el conjunto de datos obtenidos de la región ITS-1 con el análisis de *Neighbor-joining*, se realizó con 1000 repeticiones de *bootstrap*, bajo el criterio de Tamura-Nei, analizando los datos con *pairwise deletion* y dando el mismo peso a los eventos de transición y transversión. Dentro del árbol consenso estricto generado, (Figura 7d), se generaron 3 grupos. En el grupo 1 y 2 las distancias genéticas oscilaron entre 0.000 y 0.005 y con soportes estadísticos de 0 al 50%, no resolviéndose las relaciones filogenéticas dentro de estos dos grupos. El grupo 2 se diferenció del grupo 3 con un valor de distancia genética del 0.081 entre las cepas CP-406 y CP-400. Nei (1976), menciona que entre mismas especies se obtengan valores situados entre 0.000 y 0.005 y, entre especies diferentes, la distancia aumente al intervalo de 0,02 a 0,20. Si consideramos este valor para diferenciar entre especies de hongos, las distancias obtenidas entre el grupo 2 y el grupo 3 confirmarían que se trata de especies diferentes obteniendo un valor superior al 0.020. Dentro del grupo 3 se resolvieron 7 subgrupos, el subgrupo 3.1 se resolvió del subgrupo 3.2 con un valor de distancia de 0.024, cepas CP-475 y CP-513; el subgrupo 3.2 y 3.3 se resolvieron con un valor de 0.021, cepas CP-513 y CP-473; los valores de distancia para los subgrupos 3.3, 3.4 y 3.5 fueron de 0.082, 0.078 y 0.045, valores calculados entre las cepas CP-472-CP-405, CP-388-CP-447 y CP-454-CP-498, respectivamente; el subgrupo 3.6 y 3.7 se resolvió con un valor de 0.022 entre las CP-389 y CP-446. El soporte estadístico para el grupo 3 y sus subgrupos fueron superiores al 50% confirmando la solidez de las ramas que agrupan a estos clados.

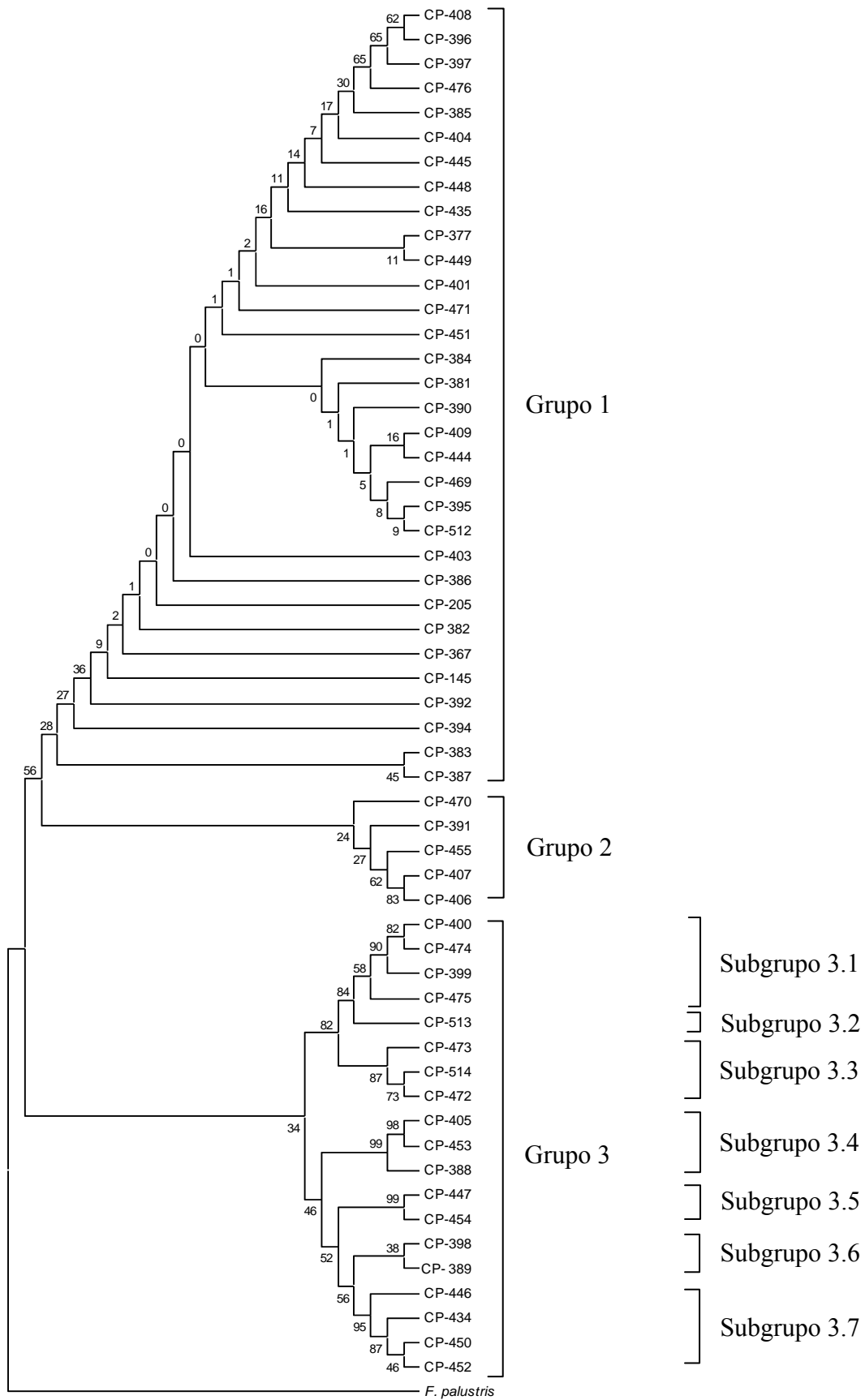


Figura 7d. Filograma obtenido de las secuencias de la región ITS-1, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de *Neighbor-Joining* y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

Para el conjunto de datos obtenidos de la región ITS-4 se creó el árbol consenso estricto figura 7e, generando 4 grupos. Del grupo 1 al 3 las distancias genéticas no fueron superiores a 0.020 sugiriendo que se trata de las misma especie, sin embargo, el agrupamiento obtenido por el método de análisis diferencia estos 3 grupos, dentro del grupo 1 se identificó el subgrupo 1.1 y 1.2 con una distancia genética 0.021 entre las cepas CP-455 y CP-406; el grupo 1 del grupo 2 mostró una distancia genética de 0.019 entre las cepas CP-383 y CP-382; el grupo 2 y el grupo 3 se diferencian con una distancia de 0.019 entre las cepas CP-398 y CP-401, a pesar de la formación de estos grupos y sus subgrupos el soporte estadístico fue bajo en la mayoría de las cepas agrupadas, pudiéndose tratar de un complejo de una misma especie. Entre el grupo 3 y el grupo 4 se obtuvo una distancia genética de 0.067 entre las cepas CP-394 y CP-400. Dentro del grupo 4 se resolvieron 5 subgrupos con valores de 0.031 (subgrupo 4.1 y 4.2, cepas CP-513 y CP-514), 0.082 (subgrupo 4.2 y 4.3, entre las cepas CP-473 y CP-405), 0.065 (subgrupos 4.3 y 4.4, cepas CP-388 y CP-447) y 0.066 (subgrupo 4.4 y 4.5, valor obtenido entre las cepas CP-454 y CP-446). El soporte estadístico dentro del grupo 4 y sus subgrupos fue superior al 70% confirmando la solidez de los grupos generados.

Con el conjunto de datos consenso generados de las regiones ITS-1 + ITS-4 se identificaron 8 grupos, figura 7f. Del grupo 1 al grupo 5 los valores de distancias genéticas no fueron mayores al 0.007, sin embargo, la mayoría de las cepas incluidas en estos grupos compartían valores de distancias de 0.000 y 0.002. El grupo 5 y el grupo 6 se diferenciaron con un valor de distancia de 0.055 entre las cepas CP-398 y CP-472; dentro del grupo 6 se resolvieron 3 subgrupos con una distancia genética de 0.022 entre el subgrupo 6.1 y el subgrupo 6.2 entre las cepas CP-514 y CP-513; el grupo 6 y 7 mostraron diferencias genéticas de 0.099 entre las cepas CP-400 y CP-447; dentro del grupo 7 se resolvieron 2 subgrupos con un valor de 0.027 entre las cepas CP-554 y CP-444; el grupo 7 y 8 mostró una diferencia genética de 0.084 entre las cepas CP-452 y CP-388. El soporte estadístico de los grupos 1 al 5 fue bajo no resolviendo las relaciones filogenéticas entre este grupo de cepas, para los grupos 6 al 8 los valores del soporte estadístico fueron superiores al 50%, confirmando la formación de los grupos y sus subgrupos.

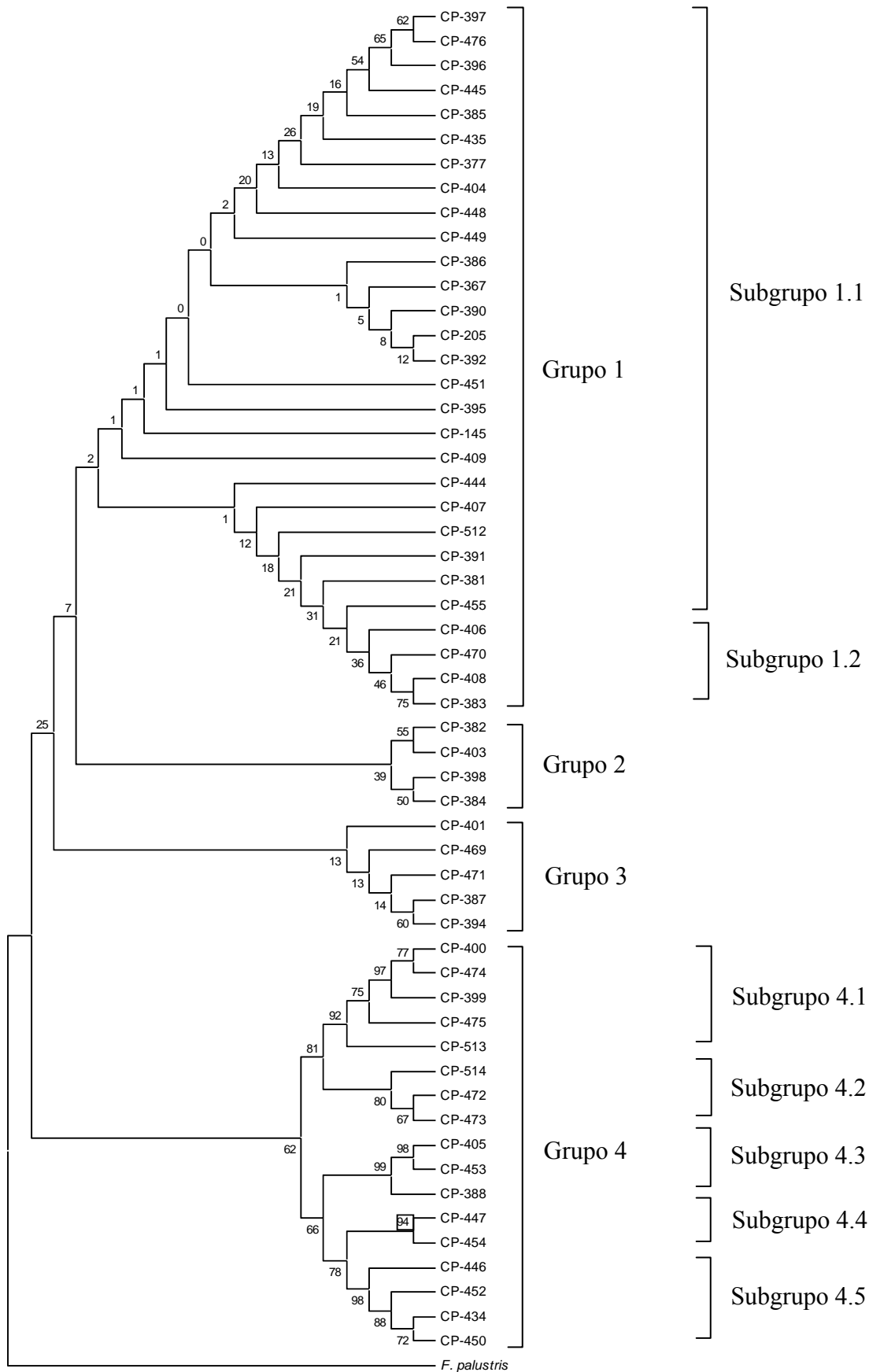


Figura 7e. Filograma obtenido de las secuencias de la región ITS-4, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de *Neighbor-Joining* y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

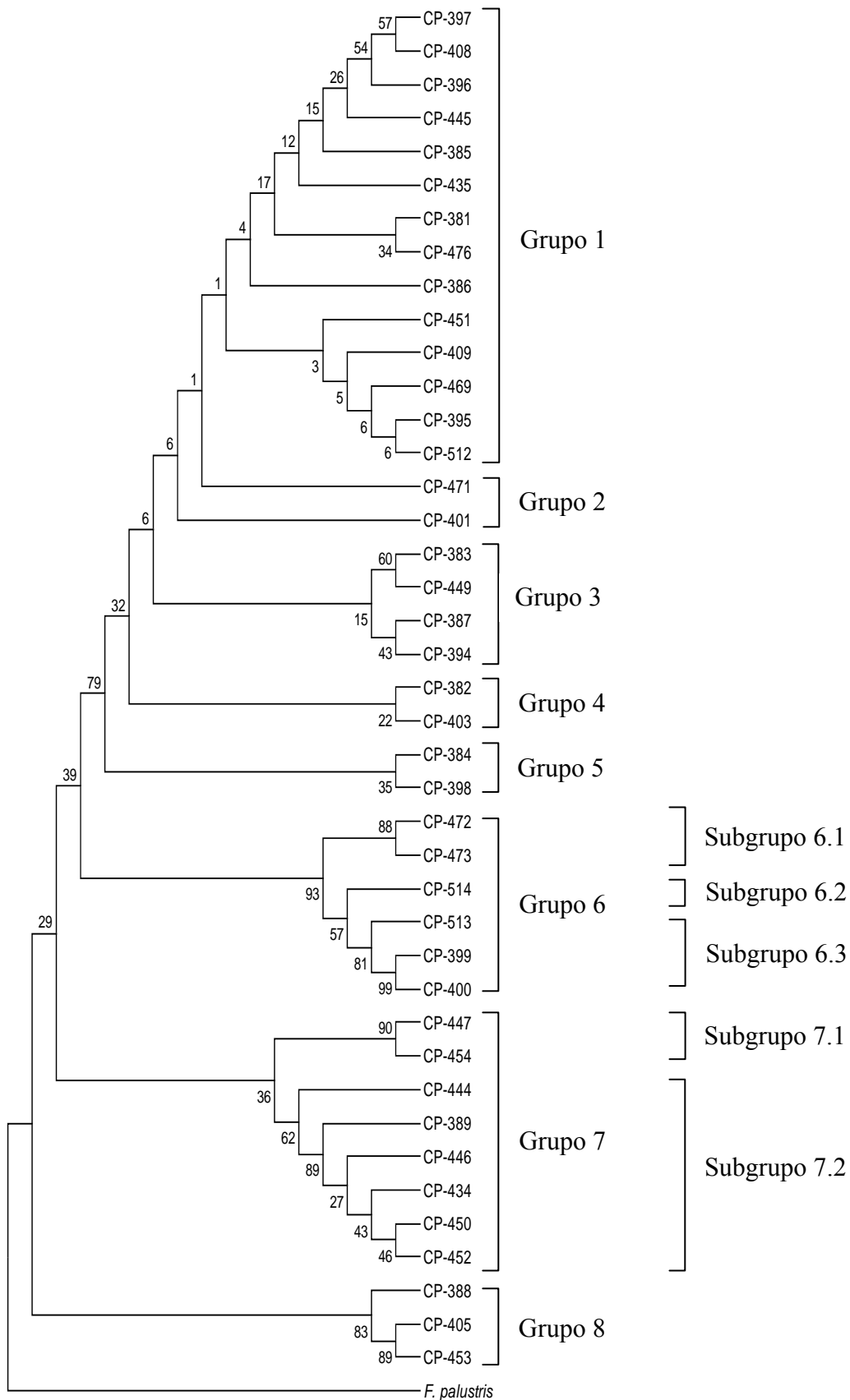


Figura 7f. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de *Neighbor-Joining* y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

La topología en los tres árboles consenso estricto producidos con *Neighbor-joining* fue similar para el conjunto de datos obtenidos por las regiones independientes y su consenso. De acuerdo a los valores de variación nucleotídica establecidos por Moncalvo *et al.* (1995a), en este trabajo se encontró una relación con los valores de distancia genética, el cual sugiere que un valor de distancia genética mayor a 0.020 es adecuado para distinguir relaciones intra-específicas mientras que inter-específicas debe ser menor. Tomando en cuenta esta consideración, para el árbol obtenido por la región ITS-1 se resolvieron nueve especies con altos valores de distancia genética entre grupos y subgrupos, además de un soporte estadístico moderado mayor al 50%. Para la región ITS-4 se resolvieron siete especies con altos valores de distancia genética y un alto soporte estadístico.

El árbol generado partir de las secuencias consenso de las regiones ITS-1 + ITS-4 mostró valores de distancia genética más altos, así como, valores altos de bootstrap, resolviendo de una mejor manera cada rama generada haciendo una mejor distinción entre especies. Sin embargo, la resolución intraespecífica no fue resuelta obteniendo valores de distancia genética bajos así como del soporte estadístico. Moncalvo *et al.* (1995a), en un análisis de máxima parsimonia también reportaron bajos valores de *bootstrap* discutiendo su significancia en organismos de una misma especie de *Ganoderma*.

9.2.3.3 Identificación de las especies

Para la identificación de la especie correcta en los grupos obtenidos con máxima parsimonia y mínima evolución, se realizó un búsqueda de la similitud, a partir de los datos depositados en bases de datos *European Bioinformatics Institute* (EBI), en la cual se obtuvieron similitudes con especies como *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres. 1932, *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1887, *G. subamboinense* Henn. 1997, *G. adspersum* (Schulzer) Donk 1969, así como especies no determinadas, *G. sp.*, además de destacar en la mayoría de las 66 cepas de este trabajo *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst 1981. Sin embargo, esta búsqueda sólo se consideró como un acercamiento de la diversidad de especies representada en las 66 cepas estudiadas.

Para comprobar la especie correcta se realizó un análisis de máxima parsimonia, incluyendo la secuencia de nucleótidos obtenidos a partir de las regiones ribosomales ITS, depositadas en la base de datos (EBI) ver anexo G. El árbol se generó a partir de los datos derivados por la región ITS-1 obtenidos en este trabajo y se incluyeron las secuencias externas, el árbol

mantuvo una topología similar a la obtenida de los análisis generados en las secciones 9.2.3.1 y 9.2.3.2. (Figura 7g). Dentro del árbol generado estricto se resolvieron 4 grupos, el soporte estadístico para los grupos 1 al 3 fue mayor al 80%, sin embargo, el grupo 4 no fue resuelto con los valores de Bootstrap, los cuales fueron bajos.

Dentro del grupo 1 se resolvieron cuatro subgrupos, mostrando diferencias de distancias genética y variación nucleotídica mayores a 0.020 y 6%, respectivamente anexo E1 y E2, lo cual indicó que se trató de especies diferentes a pasar de la similitud observada en la base de datos. En el grupo 2 se resolvieron dos subgrupos, en el subgrupo 2.1 se encontró relación estrecha con *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887, con valores de 0.002 y 1% de distancia genética y variación nucleotídica, lo cual demostró la cercanía con esta especie. Además del porcentaje de 99 del soporte estadístico de las cepas CP-447 y CP-454 con respecto a *G. applanatum*. Para las cepas CP-388, CP-405 y CP-453 (subgrupo 2.2) los valores de distancia genética y variación nucleotídica con respecto a *Ganoderma subamboinense* fueron de 0.004, 0.011, 0.009 y del 2%, 6% y 5%, respectivamente, demostrando su pertenencia a la especie *G. subamboinense* Henn. 1997. También el soporte estadístico fue del 99%, asegurando la confiabilidad de la agrupación. En el tercer grupo se resolvieron tres subgrupos que mostraron relaciones genéticas iguales. Un dato importante en el conjunto de los grupos 1 al 3 fue la presencia de especies tales como *G. philippii*, y *G. applanatum* pertenecientes al género *Elfvigia* (complejo no laqueado), demostrando la resolución de este género dentro de las cepas analizadas en este trabajo, además de la corroboración de los datos morfológicos obtenidos al momento de su recolección (Observaciones obtenidas en comunicación personal con el Biólogo Elizur Montiel del CIB-UAEM, México).

En el grupo 4 las ramas no fueron resueltas estadísticamente, obteniéndose valores bajos de *bootstrap*. La similitud de estas cepas comparadas en la base de datos parece estar relacionada con la especie *G. lucidum*, sin embargo, al comparar la variación nucleotídica con secuencias de la base de datos (EBI) fueron superiores al 6%, no siendo así el caso para los valores de distancia genética observados entre 0.002 a 0.019. Por otra parte, al comparar el parentesco de *G. lucidum* con el grupo 4 con respecto a la distancia genética y variación nucleotídica, solo las cepas CP-470 y CP-391 mantuvieron relación estrecha con esta especie, identificando a estas dos cepas como *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst 1981. Los valores de distancia genética y variación nucleotídica se muestran en los Anexo E1 y E2.

Al parecer el valor de variación nucleotídica fue más estricto para discriminar entre especies y subespecies o géneros jóvenes en proceso de especiación, ya que con este valor se distinguió *Ganoderma lucidum* (género *Ganoderma* complejo laqueado) de otras especies o subespecies del mismo complejo, no siendo el caso para el valor de distancia genética, que a pesar de que los subgrupos generados pertenecieron a diferente subespecies el valor de 0.020 no fue suficiente para realizar una adecuada clasificación.

De acuerdo a Moncalvo *et al.* (1995a,b); Smith y Sivasithamparam (2000a,b) y Moncalvo y Buchanan (2008), quienes siguieron dos subgéneros sólidos para *Ganoderma*, subgénero *Elfvigia* (hongos no laqueados) y subgénero *Ganoderma* (hongos laqueados) con el análisis molecular de los ITS se diferenciaron estos dos subgéneros ya que las características morfológicas de los especímenes recolectados se correlacionan con estos resultados.

