



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Jessica Valeria Guerrero Torres
Ingeniero Biotecnólogo

Identificación de los genes involucrados en la síntesis de β -glucanos en
Ganoderma lucidum

Dirigida por

Dr. Claudio Garibay Orijel
Dr. Roberto Garibay Orijel

México, D. F. Agosto, 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 09 del mes de Agosto del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:
 Identificación de los genes involucrados en la síntesis de β-glucanos en Ganoderma lucidum

Presentada por la alumna:

 Guerrero
Apellido paterno

 Torres
Apellido materno

 Jessica Valeria
Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	9	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

 Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Roberto Garibay Orijel

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

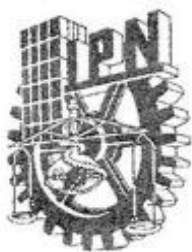
Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Jesús Agustín Badiillo Corona



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

Dr. Edgar Salgado Manjarrez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D. F. el día 09 del mes Agosto del año 2010, la que suscribe Jessica Valeria Guerrero Torres alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B081957, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Claudio Garibay Orijel y del Dr. Roberto Garibay Orijel y cede los derechos del trabajo intitulado Identificación de los genes involucrados en la síntesis de β -glucanos en *Ganoderma lucidum*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jvaleriaguerrero@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IBT. Jessica Valeria Guerrero Torres

Declaración de originalidad

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



IBT. Jessica Valeria Guerrero Torres.



Vo. Bo. Dr. Claudio Garibay Orijel



Vo. Bo. Dr. Roberto Garibay Orijel

Créditos

Agradezco al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, por la facilitación de la cepa 796, la orientación proporcionada y por permitirme hacer uso del laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles del INECOL, Xalapa. Agradezco al Dr. Rigoberto Gaitán Hernández, a la Dra. Dulce María Salmones Blásquez y al Biólogo Carlos Ortega por su apoyo en el laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles del INECOL, Xalapa.

Agradezco al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, del Colegio de Postgraduados de Puebla, por las cepas y fructificaciones proporcionadas.

Agradezco a los miembros de la comisión revisora por el tiempo dedicado a la dirección y revisión de la presente investigación.

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Roberto Garibay Orijel

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Agradezco a CONACyT por la beca No. 220510 otorgada para la realización de este trabajo.

Agradecimientos

A ti Dios por haberme dado la fortaleza necesaria para llegar al final de esta etapa de mi vida, ke debo admitir no fue nada fácil.

A ti mama y a ti papa, por aguantar mi mal carácter y esos kambios tan repentinos en mi estado de ánimo, porque están conmigo en las buenas y en las malas, por sus regaños, sus sonrisas, su presencia.....por ser mis papas.....los mejores de todo el mundo.....LOS AMO.....

A ti Neno por ser mi hermanito y por no dejarme sola, por cuidarme y quererme muxo...por sakarme una sonrisa kuando estaba tan sttressada y porke kuando llegaba toda kansada de la eskuela me llevabas kasi de los cabellos al Gym...jajaja....yaaaaaa ceveroo....

A ustedes pipis, ever, barbie y billo por prestarme su compu y su internet para hacer las tareas kuando yo no tenía..a y por los discos lightscribe jajaja...y no kreas que se me olvido barbie...gracias por ayudarme a chekar las referencias...

A ustedes ivanson, tere, karen y chikitito porque aunque están lejos, el escucharlos me daba ánimos para terminar pronto e ir a visitarlos....los extrañooo....

A ti Claudio porque además de ser un excelente asesor y director de tesis, fuiste un gran amigo...porque siempre fuiste muy comprensivo, porque siempre escuchabas mis boberías, porque me dabas consejos (por cierto...todos los tengo muy presentes), porque nunca me pusiste obstáculos mal plan y principalmente por todo el conocimiento que me transmitiste.

A ti Roberto por enseñarme mas acerca de los hongos y por resolver mis dudas cuando te lo pedía.....aunke fuera domingo a las 9 pm jajaja....y porque siempre conté con tu apoyo....

A ti O°o ke durante mucho tiempo formaste parte de mi vida y lo sigues haciendo.... porque no creas ke ya olvide que tú me metiste esta idea en la cabeza...Mi-e dor de tine mio.

A ti Massi por seguir siendo mi mejor amiga.....sabes ke tkm y puedes contar conmigo siempre.

A ti..kGz...(aunque se ke probablemente jamás lo leerás).....por estar conmigo siempre y por darme kariño y apoyo en los momentos difíciles, nunk lo olvidaré....

