

Posibilidades de cultivo de *Ganoderma resinaceum* Boud. (Basidiomycetes, Ganodermataceae) en Cuba*

Nelis BLANCO HERNÁNDEZ**, Sara HERRERA FIGUEROA** y Teresa CABRERA NEVOT**†

ABSTRACT. Numerous species of genera *Ganoderma* are used in the traditional oriental pharmacopeias to the treatment of a wide range of illnesses (the medicine traditional Chinese uses habitually *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst.). Although In Cuba several species exist in this genera, they are not used by the people, neither their medicinal properties are known. However, there are possibilities that species that inhabit our archipelago have similar compound to Asian species. These compound can be used in the medicine. In many Asian countries, due to the demand, they are no longer enough the fruitful bodies collected in the nature and they are cultivated under artificial conditions. This paper has the objective to demonstrate the possibility of culture of *Ganoderma* and obtain enough fruit bodies to prove their medicinal properties in future works. There were tested in Petri dishes of the micelial growth of the Cuban strains 4-93 of *Ganoderma resinaceum* Boud. 1889 on sawdust of: *Aucomea klaineana* Pierre, *Terminalia ivorensis* A. Chef., *Picea abies* (L.) Karst. and *Saccharum officinarum*, L. all enriched with wheatpeel. Different inoculate were also tested and the culture of this species in of polipaper bags for autoclaves obtaining fruit bodies very developed of this species under pilot plant conditions with half-controlled temperature and humidity.

KEY WORDS. *Ganoderma*, culture, medicinal properties

INTRODUCCIÓN

Muchas especies de hongos superiores sintetizan compuestos que son biológicamente activos, entre los que se destacan terpenos, ácidos y polisacáridos. Numerosas especies de este grupo son utilizadas en las farmacopeas tradicionales orientales para tratar una amplia gama de enfermedades (la medicina tradicional china utiliza corrientemente «*Ganoderma lucidum*» conocida como «Lingzhi» en China o «Reishi» en Japón (Ying *et al.*, 1987, Zhao, 1989, Soo, 1994).

Se recomiendan para mantener la salud, la juventud, y hacer longevos a sus consumidores. Para su consumo se hacen infusiones o extractos alcohólicos. Miyazaki y Nishijima (1981) reportan actividades antitumorales en polisacáridos solubles en agua de *Ganoderma lucidum*. Mizuno y colaboradores (1985) mencionan la actividad antitumoral de los polisacáridos insolubles en agua obtenidos de los cuerpos fructíferos de esta misma especie.

En algunos países asiáticos como Japón, China, Tailandia, etc., los cuerpos fructíferos colectados en la naturaleza no satisfacen las necesidades y se ha desarrollado, con buenos resultados, el método de cultivo en bolsas de polipapel.

En Cuba, aunque existen varias especies de *Ganoderma* no se utilizan por la población, ni se conocen sus propiedades medicinales. Constituyen además hongos de la pudrición blanca de la madera que degradan la lignina por vía de una serie de enzimas extracelulares (lacasas, manganeso peroxydasas, etc.) que les permiten colonizar y degradar los principales constituyentes del sustrato leñoso (lignina, celulosa). Estas enzimas han interesado desde hace tiempo a los biotecnólogos a causa de sus aplicaciones industriales, en procesos de polución y degradación de moléculas producidas por la actividad humana.

Trabajos recientes han reportado la presencia de metabolitos secundarios (esteroles y lanostanoides) en extractos no polares

de *G. applanatum* (Pers.) Pat. y *G. resinaceum*, los cuales se consideran que son los parcialmente responsables de la actividad biológica de *G. lucidum*, sugiriendo la posibilidad de utilizarlos en la formulación de complementos alimenticios y alimentos funcionales (Trigos *et al.*, 2008).