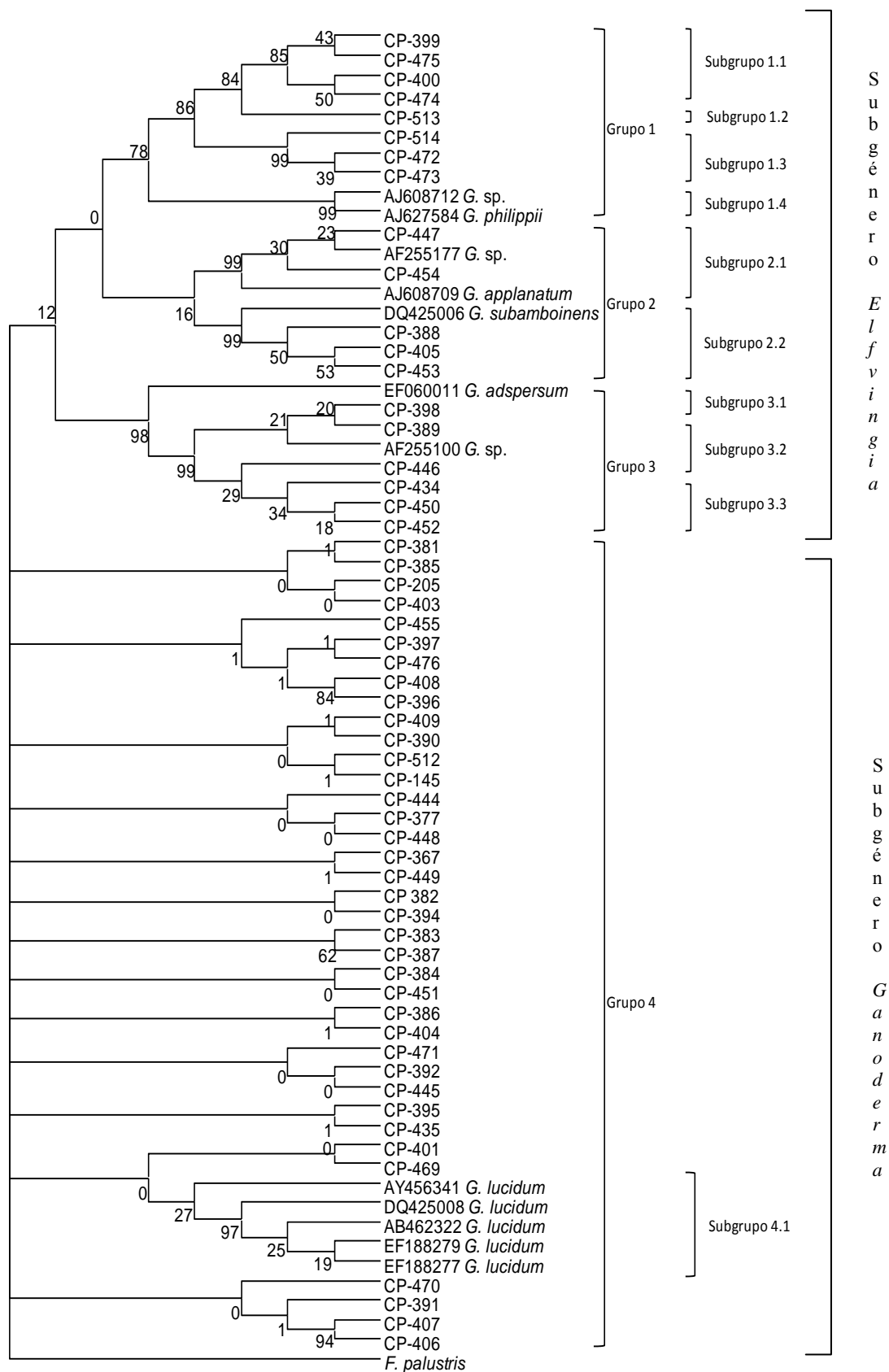


Figura 7g. Filograma obtenido de las secuencias consenso a partir de la región ITS-1 + secuencias externas, usando como grupo externo a *Fomitopsis palustris*, el árbol consenso fue generado con el método de agrupación de máxima parsimonia y un *bootstrap* de 1000 réplicas, los números de las ramas indican el soporte estadístico.

9.3 Caracterización del material biológico

9.3.1 Caracterización morfo-descriptiva de las cepas

En el análisis morfológico del micelio se describen tipo de crecimiento, textura, densidad, apariencia, color; además, en cada medio de cultivo empleado. Los requerimientos de crecimiento para *Ganoderma* spp. predominantemente para *Ganoderma lucidum* han sido publicados en la literatura (Tseng *et al.*, 1984; Yang y Liao, 1998), sin embargo, no existe evidencia que sugiera que las diferentes especies del mismo género requieran los mismos factores nutricionales de crecimiento. Es más, cepas de distinto origen geográfico no necesariamente crecen bajo las mismas condiciones. Solo para el género *Ganoderma* han sido publicados gran variedad de condiciones de crecimiento (Chen, 1993; Chen y Miles. 1996; Mayzumi *et al.*, 1997; Stamets, 1993; Tong y Chen 1990). Para determinar las características morfológicas miceliales se utilizaron dos medio de cultivo: extracto de malta agar (EMA+BF) y bran-flakes sólido (BFS+BF). Se ha reportado que el pH óptimo para crecimiento de *Ganoderma* spp. es de 6 con un rango de 4 a 8 (Chen y Yu, 1999; Lin *et al.*, 1973; Yang y Liao, 1998), además de que el pH óptimo para otros hongos basidiomicetos ha sido reportado de 6 (Kim *et al.*, 2002), y un rango de temperatura de 25°C a 37°C con un óptimo de 30°C. Esta temperatura se reportó como óptima para otras especies de *Ganoderma* (Lin *et al.*, 1973; Yang y Liao, 1998) además de ser utilizada en cultivos líquidos (Fang y Zhong, 2002b; Lee *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Sin embargo, cepas americanas de *Ganoderma* spp. muestran una temperatura óptima de 25°C. De las características observadas como; densidad, textura y color, se realizó una guía y se utilizó para la descripción del material biológico aislado (Figura 8).

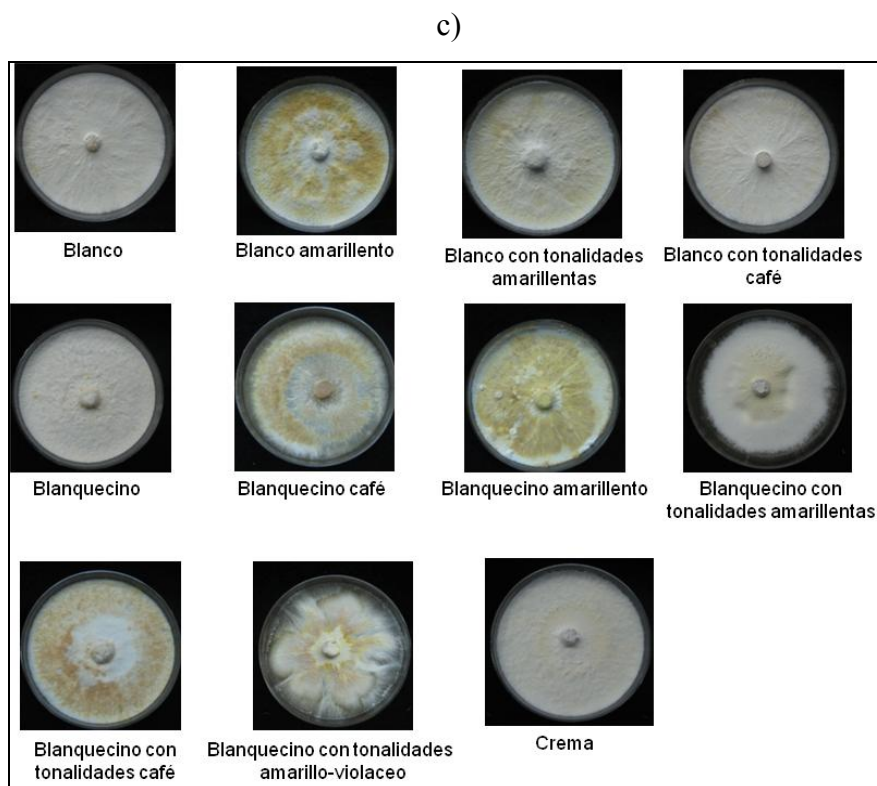
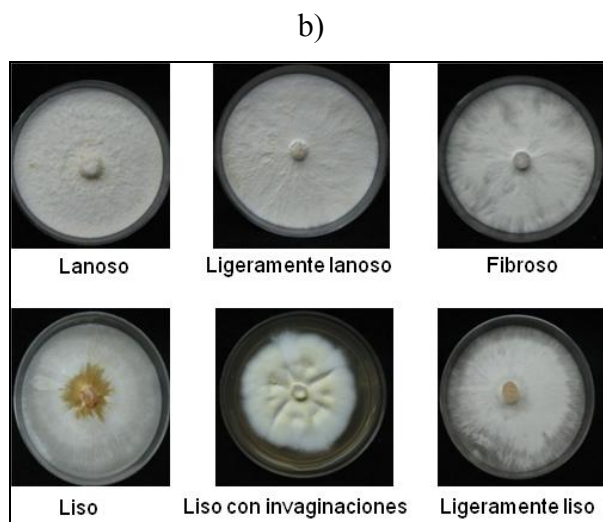
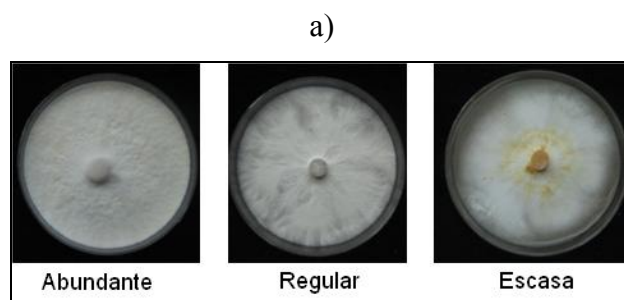


Figura 8. Características morfo-descriptivas del micelio del género *Ganoderma* spp. a) densidad, b) textura y c) color.

Las características que presentaron las cepas fueron textura de lanoso a ligeramente lanoso, fibroso, liso, liso con invaginaciones y ligeramente liso; la densidad que se presentó fue de abundante, regular a escaso; el tipo de color fue de blanco, blanco amarillento, blanco con tonalidades amarillentas, blanco con tonalidades café, blanquecino, blanquecino café, blanquecino amarillento, blanquecino con tonalidades amarillentas, blanquecino con tonalidades café, blanquecino con tonalidades amarillo-violáceo y crema, el tipo de crecimiento para todas las cepas fue radial y de apariencia plana, sin embargo, las características variaron dependiendo el medio de cultivo que empleado (Tabla 3).

Las características morfológicas del micelio de las cepas nativas coinciden con lo reportado por Rodríguez *et al.* (1997) para cepas nativas del estado de Jalisco, reportando micelios de crecimiento radial, apariencia plana creciendo sobre agar en medio de cultivo, color blanco a blanquecino con tonos amarillentos y café, no aéreo y densidad abundante, de igual manera para cepas comerciales *Ganoderma lucidum* (Stamets, 1993).

Tabla 3. Características morfo-descriptivas del micelio en las 66 cepas de <i>Ganoderma</i> .				
CEPA	Medio de cultivo	Características del micelio		
		Textura	Densidad	Color
CP-381	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco
CP-382	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco con tonalidades café
CP-383	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco
CP-384	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-385	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Regular	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
CP-386	EMA+BF	Liso	Regular	Blanco amarillento
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanco con tonalidades café
CP-387	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-388	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Lanosa	Abundante	Crema
CP-389	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco con tonalidades café
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanco
CP-390	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento

	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-391	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanquecino con tonalidades café
CP-392	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco
CP-393	EMA+BF	Lanosa	Regular	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Regular	Blanquecino café
CP-394	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco con tonalidades amarillentas
CP-395	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco con tonalidades amarillentas
CP-396	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanquecino
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-397	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-398	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Lanosa	Abundante	Blanquecino
CP-399	EMA+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Liso	Escaso	Blanco con tonalidades café
CP-400	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Regular	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Liso	Escaso	Blanco con tonalidades café
CP-401	EMA+BF	Liso	Regular	Blanco
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanco
CP-402	EMA+BF	Fibrosa	Regular	Blanquecino con tonalidades amarillo-violáceo
	BFS+BF	Liso	Escaso	Blanquecino café
CP-403	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco
CP-404	EMA+BF	Fibrosa	Regular	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-405	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Amarillento
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Crema
CP-406	EMA+BF	Liso	Regular	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
CP-407	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanco con tonalidades café
	BFS+BF	Lanosa	Abundante	Blanco
CP-408	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-409	EMA+BF	Liso	Regular	Blanquecino café
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-38	EMA+BF	Liso	Regular	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Liso	Escaso	Blanquecino café
CP-42	EMA+BF	Liso con invaginaciones	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Liso	Escaso	Blanquecino con tonalidades café
CP-62	EMA+BF	Liso	Abundante	Blanquecino amarillento

	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanquecino amarillento
CP-66	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-434	EMA+BF	Liso con invaginaciones	Abundante	Blanco
	BFS+BF	Fibrosa	Escaso	Blanco
CP-435	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Amarillento
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-444	EMA+BF	Liso	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco con tonalidades café
CP-445	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Banco
CP-446	EMA+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanquecino con tonalidades café
CP-447	EMA+BF	Liso con invaginaciones	Abundante	Blanquecino con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanco
CP-448	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanquecino con tonalidades café
CP-449	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Crema con tonalidades café
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
CP-450	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Regular	Blanquecino con tonalidades café
	BFS+BF	Liso	Regular	Blanco
CP-451	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco
CP-452	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
CP-453	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino
CP-455	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-454	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco con tonalidades amarillentas
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Crema
CP-145	EMA+BF	Lanosa	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino
CP-205	EMA+BF	Liso	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco con tonalidades amarillentas
CP-367	EMA+BF	Fibrosa	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanco
CP-377	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Liso	Abundante	Blanco
CP-469	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanco con tonalidades café
CP-470	EMA+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanco
CP-471	EMA+BF	Lanoso	Abundante	Blanquecino café

	BFS+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanco con tonalidades café
CP-472	EMA+BF	Fibroso	Abundante	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanquecino café
CP-473	EMA+BF	Fibroso	Regular	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanquecino café
CP-474	EMA+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanquecino amarillento
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino amarillento
CP-475	EMA+BF	Ligeramente liso	Regular	Amarillento
	BFS+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanquecino amarillento
CP-476	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanco
	BFS+BF	Fibrosa	Abundante	Blanquecino con tonalidades café
CP-477	EMA+BF	Liso con invaginaciones	Abundante	Blanco amarillento
	BFS+BF	Liso	Abundante	Crema
CP-510	EMA+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanquecino café
	BFS+BF	Ligeramente liso	Regular	Blanco
CP-511	EMA+BF	Ligeramente lanoso	Regular	Blanco
	BFS+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanquecino café
CP-512	EMA+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanco con tonalidades café
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino café
CP-513	EMA+BF	Liso	Abundante	Blanco
	BFS+BF	Fibrosa	Regular	Blanquecino café
CP-514	EMA+BF	Liso con invaginaciones	Abundante	Blanco con tonalidades café
	BFS+BF	Ligeramente lanoso	Abundante	Blanquecino amarillento
CP-532	EMA+BF	Liso	Regular	Blanquecino café
	BFS+BF	Ligeramente liso	Abundante	Blanco con tonalidades café
CP= Cepario del Colegio de Postgraduados. EMA+BF= Extracto de malta agar. BFS+BF= Bran-flakes sólido.				

El medio de cultivo óptimo reportado para especies del género *Ganoderma* es extracto de malta agar, mostrando una densidad abundante en la mayoría de las cepas, sin embargo, la presencia de tonos color amarillento o café en algunas cepas puede ser por deficiencia de algunos nutrientes necesarios para su desarrollo, regularmente oxidándose el micelio y el medio de cultivo por excreción de metabolitos secundarios.

Al utilizar el medio de cultivo bran-flakes sólido, el color del micelio predominante fue blanco, sin embargo, la densidad en la mayoría de las cepas fue regular. Posiblemente la presencia de material ligninocelulosico en este medio de cultivo semeje los sustratos naturales y nutrientes de las cepas recolectadas, no observando la presencia de oxidación del micelio. Por otra parte, la textura parece no estar relacionada con el uso del medio de cultivo que se emplee, ya que la textura fue constante en ambos medio de cultivo, al parecer esta se relacionó con el origen y la especie que se trate.

9.3.2 Caracterización microscópica de las cepas

Las características microscópicas del micelio fueron registradas, describiendo ausencia o presencia de septos, tipo de hifas, ancho en micras (μ) de las hifas, presencia de fibulas, tamaño de fibulas (μ) largo por ancho (Tabla 4). Para determinar las características morfológicas miceliales se utilizaron dos medios de cultivo, como medio óptimo se utilizó extracto de malta agar (EMA+BF) y un medio con material ligninocelulosico como única fuente de carbono, *branflakes* sólido (BFS+BF).

Una característica importante del género *Ganoderma* fue la presencia de trama trimítica al formar los basidiomas. Al revisar el micelio al microscopio óptico, la mayoría de las cepas presentó el tipo de hifas dimítico, incluso al ser cultivado en placas con agar en medio sólido, mostraron la presencia de hifas generativas o básicas, usualmente con pared delgada, septadas y fibulas presentes, así como hifas esqueléticas, ausencia de fibulas, relativamente anchas, de paredes espesas, septadas y de forma regular. Al parecer el sistema hifal dimítico se presenta al envejecer el micelio, no obstante, la microscopía en las 66 cepas se realizó en tiempos iguales al séptimo día después de haber inoculado el medio de cultivo y persistía este tipo de hifas.

Otra característica constante en las cepas fue el tamaño de las hifas generativas, con una media de 2 μ de ancho y en ocasiones de 3 a 6 μ . Resultados similares fueron observados por Stamets, (1993). El uso de diferentes medio de cultivo parece no afectar el tamaño de las hifas generativas, aún en aquellas cepas en las que el tamaño de micelio es mayor a 2 μ . Las hifas esqueléticas en las cepas con tipo hifal dimítico mostraron una apariencia más robusta, observando paredes gruesas y de forma regular. El tamaño varió de 2 a 5 μ con una media de 2 – 4 μ . De igual manera el uso de medio de cultivo no se relaciona directamente con el tamaño y forma (Tabla 4).

Tabla 4. Características microscópicas del micelio en las diferentes cepas de *Ganoderma*.

Características microscópicas						
CEPA	Medio de cultivo	Sistema hifal	Ancho de hifa generativas (μ)	Tamaño de hifas esqueléticas (μ)	Presencia de fibulas	Tamaño de fibula largo X ancho (μ)
CP-381	EMA+BF	Dimítico	4	2—4	Regular	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	6x10
CP-382	EMA+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	6x6
	BFS+BF	Dimítico	3	2—4	Abundante	5x4
CP-383	EMA+BF	Dimítico	2	2—4	Regular	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x4
CP-384	EMA+BF	Dimítico	4	2—4	Regular	4x6
	BFS+BF	Dimítico	2	2—4	Regular	4x2
CP-385	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x4
	BFS+BF	Dimítico	4	2—3	Regular	6x4
CP-386	EMA+BF	Dimítico	4	3—4	Abundante	8x10
	BFS+BF	Dimítico	2	2—4	Abundante	4x2
CP-387	EMA+BF	Dimítico	2	3—4	Escasas	4x2
	BFS+BF	Dimítico	2	3—4	Escasas	4x2
CP-388	EMA+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
CP-389	EMA+BF	Dimítico	6	2—3	Abundante	4x6
	BFS+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	6x4
CP-390	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x3
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x3
CP-391	EMA+BF	Dimítico	3	2—3	Regular	5x4
	BFS+BF	Dimítico	3	2—3	Regular	5x4
CP-392	EMA+BF	Dimítico	2	3—4	Regular	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x2
CP-393	EMA+BF	Dimítico	2	2—4	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-394	EMA+BF	Dimítico	2	2—4	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	3	2—4	Abundante	6x4
CP-395	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-396	EMA+BF	Dimítico	2	3—4	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—4	Regular	4x4
CP-397	EMA+BF	Dimítico	4	3—4	Regular	6x2
	BFS+BF	Dimítico	2	3—4	Regular	4x4
CP-398	EMA+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
CP-399	EMA+BF	Monomítico	2		Regular	3x2
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	3x2
CP-400	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4

	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x2
CP-401	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-402	EMA+BF	Dimítico	4	3—4	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	3	2—3	Abundante	6x4
CP-403	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-404	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x2
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x4
CP-405	EMA+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
CP-406	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-407	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Escasas	4x2
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Escasas	4x2
CP-408	EMA+BF	Dimítico	4	2—3	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x2
CP-409	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-38	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	6x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	3x2
CP-42	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	6x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	6x4
CP-62	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-66	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-434	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	3	_____	Abundante	6x4
CP-435	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
CP-444	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
CP-445	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	3x4
CP-446	EMA+BF	Dimítico	2	3—2	Abundante	6x2
	BFS+BF	Dimítico	2	3—2	Abundante	4x4
CP-447	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-448	EMA+BF	Dimítico	2	3—5	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	3—5	Abundante	4x4
CP-449	EMA+BF	Dimítico	2	2—4	Regular	3x2
	BFS+BF	Dimítico	2	2—4	Regular	3x2
CP-450	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4

	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-451	EMA+BF	Dimítico	2	2—2	Regular	3x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Regular	4x4
CP-452	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	3x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x3
CP-453	EMA+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
CP-455	EMA+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	4x10
	BFS+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	4x10
CP-454	EMA+BF	Monomítico	3	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-145	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
CP-205	EMA+BF	Dimítico	3	2—2	Abundante	6x6
	BFS+BF	Dimítico	3	2—2	Abundante	6x6
CP-367	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	3—4	Abundante	4x4
CP-377	EMA+BF	Monomítico	3	_____	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
CP-469	EMA+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	_____	_____
CP-470	EMA+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	4x10
	BFS+BF	Dimítico	4	2—4	Abundante	4x10
CP-471	EMA+BF	Monomítico	3	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-472	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
CP-473	EMA+BF	Dimítico	3	2—2	Abundante	6x6
	BFS+BF	Dimítico	3	2—2	Abundante	6x6
CP-474	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	3—4	Abundante	4x4
CP-475	EMA+BF	Monomítico	3	_____	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	4x4
CP-476	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Regular	6x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Regular	6x4
CP-477	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4
CP-510	EMA+BF	Dimítico	3	_____	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	3	_____	Abundante	4x4
CP-511	EMA+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	2	2—3	Abundante	6x4
CP-512	EMA+BF	Monomítico	3	2—3	Regular	4x4
	BFS+BF	Monomítico	2	2—3	Regular	4x4
CP-513	EMA+BF	Monomítico	2	_____	Abundante	4x4

	BFS+BF	Monomítico	2	-----	Abundante	4x4
CP-514	EMA+BF	Dimítico	4	-----	Abundante	4x4
	BFS+BF	Dimítico	4	-----	Abundante	3x4
CP-532	EMA+BF	Monomítico	2	2—4	Abundante	3x4
	BFS+BF	Monomítico	2	2—4	Abundante	4x3
Abundante= Mas de 6 fibulas por campo. Escaso= 3 o menos fibulas por campo. Regular= 4 a 6 fibulas por campo. CP= Cepario del Colegio de Postgraduados. μ = Micras. EMA+BF= Extracto de malta agar. BFS+BF= <i>Branflakes</i> sólido. -----= Ausentes						

La presencia de fibulas varió de abundante a regular siendo mayor el número de cepas que presenta abundantes fibulas, el uso de diferentes medios de cultivo no afecta su presencia, sin embargo, el tamaño fue ligeramente mayor al utilizar EMA. Es importante mencionar que en algunas especies del género *Ganoderma* el tipo de micelio es septado sin presencia de fibulas (Stamets, 1993). Una característica distintiva en las cepas CP-388, CP-398, CP-505 y CP-453, fue la presencia de clamidosporas abundantes, con tamaño de 12 μ de alto por 10 μ de ancho, forma globosa color café, micelio monomítico, septado sin presencia de fibulas (Figura 9). Srinivasulu *et al.* (2008), reportaron la presencia de clamidosporas en *Ganoderma applanatum* y *G. lucidum*, sin embargo, no mencionaron la ausencia de fibulas en estas especies. De igual manera Seo *et al.* (1995), y Schwarze y Ferner, (2003), reportaron clamidosporas en especie como *G. lucidum* y *G. resinaceum*. La presencia de clamidosporas en algunas especies de basidiomicetos sirven como formas de resistencia (Chang y Miles, 1996), generalmente su presencia esta influenciada por el medio de cultivo que se emplee en su crecimiento. En algunos hongos generalmente en micromicetos (mohos) y en menor proporción basidiomicetos (*Volvariella volvacea*), las clamidosporas se forman por el engrosamiento de las hifas en condiciones adversas y son formas de reproducción asexual (Chang y Miles, 1989).