A ti Mony por ser una super amiga y confidente...porke siempre comprendiste mis lokuras y mis tarugadas... será porke estamos igual de lokas????..y porke cuando necesité tu ayuda nunca me la negaste..

A ustedes Montse, Lara y Rafa, Diana, Marisol, Cesar, Jonas, Hernan, Lalo (muegano), Paola, Ricardo, Octavio, Elier y Pamela por ser personas tan agradables y porque cuando les pedí un favor jamás me lo negaron.

DEDICADO A Todas las personas que amo y a mis tíos Manuel Ramírez Olvera, José Luis Torres Ramírez y Pedro Guerrero Rodríguez.

Contenido

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	i
Declaración de originalidad	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Acta de revisión.....	v
Créditos.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tablas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de los hongos.....	1
1.1.1. Nutrición de los hongos.....	2
1.1.2. Clasificación del reino de los Hongos	3
1.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	4
1.2.1. Usos medicinales de <i>G. lucidum</i>	6
1.2.2. Compuestos bioactivos de <i>G. lucidum</i>	7
1.2.3. Polisacáridos de <i>G. lucidum</i>	7
1.2.4. β -D-glucanos.....	8
1.2.5. Metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos	10
1.2.6. Producción y mercado de <i>G. lucidum</i> y sus derivados.....	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos.....	12
2.2. Genoma de <i>G. lucidum</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Estrategia experimental	16
5.2. Conservación de las cepas	16
5.3. Secuenciación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum s.l.</i>	17
5.3.1. Extracción de ADN de <i>G. lucidum s. l.</i>	17
5.3.2. Amplificación por PCR de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum s.l.</i>	18
5.4. Análisis del metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos y diseño de iniciadores.....	19
5.5. Búsqueda de las secuencias correspondientes a los iniciadores diseñados en el genoma de <i>G. lucidum s.l.</i>	21
5.6. Purificación de ADN por electroforesis.....	24
5.7. Secuenciación	25

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1. Caracterización de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>Ganoderma lucidum</i> s.l.....	27
6.2. Diseño de iniciadores.....	29
6.3. Identificación de secuencias en el genoma de <i>G. lucidum</i> s. l.....	32
6.4. Secuenciación	37
7. CONCLUSIONES.....	44
8. REFERENCIAS.....	45

Índice de Figuras

Figura 1. Filogenia del reino de los Hongos (Hibbett et al., 2007).....	4
Figura 2. Fructificación de la cepa 382 de <i>G. lucidum</i> s. l. donada por el COLPOS, Puebla.....	5
Figura 3. β -(1,3)(1,6)-D-glucanos (Hung et al., 2008).	9
Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos y enzimas participantes	10
Figura 5. Estrategia experimental para la obtención de secuencias correspondientes a los genes involucrados en la síntesis de β -(1,3)-D-Glucanos.	16
Figura 6. Región conservada en el alineamiento de secuencias para el diseño de iniciadores.....	20
Figura 7. Amplificación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum</i> s.l.....	27
Figura 8. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas β -fructofuranosidasa, α -glucosidasa y Fosfoglucomutasa.	34
Figura 9. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas Hexocinasa y UDP-glucosa pirofosforilasa.....	35
Figura 10. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas (1,3)- β -glucano sintetasa y Fosfoglucomutasa.	35
Figura 11. Cromatograma incorrecto del fragmento amplificado con los iniciadores FOS31LbF y FOS1123LbR.....	38
Figura 12. Ubicación de los fragmentos 1 y 2 de <i>G. lucidum</i> s. l.....	41
Figura 13. Árbol filogenético del fragmento 1 de <i>G. lucidum</i> s. l. obtenido con los iniciadores [BGS547UmF BGS2113UmR]	42
Figura 14. Árbol filogenético del fragmento 2 de <i>G. lucidum</i> s. l. obtenido con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR].....	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Reino de los Hongos y organismos similares (Blackwell y Spatafora, 2004).....	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>G. lucidum</i> (NCBI taxonomy).....	5
Tabla 3. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos en basidiomicetos	13
Tabla 4. Genes correspondientes a enzimas de <i>G. lucidum</i>	14
Tabla 5. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	18
Tabla 6. Iniciadores y programa de PCR utilizados (Gardes y Bruns, 1993).....	19
Tabla 7. Organismos utilizados como base en el diseño de iniciadores	21
Tabla 8. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	22
Tabla 9. Programa de PCR utilizado para cada par de iniciadores	22
Tabla 10. Análisis de similitud de las secuencias ITS de las cepas 382, 145 y 796, con secuencias depositadas en el GenBank	28
Tabla 11. Secuencia y características de los iniciadores diseñados.....	31
Tabla 12. Fragmentos obtenidos por PCR con cada par de iniciadores.	32
Tabla 13. Concentración óptima de $MgCl_2$ en la PCR para cada par de iniciadores.....	36
Tabla 14. Resultados de la secuenciación de los fragmentos obtenidos con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR], [BGS547UmF y BGS2113UmR], [BGS2947UmF y BGS3561UmR] y [BFF658UmF y BFF1128UmR]	38
Tabla 15. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR], con secuencias depositadas en el GenBank.....	39
Tabla 16. Secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR].....	40