En el presente trabajo nos proponemos demostrar la posibilidad de cultivar especies de *Ganoderma* en bolsas de polipapel con distintos sustratos lignocelulósicos desechos de la agricultura o de agroindustrias, con el fin de aprovechar sus propiedades medicinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa cubana 4-93 del Instituto de Ecología y Sistemática, de la especie *Ganoderma resinaceum*, colectada por N. Blanco sobre tronco vivo de *Ficus* sp. el 18 de septiembre de 1993 en la localidad “El Cacahual”, en Ciudad de La Habana.

I- Experiencia en placas.

Se utilizaron aserrines de diferentes plantas y otros sustratos, con o sin aditivos con el fin de determinar el crecimiento en cada uno de ellos. Los sustratos probados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustratos utilizados para el crecimiento de la cepa 4-93 en placas de Petri.

Sustrato	Porcentaje	Salvado de trigo (%)	Trigo (%)
<i>Aucomea klaineana</i> Pierre	70	30	---
<i>Aucomea klaineana</i> Pierre	70	20	10
<i>Terminalia ivorensis</i> A. Chef.	70	30	---
<i>Terminalia ivorensis</i> A. Chef.	60	20	10
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	70	30	---
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	60	20	10
<i>Saccharum officinarum</i> L.	70	30	---
<i>Saccharum officinarum</i> L.	60	20	10

*Manuscrito aprobado en Marzo de 2009.

**Instituto de Ecología y Sistemática, A. P. 8029, C. P. 10800, La Habana, Cuba.

Se utilizaron placas de 120 X 25 mm. La humedad de sustrato fue del 65%. Se esterilizaron en autoclave 2 días consecutivos a 1.2 atm de presión durante una hora diaria. Se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se sembraron con discos de 7 mm de diámetro tomados del borde de los cultivos en crecimiento en agar malta al 2%.

Se midió el diámetro a la semana de sembrados. Se hicieron los análisis estadísticos ANOVA y DUNCAN.

II- Prueba de inóculo en pomos de cristal.

Se utilizaron como soportes puros de inóculo los granos de: *Triticum vulgare* (Trigo), *Zea mays* (Maíz), así como médula de *Hibiscus cannabinus* L. (kenaf) al 35 y 75% de humedad respectivamente, con el objetivo de determinar el crecimiento en cada uno de ellos y comparar el resultado entre dos soportes ricos en nutrientes y otro pobre pero que ha tenido éxito en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Todos los sustratos fueron remojados previo a su esterilización durante una hora para que absorbieran agua. Se esterilizaron en autoclave a 1.2 atm de presión, durante una hora. Se envasaron en frascos de cristal de boca ancha de 450 ml y se llenaron hasta el cuello con cada sustrato humedecido. Se sembraron con discos de 7 mm de diámetro tomados del borde de los cultivos en crecimiento en agar malta al 2%. Se midió semanalmente el crecimiento micelial vertical.

III. Cultivo en bolsas.

Para la preparación del inóculo se tuvo en cuenta el resultado de las pruebas de inóculo del experimento anterior. Se llenaron frascos de cristal hasta el cuello con el soporte seleccionado (según el experimento II), esterilizaron por 2 días consecutivos, 1 hora diaria a 1,2 atm de presión y se sembraron con porciones de micelio en activo crecimiento en agar malta al 2%. Se incubaron en una incubadora refrigerada Gallenkamp a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta que el micelio cubrió todo el sustrato contenido en el frasco.

Para el cultivo propiamente dicho se emplearon bolsas autoclaveables de 24.5 x 1.5 cm. La mezcla empleada fue aserrín de *Picea abies* (L.) Karst. enriquecida con salvado de trigo (70 y 30% respectivamente) y con humedad del 65%. Se llenaron a razón de 450 gr por bolsa y se esterilizó la mezcla en dichas bolsas durante 1 hora a 1,2 atm de presión. Se dejaron enfriar en el cuarto de cultivo y se sembraron con el inóculo al 6%. Se taparon con tapones de algodón. Se pusieron en el cuarto de incubación a temperatura ambiente y oscuridad hasta lograr la completa colonización de la bolsa. Después que el micelio cubrió el sustrato, se les dió cuatro semanas más para la completa maduración del micelio antes de abrir las bolsas.