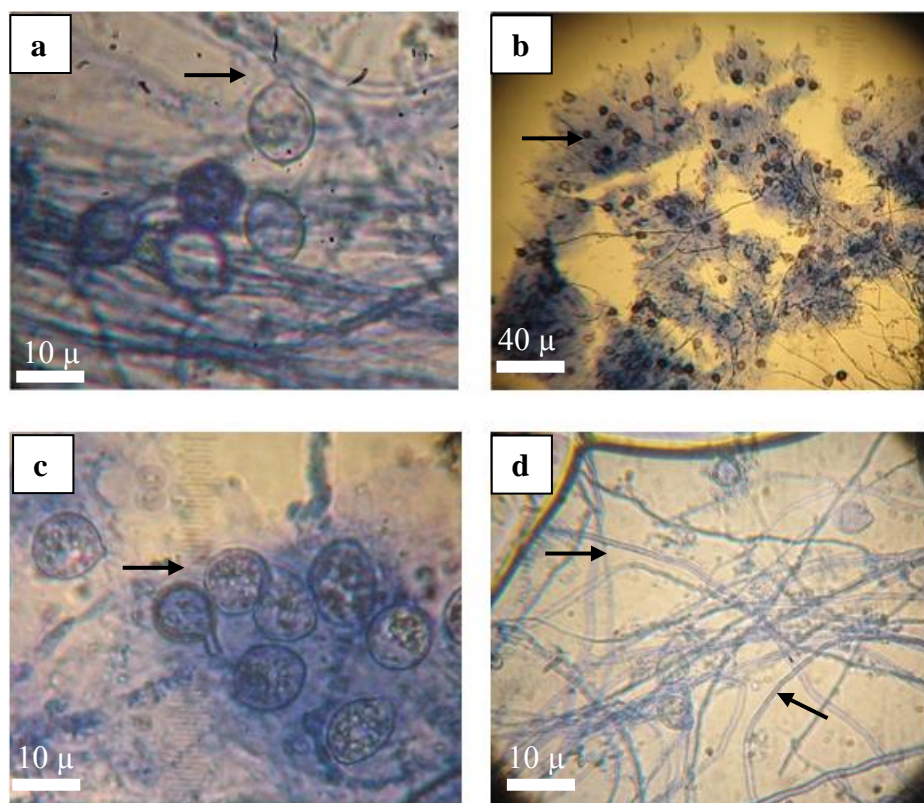


Figura 9. Características morfológicas del micelio de *Ganoderma* spp. a) Clamidospora anclada al micelio, b) Clamidosporas ancladas al micelio color café vistas al microscopio óptico, objetivo de 10X, c) Conjunto de clamidosporas con forma globosa vistas al objetivo de 40X y d) Clamidosporas ancladas al micelio, tipo hifal monomítico, septado y ausencia de fibulas.

9.3.3 Cinética de crecimiento

Se ha observado que la tasa específica de crecimiento es un buen parámetro para comparar la capacidad de colonización de diferentes especies bajo diversas condiciones de laboratorio (Bilay *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 1997). En esta investigación la tasa específica de crecimiento expresada en milímetros por día (mm día^{-1}) fue medida en las 66 cepas a pH 6.0 y temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en dos diferentes medios de cultivo EMA+EB y BFS+EB (Tabla 5).

Tabla 5. Tasa específica de crecimiento (mm/día) de las 66 cepas de hongos pertenecientes a <i>Ganoderma</i> .					
CEPA	EMA +BF	BFS+BF	CEPA	EMA+BF	BFS+BF
CP-381	6.64 ± 0.08	7.41 ± 0.21	CP-434	6.15 ± 0.15	6.48 ± 0.15
CP-382	$8.04 \pm 0.21^*$	$9.17 \pm 0.08^*$	CP-435	$6.82 \pm 0.25^*$	$9.54 \pm 0.07^*$
CP-383	7.29 ± 0.17	7.49 ± 0.05	CP-444	5.65 ± 0.18	8.54 ± 0.45
CP-384	5.05 ± 0.05	6.17 ± 0.12	CP-445	6.81 ± 0.29	7.97 ± 0.25
CP-385	$7.68 \pm 0.14^*$	$8.84 \pm 0.14^*$	CP-446	$7.06 \pm 0.35^*$	$8.19 \pm 0.42^*$
CP-386	5.71 ± 0.16	7.24 ± 0.08	CP-447	$4.52 \pm 0.05^*$	$5.87 \pm 0.00^*$

CP-387	6.67 ± 0.23*	7.74 ± 0.08*	CP-448	5.47 ± 0.14	6.44 ± 0.11
CP-388	10.31 ± 0.18*	9.4 ± 0.00*	CP-449	7.19 ± 0.35*	8.79 ± 0.28*
CP-389	8.29 ± 0.18*	9.16 ± 0.23*	CP-450	2.59 ± 0.12*	5.71 ± 0.10*
CP-390	8.19 ± 0.24*	9.34 ± 0.21*	CP-451	7.98 ± 0.35	7.49 ± 0.39
CP-391	6.67 ± 0.36	5.03 ± 0.19	CP-452	7.63 ± 0.08*	8.62 ± 0.18*
CP-392	6.69 ± 0.34*	8.14 ± 0.14*	CP-453	9.99 ± 0.42	10.58 ± 0.41
CP-393	5.64 ± 0.18	6.01 ± 0.15	CP-454	4.20 ± 0.10*	4.57 ± 0.10*
CP-394	5.48 ± 0.43	6.15 ± 0.15	CP-455	6.28 ± 0.26*	7.26 ± 0.23*
CP-395	7.87 ± 0.30	7.88 ± 0.12	CP-145	8.63 ± 0.41	9.40 ± 0.00
CP-396	6.67 ± 0.24	5.59 ± 0.15	CP-205	6.39 ± 0.23*	7.87 ± 0.30*
CP-397	7.70 ± 0.40	8.14 ± 0.21	CP-367	4.91 ± 0.23	6.60 ± 0.10
CP-398	10.06 ± 0.31*	10.24 ± 0.27*	CP-377	8.02 ± 0.44	8.87 ± 0.22
CP-399	8.47 ± 0.35	9.02 ± 0.35	CP-476	4.95 ± 0.05	6.64 ± 0.09
CP-400	3.77 ± 0.05	4.21 ± 0.07	CP-477	3.37 ± 0.14	3.45 ± 0.07
CP-401	3.04 ± 0.10	3.86 ± 0.05	CP-469	7.38 ± 0.22	7.48 ± 0.10
CP-402	6.80 ± 0.46	5.87 ± 0.11	CP-470	8.95 ± 0.13*	11.28 ± 0.42*
CP-403	7.41 ± 0.39	8.18 ± 0.32	CP-471	6.85 ± 0.55	7 ± 0.33
CP-404	5.17 ± 0.30	6.76 ± 0.17	CP-472	5.97 ± 0.41*	7.2 ± 0.22*
CP-405	10.34 ± 0.11	10.87 ± 0.02	CP-473	6.27 ± 0.22	7.52 ± 0.06
CP-406	6.85 ± 0.33	6.30 ± 0.02	CP-474	6.87 ± 0.03*	7.56 ± 0.10*
CP-407	8.72 ± 0.34	8.94 ± 0.13	CP-475	6.82 ± 0.08*	8.9 ± 0.35*
CP-408	6.80 ± 0.28*	8.82 ± 0.12*	CP-510	7.87 ± 0.14	7.89 ± 0.43
CP-409	7.62 ± 0.30*	8.92 ± 0.19*	CP-511	6.68 ± 0.33	5.59 ± 0.10
CP-38	7.37 ± 0.09	7.47 ± 0.25	CP-512	5.95 ± 0.23	7.2 ± 0.52
CP-42	3.75 ± 0.00	4.47 ± 0.09	CP-513	6.38 ± 0.42*	7.52 ± 0.18*
CP-62	3.96 ± 0.07	7.47 ± 0.08	CP-514	6.82 ± 0.30	6.9 ± 0.23
CP-66	5.90 ± 0.32	5.71 ± 0.09	CP-532	7.64 ± 0.14	8.62 ± 0.32

CP= Cepario del Colegio de Postgraduados. EMA+BF=Extracto de malta agar. BFS+BF=*Branflakes sólido*. * Existen diferencias significativas $\alpha=0.05$ entre tratamientos (medio de cultivo).

Al analizar el uso de diferentes medios de cultivo sobre la tasa de crecimiento radial, se observó un ligero incremento cuando las cepas fueron crecidas usando como suplemento *branflakes* sólido en temperatura y pH óptimo. Este comportamiento puede deberse a que el medio de cultivo utilizado sea parecido al sustrato en el que fueron recolectados los hongos y mantengan una mejor capacidad para degradar el material ligninocelulósico. Del análisis realizado en las 66 cepas se observaron rangos de 2.60 a 10.34 mm día⁻¹ cuando se crecieron en extracto de malta agar (EMA+BF) y de 3.46 a 10.87 mm día⁻¹ en *branflakes* sólido (BFS+BF).

Aunque el uso de estos datos morfológicos son considerados como no taxonómicos, existe una ligera correlación entre éste y el análisis filogenético de las cepas CP-447, CP-388 y CP-399 que se caracterizaron por formar 3 subgrupos en el filograma obtenido por máxima parsimonia con el conjunto de datos obtenidos por las regiones combinadas ITS-1 + ITS-4.

Se observaron diferencias estadísticas significativas en la velocidad de crecimiento, lo cual serviría para realizar una correlación para diferenciar entre especies, de igual manera, se pueden apreciar grandes diferencias en la textura, densidad y color, tomando como principal y por orden de importancia la textura, la cual fue diferente en las cepas, en segundo lugar la densidad, ya que esta también varió en las cepas y por último el color, que, aunque este depende del medio de cultivo empleado, al realizar el análisis utilizando extracto de malta agar (EMA) se observaron diferencias no significativas pero útiles para tomar una decisión al momento de caracterizar la familia e incluso a nivel de género.

Las características más usadas para distinguir entre cultivos de *Ganoderma* son la presencia de clamidosporas y la tasa de crecimiento (Nobles, 1948; Adaskeveg y Gilberston, 1989; Wang y Hua, 1991). En la Figura 10 se muestra la correlación entre estos caracteres en las muestras estudiadas, en la cual, la presencia de las clamidosporas parece estar relacionada con tres cepas las cuales mostraron la mayor tasa de crecimiento (CP-405, CP-453 y CP-388), subgrupo 7.1, y fueron agrupadas por compartir características genéticas con *Ganoderma subamboinense* en los filogramas obtenidos. Para las cepas (CP-389 y CP-398), a pesar de mostrar altos valores de tasa de crecimiento no se observó la presencia de clamidosporas, además de que este subgrupo (7.3) obtuvo diferentes porcentajes de variación nucleotídica y de distancia genética con respecto a *G. subamboinense*, lo cual indica su clasificación en diferente taxa.

Nobles (1948), enfatizó la producción de clamidosporas en cultivos de *G. lucidum* y *G. tsugae* originarias de Norte América, por otra parte Wang y Hua (1991), reportan la ausencia de estas en cultivos de *G. lucidum* de Europa. Para México, parece ser que la presencia de clamidosporas no es característico del subgénero *Ganoderma*, puesto que no se observó su presencia en los grupos obtenidos en el subgénero, sin embargo, en el subgénero *Elfvigia* su presencia parece estar restringida a un solo taxa (subgrupo 7.1) identificado como *Ganoderma subamboinense*. Por otra parte, las características morfológicas del cultivo micelial de *Ganoderma* spp. parecen no ser significativas en la construcción de relaciones filogenéticas, ya que al analizar su presencia en el material biológico estudiado no se encontró relación con los grupos formados con evidencia molecular, por lo que los caracteres morfológicos del micelio son considerados como no taxonómicos, (Figura 10).

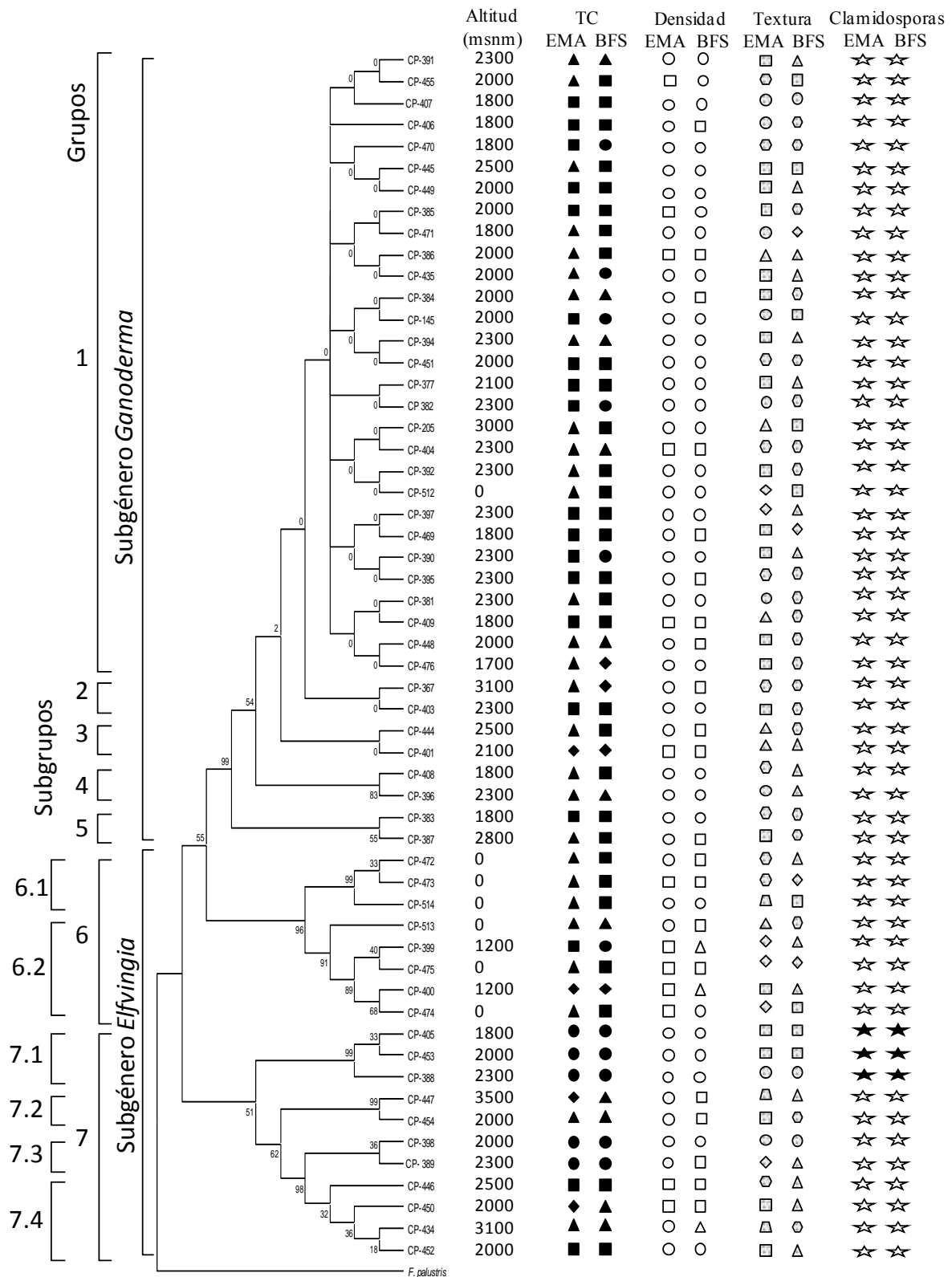


Figura 10. Filogenia de 51 cepas de *Ganoderma* spp., generada a partir de la región ITS-1 comparado con características morfológicas del micelio. TC= Tasa de crecimiento: ●= ≤ 9, ■= 7-9, ▲=5-7, ◆= ≥ 5. Densidad: ○= abundante, □= regular, △= escaso. Textura: ○= lanosa, □= ligeramente lanoso, △= liso, ◇= ligeramente liso, ○= fibroso, △= liso con invaginaciones. Clamidosporas: ☆= ausente, ★= presente, msnm= metros sobre nivel del mar.

9.4 Cultivo sólido en módulo de producción

9.4.1 Caracterización de las cepas en sustrato sólido

Debido a la importancia del género *Ganoderma* se caracterizó el crecimiento de las cepas en el módulo de fructificación. Es importante resaltar la significancia del subgénero *Ganoderma*, ya que en la mayoría de los trabajos publicados la incidencia de *Ganoderma lucidum* es en la que un gran número de metabolitos con actividad funcional han sido caracterizados. Para el género *Elfvíngia*, la fructificación de las especies resulta importante ya que, al pertenecer al género *Ganoderma* posiblemente se obtengan compuestos con novedosas actividades funcionales. Por lo tanto, se realizaron cultivos en sustrato sólido de las cepas CP-381, CP-382, CP-383, CP-387, CP-390, CP-391, CP-392, CP-397, CP-407, CP-409, CP-444, CP-451 subgénero *Ganoderma*. Así como, de las cepas CP-38, CP-388, CP-389, CP-399, CP-400, CP-447 subgénero *Elfvíngia*. Para la fructificación se utilizó la fórmula COLPOS-17, la composición de la fórmula se describe en la sección 7.7.1. El crecimiento del micelio de las 18 cepas fue bueno cubriendo el sustrato en un tiempo aproximado de 6 a 9 días. Una vez cubierto el sustrato, se inició la etapa de incubación. Al monitorear las unidades de producción en la fase de incubación se observó la aparición temprana de primordios en las cepas CP-381, CP-382, CP-387, CP-388, CP-390, CP-392, CP-397 y CP-451. Es importante mencionar la aparición temprana de fructificaciones en esta familia, ya que para algunas especies se han reportado tiempos de fructificación de 7 a 9 meses. En el módulo de fructificación se mantuvo una temperatura máxima promedio de 23°C y una mínima de 14°C, entre el mes de enero y abril con un 68.5 % de humedad. (Stamets, 1996; Chen y Miles, 1996; Royse, 1997) reportan la formación de cuerpos fructíferos de apariencia típica al fructificar a *Ganoderma lucidum* a temperaturas que oscilan entre los 20°C a 28°C, así como al mantener una humedad relativa del 85 al 95%. Una observación adicional en el cultivo de estas cepas fue la inhibición de la fructificación a bajas temperaturas ya que en los meses de invierno no se logró finalizar la fructificación del material biológico seleccionado.

9.4.2 Fructificación de *Ganoderma* spp.

Se inocularon en sustrato sólido 18 cepas de *Ganoderma*, de las cuales 9 solamente fructificaron, obteniendo rendimientos máximos de 202 g/k de peso seco de sustrato utilizado para la cepa CP-383 (subgénero *Ganoderma*) y una mínima de 68 g/k para la cepa CP-388 (subgénero *Elfvíngia*), la eficiencia biológica fue baja en todas las cepas ya que los valores obtenidos no fueron mayores al 10% (Tabla 6).

Se inocularon las cepas CP-381, CP-382, CP-383, CP-387, CP-390, CP-391, CP-392 y CP-451 pertenecen al subgénero *Ganoderma* (complejo laqueado), en donde, al parecer coexiste un complejo de especies de este subgénero, y solamente fructificó una cepa del subgénero *Elfvigia*, CP-388. Un dato importante fue la fructificación, debido a la importancia de los subgéneros, caracterizándolo como un importante recurso genético, el cual puede ser utilizado para su producción y comercialización.

Para la cepa CP-391 identificada como *Ganoderma lucidum* se obtuvo una producción de 132 ± 15 g/k de peso seco. También las cepas CP-381, CP-387, CP-392 y CP-451 especies no identificadas (*Ganoderma* spp.), mostraron altos rendimientos. Guillermo *et al.* (2001) reportaron altos porcentajes de eficiencia biológica al utilizar materiales agroindustriales puros como viruta de encino y olote de maíz, obteniendo porcentaje mayores del 40%.

Cabe mencionar que las cepas CP-399 (*Ganoderma* sp.); CP-389 (*Ganoderma* sp.); CP-400 (*Ganoderma* sp.) y CP-447 (*Ganoderma applanatum*), agrupadas dentro del subgénero *Elfvigia* (complejo no laqueado) no fructificaron. Al parecer los requerimientos ambientales para estas especies así como los tiempos de fructificación fueron distintos a los ensayados, ya que algunas cepas agrupadas dentro de este género mostraron aparición de primordios. Sin embargo, para la cepa CP- 388 (*Ganoderma subamboinense*) agrupada dentro del subgénero *Elfvigia* se obtuvieron fructificaciones alcanzando rendimientos moderados con respecto a los obtenidos del género *Ganoderma* con una producción de 68.166 g/k de peso seco.

La fructificación de la cepa CP-388 (*Ganoderma subamboinense*, subgénero *Elfvigia*) es de relevante importancia ya que en algunas especies pertenecientes a este subgénero se han caracterizado metabolitos con actividad medicinal (Kiet, 1998; Turner y Aldrich, 1983); sin embargo, el material biológico utilizado en estos estudios han sido de origen silvestre. Por tal razón, la fructificación de CP-388 significó un importante avance en la disponibilidad de los recurso genéticos con novedosos y potentes metabolitos. Es importante señalar los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la eficiencia biológica y rendimiento, ya que la evaluación de estos parámetros en *Ganoderma* spp. no han sido reportados, adquiriendo relevancia en el cultivo comercial. Para las cepas CP-38, CP-397, CP-407, CP-409 y CP-444, aunque se obtuvieron fructificaciones, no se consederron los datos ya que su seguimiento de interrumpió debido a una suspensión laboral.

Tabla 6. Producción (g/k de peso seco) y eficiencia biológica (EB) obtenidas empleando la formulación COLPOS-17.

Subgénero	Especie	Cepa	TD (mm/día) EMA	TC al 100% (Días)	Producción (g/833.258 pss)	Producción (g/k Ps S)	Eficiencia biológica (%)
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-381	6.64 ± 0.08	9	122.25 ± 66.4	146.65 ± 66.4	5.86
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-382	8.04 ± 0.34	9	82.5 ± 22.0	99.00 ± 22.0	3.96
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-383	7.29 ± 0.17	9	169 ± 38.6	202.81 ± 38.6	8.11
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-387	6.67 ± 0.23	6	111.5 ± 13.1	133.81 ± 13.1	5.35
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-390	8.19 ± 0.24	9	138 ± 26.3	166 ± 26.3	6.66
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> af. <i>lucidum</i>	CP-391	6.67 ± 0.36	9	110.5 ± 15.0	132 ± 15.0	5.34
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-392	6.69 ± 0.34	9	128.5 ± 14.1	154 ± 14.1	6.16
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-397	7.70 ± 0.40	9			
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-407	8.72 ± 0.34	9			
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-409	7.62 ± 0.30	9			
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-444	5.65 ± 0.18	9			
<i>Ganoderma</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-451	7.98 ± 0.35	6	124 ± 16.1	124 ± 16.1	5.95
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-38	7.37 ± 0.09	9	_____	_____	_____
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> af. <i>subamboinense</i>	CP-388	10.31 ± 0.43	9	56.8 ± 24.0	68.166 ± 24.0	4.77
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-389	8.29 ± 0.18	9	_____	_____	_____
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-399	8.47 ± 0.35	9	N/F	N/F	N/F
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	CP-400	3.77 ± 0.05	9	N/F	N/F	N/F
<i>Elfvíngia</i>	<i>Ganoderma</i> af. <i>applanatum</i>	CP-447	4.52 ± 0.05	9	N/F	N/F	N/F

N/F= No hubo fructificación. _____ = Sin datos. TD= Tasa de desarrollo en cajas de Petri estériles con medio de cultivo de agar con extracto de malta. TC= Tiempo promedio de colonización del sustrato. Pss= peso seco del sustrato.

9.4.3 Caracterización morfológica de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma* spp.

Las características de los cuerpos fructíferos cosechados en las cepas CP-381, CP-382, CP-383, CP-387, CP-388, CP-390, CP-391, CP-392 y CP-451 fueron variadas, el color rojizo del píleo fue predominante en las cepas, el color del himenio varió de blanquecino a amarillento, el diámetro del sombrero varió de 18.5 cm a 2.5 cm y el tamaño del estípote fue de 3.7 cm a 1.7 cm. De igual manera se hicieron observaciones de la forma del sombrero, tipo de cutícula, tipo de crecimiento del carpóforo, así como también del color, forma y tamaño de la espora (Tabla 7). Características similares fueron observadas por Torres-Torres y Guzmán-Dávalos (2005) al estudiar la morfología de *Ganoderma curtissi*. Una característica importante de la cepa CP-392 fue la forma del sombrero la cual fue típica a las colectadas de manera natural mostrando la forma de riñón. En la figura 11 se muestran las formas de los cuerpos fructíferos cosechados.