Resumen

Ganoderma lucidum es un macromiceto económica y culturalmente importante a nivel mundial, debido a sus propiedades medicinales. Esta especie contiene diferentes compuestos bioactivos, entre los que se encuentran principalmente polisacáridos con efectos inmunomoduladores, anticancerígenos y radioprotectores. Polisacáridos de *G. lucidum* tales como β -D-glucanos se han aislado y caracterizado siendo los β -(1,3)(1,6)-D-glucanos los principales. La ruta metabólica para la síntesis de β -(1,3)-D-glucanos ha sido propuesta para diversos organismos, incluyendo a *G. lucidum*. Con base en estos antecedentes las enzimas que participan en la formación de los β -(1,3)-D-glucanos a partir de sacarosa son la α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa.

Los objetivos de este trabajo fueron, diseñar iniciadores para identificar la secuencia de los genes correspondientes a las enzimas α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa en *G. lucidum* y posteriormente obtener la secuencia de estos genes. Los iniciadores fueron diseñados realizando una búsqueda de los genes que participan en la síntesis de estos polisacáridos, en organismos similares a *G. lucidum*, debido a que estos genes aun no han sido elucidados para este hongo. Después, con la aplicación de PCR se probaron los iniciadores utilizando ADN extraído de la cepa 382 de *G. lucidum* s. l. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y analizados en el GenBank. Se logró identificar la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa de este hongo.

Abstract

Ganoderma lucidum is a macromycete economically and culturally important in the globe, because of its medicinal properties. This species contain different bioactive compounds, including polysaccharides that have demonstrated immunomodulatory anticancer and radioprotective effects. These polysaccharides have been isolated and characterized, being β -(1,3)(1,6)-D-glucans the most representative structure. The metabolic pathway for the synthesis of β -(1,3)-D-glucans has been proposed for various organisms, including *G. lucidum*. Based on these background the enzymes involved in the synthesis of β -(1,3)-D-glucans from sucrose are: α -glucosidase, β -fructofuranosidase, hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase and (1,3)- β -glucan synthase.

The objectives of this study were, to design primers to identify the sequence of genes for enzymes α -glucosidase, β -fructofuranosidase, hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase and (1,3)- β -glucan synthase in *G. lucidum* and then to obtain the sequence of these genes. The primers were designed by searching for genes involved in the synthesis of these polysaccharides in organisms similar to *G. lucidum*, because these genes have not been yet elucidated for this fungus. Then, with the application of PCR, primers were tested using DNA extracted from *G. lucidum* s. l. strain 382. The fragments were sequenced and analyzed in the GenBank. We identified the enzyme (1,3)- β -glucan synthase of this fungus.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Jessica Valeria Guerrero Torres
Ingeniero Biotecnólogo

Identificación de los genes involucrados en la síntesis de β -glucanos en
Ganoderma lucidum

Dirigida por

Dr. Claudio Garibay Orijel
Dr. Roberto Garibay Orijel

México, D. F. Agosto, 2010

Declaración de originalidad

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



IBT. Jessica Valeria Guerrero Torres.



Vo. Bo. Dr. Claudio Garibay Orijel



Vo. Bo. Dr. Roberto Garibay Orijel

Resumen

Ganoderma lucidum es un macromiceto económica y culturalmente importante a nivel mundial, debido a sus propiedades medicinales. Esta especie contiene diferentes compuestos bioactivos, entre los que se encuentran principalmente polisacáridos con efectos inmunomoduladores, anticancerígenos y radioprotectores. Polisacáridos de *G. lucidum* tales como β -D-glucanos se han aislado y caracterizado siendo los β -(1,3)(1,6)-D-glucanos los principales. La ruta metabólica para la síntesis de β -(1,3)-D-glucanos ha sido propuesta para diversos organismos, incluyendo a *G. lucidum*. Con base en estos antecedentes las enzimas que participan en la formación de los β -(1,3)-D-glucanos a partir de sacarosa son la α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa.