Las bolsas se abrieron a las 11 semanas de sembradas. En el cuarto de fructificación se pusieron de forma horizontal en cajas plásticas, y quedaron sujetas al régimen natural diario de luz y oscuridad (440 Lux-1400 Lux), y regadío 2 veces al día para una oscilación de la humedad relativa de 35-94% medidos con un psicrómetro antes y después del riego. Al principio de estar en este cuarto las bolsas fueron cubiertas con una lámina de polietileno para inducir la fructificación según Triratana et al. (1991). Luego se les quitó ésta y se dejaron que fructificaran.

Las bolsas se midieron semanalmente. Las mediciones se hacían determinando la cantidad de centímetros que el micelio había ido cubriendo desde el ápice hasta la base de la bolsa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los resultados del experimento I en placas de Petri con diferentes sustratos se analizaron mediante un análisis de clasificación simple, que involucra un arreglo factorial de los tratamientos cepa-sustratos (ANOVA). Se obtuvo diferencia significativa entre sustratos y no significativa en la interacción cepa-sustrato. Las diferencias entre medias se detectaron por una prueba de Duncan. Se obtuvo diferencia significativa entre tratamientos, entre sustratos y sustancias aditivas, no así en la correlación entre estos dos últimos. Hubo diferencias significativas entre el sustrato de aserrín de *Aucomea klaineana* y el resto de los sustratos pero no hubo diferencias significativas en el tipo de sustrato y aditivos (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Resultados del ANOVA.

Fuente de variación	I
Tipo de sustrato (A)	*
Aditivo (B)	XXX
A X B	N.S

P<0.05

P<0.001

N.S. no significativo

Tabla 3. Resultados del análisis de los valores promedios de la colonización de la cepa 4-93 según el tipo de sustrato empleado (DUNCAN). Leyenda: S I: *Aucomea klaineana*, S II: *Terminalia ivorensis*, S III: *Picea abies*, S IV: *Saccharum officinarum*.

S I	S II	S III	S IV
6.89 ^a	6.31 ^{ab}	6.03 ^b	5.74 ^b

Los medios con letras comunes no difieren significativamente a $P < 0,05$ por medio de la prueba de Duncan como se muestra en el Fig. 1.

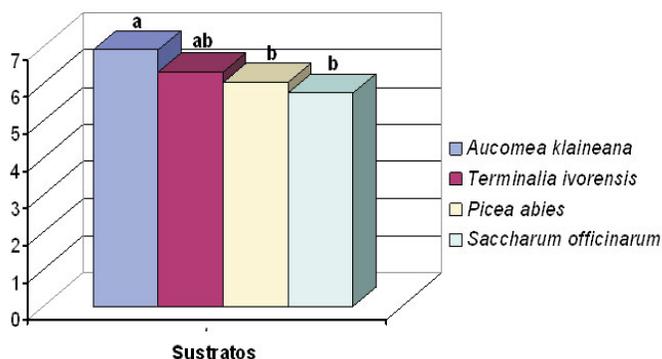


Fig. 1. Resultado del Duncan para $P < 0,05$ según los sustratos empleados.

Según Quimio (1986) y Triratana *et al.* (1991) el inóculo se realiza en granos de cereales. Nosotros, debido a la competencia que tienen los cereales en el país con la alimentación humana y animal, utilizamos en el experimento II dos soportes ricos en nutrientes y la médula de Kenaf que es pobre en nutrientes pero con los que se han obtenido resultados positivos de uso como soporte de inóculo en el cultivo de *Pleurotus*, para así comparar el crecimiento micelial de esta especie sobre diferentes materiales. El micelio creció rápidamente sobre los granos de trigo y maíz, llegando a colonizarlos totalmente a la tercera semana de sembrados (Fig. 2). Sin embargo solo creció sobre el a fructificar, 4 tuvieron primordios a los 13 días y en una se obtiene un basidioma bien diferenciado en píleo y estípites a los 32 días de permanencia en este cuarto. A pesar de que entre nuestros objetivos no estaba el determinar número de cosechas y eficiencias biológicas, una de las bolsas produjo dos cosechas con aproximadamente 15 días de intervalo. Durante el mes de agosto hubo dificultades en mantener una humedad relativa alta, por lo que varios cuerpos fructíferos abortaron y puede ser la causa del bajo peso de los colectados en el mes de septiembre.