Las características fenotípicas evaluadas de los cuerpos fructíferos coinciden con lo reportado por Stamets (1996); Murrill (1917); Ryvarden (1976); García *et al.* (1998) manteniendo la forma similar a los especímenes nativos recolectados.



Figura 11. Cuerpos fructíferos cosechados en el módulo experimental de *Ganoderma* spp. A: CP-381, B: CP-382, C: CP-383, D: CP-388, E: CP-390, F: CP-387, G: CP-391, H: CP-392, I: CP-451, J: CP-444, K: CP-389 y L: CP-409.

La diversidad morfológica dentro del grupo de especies fructificadas fue amplia, en la cual se observaron desde formas típicas de los cuerpos fructíferos tales como dimidiados, circulares, sonados de presencia única o agregados, así como atípicas, en forma de dedos, con la presencia de píleo múltiple, con sombreros amorfos no circulares ni dimidiados y en ocasiones con escaso contexto. Es evidente que las características morfológicas de los cuerpos fructíferos varía dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrollen, principalmente altura sobre nivel del mar y temperatura, puesto que algunas especies al momento de fructificarlas mantuvieron las características originales de los progenitores de donde fueron aisladas mientras que otras cambiaron completamente, lo cual sugiere la hipótesis de que las condiciones ambientales juegan un papel importante sobre las características fenotípicas de los carpóforos.

Tabla 7. Características morfológicas de los cuerpos fructíferos cosechados de especies de *Ganoderma*.

Cepa	Tipo de crecimiento	Forma del píleo	Laca	Largo y ancho del píleo (cm)	Color del píleo	Cutícula	Largo y diámetro del estípite (cm)	Color del himenio
CP-381	Solitario	Abanico	Presente	14.3 x 5.2	Rojizo	Irregular y radiado	13 x 2.9	Crema
CP-382	Solitario	Abanico	Presente	2.5 x 2.2	Café rojizo	Regular y liso	13.5 x 3.5	Blanquecino
CP-383	Agregados	Cespitoso	Presente	18.5 x 3.5	Rojizo	Regular, liso y radiado	7.2 x 3.2	Blanquecino
CP-387	Agregados	Cespitoso	Presente	10.5 x 3.2	Amarillento	Regular y rugosa	10.5 x 3.5	Blanquecino
CP-388	Solitario	Abanico	Presente	22.3 x 21.5	Rojizo	Irregular y rugosa	10.5 x 2.5	Crema
CP-390	Solitario	Abanico	Presente	10.5 x 7.7	Amarillento	Regula y liso	7.5 x 2.3	Blanquecino
CP-391	Agregados	Cespitoso	Presente	17.5 x 3.5	Amarillento	Irregular rugosa	8.2 x 3.2	Blanquecino
CP-392	Solitario	Reniforme	Presente	18.5 x 17.3	Rojizo	Regular y radiado	10.5 x 2.8	Blanquecino
CP-451	Solitario	Abanico	Presente	17.5 x 14.2	Rojizo	Irregular y lisa	11.2 x 2.5	Crema

9.5 Diseño del paquete tecnológico del cultivo de *Ganoderma* spp.

El cultivo de *Ganoderma* representa una importante actividad económica. A nivel rural permitiría un importante aporte económico para familias de escasos recursos ya que la demanda de este hongo a nivel mundial e incluso a nivel nacional se ha venido incrementando.

La adopción del paquete tecnológico a nivel industrial que va desde la producción del hongo hasta la producción del micelio en fermentadores biológicos representa una alternativa económica importante pues, al iniciar el proceso se requiere de gente capacitada así como, mano de obra, lo cual impulsa la generación de empleos. Es importante reiterar que el uso de sustratos o formulas alternativas como los desarrollados en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla apoyan a la disminución de la degradación del medioambiente ya que el reciclado de sustratos como virutas de encino, olote de maíz, salvado de trigo, bagazo de caña y algunos otros desechos agroindustriales apoyan a disminuir el deterioro del ambiente, principalmente la tala de árboles, y su recolección resulta ser económica la cual es un atributo que hacen beneficioso el cultivo y producción de este hongo. La elaboración de sustratos (composta) a partir del desecho de la post-cosecha, la integración de este desecho al suelo (suelos para cultivos principalmente) puede ayudar a regenerar micro y macro-nutrientes que son consumidos tanto por cosechas excesivas y/o problemas de monocultivo. De igual manera, la incorporación de microorganismos como bacterias y hongos micorrízicos producto del proceso de composteo de los desechos, resulta benéfico al suelo por las interacciones que

se dan planta-microorganismo. Un aporte más, es la utilización de este hongo ó el resultado de su actividad metabólica (enzimas) para remediación de sitios contaminados con compuestos recalcitrantes, ya que, considerando que es conocido como hongo de la pudrición blanca y su sistema enzimático es capaz de degradar lignina compuesto químico que tiene similitud con los compuestos derivados del petróleo lo hace un organismo ideal para solucionar problemas de contaminación del ambiente.

Actualmente, con el avance de los conocimientos que se tienen sobre los macromicetos respecto a su fisiología, ciclo de vida, bioquímica, eficiencias biológicas, ciclos de producción y tasas de producción, es posible diseñar modelos estratégicos que den como resultado la solución de problemas de carácter social, económico y ecológico. Aún más, es posible la aplicación de determinadas especies biológicas para zonas con requerimientos especiales. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles cuenta con una vasta colección de recursos de hongos comestibles de distintos géneros y especies, estas cepas fueron recolectadas en condiciones de distinta condición ambiental, lo cual establece de estas un verdadero recurso genético con gran potencial de explotación. Agregado al conocimiento biológico *per se* del organismo, aunado al avance de la tecnología se puede realizar estrategias para mejoras genéticas y lograr obtener cepas competitivas para el mercado. En la figura 12 se puntualizan los elementos que se toman en cuenta para el diseño del paquete tecnológico generado en esta investigación.

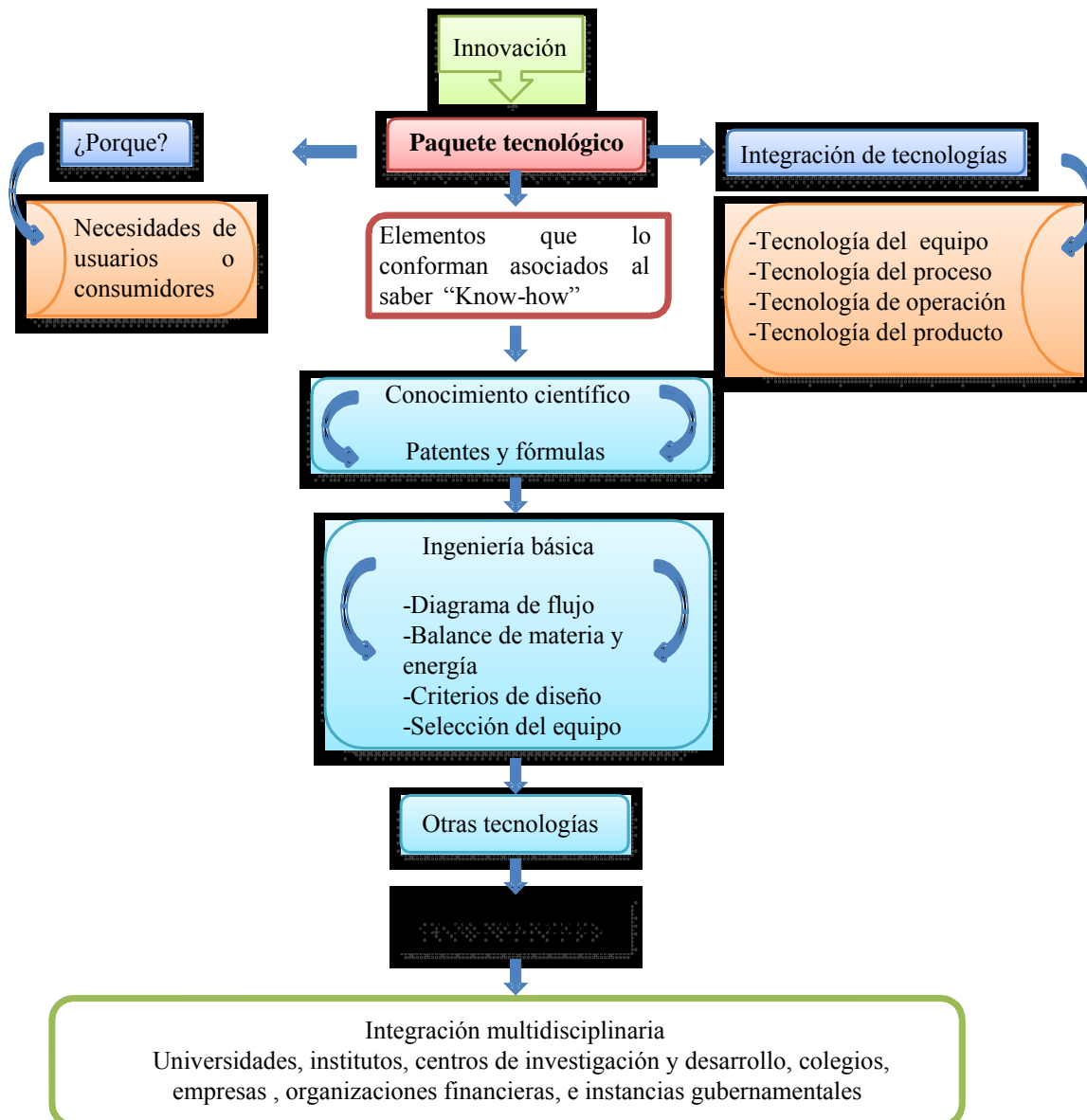


Figura 12. Diagrama de los elementos considerados en el diseño del un paquete tecnológico.

9.5.1 La estrategia

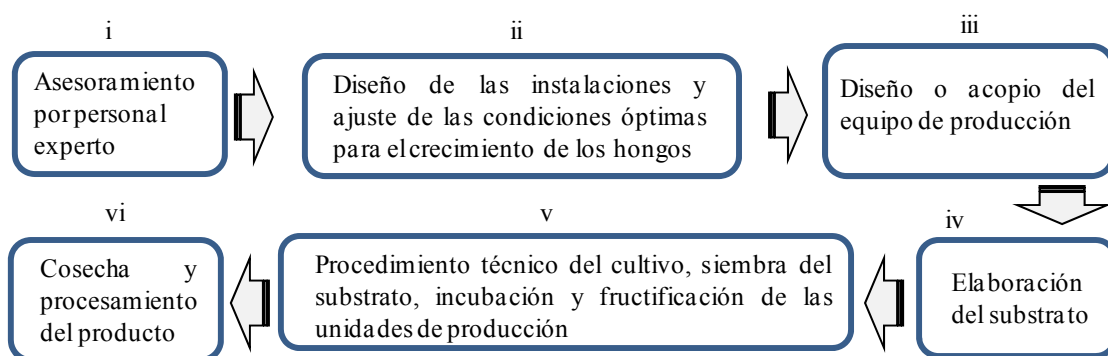
La estrategia propuesta en esta investigación representada como un gran potencial con el cultivo de *Ganoderma* spp. buscan como objeto principal (a) el incremento al aporte económico para familias de escasos recursos, (b) oferta de productos novedosos con propiedades benéficas para la salud, (c) disminución de los materiales de origen agroindustrial por acción de su utilización en el cultivo de *Ganoderma* spp., (d) contribuir al mejoramiento de la producción comercial de hongos comestibles funcionales. La estrategia directa se basa en la utilización del recurso genético nativo como materia primordial, así como, la utilización de productos agroindustriales, para apoyar el proceso de desarrollo social y económico principalmente al sector rural.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se presenta una propuesta de la estrategia, que permitirá visualizar los elementos que intervienen en el proceso de transferencia de la tecnología del paquete tecnológico diseñado.

9.5.2 Paquete tecnológico

El proceso tecnológico fue integrado con una serie de elementos esenciales para asegurar beneficios positivos como resultado de su aplicación. Se generó el conocimiento científico además. Entendiendo como generación de conocimiento la identificación del recurso genético, o sea, la tipificación de las características potenciales del producto y subproductos generados, así como, el diseño y elaboración de fórmulas o substratos adecuados para el cultivo de los cuerpos fructíferos “hongos”. Este conocimiento puede ser transferido de forma teórica conceptual para evidenciar la adopción de la tecnología del cultivo de los hongos. Como parte medular del diseño del paquete tecnológico se detallan a continuación los pasos requeridos de la ingeniería básica de la tecnología del proceso de cultivo, los cuales son:

Diagrama de flujo del proceso:



i) Asesoramiento por personal experto:

El asesoramiento técnico del proceso debe de estar presente durante todas las fases del proceso, ya que de este depende el éxito de proceso.

ii) Diseño de las instalaciones y ajuste de las condiciones óptimas para el crecimiento de los hongos:

La planta para el cultivo debe de contar con 4 áreas de producción: un área de almacenamiento de los substratos, la cual debe de estar lejana de las demás áreas. El área puede tener dimensiones de 4 metros de ancho por 4 metros de largo y, la altura debe se

suficiente para permitir la ventilación y evitar la acumulación de humedad. El área de siembra de dimensiones 3 x 3 metros de ancho por largo debe de ser diseñada sin acceso a corrientes de aire exterior, regulando su entrada a través de extractores con filtro. El área debe de permanecer limpia y libre de factores contaminantes como humedad, polvo y aire sin purificar. La incubación se debe realizar en un área ventilada con un porcentaje de iluminación de 50 a 80. El área debe permanecer limpia libre de polvo y humedad. En el área de fructificación se debe procurar la aereación continua, de forma natural o forzada a través de extractores, además del 30 al 50% de iluminación con una humedad relativa superior al 80%. La humedad puede realizarse de manera manual o automática, mediante un sistema de nebulización y riego automatizado procurando mantener un 70% de humedad constante.

iii) Diseño o acopio del equipo de producción:

- Ollas de presión de 21 litros con manómetro (All american)
- Parrilla con quemadores
- Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A*)
Termosellador electrónico (Impulse sealer UL)
- Tina mezcladora de plástico de 500 litros
- Campana de flujo laminar con norma ISO 9002 (filtro tipo HEPA)
- Extractores de aire
- Sistema de riego por nebulización
- Horno de secado (Felisa, México)

iv) Elaboración del sustrato (fórmula requerida para la obtención de 11 unidades de producción con 2600 gramos de sustrato):

El sustrato contiene la siguiente composición: *Zea mays* (olote de maíz), viruta de *Quercus acutifolia.*, viruta de *Bursera simaruba.*, salvado de trigo, bagazo de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), carbonato de calcio, sulfato de calcio y agua.

Forma de prepararse: Los componentes son mezclados en una tina, asegurando la homogenización mediante una pala, también estos pueden ser mezclados de manera mecánica.

Procesamiento del sustrato: 2600 gramos del sustrato preparado son depositados en bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A*) cerrando levemente las bolsas con pinzas metálicas.

Esterilización del sustrato: Con el fin de eliminar contaminantes biológicos, las bolsas con sustratos son esterilizadas mediante ollas de presión por hora y media a 121°C. Una vez transcurrido el tiempo las bolsas con sustrato estéril son mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas antes de ser utilizadas.

v) Procedimiento técnico del cultivo, siembra del sustrato, incubación y fructificación de las unidades de producción:

Inoculación del sustrato y formación de las unidades de producción: Una vez estéril el sustrato y a temperatura ambiente, en una campana de flujo laminar las bolsas con sustrato se abren totalmente retirando las pinzas metálicas. Posteriormente, el sustrato es inoculado con 250 gramos de “semilla” de *Ganoderma* spp., dispersando el inóculo por todo el sustrato, una vez homogeneizado las bolsas (unidades de producción) son selladas mediante un termo sellador electrónico.

Incubación de las unidades de producción: Las unidades de producción son almacenadas en el área de incubación, las cuales pueden ser mantenidas en un rango de temperatura entre 14 y 23°C, con una obscuridad del 30 al 50%, por un período de tiempo de 30 días hasta que el micelio cubra completamente al sustrato y, las agregaciones hifales (primordios) sean visibles.

Fructificación de las unidades de producción: Las unidades de producción ya incubadas son trasladadas al área de fructificación, en donde, se mantendrá un 70% de humedad en el ambiente, además, de un 30 a un 50% de iluminación. A las unidades de producción se les retirará la parte superior de la bolsa exponiendo un 10% del sustrato, y serán mantenidas por 35 días hasta que los cuerpos fructíferos “hongos” alcancen el estadio adulto.

vi) Cosecha y procesamiento del producto:

Una vez que los cuerpos fructíferos han alcanzado el estadio adulto, son retirados del sustrato con ayuda de un cortador. Posteriormente los cuerpos fructíferos son depositados en charolas y son secados en un horno a 90 °C por un período de tiempo de 24 horas. Los cuerpos fructíferos secos son colocados en bolsas de polipapel sellando la bolsa para evitar el contacto con humedad e insectos que deterioren la calidad del producto.

9.5.3 Actores de la estrategia

Los actores directos e indirectos considerados para aplicar dicha estrategia son:

- Los productores de hongos y personas interesadas en la explotación de dicho producto.
- Las instituciones de investigación y organizaciones encargadas de proporcionar alternativas en paquetes tecnológicos viables con visión de mejorar la calidad de vida en el entorno social, político, económico, cultural y ecológico. Como es el caso del Colegio de Postgraduados en específico el *Campus* Puebla con su programa de biotecnología en hongos comestibles, universidades, institutos, centros de investigación y escuelas.
- El sector gubernamental, a través de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Fundaciones PRODUCE y otros organismos que están en posibilidades de brindar apoyos técnicos, financieros y administrativos.
- Los consumidores que finalmente son los segundos beneficiados más importantes del producto generado a través del paquete tecnológico.

10 CONCLUSIONES

Se observó gran diversidad molecular de especies de *Ganoderma* a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal, resolviéndose al menos dos subgéneros de *Ganoderma*, subgénero *Ganoderma* (complejo laqueado) y subgénero *Elfvigia* (complejo no laqueado).

Las cepas analizadas en el filograma forman un grupo monofilético con respecto al grupo externo *Fomitopsis palustris*, lo cual podría sugerir que las cepas analizadas pertenezcan a un solo género de la familia Ganodermataceae.

Dentro de *Ganoderma*, subgénero *Ganoderma* se observó una alta diversidad de organismos agrupados filogenéticamente en distintos grupos, con valores de distancia genética inferiores al 2%, sin embargo, sus características morfológicas fueron distintas, sugiriendo la coexistencia de diferentes especies. Para el subgénero *Elfvigia* se obtuvieron mayores valores de distancia genéticas identificando una gran diversidad de especies.

Se identificaron molecularmente dos especies para el subgénero *Elfvigia*, CP-388 (*Ganoderma subamboinense*), CP-447 (*Ganoderma applanatum*) y una para el subgénero *Ganoderma* CP-391 (*Ganoderma lucidum*) especie representativa de la familia por sus propiedades funcionales que presenta.

El uso de la región interna de transcripción de la subunidad pequeña del gen ribosomal es útil para diferenciar entre especies que muestren valores de distancias genéticas mayores al 2%, sin embargo para identificar diferencias intraespecie principalmente en organismos en proceso de especiación se requiere analizar caracteres que proporcionen mayor información.

En México, el género *Ganoderma* está ampliamente representado, recolectándolo desde el nivel del mar hasta las altas montañas (3000 msnm), creciendo principalmente en tocones de árboles muertos de especies de *Quercus* y otras especies de árboles de maderas duras como *Ficus* sp, *Casuarina* sp y *Spathodea campanulata*. Las especies laqueadas se distribuyen principalmente en una altura entre los 1500 a los 2500 msnm, las cuales presentan una gran diversidad morfológica, mientras que la incidencia de las especies no laqueadas se localiza en condiciones ambientales diferentes superior a los 2500 msnm e inferior a los 1500 msnm.

Las características morfo-descriptivas del micelio como densidad, textura y color fueron las siguientes, tres densidades, 6 tipos de textura y 11 variedades de color, la textura que mayormente se presentó fue lisa a ligeramente lanosa, predominando la densidad abundante en la mayoría de las cepas, sin embargo, el color desarrollado fue dependiente del medio de cultivo empleado, así como el estado de desarrollo.

Al analizar las características microscópicas del micelio en medio de cultivo, las cepas presentaron dos tipos de hifas, primarias ó generativas e hifas secundarias ó estructurales. Otra característica adicional se observó en las cepas CP-388, CP-398, CP-505 y CP-453 fue la presencia de clamidosporas, estas pueden ser característica representativa de alguna especie en particular.

Se fructificaron 9 cepas de *Ganoderma*, obteniendo rendimientos máximos de 202 g/k de peso seco de sustrato utilizado para la cepa CP-383 (subgénero *Ganoderma*) y una mínima de 68 g/k para la cepa CP-388 (subgénero *Elfvigia*), la eficiencia biológica fue baja en todas las cepas ya que los valores obtenidos no fueron mayores al 10%.

La gran plasticidad morfológica y genética del género *Ganoderma* mostró la presencia de especies con características únicas, las cuales al parecer y acorde al soporte molecular varían dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrollen.

El proceso tecnológico fue integrado con una serie de elementos esenciales para asegurar beneficios positivos como resultado de su aplicación. El paquete tecnológico del cultivo de especies de *Ganoderma* fortalece el desarrollo rural y regional en México haciendo una importante contribución principalmente a nivel económico para el productor, ecológico para el ambiente y de salud, con su utilización directa para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer cuya incidencia es mayor.

11 PERSPECTIVAS

Usar datos morfológicos del micelio así como del cuerpo fructífero como un parámetro más para poder identificar a nivel de especie el material biológico recolectado.

Determinar el rendimiento y producción de los compuestos bioactivos de cepas potenciales de *Ganoderma* en fermentación líquida y del cuerpo fructífero.

Realizar pruebas para determinar la capacidad antioxidativa, bacteriostático y microbicida, así como la capacidad de regular al sistema inmunológico de los compuestos producidos en fermentación líquida y cuerpo fructífero.

12 LITERATURA CITADA

Adaskeveg, J. E. y R. L. Gilbertson. 1989. Cultural studies of four North American species in the *Ganoderma lucidum* complex with comparisons to *G. lucidum* and *G. tsugae*. *Mycological Research* 92: 182-191.

Araya, G. O. 2006. Manual para la producción y comercialización de hongos comestibles. Buenos Aires, Argentina. 86 pp.

Araoz, A. 1978. Las actividades de consultoría e ingeniería. Su papel en la transferencia de tecnología. *Comercio Exterior*,(México) 28(12). 1448-1461.

Bassols, 1979. *In*: Cuevas, S. J. Recursos genéticos (notas del curso). Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla. México.

Berbee, M. L. y J. W. Taylor. 1992. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Biosystems* 28: 117-125.

Bessey, 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.

Bilay, V. T., Solomko, E. F. y A. S. Buchalo. 2000. Growth of edible and medicinal mushrooms on comercial agar media. *In*: Pro 15th int Congres Sci Cultivation of edible Fungi. Vol. 1 y 2 (ed. L. J. L. D. van griensven), pp. 757-761. A.A. Balkema, Rotterdam, Maastricht.

Binder, M. y D. S. Hibbett. 2001. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76-79.

Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.

Brinkman, F. S. L. y Leipe, D. D. 2001. Phylogenetic Analysis. *In*: *Bioinformatics: A practical guide to analysis of genes and proteins* (ed. A.D. Baxevanis and B.F.F. Ouellette), pp. 323-358. John Wiley and Sons, Inc.

Bruns, T. D., White, T. J. y J. W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.