Los objetivos de este trabajo fueron, diseñar iniciadores para identificar la secuencia de los genes correspondientes a las enzimas α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa en *G. lucidum* y posteriormente obtener la secuencia de estos genes. Los iniciadores fueron diseñados realizando una búsqueda de los genes que participan en la síntesis de estos polisacáridos, en organismos similares a *G. lucidum*, debido a que estos genes aun no han sido elucidados para este hongo. Después, con la aplicación de PCR se probaron los iniciadores utilizando ADN extraído de la cepa 382 de *G. lucidum* s. l. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y analizados en el GenBank. Se logró identificar la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa de este hongo.

Abstract

Ganoderma lucidum is a macromycete economically and culturally important in the globe, because of its medicinal properties. This species contain different bioactive compounds, including polysaccharides that have demonstrated immunomodulatory anticancer and radioprotective effects. These polysaccharides have been isolated and characterized, being β -(1,3)(1,6)-D-glucans the most representative structure. The metabolic pathway for the synthesis of β -(1,3)-D-glucans has been proposed for various organisms, including *G. lucidum*. Based on these background the enzymes involved in the synthesis of β -(1,3)-D-glucans from sucrose are: α -glucosidase, β -fructofuranosidase, hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase and (1,3)- β -glucan synthase.

The objectives of this study were, to design primers to identify the sequence of genes for enzymes α -glucosidase, β -fructofuranosidase, hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase and (1,3)- β -glucan synthase in *G. lucidum* and then to obtain the sequence of these genes. The primers were designed by searching for genes involved in the synthesis of these polysaccharides in organisms similar to *G. lucidum*, because these genes have not been yet elucidated for this fungus. Then, with the application of PCR, primers were tested using DNA extracted from *G. lucidum* s. l. strain 382. The fragments were sequenced and analyzed in the GenBank. We identified the enzyme (1,3)- β -glucan synthase of this fungus.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 09 del mes de Agosto del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:
 Identificación de los genes involucrados en la síntesis de β-glucanos en Ganoderma lucidum

Presentada por la alumna:

 Guerrero
Apellido paterno

 Torres
Apellido materno

 Jessica Valeria
Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	9	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

 Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Roberto Garibay Orijel

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

Dr. Edgar Salgado Manjarrez
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Créditos

Agradezco al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, por la facilitación de la cepa 796, la orientación proporcionada y por permitirme hacer uso del laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles del INECOL, Xalapa. Agradezco al Dr. Rigoberto Gaitán Hernández, a la Dra. Dulce María Salmones Blásquez y al Biólogo Carlos Ortega por su apoyo en el laboratorio de Cultivo de Hongos Comestibles del INECOL, Xalapa.

Agradezco al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, del Colegio de Postgraduados de Puebla, por las cepas y fructificaciones proporcionadas.

Agradezco a los miembros de la comisión revisora por el tiempo dedicado a la dirección y revisión de la presente investigación.

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Roberto Garibay Orijel

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Agradezco a CONACyT por la beca No. 220510 otorgada para la realización de este trabajo.

Agradecimientos

A ti Dios por haberme dado la fortaleza necesaria para llegar al final de esta etapa de mi vida, ke debo admitir no fue nada fácil.

A ti mama y a ti papa, por aguantar mi mal carácter y esos kambios tan repentinos en mi estado de ánimo, porque están conmigo en las buenas y en las malas, por sus regaños, sus sonrisas, su presencia.....por ser mis papas.....los mejores de todo el mundo.....LOS AMO.....

A ti Neno por ser mi hermanito y por no dejarme sola, por cuidarme y quererme muxo...por sakarme una sonrisa kuando estaba tan sttressada y porke kuando llegaba toda kansada de la eskuela me llevabas kasi de los cabellos al Gym...jajaja....yaaaaaa ceveroo....

A ustedes pipis, ever, barbie y billo por prestarme su compu y su internet para hacer las tareas kuando yo no tenía..a y por los discos lightscribe jajaja...y no kreas que se me olvido barbie...gracias por ayudarme a chekar las referencias...

A ustedes ivanson, tere, karen y chikitito porque aunque están lejos, el escucharlos me daba ánimos para terminar pronto e ir a visitarlos....los extrañooo....

A ti Claudio porque además de ser un excelente asesor y director de tesis, fuiste un gran amigo...porque siempre fuiste muy comprensivo, porque siempre escuchabas mis boberías, porque me dabas consejos (por cierto...todos los tengo muy presentes), porque nunca me pusiste obstáculos mal plan y principalmente por todo el conocimiento que me transmitiste.