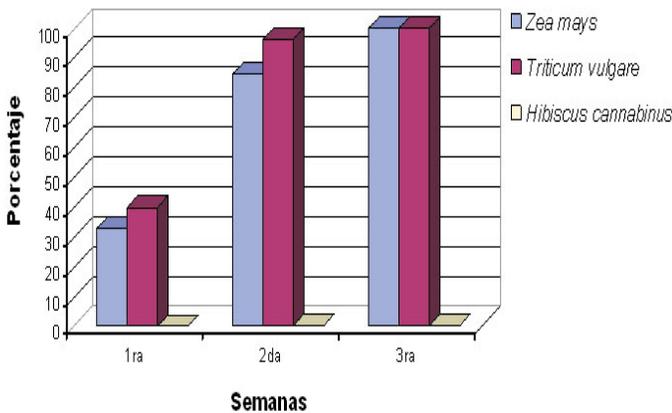


Fig. 2. Crecimiento micelial de la cepa 4-93 sobre diferentes soportes de inóculo.

CONCLUSIONES

- ♦ La cepa de *Ganoderma* utilizada crece en todos los sustratos probados.
- ♦ Los mejores soportes para inóculo son los granos.
- ♦ El sustrato de viruta de gimnosperma con salvado de trigo logró inocular las bolsas de fructificación.

- ♦ En el sustrato de aserrín de gimnosperma más salvado de trigo se produjeron diferentes fructificaciones normales de la especie de *Ganoderma* probada.
- ♦ Es factible producir cuerpos fructíferos de *Ganoderma resinaceum* en bolsas de polipapel.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido posible gracias al financiamiento del Programa Ramal Sistemática y Colecciones Biológicas, su conservación, mantenimiento y exhibición, del CITMA, Cuba, y del Consejo Inter-universitario de la Comunidad Francesa de Bélgica: Cooperación Universitaria para el Desarrollo (proyecto CIUF-CUD-MUCL- Cuba) así como de la Iniciativa Darwin, del Reino Unido.

REFERENCIAS

- Miyazaki, T., y M. Nishijima. 1981. Studies of Fungal Polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3611-3616.
- Mizuno, T., E. Suzuki, K. Maki, y H. Tamaki. 1985. Fractionation, chemical modification and antitumor activity of water-insoluble polysaccharides of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi* 59: 1143-1151.
- Quimio, T.H. 1986. Culturing *Ganoderma* the "Pleurotus-way". *Mushroom Newsletter for the tropics* 6 (4): 12-13.
- Soo T. W. 1994. The therapeutic value of *Ganoderma lucidum*. Proc. Contr. Symp. 5th IMC, Vancouver: 105-113.
- Trigos Landa, A., J. Suárez Medellín, FL. Guadarrama Acosta, M. Luna Rodríguez. 2008. *Aislamiento de esteroides a partir de dos especies del género Ganoderma*. VI Congreso Latinoamericano de Micología: libro de resúmenes. 1ª ed. Buenos Aires: Asociación Latinoamericana de Micología (ALM). 195p. ISBN 978-987-24692-0-7.
- Triratana, S., S. Thaithatgoon, y M. Gawgla. 1991. *Cultivation of Ganoderma lucidum in sawdust bags*. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher, M.J. (ed) Balkema, Rotterdam. ISBN 90 54100214.
- Ying J., X. Mao, Q. Ma, Y. Zong, y H. Wen. 1987. *Icons of medicinal fungi from China*. Science Press, Beijing. 575pp. ISBN 7-03-000195-8.
- Zhao J. D. 1989. *The Ganodermataceae in China*. Bibliotheca mycologica 132. J. Cramer, Berlin, 76pp.