Buchanan, P. K. 2001. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with especial reference to species of medicinal and nutraceutical importance. *Proceeding International Symposium Ganoderma Science*: 27-29.

Budiatman, S. y B. K. Lonsane. 1987. Cassava fibrous waste residue; a substrate to wheat bran in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 9(8): 597-600.

Carrizales, V. 1983. Producción de enzimas extracelulares en cultivos semisólidos. *En*: Huitrón, C. (Ed.). *Biotecnología de enzimas*. UNAM, México, D. F.

Casselton, L. A. 1978. Dikarion formation in higher basidiomycetes. *In: J.E., Smith y R. Berry (Eds.). The filamentous fungi. Volume III. Development mycology. Eduard Arnold. 275-297 p.* Tomado de: Sánchez, J. E.; D. Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El Colegio de Frontera Sur; Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores. 294 pp.

Castillo, J., Guzmán, G. y G. Sepúlveda. 1969. Estudio sobre los Poliporaceos. I. *Ciencia* 27: 9-18.

Challen, M. P., A. J. Moore y D. Martinez-Carrera. 1995. Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *Biotechniques* 18: 975-978.

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

Chang, S. T. y P. G. Miles. 1989. Overview of the biology of the fungi. *In: edible mushrooms and their cultivation* (ed. S.T. Chang y P.G. Miles), pp. 41-79. CRC Press, Inc., Florida, Usa.

Chang, S. T. 1995. *Ganoderma* – The Leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. pp 43-52. *In: Proceedings 6th International Symposium Recent Advances in Ganoderma lucidum*. Eds. Kim, B. K., Kim I. H. and Y. S. Kim), The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.

Chang, S. T. y J. A. Buswell. 1996. Mushroom nutraceuticals. *World Journal Microbiology Biotechnology* 12: 473-476.

Chang, S. T. 1996. Mushroom research and development - equality and mutual benefit, in *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Royse, D. J., Ed., Pennsylvania State University, University Park. Pp.1-10.

Chang, S. T. y P. G. Miles. 1989. Cultivation in polypropylene bags (“bag log” cultivation). Pp. 201-223. *In Edible Mushrooms and their cultivation* (ed. S.T. Chang and P.G. Miles), CRC Press, Inc., Florida, USA.

Chang, S. T. y P. G. Miles. 1990. Recent trends in world production of cultivated edible mushrooms. *Mushroom Journal* 10: 15-18.

Chen, A. W. y P. G. Miles, 1996. Cultivation of *Ganoderma bonsái*. *In: 2nd Proceedings of the International Conference Mushrooms* (ed. D.J. Royse), University Park, Pennsylvania.

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.

Chen, R. Y. y D. Q. Yu. 1999. Studies on the triterpenoid constituents of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 147-152.

Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K. y S. S. Han. 2000. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 475-481.

- 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: 769-774.
- Fang, Q. H., Tang, Y. J. 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.
- 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.
- Farris, J. S., Albert, V. A., Källersjö, M., Lipscomb, D. y A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperform neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- García, J., D. Pedraza, I. Silva, L. Andrade y J. Castillo. 1998. Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gao, J. J., Min, B. S., Alm, E. M., Nakamura, N., Lee, H. K. y M. Hattori, 2002. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cell. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) 50: 837-840.
- García, J., Pedraza, D., Silvia, I., Andrade, L. y Castillo, J. 1998. Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gerhardt, E., J. Vila y X. Llimona. 2000. Hongos de España y de Europa. Manual de identificación. Ediciones Omega, S. A. pp. 10-20.
- Ghildyal, N. P., Rmshna, S. V., Nirwa, D. P., Lonsane, B. K. y H. N. Asthana. 1981. Large scale production of pectinolytic enzyme by solid state fermentation. *Journal of Food Science Technology* 18: 248-251.
- Giral, J. y Gonzáles, S. 1980. Tecnología apropiada, Ed. Alhambra, México.
- Gottlieb, A. M., Saidman, B. O. y J. E. Wright. 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* 102: 415-426.
- Gottlieb, A. M., y J. E. Wright. 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103: 661-673.
- Gottlieb, A. M., Ferrer, E. y J. E. Wright. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104: 1033-1045.

- Graybeal, A. 1998. Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Systematics Biology* 47: 9-17.
- Guillermo O, Urdapilleta, M. y E. Montiel. 2001. Aislamiento, caracterización y cultivo de tres cepas silvestres de *Ganoderma lucidum* sobre olote de maíz, en Cuernavaca Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Autónoma del estado de Morelos. Tesis de licenciatura.
- Guzmán, G. 1963. Frecuencia y distribución de algunos basidiomicetes lignícolas importantes en México. *Anales de la Escuela Nacional de Biología* 12: 23-41.
- Guzmán, G. 1980. Identificación de los Hongos, comestibles, venenosos y alucinantes. 1980. Editorial Limusa. México, Pp. 60-62.
- Guzmán, G., Mata G., D. Salmenes, C. Soto-Velasco, y L. Guzmán-Dávalos. 1993. El cultivo de los Hongos Comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. Editorial Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 245.
- Guzmán, G. 2000. Tropical Fungi of Mexico. Diversity and distribution. *Symposium Tropical Mycology*, Abril 25-29, Liverpool.
- Guzmán, G., Mata. G., Salmenes D., Soto-Velazco C. y L. Guzmán-Dávalos. 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. 245 pp.
- Hawksworth, D.L., B. C. Sutton y G. C. Ainsworth. 1983. Dictionary of the fungi (Including the lichens). Commonwealth mycological institute. 444 p. Tomado de: Sánchez, J.E.; D.Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El Colegio de Frontera Sur; Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores. 294 pp.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica aplicada. UNAM FCE. 552 pp.
- Hillis, D.M. 1996. Inferring complex phylogenies. *Nature* 383: 130-131.
- Hong, S. G., Jeong, W. y H. S. Jung. 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia* 94: 823-833.
- Jablonski, D. 1993. The tropics as a source of evolutionary through geological time. *Nature* 364: 142-144.
- Karsten, P. A. 1881. Enumeratio boletinearum et polyporearum fenicarum. Systemate novo dispositarum. *Reviews Mycology* 3: 101-134.

- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H. y J. W. Yun. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* 34: 56-61.
- Kiet, T. T. 1998. Investigations of tropical macrofungi of Vietnam: Taxonomy, ecology and developmental physiology. Ph.D. Thesis, Jena University, Biological-Pharmaceutical Faculty, Jena, Germany.
- Lee, K. M., Lee, S. Y. 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.
- Lei, L. S y Z. B. Lin. 1992. Effect of *Ganoderma* polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocytes response. *Acta Pharmaceutical Sinica* 27: 331-335.
- Lin, C. P., Sun, A. T. y Liu, Y. A. 1973. Studies on the submerged cultivation of *Ganoderma* sp. *Acta Microbiologica Sinica* 13: 145-151.
- Mapes, C., Guzmán, G. y J. Caballero. 1981. Etnomicología Purepecha. El conocimiento y uso de los hongos en la Cuenca de Pátzcuaro, Michoacán. Cuadernos de trabajo, *Series Etnobiologics*.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben, P. Morales, M Sobal y A. Larqué-Saavedra. 1991. Historia del cultivo comercial de los hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo* 96: 33-43.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez-Sánchez, A. Aguilar y A. Larqué-Saavedra. 1995. Edible mushroom cultivation and sustainable agriculture in Mexico. *The African Journal of Mycology and Biotechnology* 3: 13-18.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Martínez, M. y Y. Mayett. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. El Shiitake. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*, Biotecnología de Hongos Comestibles. 48 pp.
- Mata, G. y D. Martínez-Carrera. 1988. Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México. *Revista Mexicana de Micología* 4: 287-296.
- Mayzumi, F., Okamoto, H. y T. Mizuno. 1997. Cultivation of Reishi *Ganoderma lucidum*. *Food Reviews International* 13: 365-382.
- Miller, R. N. G., Holderness, M., Bridge, P. D., Chung, G. F. y M. H. Zakaria. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48: 595-603.
- Mishra, G. y M. Tripathy. 1993. A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:35-38.
- Mizuno, T., Sakai, T. y G. Chihara. 1995. Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Reviews International* 11: 151-166.

- Mizuno, T. 1997. Studies on bioactive substances and medicinal effect of Reishi, *Ganoderma lucidum*. pp. 121-127. in Japanese. In: *Proceedings 1st International Symposium Ganoderma lucidum in Japan* (ed. A. committee), Toyo-Igaku-sha Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- Moncalvo, J. M. y F. Ryvarden. 1998. Nomenclature of Ganodermataceae. *Synopsis Fungorum* 11: 1-109.
- Moncalvo, J. M., Wang, H F. y R.S. Hseu. 1995a. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99: 1489-1499.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. F. y R. S. Hseu. 1995b. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. F., Wang, H. H. y R. S Hseu. 1994. Molecular studies in the *Ganoderma lucidum* complex. Pp. 12-13. In: *94' International Symposium Ganoderma* (ed. Z.B. Lin), Beijing Medical University Press, Beijing, China.
- Moncalvo, J. M. 2000. Systematics of *Ganoderma*. Pp. 23-45. In: *Ganoderma Diseases of Perennial Crops* (ed. J. Flood, P.D. Bridge and M. Holderness), CABI Bioscience, Egham, UK.
- Murrill, W. A. 1908. Polyporaceae in North America. *Flora* 9 (2): 73-131.
- Murrill, W. A. 1917. The poliporaceae of México. *Bulletin New York Botanical Garden* 8: 137-158.
- Murrill, W. A. 1905. The Polyporaceae of North America. XI. A Synopsis of the Brown pileate species. *Bulletin Torrey Botanical Club* 32: 353-371.
- Naoui, Y. 1997. Artificial cultivation of "Reishi": To harvest the highest-quality *Ganoderma lucidum*. Pp. 160-162. In: *Proceedings of the 1st International Symposium Ganoderma lucidum* in Japanese (ed. A. committee), Toyo-Igaku-sha Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Review in Genetics* 30: 371-403.
- Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford. University Press. pp.1-295.
- Nobles, M. K. 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canadian Journal of Research* 26: 281-431.
- Oriol, E. 1987. Croissance d' *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse Doctorat (U.P.S.), Toulouse, Francia.
- Parra, V. M. R. 1954. Recursos naturales ecosistemas y su uso múltiple. En Cuevas, S. J. Recursos genético (notas del curso). Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla. México.

- Park, K. S., Park, S., Jung, I. C., Ha, H. C., Kim, S. H. y J. S. Lee. 1994. Production of protein-bound polysaccharides by solid state fermentation of *Coriolus versicolor*. *The Korean Journal of Mycology* 22: 184-189.
- Perlin, D. S y S. Park. 2001. Rapid identification of fungal pathogens: molecular approaches for the new millennium. *Reviews of Medical Microbiology* 12 (1): 13-20.
- Perri, J. 1971. Design Engineering and the Mastery of Knowledge for the Accumulation of Capital in Developing Countries, IREP, Université de Grenoble.
- Poe, S. 1998. The effect of taxonomic sampling on accuracy of phylogeny estimation: test case of a know phylogeny. *Molecular Biology Evolution* 15: 1086-1090.
- Qadeer, M. A., J. Iqbal, S. K. Aziz, M. Hussain y H. Hassan. 1985. Solid substrate fermentation for pectinase production by *Aspergillus foetidus*. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 28: 179-181.
- Quimio, T. H. 1986. Culturing *Ganoderma* the "Pleurotus-way". *Mushrooms Newsletter for the Tropics* 6: 12-13.
- Rimko H. y P. J. M. Teunissen. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemistry Reviews* 101: 3397-3413.
- Rodríguez. R. M, Soto-Velasco, S. F. Guerra y J. Álvarez. 1997. Perspectiva de producción del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* en el estado de Jalisco, México, Tapachula, Chiapas México.
- Roussos, S. 1985. Croissance de *Trichoderma hurzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université de Provence, Francia.
- Royse, D. J. 1997. Specialty mushroom: Consumption, production and cultivation. *Revista Mexicana de Micología* 13: 1-11.
- Royse, D. J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia* 77(5): 756-762.
- Ryvarden, L. 1976. The polyporeceae of North Europe. Volumen 1, *Albatrellus incrustoporia* Fungiflora, Oslo, Norway. pp. 161-173.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores. Nomenclature and taxonomy. Pp. 363. In *Synopsis Fungorum* 5. *Fungiflor*. Oslo, Norway.
- Ryvarden, L. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma*? Pp. 19-24. In: *Systematics, Phytopathology and Pharmacology, 5th International Mycological Congress* (ed. P. K. Buchanan, R.S. Hseu and J. M. Moncalvo), Dep.. Agric. Chem., National Taiwán University, Taipei, China.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92: 180-191.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación en México. Editorial Limusa, México, pp. 432.

- Rzedowski, J. y G. C. Rzedowski. 1989. Sinopsis numérica de la flora fanerogáma del valle de México. *Acta Botánica Mexicana* 8: 15-30.
- Saitou, N. 1996. Reconstruction of gene trees from sequence data. *Methods in Enzymology* 266: 427-449.
- Sábato, J. A. y M. Mackenzie. 1982. La producción de tecnología, Editorial Nueva Imagen, México.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual, 3rd edition. CSHL press, NY. USA.
- 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.
- Sanderson, M. J. y M. J. Donoghue. 1989. Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution* 43: 1781-1795.
- Seo, G. S., Shin, L. G. C., Otani, H., Komada, M. y Kohmoto, K. 1995. Formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum* isolates on a nutrition agar medium. *Mycoscience* 36: 1-7.
- Smith, B. J. y K. Sivasithamparam. 2000a. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Mycological Research* 104: 943-951.
- Smith, B. J. y K. Sivasithamparam. 2000b. Isozymes of *Ganoderma* species in Australia. *Mycological Research* 104: 952-961.
- Sobal, M., Morales, P., Bonilla, M., Martínez, W., Galván, F., Sihuanca, F., Quiriz, F., Juárez, M. y Martínez-Carrera, D. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. Pp. 179-183. In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora (Eds). 2010. *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS.CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. y A. Misaki. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 2641-2653.
- Srinivasulu B., Nagamalleswari, Y. Aruna, K. Lakshmi, M. V., Vijay Krishna Kumar, K. y Krishna Sri. 2008. Scanning electron microscopy confirmation of mycoparasitism exhibited by *Trichoderma* spp on coconut pathogens, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum* and *Thielaviopsis paradoxa*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2 (4): 562 -567.
- Stamets, P. 1993. *Ganoderma lucidum* (Wm, Curtis: Fries) Karsten. Pp. 355-369. In: *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* (ed. P. Stamets), Ten Speed Press, Berkeley, CA.
- Stamets, P. 1996. Growing gourmet and medicinal mushroom. Ten Speed Press. Berkeley, CA. Pp 355-369.

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.

Schwarze, F.W.M.R. y D. Ferner. (2003). *Ganoderma* on Trees - Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal* 27: 59-77.

Swofford D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. y D. M. Hillis, 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis DM, Moritz C and Mable BK (eds) *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. pp. 407-514.

Swann, E. C. y J. W. Taylor. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.

Swann, E. C. y J. W. Taylor. 1995. Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematic: evidence form the 18S rRNA gene. *Canadian Journal of Botany* 73 (1): 862-868.

Takamatsu, S. 1998. PCR application in fungal phylogeny. Pp. 125.152. In: *Applications of PCR in Mycology* (ed. P. Bridge, D. Arora, C. Redyy and R. Elander), CAB International.

Tamura K., Dudley J., Nei M. y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24(8): 1596–1599.

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.

Tong, C. C. y Z. C. Chen. 1990. Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Science) in Malaysia. *Mushroom Journal for the Tropics* 10: 27-30.

Triratana, S., Thaithatgoon, S. y M. Gawgla. 1991. Cultivation of *Ganoderma lucidum* in sawdust bags. In: *Proceedings 13th International Congress Cultivation of Edible Fungi, 1-2* (ed. M. J. Maher). A. A. Balkema Publisher, Dublin, Ireland.

Tseng, T. C., Shiao, M. S., Sheih, Y. S. y Y. Y. Hao. 1984. Studies on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid culture and chemical composition of mycelium. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 25: 149-157.

Tuttobello, R. y P. J. Mill. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochemical Journal* 79 (5): 1-57.

Turner, W. B. y D.C. Aldrich. 1983. *Fungal Metabolites II*. Academic Press: New York.

Torres y Torres, M. G. y L. Guzmán-Dávalos. 5005. Notas sobre la variación morfológica de *Ganoderma curtissi* (Ganodermatales, Ganodermataceae) en México. *Revista Mexicana de Micología*. 21: 39-47.

Vidal, C., Fargues, J. y L. A. Lacey. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces funmososeus*: Effect of temperature and vegetative growth. *Journal Invertebrate Pathology* 70: 18-26.

Wang, B. C. y J. Hua. 1991. A cultural atlas of some *Ganoderma* cultures. Publication of the Food Industry Research and Development Institute (FIRDI): Hsinchu, Taiwan, pp 131.

Wang, Y. C. y B. McNeil. 1995. pH effects on exopolysaccharide and oxalic acid production in cultures of *Sclerotium glaucanicum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 124-130.

Wasser, S. P. y A. L. Weis. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a current perspective. *Critical Reviews Immunology* 19: 65-96.

White, T. J., Bruns, S. y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (edt.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, 315-322.

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

Yang, F. C. y C. B. Liao. 1998. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 19: 233-236.

Zhao J. D. y X. Q. Zhang. 2000. Ganodermataceae. Flora fungorum sinicorum. Beijing: Science Press 18: 1-178.

Zhang, G. L., Wang, Y. H., Ni, W., Teng, H. L. y Z. B. Lin. 2002. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG- induced immune liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology* 8: 728-733.

Zimmermann, W.E. 1951. Recursos de industrias del mundo. F.C.E. México. pp. 13.

Zhong, J. J. Fang, Q. H. 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.

Anexo A

Anexo A-1. Secuencias consenso generadas a partir de las regiones ITS-1 e ITS-4. Las secuencias son leídas en dirección 5'-3'. Las cajas de las bases en dirección 5' y 3' indican el inicio y el fin de la unidad ribosomal 5.8S, respectivamente. Las bases nucleotídicas intermedias de las secuencias señaladas indican la región invariable del gen ribosomal 5.8S.

1) CP-514 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 595

5' ATCATTTCGAGTTTNGACTGGGTTGTAGCTGGCCTCCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TCACTGTGGGCTTCAGATTGTCGTGAAACAGGCTCCTTACCGGGCTTGTGAAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAACT
TATAAAAGTAAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
TTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCATGAAATCTCAACCTGCAAGCTTATGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGG
AGGCTTGTCCGCCGTGCCTGGTCCGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTC
TACGCCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAATAGTCTCGGTTAGAGACAGTTTATGACCTCTGACCTCAAATCNGG
NANGACTACCCGCTGAA3'

2) CP-381 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 574

5'CTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGYTCATCCACTCTACCACCTGTGCACTTACTGTGGGCTT
CAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTCCGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTATAAAGTAAACAGAA
TGTTGATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGA
GCATGCCTGTTTGTAGTGTCATGAAATCTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCCGT
TATTGGTCCGCTCCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCNTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACGCCGACCGTGT
AAGCGTTGACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA3'

3) CP-382 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 566

5'GATCATTTCGAGTTTTGACCGGGGTTGTARTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGC
ACTTACTGTGGGCTTCAGATCGNGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTCCGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCT
ATAAAGTAAMMRAATGTGTATTGCGATGTAACGCAYCTATATACAACCTTCAGCAACGGAWCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAARKCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
TTGGTATYCCGAGGCMKKCCTGTTTGTARTGTCAYSAATCTTCAACCTACAAGCKTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGG
GAGSCYYGTMRCRRTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATAT
CTACGCCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAA3'

4) CP-383 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 567

5'CGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAYTTACTTGTGGGCTTTCAGA
TCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTGTGGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTATAAAGTAAACAGAATGTGT
ATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATG
CCTGTTTGTAGTGTCATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCCGTATTG
GTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACGCCGACCGTGAAGCG
TTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCAA3'

5) CP-384 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTTCGAGTTTTGACCGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTCCGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA3'

6) CP-385 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTTCGANTTTTACCGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTCCGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA3'

7) CP-386 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTTCGAGTTTTGRCCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTCCGAGGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA

GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGNCCTCTGACCTCAAATCANGTAGGACTA
NCCGCTGAA₃'

8) CP-387 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTTACCGGGCTTGTGGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA₃'

9) CP-388 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 598

5'ATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCNTTCCACTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGNTTCAGAAGTCNGAAGCGGGCTCTTACTGAGCNTGTAGAGCGNTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACT
CCATAAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACTTACAGACCTTTGNGGGTTTGTAGGCTTGGACTT
GARGGCTTGTCCGGCCGTTTTCGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTCTCGGTGTGATAA
GTCTACGCCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCCTCTCGTTTGGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCA
GGNAGGACTACCCGCTGAA₃'

10) CP-389 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 555

5'CGGGTTGTAGCTGGCCTTYCGAGGCCnATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTACAGG
ATCGCGAAACCGGCTCTTTACCGGGCTCGCGGAGCGCCTTGTGCCCGCTTATCACAAACCCATGAAGTATTAGAATGT
GTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATYTTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
SGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAWTCTTTGAACGCMCCTTGCCTTGGTATTCGAGGAGCA
TGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACTTACGAGCTTCTTGGCAGGTTTGGKAGGCTTGGACTTGGARGCTTGKCSGTCTT
ACAGGKCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGGGATCGGKTKCGGTTGTGATAAATGTCTACGCCSCGACCGT
AAGCATTGGCAAGCTTCTAACCCTCTCGGTATAGAGACAAGTTTATGACCTCNGACCTC 3'

11) CP-398 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 570

5'ATCATTATCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGTGAGGCAGGCTCTTTACCGGGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCNGACCTCAAATCAGG₃'

12) CP-394 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTTKACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTTACCGGGCTTGTGGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGNCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCANGTAGGACTA
CCCGCTGAA₃'

13) CP-395 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTTACCGGGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCCTTATAGACAGCTTATGACCTCTGACCTCAAATCANGTAGGACTA
CCCGCTGAA₃'

14) CP-396 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATWATCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTTACCGGGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTA
TAAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAG
GCTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGACTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTAC

GCCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA3'

15) CP-397 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 582

5'ATCATTATCGAGTTTGRCCGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAATGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATGAAATATTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTTATTGGTTCGNCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCNGACTACCCGCT
GAA3'

16) CP-399 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 597

5'ATCATTATWCGAGTTTGTAGCTGGGTTGTAGCTGGCCTCCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCA
CTACTGTGGGCTTCAGATTGTCTGTAAGCGGGCTCCTTACC GGCTTGTGAAGCGGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAAC
TATATTAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCT
CCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTATGTGGTTTGTAGGCTTGGACTT
GGAGGCTTTGTCCGCCATGCCCGGTCCGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTNCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAA
GTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAATCGTCTTGGTTAGAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAANNCA
GGTANGACNACCCGCTNAA3'

17) CP-400 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 593

5'ATCATTATCGAGTTTGTAGCTGGGTTGTAGCTGGCCTCCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TACTGTGGGCTTCAGATTGTCTGTAAGCGGGCTCCTTACC GGCTTGTGAAGCGGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAAC
TATATTAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCT
CCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTATGTGGTTTGTAGGCTTGGACTT
GGAGGCTTTGTCCGCCATGCCCGGTCCGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTTCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAA
GTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAATCGTCTTGGTTAGAGACAGGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATC
AGGTANGANTACAA3'

18) CP-401 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTTCACCGGGTTGTAGCTGGCCTCCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAG
CTTGTCCGCCGTTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA3'

19) CP-403 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTNGRCCGGGTTGTAGCTGGCCTCCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA3'