A ti Roberto por enseñarme mas acerca de los hongos y por resolver mis dudas cuando te lo pedía.....aunke fuera domingo a las 9 pm jajaja....y porque siempre conté con tu apoyo....

A ti O°o ke durante mucho tiempo formaste parte de mi vida y lo sigues haciendo.... porque no creas ke ya olvide que tú me metiste esta idea en la cabeza...Mi-e dor de tine mio.

A ti Massi por seguir siendo mi mejor amiga.....sabes ke tkm y puedes contar conmigo siempre.

A ti..kGz...(aunque se ke probablemente jamás lo leerás).....por estar conmigo siempre y por darme kariño y apoyo en los momentos difíciles, nunk lo olvidaré....

A ti Mony por ser una super amiga y confidente...porke siempre comprendiste mis lokuras y mis tarugadas... será porke estamos igual de lokas?????..y porke cuando necesité tu ayuda nunca me la negaste..

A ustedes Montse, Lara y Rafa, Diana, Marisol, Cesar, Jonas, Hernan, Lalo (muegano), Paola, Ricardo, Octavio, Elier y Pamela por ser personas tan agradables y porque cuando les pedí un favor jamás me lo negaron.

DEDICADO A Todas las personas que amo y a mis tíos Manuel Ramírez Olvera, José Luis Torres Ramírez y Pedro Guerrero Rodríguez.

Contenido

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	i
Declaración de originalidad	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Acta de revisión.....	v
Créditos.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tablas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de los hongos.....	1
1.1.1. Nutrición de los hongos.....	2
1.1.2. Clasificación del reino de los Hongos	3
1.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	4
1.2.1. Usos medicinales de <i>G. lucidum</i>	6
1.2.2. Compuestos bioactivos de <i>G. lucidum</i>	7
1.2.3. Polisacáridos de <i>G. lucidum</i>	7
1.2.4. β -D-glucanos.....	8
1.2.5. Metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos	10
1.2.6. Producción y mercado de <i>G. lucidum</i> y sus derivados.....	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos.....	12
2.2. Genoma de <i>G. lucidum</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Estrategia experimental	16
5.2. Conservación de las cepas	16
5.3. Secuenciación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum s.l.</i>	17
5.3.1. Extracción de ADN de <i>G. lucidum s. l.</i>	17
5.3.2. Amplificación por PCR de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum s.l.</i>	18
5.4. Análisis del metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos y diseño de iniciadores.....	19
5.5. Búsqueda de las secuencias correspondientes a los iniciadores diseñados en el genoma de <i>G. lucidum s.l.</i>	21
5.6. Purificación de ADN por electroforesis.....	24
5.7. Secuenciación	25

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1. Caracterización de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>Ganoderma lucidum</i> s.l.....	27
6.2. Diseño de iniciadores.....	29
6.3. Identificación de secuencias en el genoma de <i>G. lucidum</i> s. l.....	32
6.4. Secuenciación	37
7. CONCLUSIONES.....	44
8. REFERENCIAS.....	45

Índice de Figuras

Figura 1. Filogenia del reino de los Hongos (Hibbett et al., 2007).....	4
Figura 2. Fructificación de la cepa 382 de <i>G. lucidum</i> s. <i>l.</i> donada por el COLPOS, Puebla.....	5
Figura 3. β -(1,3)(1,6)-D-glucanos (Hung et al., 2008).	9
Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos y enzimas participantes	10
Figura 5. Estrategia experimental para la obtención de secuencias correspondientes a los genes involucrados en la síntesis de β -(1,3)-D-Glucanos.	16
Figura 6. Región conservada en el alineamiento de secuencias para el diseño de iniciadores.....	20
Figura 7. Amplificación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de <i>G. lucidum</i> s. <i>l.</i>	27
Figura 8. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas β -fructofuranosidasa, α -glucosidasa y Fosfoglucomutasa.	34
Figura 9. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas Hexocinasa y UDP-glucosa pirofosforilasa.....	35
Figura 10. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas (1,3)- β -glucano sintetasa y Fosfoglucomutasa.	35
Figura 11. Cromatograma incorrecto del fragmento amplificado con los iniciadores FOS31LbF y FOS1123LbR.....	38
Figura 12. Ubicación de los fragmentos 1 y 2 de <i>G. lucidum</i> s. <i>l.</i>	41
Figura 13. Árbol filogenético del fragmento 1 de <i>G. lucidum</i> s. <i>l.</i> obtenido con los iniciadores [BGS547UmF BGS2113UmR]	42
Figura 14. Árbol filogenético del fragmento 2 de <i>G. lucidum</i> s. <i>l.</i> obtenido con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR].....	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Reino de los Hongos y organismos similares (Blackwell y Spatafora, 2004).....	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>G. lucidum</i> (NCBI taxonomy).....	5
Tabla 3. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos en basidiomicetos	13
Tabla 4. Genes correspondientes a enzimas de <i>G. lucidum</i>	14
Tabla 5. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	18
Tabla 6. Iniciadores y programa de PCR utilizados (Gardes y Bruns, 1993).....	19
Tabla 7. Organismos utilizados como base en el diseño de iniciadores	21
Tabla 8. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	22
Tabla 9. Programa de PCR utilizado para cada par de iniciadores	22
Tabla 10. Análisis de similitud de las secuencias ITS de las cepas 382, 145 y 796, con secuencias depositadas en el GenBank	28
Tabla 11. Secuencia y características de los iniciadores diseñados.....	31
Tabla 12. Fragmentos obtenidos por PCR con cada par de iniciadores.	32
Tabla 13. Concentración óptima de $MgCl_2$ en la PCR para cada par de iniciadores.....	36
Tabla 14. Resultados de la secuenciación de los fragmentos obtenidos con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR], [BGS547UmF y BGS2113UmR], [BGS2947UmF y BGS3561UmR] y [BFF658UmF y BFF1128UmR]	38
Tabla 15. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR], con secuencias depositadas en el GenBank.....	39
Tabla 16. Secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR].....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas que poseen una pared celular compuesta fundamentalmente por polisacáridos y diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetil glucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). Aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las células vegetales en la composición de la pared y en que carecen de cloroplastos y clorofila. Mientras que la diferencia con las células animales es que las células de los hongos tienen pared celular y presentan ergosterol en la membrana citoplásmica (Pontón et al., 2002).

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfología celular: una multicelular filamentosa denominada micelio y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliales o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares denominadas hifas. En la mayoría de los hongos filamentosos, las hifas son tabicadas y presentan septos que delimitan las diferentes células. Las hifas que carecen de septos se denominan cenocíticas o sifonadas. Las hifas de los hongos tabicados suelen tener un diámetro inferior (2-5 μm) a las de los hongos sifonados (10-15 μm). Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen gracias al depósito de nuevos materiales en su extremo, ramificándose con mucha frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio. En una colonia de un hongo filamentoso se produce una diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio

vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior de la colonia y puede producir esporas asexuales (Pontón et al., 2002).

1.1.1. Nutrición de los hongos

Los hongos son quimioheterótrofos por absorción. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos en carbohidratos para alcanzar sus requerimientos de energía y biomasa (Berry, 1998). Los hongos producen una amplia variedad de enzimas extracelulares, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden degradar la mayor parte de los sustratos orgánicos que existen naturalmente, incluyendo la celulosa, la quitina, el almidón, azúcares, hemicelulosas y lignina. Normalmente los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos; son metabolizados para proporcionar energía y también actúan como precursores para la síntesis de material celular (Gadd, 1988). Otras fuentes de carbono utilizadas por los hongos incluyen alcoholes, hidrocarburos, glicerol y almidón. Los hongos utilizan nitrógeno, especialmente en forma de amonio, aunque casi todos pueden utilizar nitrato (Wainwright, 1995).

Los hongos generalmente crecen en el laboratorio sobre medios definidos que contienen azúcares, como glucosa y sacarosa, o sobre polímeros, como celulosa. El Nitrógeno inorgánico generalmente se suministra a los medios en forma de amonio, nitrato, amidas o aminoácidos. En algunos procesos de fermentación industrial también pueden utilizarse fuentes de nitrógeno orgánicas tales como extracto de levadura, peptona o caseína (Fang y Zhong, 2002b). Otros nutrientes minerales importantes requeridos por los hongos para un máximo rendimiento incluyen Fósforo, Azufre, Potasio y Magnesio. También se requieren para el funcionamiento de las enzimas en condiciones de crecimiento rápido, nutrientes menores como el Zinc, Cobre, Molibdeno y Vitaminas (Wainwright, 1995).

En la producción de polisacáridos a partir de hongos basidiomicetos como *Ganoderma lucidum*, se utilizan medios complejos, compuestos principalmente por peptona, caseína o extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno, glucosa o sacarosa como fuente de carbono, $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ que le confieren al medio algunos minerales y finalmente algunas vitaminas como la vitamina B1 (Fang y Zhong, 2002a; Fang y Zhong, 2002b; Tang y Zhong, 2002).