20) CP-405 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 574

5'GTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTACTGTGGGCTTCAGAAGTCG
TGAAGCGGGCTCTTACTGTAGCTTGTAGAGCGATGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCCATAAAGTATTAGAATGTGTAT
TGCGATGTAACGCATCTANTACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT
GTTTGTAGTGTCAATGAAATCTTCAACTACAGACCTTTGC GGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCCGTGTTTCGG
TCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTATTCCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGT
TTTGGCGAGCTTNTAACCGTCTCCTGTTTGGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCANGTANGACTACCCGCTGAA3'

21) CP-408 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 569

5'GTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTACTGTGGGCTTCAGATCGCG
AGGAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTATAAAGTAACAGAATGTGTATTGC
GATGTAATGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTT
TGAGTGTCAATGAAATATTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCCGTTTATTGGTTCGAC

TCCTCTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGAG
AnCGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA³'

22) CP-409 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTTKACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCNGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCNGACCTCAAATCNGGNANGACTA
CCCGCTGAA³'

23) CP-434 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 598

5'ATCATTATCGAGTTTNGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGTTACAGGATCGCGAAACGGGCTCTTACCNGGCTTCGAGAGCGCGCTTGTGCCCGGTTTATCACAAACCC
ATGAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTI
GGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACGAGCTTCTTGCAGGTTTGTAGGCTTGGACTTG
GAGCTTGTCCGCTTACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGTTGTCCGGTGTGATAATG
TCTACGCCGCGACCGTGAAGCATTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGGTATAGAGACAAGTTTATGACCTCTGACCTCAAATC
ANGGTAGGACTACCCGCTGAA³'

24) CP-435 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTGTACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCNGGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGNGTTTACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTANGACTA
CCCGCTGAA³'

25) CP-444 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 598

5'nATCATNAWCGAGTTTGTACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCRCCTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGTTWAGGATCGCGARRCRGGCTCTTACSGGGCTYGCAGGCGCRYTGTGCCYCGGTTTATCACAAACYC
YATRAAGTAWYAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCT
ITGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACYACRAGCTTYTTCGCGWGGTTTGTAGGCTTGGACT
TGGAGGCTTGTCCGGYCKTAYWGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGTTTGTCCGGTGTGATAA
TRTCTACGCCGCGACCGTGAAGCATTTGACRAGCTTCTAACCGTCTCGGTATAGAGACARSTTTATGACCTCTGACCTCAAAT
CAGGTAGGACTACCCGCTGAA³'

26) CP-445 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTTGRCCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCNGGCTTGCAGGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTTCGGTGTGATAATATCTACG
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTANGACTA
CCCGCTGAA³'

27) CP-446 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 597

5'ATCATTATCGAGTTTGTACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGTTACAGGATCGCGAAACGGGCTCTTACCNGGCTTCGNGAGCGCGCTTGTGCCCGGTTTATCACAAACCC
CATGAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTI
TGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACGAGCTTCTTGCAGGTTTGTAGGCTTGGACTT
GGAGGCTTGTCCGGTCTTACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGTTTGTCCGGTGTGATAA
GTCTACGCCGCGACCGTGAAGCATTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGGTATAGAGACAAGTTTATGACCTCTGACCTCAAAT
CAGGTAGGACTACCCGCTGAA³'

28) CP-447 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 601

5'ATCATTATCGAGTTTGTACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCACGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGTTTACCNGTCCGAAACGGGCTCGTTTATCCGGCTTGTGGAGCGCACTTGTGCCTGCGTTTATCACAAACT
CCATTAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTC
CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA¹TGAAATCTTCAACTACAAGCTTTCGCGGGTTTGTAGGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGTCCGGCTTAAACGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTGTCCGGTGTGATA
TTGGAGGCTTGTCCGGCTTAAACGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTTGTCCGGTGTGATA

ATGTCTACTCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGTTACAGAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAA
TCAGGTANGACTACCCGCTGAAβ'

29) CP-449 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 570

5'ATCATTTCGAGTTTTKACCGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTATTGGTCCNGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATCTACC
CCSCCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCNGACCTCAAAnCnGβ'

30) CP-450 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 597

5'ATCATNAWCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGTTACAGGATCGCGAAACGGGCTCTTACGGGGCTCGCAGAGCGCGCTTGTGCCCGGTTTATCACAAACCC
CATGAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCT
TGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACGAGCTTCTTGCAGGTTTGTAGGCTTGGACTT
GGAGGCTTGTCCGCTTTACAGGTCGGCTCCTCTTAAANGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTGTCCGGTGTGATAA
GTCTACGCCGCGACCGTGAAGCAATTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGGTATAGAGACAAGTTTATGACCTCTGACCTCAAAT
CAGGTAGGACTMCCCCTGAAβ'

31) CP-451 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTTCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATCTACC
CCGCGACCGTGAAGCGTTTACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCANGNAGGACTA
CCCGCTGAAβ'

32) CP-452 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 597

5'ATCATTTCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGTTACAGGATCGCGAAACGGGCTCTTACC GGCTCGCAGAGCGCGCTTGTGCCCGGTTTATCACAAACCC
ATGAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACGAGCTTCTTGCAGGTTTGTAGGCTTGGACTTGG
GAGGCTTGTCCGCTTTACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATG
TCTACGCCGCGACCGTGAAGCAATTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGGTATAGAGACAAGTTTATGACCTCTGACCTCAAATC
NNNTANGACTACCCGCTGANβ'

33) CP-453 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 577

5'TGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGAAG
TCGTGAAGCGGGCTCTTACTGAGCTTGTAGAGCGATGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCCATAAAGTATTAGAATGTG
TATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCAT
GCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACAGACCTTTCGGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGGCTGTT
TCGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGAATTCCTTGC GGATCGGCTCTCGGTGTGATAAATGTCTACGCCGCGACCGTGA
ACGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCGTTTGGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCNAATCANGTAGGACTACCCGCTGAAβ'

34) CP-454 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 601

5'NNCATNATCGAGTTTTGACNGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCACGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGTTACC GGTCGCGAAACGGGCTCGTTTATTCGGCTTGTGGAGCGCACTTGTGCCTGCGTTTATCACAAAC
TCCATTAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCT
CCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACAAGCTTTCGGGGTTTGTAGGCTTGGG
CTTGGAGGCTTGTCCGGCTTAAACGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGAATTCCTTGC GGATCGGCTGTCCGGTGTGATA
ATGTCTACTCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCGTTACAGAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAA
TCANGTAGGACTACCCGCTGAAβ'

35) CP- Tamaño Largo de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTTCGAGTTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACC GGCTTGC GGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGCCGTTATTGGTCCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATCTACC

CCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATC NNNNANGACTA
CCCGCTGAA 3'

36) CP-471 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 587

5'ATCATTATCGAGTTT GACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC
TTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTGCAGGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTAT
AAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGG
CTTGTCCGGCCGTTTATGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTACC
CCGCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAA 3'

37) CP-472 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 575

5'GGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTACTGTGGGCTTCAGATTG
TCGTGAAACAGGCTCCTTACCGGGCTTGTGAAGGGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAACTCTATAAAAGTAACAGAATGT
GTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATCCGAGGAGCA
TGCCTGTTTGTAGTGTGATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTATGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGGCCGTGCC
TGGTCCGGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCCGACCGTGAAG
CGTTTGGCGAGCTTCTAATAGTCTCGTTAGAGACAGTTTATGACCTCTGACCTCAAATCANGTAGGACTACCCGCTGAA 3'

38) CP-473 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 575

5'GGGTTGTAGCTGGNCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTACTGTGGGCTTCAGATTG
TCGTGAAACAGGCTCCTTACCGGGCTTGTGAAGGGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAACTCTATAAAAGTAACAGAATGT
GTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATCCGAGGAGCA
TGCCTGTTTGTAGTGTGATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTATGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGGCCGTGCC
TGGTCCGGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCCGACCGTGAAG
CGTTTGGCGAGCTTCTAATAGTCTCGTTAGAGACAGTTTATGACCTCTGACCTCAAATCNGGNANGACTACCCGCTGAA 3'

39) CP-476 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 567

5'GGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTACTGTGGGCTTCAGATCG
CGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTGCAGGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTACTACAAACTCTATAAAAGTAACAGAATGTGTATT
GCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
TTTGTAGTGTGATGAAATNNTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGNAGGCTTGGACTTGGANGCTTGTCCGGCCGTTATTGGTGN
NCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCNGTGTGATAAATATCTACGCCCGACCGTGAAGCGTTTG
ACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTATGANCTCTGANCTCAATC NNNNTANGACTACCCGCTGAA 3'

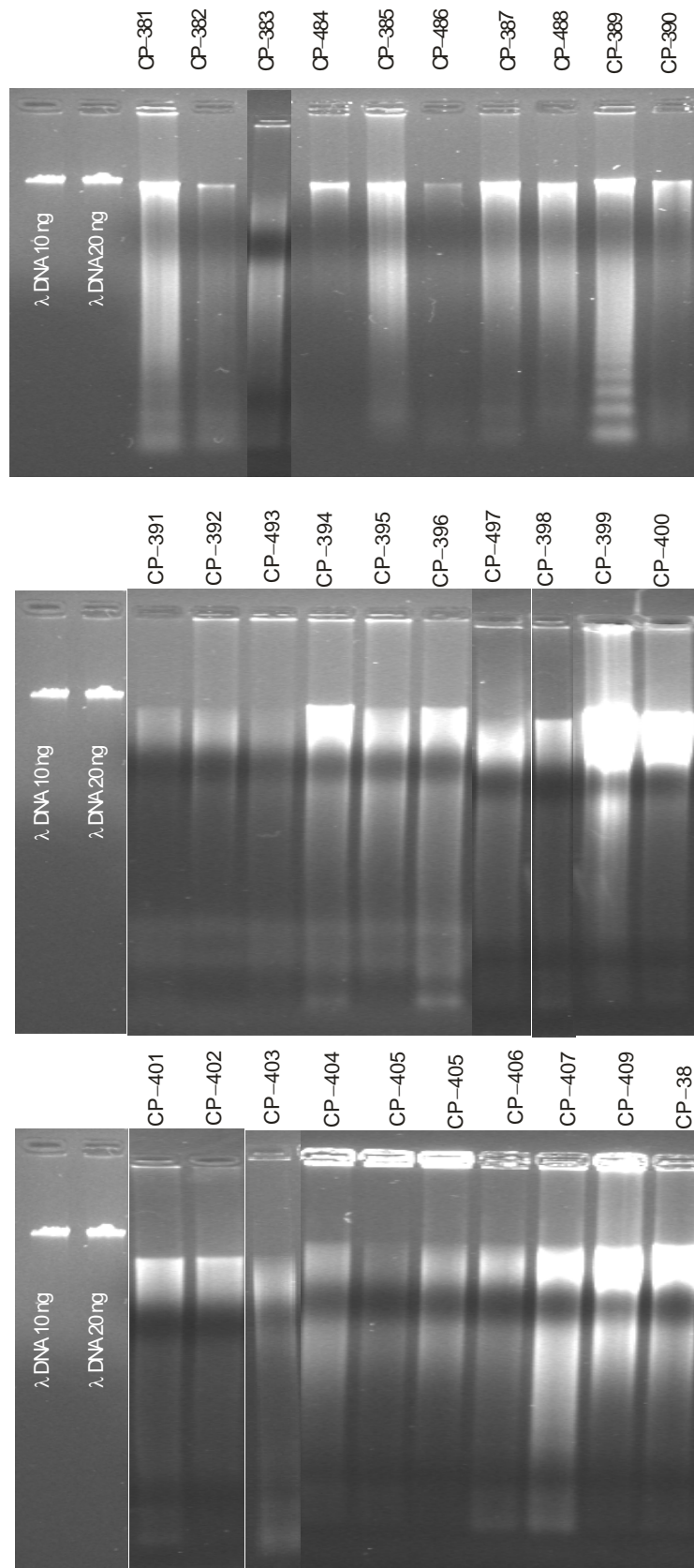
40) CP-512 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 588

5'AnCATTATCGAGTTT KACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGCTTCAGATCGCGAGGCAGGCTCTTACCGGGCTTGCAGGAGCGCATCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTCTA
TAAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAG
GCTTGTCCGGCCGTTTATGGTCCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCAGGATCGGCTTTCGGTGTGATAAATATCTAC
GCCCGACCGTGAAGCGTTTGACGAGCTTCTAACCGTCTTATAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATC NNNNAGGANT
ACCCGCTGAA 3'

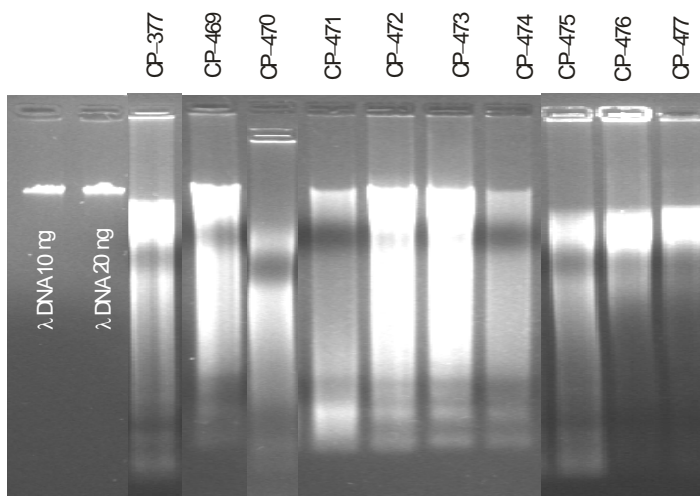
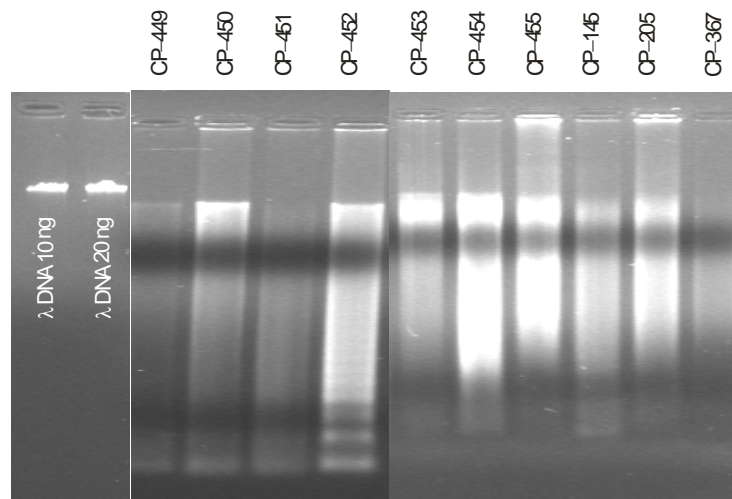
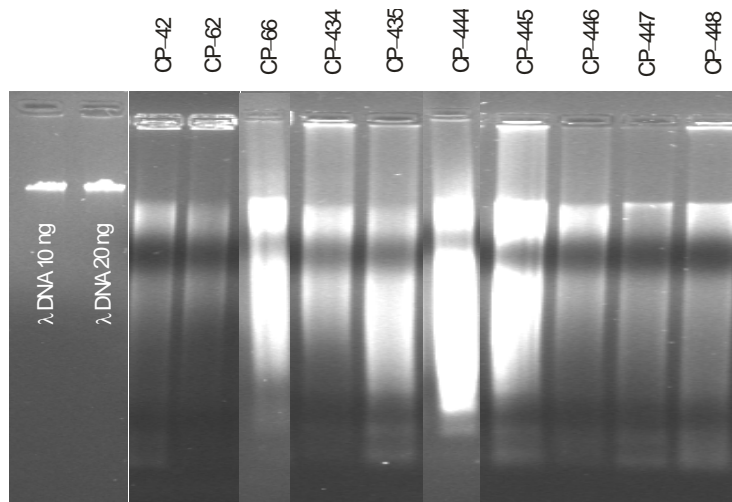
41) CP-513 Tamaño de la secuencia en (nucleótidos) 575

5'GGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTACTGTGGGCTTCAGATTG
TCGTGAAAGCGGGCTCCTTACCGGGCTTGTGAAGCGGTGTCTGTGCCTGCGTTTACTACAAACTATTAAGTATCAGAATGTGT
ATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAANAACGCANCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCANAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGNATTCCNAGGAGCATG
CCTGTTTGTAGTGTGATGAAANCTTCNACCTGCAAGCTTATGTGGNTTGTANGCTTGGACTTGNANGCTTTTNCGGNCATGCC
NGNCGGCTCNCTCNAANGNATTANNNTGGNTCCNTGCGGANCNCTNTCNGNGTGTGATAATGTCTACNCCNNGNCCNNGAA
NNGNNTNGAGCTTCTNATCNTCTCNGNTAGAGANAGCTTTNTGACCNTGANCTC N N N NAGGACNACNCTGAA 3'

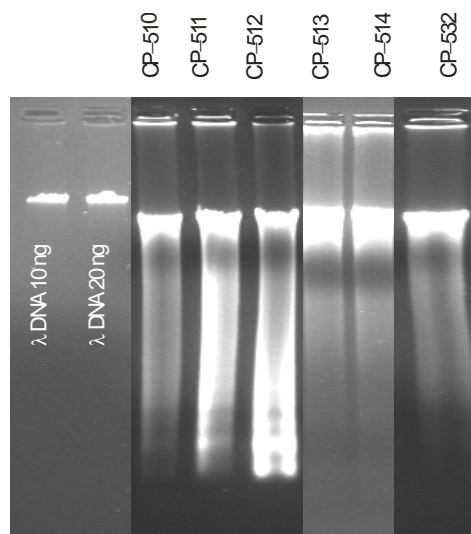
Anexo A-2. Imágenes de los geles de agarosa de ADN total y PCR de las 66 cepas estudiadas.



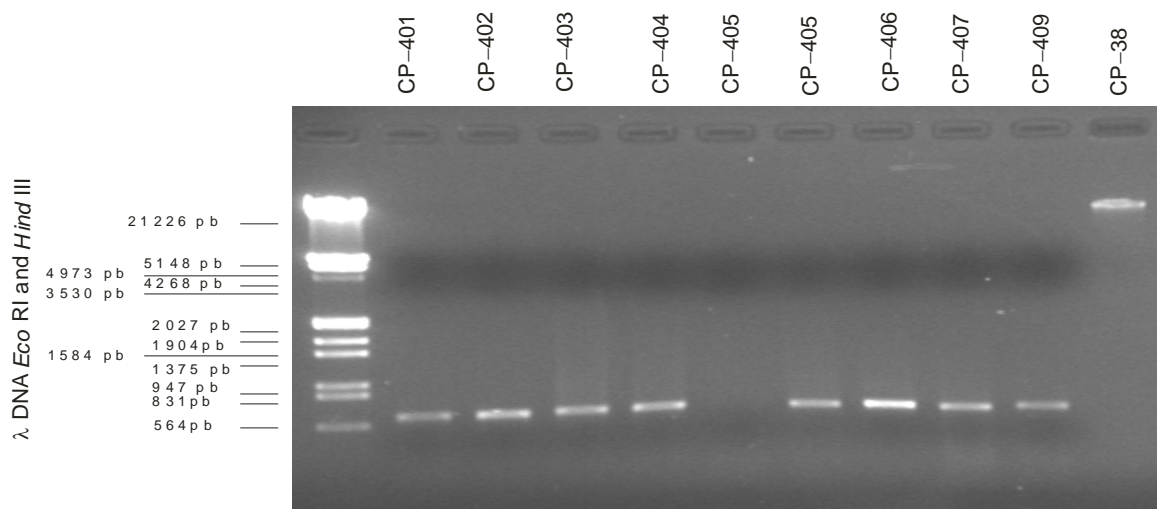
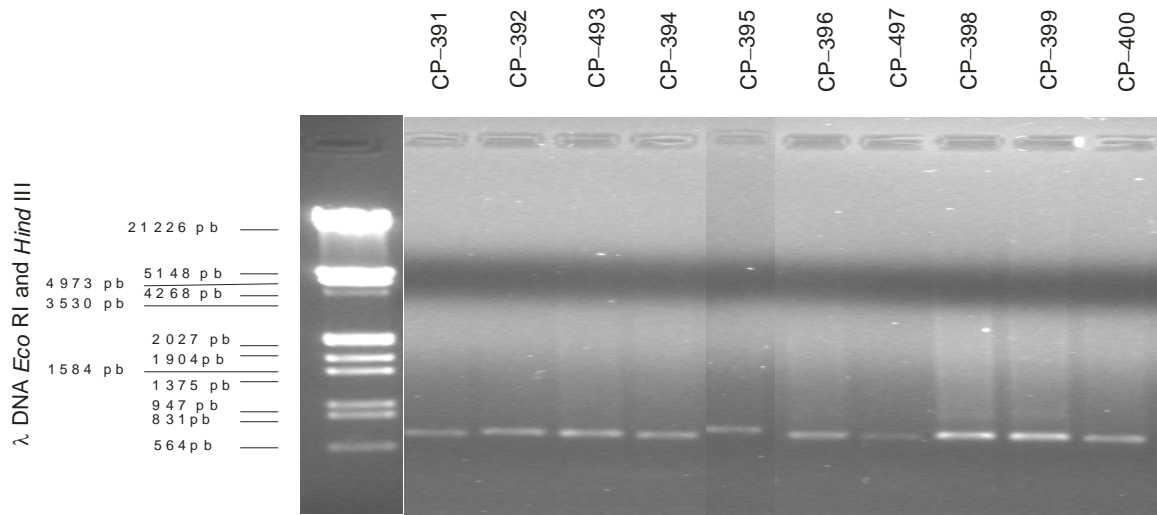
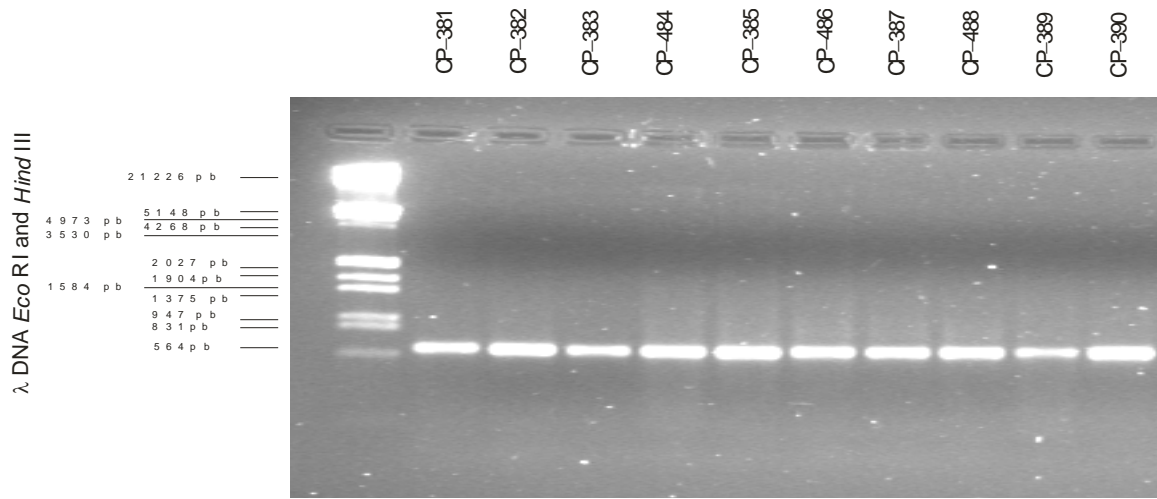
Continuación del anexo A-2.



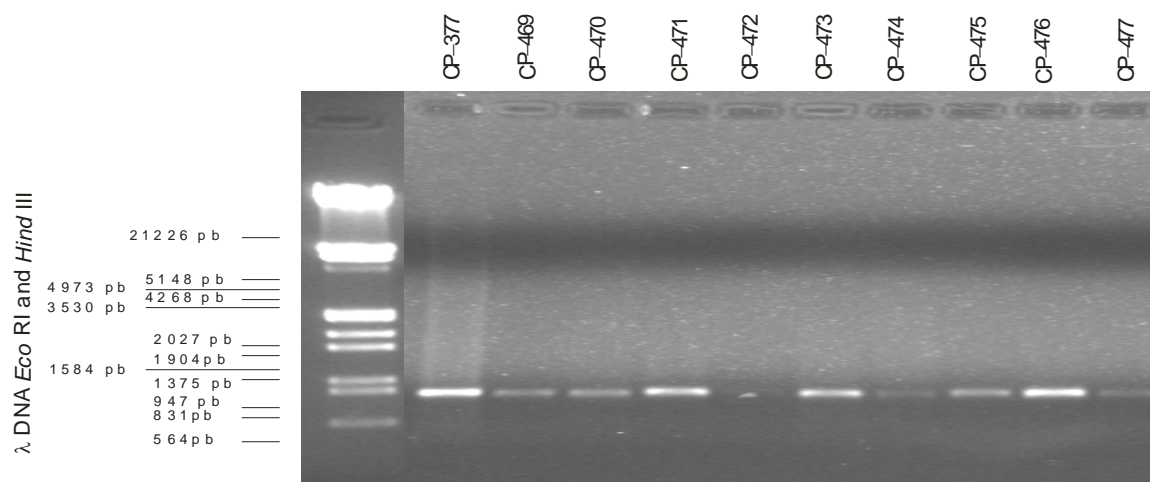
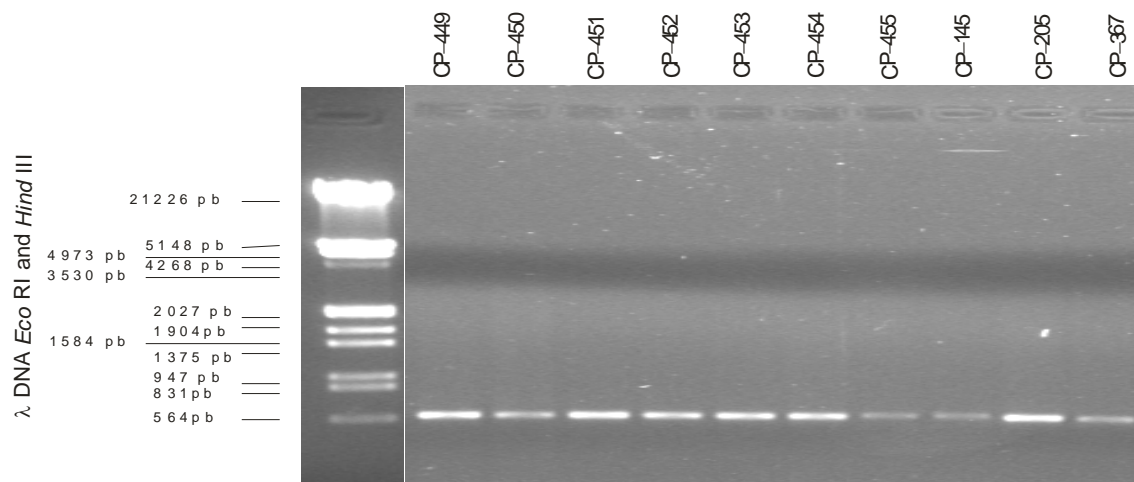
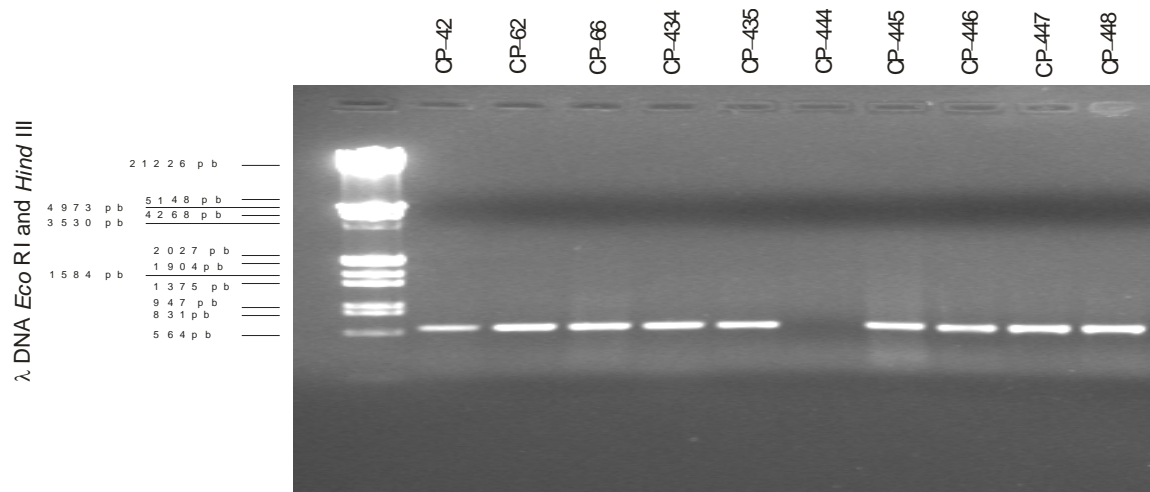
Continuación del anexo A-2.



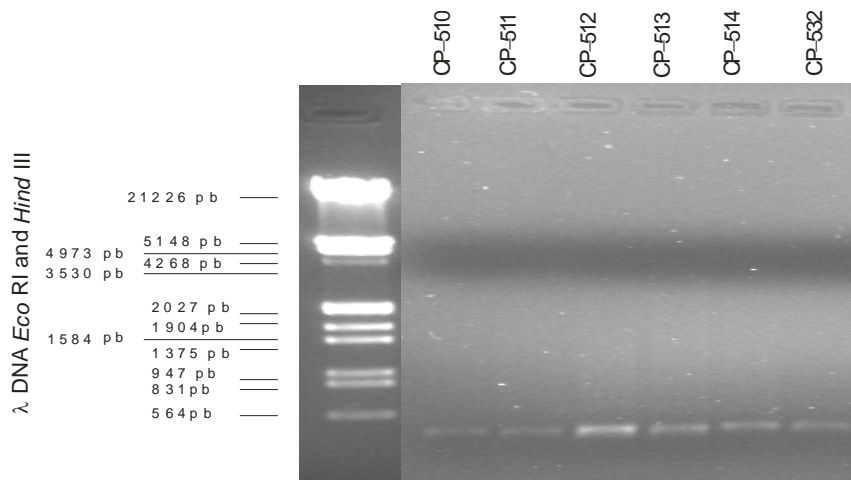
Continuación del anexo A-2.



Continuación del anexo A-2.



Continuación del anexo A-2.



Anexo B-3. Alineamiento de 42 secuencias consenso generada a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4. Los nucleótidos sombreados indican los sitios parsimoniosamente informativos, y las líneas son huecos en las secuencias. Sitios parsimoniosamente informativos 92, sitios conservados 256, sitios variables 359, total de bases incluyendo sitios perdidos y huecos 626.



Continuación del anexo C-1.

	CP-395	CP-397	CP-401	CP-403	CP-404	CP-409	CP-435	CP-444	CP-445	CP-448	CP-449	CP-451	CP-455	CP-469	CP-470	CP-471	CP-476	CP-512	<i>F. pestis</i>
CP-472																			
CP-473																			
CP-514																			
CP-513																			
CP-399																			
CP-475																			
CP-400																			
CP-474																			
CP-405																			
CP-453																			
CP-388																			
CP-447																			
CP-454																			
CP-398																			
CP-389																			
CP-446																			
CP-450																			
CP-434																			
CP-452																			
CP-407																			
CP-396																			
CP-408																			
CP-406																			
CP-145																			
CP-205																			
CP-367																			
CP-377																			
CP-381																			
CP-382																			
CP-383																			
CP-384																			
CP-385																			
CP-386																			
CP-387																			
CP-390																			
CP-391																			
CP-392																			
CP-394																			
CP-395																			
CP-397																			
CP-401	0,0																		
CP-403	0,0	0,0																	
CP-404	0,0	0,0	0,0																
CP-409	0,0	0,0	0,0	0,0															
CP-435	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0														
CP-444	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0													
CP-445	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0												
CP-448	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0											
CP-449	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0										
CP-451	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0									
CP-455	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0								
CP-469	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0							
CP-470	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
CP-471	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
CP-476	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
CP-512	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>F. pestis</i>	302,0	291,0	304,0	302,0	303,0	290,0	300,0	292,0	302,0	302,0	290,0	304,0	236,0	303,0	236,0	304,0	300,0	302,0	302,0

Continuación del anexo C-2.

CP-472	CP-395	CP-397	CP-401	CP-403	CP-404	CP-409	CP-435	CP-444	CP-445	CP-448	CP-449	CP-451	CP-455	CP-469	CP-470	CP-471	CP-476	CP-512	<i>F. palustris</i>		
CP-473																					
CP-514																					
CP-513																					
CP-399																					
CP-475																					
CP-400																					
CP-474																					
CP-405																					
CP-453																					
CP-388																					
CP-447																					
CP-454																					
CP-398																					
CP-389																					
CP-446																					
CP-450																					
CP-434																					
CP-452																					
CP-407																					
CP-396																					
CP-408																					
CP-406																					
CP-145																					
CP-205																					
CP-367																					
CP-377																					
CP-381																					
CP-382																					
CP-383																					
CP-384																					
CP-385																					
CP-386																					
CP-387																					
CP-390																					
CP-391																					
CP-392																					
CP-394																					
CP-395																					
CP-397																					
CP-401																					
CP-403																					
CP-404																					
CP-409																					
CP-435																					
CP-444																					
CP-445																					
CP-448																					
CP-449																					
CP-451																					
CP-455																					
CP-469																					
CP-470																					
CP-471																					
CP-476																					
CP-512																					
<i>F. palustris</i>	285,0	285,0	284,0	283,0	286,0	283,0	283,0	282,0	285,0	286,0	285,0	285,0	258,0	284,0	259,0	284,0	285,0	5,0	285,0	284,0	
																					284,0

Anexo C-3. Porcentaje de diferencias de nucleótidos entre diferentes aislamientos de *Ganoderma* generada a partir de las regiones ITS-1 + ITS-4.

CP-472	CP-473	CP-514	CP-513	CP-399	CP-400	CP-405	CP-453	CP-388	CP-447	CP-454	CP-389	CP-398	CP-446	CP-450	CP-434	CP-452	CP-396	CP-408	CP-381
0,0	7,0	7,0																	
CP-473	7,0																		
CP-514	11,0	11,0																	
CP-513	19,0	14,0	7,0																
CP-399	22,0	17,0	9,0	2,0															
CP-400	44,0	44,0	38,0	48,0	51,0														
CP-405	43,0	43,0	37,0	47,0	50,0	1,0													
CP-453	42,0	46,0	35,0	45,0	48,0	2,0	0,0												
CP-388	46,0	51,0	38,0	50,0	53,0	37,0	36,0	33,0											
CP-447	46,0	51,0	38,0	50,0	53,0	37,0	36,0	33,0	0,0										
CP-454	47,0	47,0	42,0	54,0	55,0	48,0	48,0	45,0	30,0	29,0									
CP-389	29,0	35,0	30,0	39,0	40,0	31,0	31,0	30,0	30,0	31,0	37,0								
CP-398	48,0	48,0	43,0	54,0	57,0	48,0	47,0	44,0	30,0	30,0	1,0	39,0							
CP-446	49,0	49,0	44,0	55,0	58,0	48,0	47,0	44,0	31,0	31,0	2,0	40,0	0,0						
CP-450	49,0	49,0	44,0	55,0	58,0	48,0	47,0	44,0	31,0	31,0	2,0	40,0	0,0	0,0					
CP-434	49,0	49,0	44,0	55,0	58,0	48,0	47,0	44,0	31,0	31,0	2,0	40,0	0,0	0,0	0,0				
CP-452	32,0	32,0	33,0	42,0	45,0	34,0	34,0	32,0	33,0	32,0	38,0	3,0	40,0	41,0	41,0	41,0			
CP-396	34,0	34,0	35,0	43,0	46,0	35,0	34,0	32,0	34,0	34,0	39,0	4,0	40,0	41,0	41,0	41,0	1,0		
CP-408	30,0	30,0	37,0	41,0	44,0	33,0	32,0	32,0	32,0	31,0	36,0	2,0	39,0	40,0	40,0	40,0	3,0	3,0	
CP-381	30,0	30,0	34,0	37,0	38,0	30,0	30,0	29,0	29,0	28,0	34,0	1,0	36,0	37,0	37,0	37,0	3,0	4,0	1,0
CP-382	33,0	33,0	33,0	43,0	43,0	35,0	35,0	33,0	34,0	33,0	38,0	2,0	43,0	44,0	44,0	44,0	6,0	7,0	4,0
CP-383	30,0	30,0	31,0	39,0	42,0	32,0	31,0	32,0	32,0	31,0	37,0	0,0	39,0	40,0	40,0	40,0	3,0	5,0	4,0
CP-384	30,0	30,0	31,0	39,0	42,0	32,0	31,0	32,0	32,0	31,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	2,0	1,0
CP-385	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	33,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-386	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-387	29,0	29,0	30,0	39,0	42,0	31,0	31,0	29,0	30,0	29,0	37,0	2,0	39,0	40,0	40,0	40,0	3,0	4,0	2,0
CP-394	29,0	29,0	30,0	39,0	42,0	31,0	31,0	29,0	30,0	29,0	37,0	2,0	39,0	40,0	40,0	40,0	2,0	3,0	2,0
CP-395	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-397	32,0	32,0	33,0	42,0	45,0	34,0	34,0	32,0	33,0	32,0	38,0	3,0	40,0	41,0	41,0	41,0	1,0	0,0	3,0
CP-403	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-409	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-435	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-444	25,0	25,0	23,0	34,0	37,0	28,0	28,0	26,0	16,0	15,0	7,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	8,0	10,0	7,0
CP-445	31,0	31,0	32,0	41,0	44,0	33,0	33,0	31,0	32,0	31,0	37,0	2,0	39,0	40,0	40,0	40,0	1,0	2,0	2,0
CP-449	30,0	30,0	31,0	40,0	41,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-451	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-469	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-471	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
CP-476	30,0	30,0	31,0	39,0	42,0	32,0	31,0	29,0	30,0	30,0	36,0	1,0	37,0	38,0	38,0	38,0	0,0	1,0	0,0
CP-512	30,0	30,0	31,0	40,0	43,0	32,0	32,0	30,0	31,0	30,0	36,0	1,0	38,0	39,0	39,0	39,0	2,0	3,0	1,0
F._pallustris	294,0	294,0	271,0	313,0	313,0	290,0	293,0	300,0	305,0	302,0	289,0	298,0	303,0	302,0	303,0	304,0	299,0	286,0	292,0

Continuación del anexo C-3.

CP-472	CP-382	CP-383	CP-384	CP-385	CP-386	CP-387	CP-394	CP-395	CP-397	CP-401	CP-403	CP-409	CP-435	CP-444	CP-445	CP-449	CP-451	CP-469	CP-471	CP-476	CP-512	F_palust	
CP-473																							
CP-514																							
CP-513																							
CP-399																							
CP-400																							
CP-405																							
CP-453																							
CP-388																							
CP-447																							
CP-454																							
CP-389																							
CP-398																							
CP-446																							
CP-450																							
CP-434																							
CP-452																							
CP-396																							
CP-408																							
CP-381																							
CP-382																							
CP-383																							
CP-384		5,0																					
CP-385		4,0	4,0																				
CP-386		4,0	1,0	0,0																			
CP-387		2,0	2,0	1,0	1,0																		
CP-394		2,0	2,0	1,0	0,0	0,0																	
CP-395		1,0	4,0	1,0	0,0	1,0	1,0																
CP-397		3,0	6,0	3,0	2,0	2,0	3,0	2,0															
CP-401		4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	2,0	0,0													
CP-403		0,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0												
CP-409		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0												
CP-435		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0												
CP-444		7,0	11,0	7,0	6,0	6,0	7,0	6,0	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0									
CP-445		2,0	5,0	2,0	0,0	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	7,0								
CP-449		1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,0								
CP-451		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,0	0,0							
CP-469		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,0	0,0	0,0						
CP-471		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,0	0,0	0,0	0,0					
CP-476		1,0	4,0	2,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
CP-512		1,0	4,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
F_palustris	287,0	289,0	298,0	298,0	299,0	300,0	299,0	299,0	298,0	298,0	298,0	298,0	298,0	299,0	300,0	298,0	299,0	299,0	299,0	299,0	285,0	285,0	297,0

Continuación del anexo D-2.

	CP-408	CP-406	CP-145	CP-205	CP-367	CP-377	CP-381	CP-382	CP-383	CP-384	CP-385	CP-386	CP-387	CP-390	CP-391	CP-392	CP-394	CP-395	CP-397	CP-401	CP-403	
CP-472																						
CP-473																						
CP-513																						
CP-514																						
CP-399																						
CP-475																						
CP-400																						
CP-474																						
CP-405																						
CP-453																						
CP-388																						
CP-447																						
CP-454																						
CP-398																						
CP-389																						
CP-446																						
CP-450																						
CP-434																						
CP-452																						
CP-407																						
CP-396																						
CP-408																						
CP-406																						
CP-145																						
CP-205																						
CP-367																						
CP-377																						
CP-381																						
CP-382																						
CP-383																						
CP-384																						
CP-385																						
CP-386																						
CP-387																						
CP-390																						
CP-391																						
CP-392																						
CP-394																						
CP-395																						
CP-397																						
CP-401																						
CP-403																						
CP-404																						
CP-409																						
CP-435																						
CP-444																						
CP-445																						
CP-448																						
CP-449																						
CP-451																						
CP-455																						
CP-469																						
CP-469																						
CP-470																						
CP-471																						
CP-471																						
CP-476																						
CP-512																						
CP-512																						
F. palustris	1,347	1,281	1,267	1,276	1,271	1,286	1,290	1,282	1,414	1,266	1,286	1,282	1,285	1,289	1,281	1,284	1,287	1,284	1,311	1,281	1,281	1,292

Anexo E

Anexo E-1. Variación nucleotídica entre las 66 cepas estudiadas mas secuencias externas generadas a partir de las regiones ITS-1.

CP-447	CP-381	CP-388	CP-397	CP-399	CP-400	CP-408	CP-409	CP-434	CP-444	CP-446	CP-514	CP-205	CP-367	CP-377	CP-382	CP-383	CP-384	CP-385		
40.0																				
CP-381	29.0																			
CP-388	38.0	0.0																		
CP-397	49.0	32.0	28.0																	
CP-399	48.0	32.0	36.0	32.0																
CP-400	44.0	3.0	31.0	0.0	1.0															
CP-408	37.0	0.0	26.0	0.0	35.0	3.0														
CP-409	48.0	53.0	46.0	52.0	31.0	56.0	51.0	50.0												
CP-434	36.0	0.0	25.0	0.0	30.0	3.0	0.0	0.0												
CP-444	47.0	51.0	48.0	50.0	62.0	60.0	49.0	0.0	48.0											
CP-514	54.0	29.0	41.0	28.0	15.0	14.0	32.0	0.0	27.0	63.0										
CP-205	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0								
CP-367	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0							
CP-377	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0						
CP-382	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
CP-383	40.0	1.0	27.0	1.0	31.0	3.0	0.0	55.0	1.0	53.0	28.0	1.0	0.0	1.0	0.0					
CP-384	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
CP-385	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
CP-386	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
CP-387	40.0	1.0	27.0	1.0	31.0	4.0	1.0	55.0	1.0	53.0	28.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-398	23.0	19.0	16.0	19.0	27.0	27.0	19.0	18.0	1.0	19.0	0.0	26.0	19.0	19.0	19.0	20.0	19.0	19.0	19.0	
CP-399	40.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-392	39.0	0.0	28.0	0.0	31.0	3.0	0.0	51.0	0.0	49.0	27.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-394	40.0	0.0	27.0	0.0	31.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	28.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-395	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-396	43.0	2.0	30.0	0.0	34.0	3.0	2.0	56.0	2.0	54.0	31.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0	1.0	
CP-401	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-403	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	53.0	0.0	51.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-404	40.0	0.0	27.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-405	32.0	33.0	27.0	33.0	41.0	40.0	36.0	31.0	53.0	30.0	53.0	45.0	33.0	33.0	33.0	32.0	32.0	32.0	33.0	
CP-435	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	53.0	0.0	51.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-445	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-448	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-449	37.0	1.0	25.0	1.0	33.0	3.0	1.0	50.0	1.0	48.0	30.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	
CP-450	48.0	53.0	48.0	52.0	64.0	62.0	56.0	51.0	0.0	50.0	0.0	65.0	54.0	54.0	53.0	55.0	54.0	54.0	54.0	
CP-451	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-452	46.0	52.0	47.0	51.0	63.0	61.0	55.0	50.0	0.0	49.0	0.0	64.0	53.0	53.0	52.0	54.0	53.0	53.0	53.0	
CP-453	31.0	32.0	0.0	32.0	40.0	39.0	35.0	30.0	32.0	29.0	52.0	44.0	32.0	32.0	32.0	31.0	31.0	32.0	32.0	
CP-454	0.0	40.0	29.0	36.0	49.0	48.0	44.0	37.0	48.0	36.0	47.0	54.0	41.0	41.0	41.0	40.0	41.0	41.0	41.0	
CP-469	40.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-471	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-472	53.0	30.0	40.0	29.0	14.0	13.0	33.0	29.0	66.0	28.0	64.0	1.0	30.0	30.0	30.0	29.0	29.0	30.0	30.0	
CP-473	51.0	28.0	38.0	27.0	14.0	13.0	31.0	28.0	64.0	27.0	62.0	1.0	28.0	28.0	28.0	27.0	27.0	28.0	28.0	
CP-474	53.0	35.0	41.0	35.0	1.0	0.0	38.0	34.0	68.0	33.0	66.0	16.0	35.0	35.0	35.0	34.0	34.0	35.0	35.0	
CP-476	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-512	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	54.0	0.0	52.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-513	44.0	27.0	32.0	27.0	4.0	6.0	30.0	27.0	58.0	27.0	56.0	11.0	27.0	27.0	26.0	26.0	26.0	27.0	26.0	
CP-475	32.0	24.0	31.0	24.0	5.0	6.0	27.0	23.0	44.0	22.0	44.0	14.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	
CP-391	23.0	0.0	19.0	0.0	20.0	21.0	3.0	0.0	39.0	0.0	38.0	19.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-455	23.0	0.0	19.0	0.0	20.0	21.0	3.0	0.0	39.0	0.0	38.0	19.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-470	23.0	0.0	19.0	0.0	20.0	21.0	3.0	0.0	39.0	0.0	38.0	19.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-145	41.0	0.0	28.0	0.0	32.0	3.0	0.0	53.0	0.0	51.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CP-389	44.0	43.0	41.0	42.0	51.0	48.0	46.0	41.0	11.0	10.0	50.0	44.0	44.0	44.0	43.0	45.0	44.0	44.0	44.0	
CP-407	48.0	7.0	35.0	7.0	39.0	39.0	10.0	7.0	61.0	7.0	59.0	36.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	
CP-406	44.0	5.0	32.0	5.0	36.0	36.0	7.0	4.0	58.0	4.0	56.0	33.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
EF188279 <i>G. lucidum</i>	41.0	9.0	27.0	9.0	32.0	31.0	12.0	9.0	57.0	8.0	56.0	31.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	
AB462322 <i>G. lucidum</i>	41.0	9.0	27.0	9.0	32.0	31.0	12.0	9.0	57.0	8.0	56.0	31.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	
DQ425008 <i>G. lucidum</i>	41.0	9.0	27.0	9.0	32.0	31.0	12.0	9.0	57.0	8.0	56.0	31.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	
EF188277 <i>G. lucidum</i>	41.0	9.0	27.0	9.0	32.0	31.0	12.0	9.0	57.0	8.0	56.0	31.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	
AF255100 <i>Ganoderma sp.</i>	48.0	53.0	50.0	52.0	64.0	62.0	56.0	51.0	2.0	50.0	1.0	65.0	54.0	54.0	53.0	55.0	54.0	54.0	54.0	
AF255177 <i>Ganoderma sp.</i>	0.0	40.0	29.0	36.0	49.0	48.0	44.0	37.0	48.0	47.0	54.0	41.0	41.0	41.0	41.0	40.0	41.0	41.0	41.0	
AJ608712 <i>Ganoderma sp.</i>	45.0	22.0	32.0	22.0	22.0	22.0	21.0	57.0	20.0	55.0	24.0	22.0	22.0	22.0	22.0	21.0	22.0	22.0	21.0	
AJ608709 <i>G. applanatum</i>	1.0	39.0	29.0	37.0	49.0	48.0	45.0	36.0	46.0</											

Continuación de anexo E-1.