1.1.2. Clasificación del reino de los Hongos

Gracias al avance que en los últimos años se ha obtenido en el campo de la biología molecular, se ha logrado separar al reino de los Hongos de otros organismos similares, que en años anteriores eran considerados como parte de este reino. La tabla 1 muestra la clasificación del reino de los Hongos, así como los organismos que fueron excluidos de este.

Tabla 1. Reino de los Hongos y organismos similares (Blackwell y Spatafora, 2004).

Hongos
Chytridiomycota
Zygomycota
Ascomycota
Basidiomycota
Straminipila
Oomycota
Hyphochytriomycota
Labyrinthulales
Thraustochytriales
Mohos mucilaginosos
Plasmodiophorales
Myxomycota
Dictyosteliomycota
Acrasiomycota

En la figura 1 se muestra la filogenia del reino de los hongos basada en estudios moleculares a partir de ARN ribosomal nuclear y ARN ribosomal mitocondrial (Hibbett et al., 2007).

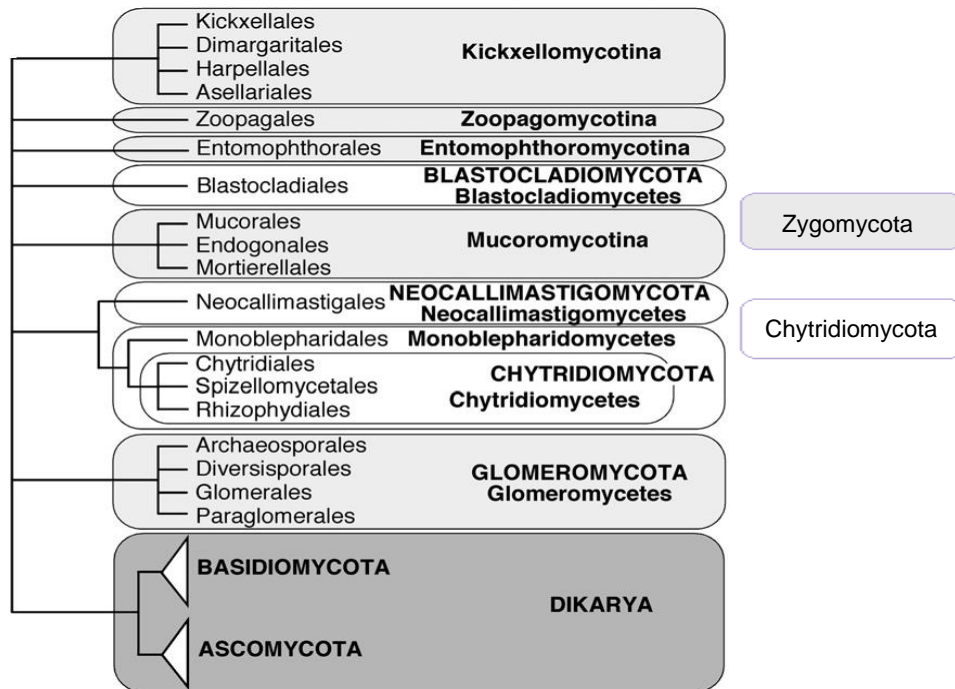


Figura 1. Filogenia del reino de los Hongos (Hibbett et al., 2007).

1. 2. *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum es un hongo económicamente importante, particularmente en China, Corea y Japón, debido a sus propiedades medicinales. Los chinos y coreanos lo conocen como Ling Zhi, mientras que los japoneses lo conocen como Reishi o Mannentake. La principal característica del extracto de *G. lucidum* es que puede funcionar como auxiliar en el tratamiento contra el cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colorrectal induciendo apoptosis y suprimiendo la proliferación y migración de células altamente invasivas (Sliva et al., 2002b; Stanley et al., 2005; Xie et al., 2006). Este hongo pertenece a la clase de los Agaricomycetos, orden Polyporales y familia Ganodermataceae (Tabla 2). Es un hongo de pudrición blanca (degrada completamente la lignina) (Paterson, 2006) y crece anualmente de manera natural sobre una amplia variedad de árboles caducifolios como *Quercus*, *Acer*, *Ulmus*, *Betula*, *Salix*, etc. En el Oriente, se desarrolla esencialmente en árboles del género *Prunus*, mientras que en las

regiones subtropicales de Europa, Asia, América del Sur y del Norte, crece principalmente, aunque con menos frecuencia, en árboles de coníferas como *Larix*, *Picea* y *Pinus* (Wasser, 2005).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *G. lucidum* (NCBI taxonomy)