CP-447	CP-453	CP-454	CP-468	CP-471	CP-472	CP-473	CP-474	CP-476	CP-512	CP-513	CP-475	CP-391	CP-455	CP-470	CP-145	CP-389	CP-407	CP-406	EF188279 <i>G. lucidum</i>
CP-381																			
CP-388																			
CP-397																			
CP-399																			
CP-400																			
CP-408																			
CP-409																			
CP-434																			
CP-444																			
CP-446																			
CP-514																			
CP-205																			
CP-367																			
CP-377																			
CP-382																			
CP-383																			
CP-384																			
CP-385																			
CP-386																			
CP-387																			
CP-398																			
CP-390																			
CP-394																			
CP-395																			
CP-396																			
CP-401																			
CP-403																			
CP-404																			
CP-405																			
CP-435																			
CP-445																			
CP-448																			
CP-449																			
CP-450																			
CP-451																			
CP-452																			
CP-453																			
CP-454																			
CP-469																			
CP-471																			
CP-472																			
CP-473																			
CP-474																			
CP-476																			
CP-512																			
CP-513																			
CP-475																			
CP-391																			
CP-455																			
CP-470																			
CP-145																			
CP-389																			
CP-407																			
CP-406																			
EF188279 <i>G. lucidum</i>																			
AB69232 <i>G. lucidum</i>																			
DQ425008 <i>G. lucidum</i>																			
EF188277 <i>G. lucidum</i>																			
AF255100 <i>Ganoderma</i> sp.																			
AF255177 <i>Ganoderma</i> sp.																			
AJ608712 <i>Ganoderma</i> sp.																			
AJ608709 <i>G. applanatum</i>																			
DQ425006 <i>G. subambosini</i>																			
EF060011 <i>G. adspersum</i>																			
<i>F. pellicularis</i>																			

Continuación de anexo E-1.

	AB462322 G. lucidum	DD425008 G. lucidum	EF188277 G. lucidum	AF255100 Genodermma sp.	AF255177 Genodermma sp.	AJ608712 Genodermma sp.	AJ608709 G. appplanatum	DD425008 G. subamboniens	EF060011 G. adspersum	F. pallidus
CP-447										
CP-381										
CP-388										
CP-397										
CP-399										
CP-400										
CP-408										
CP-409										
CP-434										
CP-444										
CP-446										
CP-514										
CP-205										
CP-397										
CP-377										
CP-382										
CP-383										
CP-384										
CP-385										
CP-386										
CP-387										
CP-388										
CP-390										
CP-392										
CP-394										
CP-395										
CP-396										
CP-401										
CP-403										
CP-404										
CP-405										
CP-435										
CP-445										
CP-448										
CP-449										
CP-450										
CP-451										
CP-452										
CP-453										
CP-454										
CP-460										
CP-471										
CP-472										
CP-473										
CP-474										
CP-476										
CP-512										
CP-513										
CP-475										
CP-391										
CP-455										
CP-145										
CP-470										
CP-145										
CP-389										
CP-407										
CP-406										
EF188279 G. lucidum										
AB462322 G. lucidum										
DD425008 G. lucidum										
EF188277 G. lucidum										
AF255100 Genodermma sp.										
AF255177 Genodermma sp.										
AJ608712 Genodermma sp.										
AJ608709 G. appplanatum										
DD425008 G. subamboniens										
EF060011 G. adspersum										
F. pallidus										
	302,0		297,0	302,0	312,0	314,0	300,0	313,0	301,0	314,0
	0,0		0,0	58,0						
	1,0		58,0	42,0	48,0	47,0				
	59,0		42,0	26,0	58,0	38,0				
	43,0		26,0	42,0	46,0	47,0				
	26,0		42,0	33,0	55,0	32,0				
	43,0		33,0	108,0	23,0	41,0				
	56,0		55,0	297,0	312,0	314,0				
	302,0		297,0	302,0	312,0	314,0				

Continuación de anexo E-2.

CP-447	CP-453	CP-469	CP-471	CP-472	CP-473	CP-474	CP-476	CP-512	CP-513	CP-475	CP-391	CP-455	CP-470	CP-145	CP-389	CP-407	CP-406	EF188279 G. lucidum																																														
0,059	0,078	0,000	0,057	0,000	0,028	0,069	0,000	0,057	0,024	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,002																																														
0,063	0,080	0,000	0,058	0,000	0,028	0,056	0,000	0,058	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,123	0,124	0,032	0,027	0,109																																														
0,084	0,104	0,055	0,068	0,055	0,000	0,069	0,000	0,067	0,018	0,065	0,000	0,000	0,000	0,114	0,114	0,032	0,027	0,077																																														
0,082	0,102	0,055	0,068	0,055	0,000	0,069	0,000	0,067	0,018	0,065	0,000	0,000	0,000	0,114	0,114	0,032	0,027	0,090																																														
0,086	0,104	0,068	0,068	0,055	0,000	0,069	0,000	0,067	0,018	0,065	0,000	0,000	0,000	0,114	0,114	0,032	0,027	0,061																																														
0,063	0,081	0,000	0,000	0,058	0,028	0,056	0,000	0,057	0,024	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,075	0,095	0,057	0,065	0,000	0,028	0,056	0,000	0,066	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,089	0,087	0,066	0,065	0,000	0,028	0,056	0,000	0,066	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,051	0,058	0,000	0,000	0,000	0,028	0,056	0,000	0,066	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,051	0,058	0,000	0,000	0,000	0,028	0,056	0,000	0,066	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,051	0,058	0,000	0,000	0,000	0,028	0,056	0,000	0,066	0,066	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,063	0,081	0,000	0,013	0,013	0,073	0,071	0,013	0,074	0,074	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,105	0,100	0,104	0,104	0,104	0,122	0,120	0,131	0,098	0,100	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,078	0,096	0,010	0,013	0,013	0,073	0,071	0,013	0,074	0,074	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,074	0,090	0,010	0,017	0,017	0,069	0,066	0,079	0,010	0,070	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,058	0,079	0,017	0,017	0,017	0,069	0,066	0,079	0,010	0,070	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,058	0,079	0,017	0,017	0,017	0,069	0,066	0,079	0,010	0,070	0,065	0,000	0,000	0,000	0,104	0,124	0,000	0,027	0,061																																														
0,108	0,092	0,108	0,107	0,107	0,132	0,132	0,137	0,110	0,109	0,126	0,104	0,104	0,104	0,106	0,124	0,032	0,027	0,109																																														
0,059	0,000	0,078	0,078	0,078	0,099	0,098	0,104	0,081	0,081	0,087	0,058	0,058	0,058	0,080	0,102	0,097	0,090	0,090																																														
0,066	0,087	0,042	0,042	0,042	0,049	0,045	0,043	0,041	0,040	0,038	0,051	0,030	0,030	0,042	0,104	0,058	0,054	0,061																																														
0,062	0,083	0,040	0,040	0,040	0,049	0,045	0,043	0,041	0,040	0,038	0,051	0,030	0,030	0,042	0,104	0,058	0,054	0,061																																														
0,064	0,078	0,013	0,013	0,013	0,061	0,059	0,071	0,013	0,013	0,059	0,062	0,007	0,007	0,013	0,028	0,021	0,027	0,027																																														
0,009	0,063	0,065	0,064	0,064	0,092	0,089	0,094	0,065	0,065	0,062	0,055	0,055	0,055	0,065	0,106	0,082	0,076	0,065																																														
0,060	0,083	0,017	0,017	0,017	0,064	0,061	0,070	0,018	0,018	0,061	0,062	0,013	0,013	0,018	0,114	0,034	0,028	0,000																																														
0,107	0,078	0,101	0,100	0,100	0,127	0,126	0,136	0,102	0,128	0,125	0,092	0,093	0,093	0,101	0,114	0,034	0,028	0,000																																														
0,058	0,079	0,017	0,017	0,017	0,061	0,059	0,067	0,017	0,017	0,059	0,062	0,012	0,012	0,017	0,114	0,032	0,027	0,100																																														
1,227	1,182	1,116	1,108	1,108	1,112	1,134	1,168	1,120	1,111	1,213	1,199	1,199	1,199	1,096	1,124	1,121	1,096	1,129																																														
CP-381	CP-388	CP-397	CP-399	CP-400	CP-408	CP-409	CP-434	CP-444	CP-514	CP-205	CP-377	CP-382	CP-383	CP-384	CP-385	CP-386	CP-387	CP-398	CP-399	CP-392	CP-394	CP-395	CP-396	CP-401	CP-403	CP-404	CP-405	CP-435	CP-445	CP-448	CP-449	CP-450	CP-451	CP-452	CP-453	CP-454	CP-454	CP-469	CP-471	CP-472	CP-473	CP-474	CP-476	CP-477	CP-512	CP-513	CP-391	CP-455	CP-470	CP-389	CP-407	EF188279 G. lucidum	AB462322 G. lucidum	AF255100 Ganoderma sp.	AF255177 Ganoderma sp.	AJ608709 G. applanatum	AJ608712 Ganoderma sp.	AJ627584 G. phillipii	AY456341 G. lucidum	DQ425006 G. subambosinensis	DQ425008 G. lucidum	EF060011 G. adspersum	EF188277 G. lucidum	F. pallustris

Continuación de anexo E-2.

	AB46232Z G. lucidum	AF255100 Ganoderma sp.	AF255177 Ganoderma sp.	AJ608709 G. applanatum	AJ608712 Ganoderma sp.	AJ627394 G. philippii	AV456331 G. lucidum	DD425008 G. subamboniense	DD425008 G. lucidum	EF060011 G. dispersum	EF188277 G. lucidum	F. pallens
CP-417												
CP-381												
CP-388												
CP-397												
CP-399												
CP-400												
CP-408												
CP-409												
CP-434												
CP-444												
CP-446												
CP-514												
CP-205												
CP-367												
CP-377												
CP-392												
CP-393												
CP-384												
CP-385												
CP-386												
CP-387												
CP-398												
CP-399												
CP-392												
CP-394												
CP-395												
CP-398												
CP-401												
CP-403												
CP-404												
CP-405												
CP-435												
CP-445												
CP-448												
CP-448												
CP-450												
CP-461												
CP-462												
CP-463												
CP-464												
CP-468												
CP-471												
CP-472												
CP-472												
CP-474												
CP-476												
CP-512												
CP-513												
CP-515												
CP-391												
CP-455												
CP-470												
CP-445												
CP-339												
CP-407												
CP-406												
EF188279 G. lucidum												
AB46232Z G. lucidum	0.12											
AF255100 Ganoderma sp.	0.80	0.085	0.002	0.077	0.000	0.050	0.069	0.065	0.110	0.164	1.129	
AJ608709 G. applanatum	0.80	0.081	0.084	0.073	0.075	0.071	0.021	0.107	0.000	1.156		
AJ608712 Ganoderma sp.	0.47	0.108	0.080	0.077	0.084	0.084	0.025	0.108	1.133			
AJ627394 G. philippii	0.43	0.106	0.075	0.081	0.075	0.071	0.025	0.107	1.131			
AV456331 G. lucidum	0.60	0.106	0.081	0.083	0.080	0.084	0.025	0.107	1.126			
DD425008 G. subamboniense	0.85	0.110	0.083	0.083	0.083	0.083	0.025	0.107	1.131			
DD425008 G. lucidum	0.00	0.118	0.083	0.070	0.111	0.111	0.025	0.108	1.133			
EF060011 G. dispersum	0.05	0.040	0.072	0.076	0.046	0.039	0.025	0.066	0.000			
EF188277 G. lucidum	0.02	1.169	1.163	1.179	1.179	1.126	1.131	1.235	1.133			
F. pallens	1.29											

Anexo F

Análisis de varianza y comparación de medias.

Variable dependiente: Velocidad de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	130	3071.952038	23.630400	125.37	<.0001
Error	909	171.339537	0.188492		
Total correcto	1039	3243.291575			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	VC Media
0.947171	6.084761	0.434157	7.135154

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	130	3071.952038	23.630400	125.37	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	130	3071.952038	23.630400	125.37	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para VC

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 909
 Error de cuadrado medio 0.188492
 Valor crítico del rango estudentizado 6.27508
 Diferencia significativa mínima 0.9681
 Media armónica de tamaño de celdas 7.919395

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento				Media	N	TRAT
			A	11.2813	8	CP-470-B
B			A	10.8750	8	CP-405-B
B			A	10.6250	8	CP-453-B
B			A	10.3438	8	CO-405-E
B			D	10.3125	8	CP-388-E
B			D	10.2500	8	CP-398-B
B	E		D	10.0625	8	CP-398-E
B	E		D	10.0000	8	CP-453-E
	F		E	9.5500	8	CP-435-B
G	F		E	9.4000	8	CP-388-B
G	F		E	9.4000	8	CP-145-B
G	F		E	9.3500	8	CP-390-B
G	F		E	9.1750	8	CP-382-B
G	F		E	9.1667	6	CP-389-B
G	F		J	9.0250	8	CP-399-B
G	F		J	8.9500	8	CP-407-B

	G	F	J	H		I	K	8.9500	8	CP-470-E							
	G	F	J	H	L	I	K	8.9250	8	CP-409-B							
	G	F	J	H	L	I	K	8.9000	8	CP-475-B							
	G	F	J	H	L	I	K	8.8750	8	CP-377-B							
	G	F	J	M	H	L	I	K	8.8250	8	CP-385-B						
	G	F	J	M	H	L	I	K	8.8250	8	CP-408-B						
	G	F	J	M	H	L	I	K	8.8000	8	CP-449-B						
	G	F	N	J	M	H	L	I	K	8.7250	8	CP-407-E					
	G	O	F	N	J	M	H	L	I	K	8.6500	8	CP-145-E				
	G	O	F	N	J	M	H	L	I	K	8.6250	8	CP-452-B				
	G	O	F	N	J	M	H	L	I	K	8.6200	8	CP-532-B				
	G	O	P	N	J	M	H	L	I	K	8.5750	8	CP-444-B				
	G	O	P	N	J	M	H	L	I	K	8.5625	8	CP-474-B				
Q	G	O	P	N	J	M	H	L	I	K	8.4750	8	CP-399-E				
Q	R	O	P	N	J	M	H	L	I	K	8.3000	8	CP-389-E				
Q	R	O	P	N	J	M	H	L	I	K	8.2900	8	CP-472-B				
Q	R	O	P	N	J	M	S	L	I	K	8.2000	8	CP-403-B				
Q	R	O	P	N	J	M	S	L	I	K	8.2000	8	CP-390-E				
Q	R	O	P	N	J	M	S	L	I	K	8.2000	8	CP-446-B				
Q	R	O	P	N	J	M	S	L	T	K	8.1438	8	CP-392-B				
Q	R	O	P	N	J	M	S	L	T	K	8.1438	8	CP-397-B				
Q	R	O	P	N	M	S	L	T	K	8.0400	8	CP-382-E					
Q	R	O	P	N	U	M	S	L	T	K	8.0250	8	CP-377-E				
Q	R	O	P	N	U	M	S	L	T	K	8.0000	8	CP-451-E				
Q	R	O	P	N	U	M	S	L	T	K	7.9763	8	CP-445-B				
Q	R	O	P	N	U	M	S		T	V	7.8900	8	CP-510-B				
Q	R	O	P	N	U	M	S		T	V	7.8883	6	CP-395-B				
Q	R	O	P	N	U	M	S		T	V	7.8725	8	CP-205-B				
Q	R	O	P	N	U	M	S		T	V	7.8725	8	CP-395-E				
Q	R	O	P	N	U	M	S		T	V	7.8700	8	CP-510-E				
Q	R	O	P	N	U	S	W	T	V	7.8250	8	CP-475-E					
Q	R	O	P	U	X	S	W	T	V	7.7513	8	CP-387-B					
Q	R	O	P	Y	U	X	S	W	T	V	7.7075	8	CP-397-E				
Q	R	O	P	Y	U	X	S	W	T	V	7.6863	8	CP-385-E				
Q	R	Z	P	Y	U	X	S	W	T	V	7.6475	8	CP-452-E				
Q	R	Z	P	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.6400	8	CP-532-E			
Q	R	Z	P	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.6238	8	CP-409-E			
Q	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.5200	8	CP-473-B			
Q	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.5200	8	CP-513-B			
	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.5000	8	CP-451-B			
	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.4800	8	CP-38-BF			
	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.4788	8	CP-469-B			
	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.4788	8	CP-62-B			
C	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.4175	8	CP-381-B			
C	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	V	A	7.4175	8	CP-403-E			
C	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	D	V	A	7.3750	8	CP-469-E		
C	R	Z	B	Y	U	X	S	W	T	D	V	A	7.3750	8	CP-38-E		
C	E	Z	B	Y	U	X	S	W	T	D	V	A	7.2913	8	CP-383-E		
C	E	Z	B	Y	U	X	S	W	F	T	D	V	A	7.2750	8	CP-473-E	
C	E	Z	B	Y	U	X	S	W	F	T	D	V	A	7.2700	8	CP-455-B	
C	E	Z	B	Y	U	X	S	G	W	F	T	D	V	A	7.2513	8	CP-386-B
C	E	Z	B	Y	U	X		G	W	F	T	D	V	A	7.2088	8	CP-449-E
C	E	Z	B	Y	U	X		G	W	F	T	D	V	A	7.2000	8	CP-512-B
C	E	Z	B	Y	U	X	H	G	W	F	D	V	A	7.0625	8	CP-446-E	
C	E	Z	B	Y	X	H	G	W	F	D	V	A	7.0025	8	CP-471-B		
C	E	Z	B	Y	X	H	G	W	F	I	D	A	6.9000	8	CP-514-B		
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G	W	F	I	D	A	6.8750	8	CP-474-E	
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G	W	F	I	D	A	6.8750	8	CP-471-E	
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	A	6.8550	8	CP-406-E	
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	K	A	6.8338	8	CP-445-E
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	K	A	6.8200	8	CP-435-E
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	K	A	6.8200	8	CP-514-E
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	K	A	6.8013	8	CP-408-E
C	E	Z	B	Y	J	X	H	G		F	I	D	K	A	6.8013	8	CP-402-E
C	E	Z	B	Y	J		H	G		F	I	D	K	A	6.7650	8	CP-404-B
C	E	Z	B	J		H	G		F	I	D	K	A	6.6963	8	CP-392-E	
C	E	Z	B	J		H	G	L	F	I	D	K	A	6.6800	8	CP-511-E	
C	E		B	J		H	G	L	F	I	D	K	A	6.6775	8	CP-391-E	
C	E		B	J		H	G	L	F	I	D	K	A	6.6775	8	CP-387-E	
C	E		B	J		H	G	L	F	I	D	K	A	6.6763	8	CP-396-E	
C	E		B	J		H	G	L	F	I	D	K	A	6.6425	8	CP-381-E	
C	E		B	J		H	G	L	F	I	D	K		6.6400	8	CP-476-B	
C	E		B	J	M	H	G	L	F	I	D	K		6.6050	8	CP-367-B	
C	E		N	J	M	H	G	L	F	I	D	K		6.4838	8	CP-434-B	

E		N	O	J	M	H	G	L	F	I	D	K	6.4475	8	CP-448-B
E	P	N	O	J	M	H	G	L	F	I		K	6.3913	8	CP-205-E
E	P	N	O	J	M	H	G	L	F	I		K	6.3800	8	CP-513-E
	P	N	O	J	M	H	G	L	F	I		K	6.3100	6	CP-406-B
	P	N	O	J	M	H	G	L		I		K	6.2850	8	CP-455-E
	P	N	O	J	M	H		L		I		K	6.1725	8	CP-384-B
	P	N	O	J	M	H		L		I		K	6.1625	8	CP-434-E
	P	N	O	J	M	H		L		I		K	6.1563	8	CP-394-B
	P	N	O	J	M	Q		L		I		K	6.0175	8	CP-393-B
R	P	N	O	J	M	Q		L		I		K	6.0013	8	CP-472-E
R	P	N	O	J	M	Q		L		I		K	5.9500	8	CP-512-E
R	P	N	O	J	M	Q		L		S		K	5.9088	8	CP-66-EM
R	P	N	O	T	M	Q		L		S		K	5.8800	8	CP-447-B
R	P	N	O	T	M	Q		L		S		K	5.8775	8	CP-402-B
R	P	N	O	T	M	Q		L		S			5.7238	8	CP-450-B
R	P	N	O	T	M	Q		L		S			5.7225	8	CP-66-BF
R	P	N	O	T	M	Q		L		S			5.7225	8	CP-386-E
R	P	N	O	T	M	Q				S			5.6600	8	CP-444-E
R	P	N	O	T	M	Q				S			5.6438	8	CP-393-E
R	P	N	O	T		Q				S			5.5963	8	CP-396-B
R	P	N	O	T		Q				S			5.5900	8	CP-511-B
R	P	U	O	T		Q				S			5.4863	8	CP-394-E
R	P	U		T		Q				S			5.4750	8	CP-448-E
R		U		T		Q				S		V	5.1738	8	CP-404-E
R		U		T		Q		W		S		V	5.0550	8	CP-384-E
R		U		T				W		S		V	5.0367	6	CP-391-B
		U		T				W		S		V	4.9588	8	CP-476-E
		U		T		X		W		S		V	4.9175	8	CP-367-E
		U				X		W		Y		V	4.5750	8	CP-454-B
		U				X		W		Y		V	4.5250	8	CP-447-E
						X		W		Y		V	4.4750	8	CP-42-BF
		Z				X		W		Y		V	4.2137	8	CP-400-B
		Z				X		W		Y			4.2025	8	CP-454-E
		Z	A			X				Y			3.9700	8	CP-62-EM
		Z	A							Y			3.8638	8	CP-401-B
		Z	A							Y			3.7700	8	CP-400-E
		Z	A							Y			3.7500	8	CP-42-EM
		Z	A			B							3.4563	8	CP-477-B
		Z	A			B							3.3775	8	CP-477-E
			A			B							3.0488	8	CP-401-E
						B									

Anexo G

Números de acceso de la base de datos (EBI) *European Bioinformatics Institute* y referencias de las secuencias utilizadas en este trabajo.

Género y subgénero	especies	Número de acceso al (EBI)	Referencia
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	sp.	AJ608712	Bougher (No publicada).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	<i>philippii</i>	AJ627584	Bougher (No publicada).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	sp.	AF255177	Monvalco y Buchanan (2008).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	<i>aplanatum</i>	AJ608709	Bougher (No publicada).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	<i>subamboinense</i>	DQ425006	Su <i>et al.</i> (No publicada).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	<i>adpersum</i>	EF060011	Terho (No publicada).
<i>Ganoderma / Elfvigia</i>	sp.	AF255110	Monvalco y Buchanan (2008).

<i>Ganoderma / Ganoderma</i>	<i>lucidum</i>	AY456341	Edwards (2004).
<i>Ganoderma / Ganoderma</i>	<i>lucidum</i>	DQ425008	Su <i>et al.</i> (No publicada).
<i>Ganoderma / Ganoderma</i>	<i>lucidum</i>	AB462322	Sotome (No publicada).
<i>Ganoderma / Ganoderma</i>	<i>lucidum</i>	EF188279	Jia (No publicada).
<i>Ganoderma / Ganoderma</i>	<i>lucidum</i>	EF188277	Jia (No publicada).
<i>Fomitopsis</i>	<i>palustris</i>	EU024964	Kim <i>et al.</i> (2009).