Reino:	Fungi
Fila:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Orden:	Polyporales
Familia:	Ganodermataceae
Género:	<i>Ganoderma</i>

En su proceso de crecimiento, primero se desarrolla el estípite cuyo extremo superior se dobla y crece en forma de espátula que se va ensanchando hasta formar un sombrero o píleo, más o menos circular, reniforme o en abanico, de 3-12 cm de diámetro y 2-3 cm de grosor con una superficie dura y muy brillante. El pie alcanza una altura de 8-15 cm, sin embargo algunos pueden ser más cortos (Rollan, 1984). La figura 2 muestra la morfología típica del basidioma correspondiente a la cepa 382 de *G. lucidum* s. l., donado por el Colegio de Postgraduados de Puebla (COLPOS).



Figura 2. Fructificación de la cepa 382 de *G. lucidum* s. l. donada por el COLPOS, Puebla.

1.2.1. Usos medicinales de *G. lucidum*

Ganoderma lucidum ha sido utilizado en la medicina tradicional de China y Japón, especialmente como auxiliar en el tratamiento de la hepatitis, hipertensión, hipercolesterolemia, cáncer, artritis y bronquitis (Chang et al., 2006), por lo que en las últimas décadas algunos investigadores se han dedicado a estudiar el efecto que pudieran tener los distintos componentes bioactivos presentes en *G. lucidum* sobre células de mamíferos, incluyendo células humanas (Paterson, 2006; Sliva et al., 2002b; Stanley et al., 2005; Wang et al., 1997; Xie et al., 2006).

Esta especie posee efectos inmunomodulatorios, anticancerígenos, neuroprotectores y antivirales. En 1997, Wang reportó un aumento de interleucinas (IL-1 e IL-6), del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y del interferón γ (IFN- γ) en macrófagos y linfocitos T de origen humano después de incubarlos en presencia de polisacáridos provenientes de basidiomas de *G. lucidum*. Por otra parte una de las principales características de las células cancerosas altamente metastásicas es la activación constitutiva de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B. Se ha demostrado que la inhibición de estos factores suprime la secreción del activador plasminogénico tipo urocinasa (uPA) lo cual impide la migración de células humanas con cáncer de mama altamente invasivas (Sliva et al., 2002a; Sliva et al., 2002c). En experimentos posteriores Sliva et al. (2002b) observó que extractos obtenidos a partir de esporas y basidiomas de *G. lucidum* inhiben constitutivamente la actividad de los factores AP-1 y NF- κ B en células humanas con cáncer de mama y cáncer de próstata altamente invasivas, lo cual resulta en la desregulación de la expresión de uPA y su receptor (uPAR) y en la disminución de uPA secretada, esto evita la migración de este tipo de células. Stanley et al. (2005) también demostraron que *G. lucidum* induce apoptosis, inhibe la proliferación celular y suprime la migración de células con cáncer de próstata en humanos. Además se probaron extractos de *G. lucidum* en células de mieloma, linfoma y leucemia obteniendo como resultado apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Müller et al., 2006). Xie et al. (2006) observaron que extractos

de *G. lucidum* poseen propiedades antioxidantes e inhiben la proliferación de células humanas con cáncer colorrectal. En otra instancia, Cheung et al. (2000) encontraron la presencia de compuestos neuroactivos en extractos de *G. lucidum*, que inducen la diferenciación neuronal y neuroprotección en células de rata PC12. Así mismo se ha observado que algunos elementos bioactivos de este hongo inhiben fuertemente la multiplicación del VIH-1 (El-Mekkawi et al., 1998).

1.2.2. Compuestos bioactivos de *G. lucidum*

Una gran variedad de informes han sido publicados en relación a los componentes químicos de *G. lucidum* (Boh et al., 2007; Huie y Di, 2004; Paterson, 2006) y especies afines (Moradali et al., 2007). El basidioma, el micelio en cultivo líquido, el medio de cultivo y las esporas de *G. lucidum* contienen diferentes compuestos bioactivos, entre los que se encuentran principalmente triterpenoides, esteroides, polisacáridos, proteínas, alcaloides, vitaminas y minerales esenciales (Paterson, 2006), siendo los polisacáridos, uno de los componentes bioactivos con mayor importancia, debido a su aporte inmunomodulatorio, anticancerígeno y radioprotector (Berovic et al., 2003; Cao y Lin, 2002; Kim y Kim, 1999; Lee et al., 2003; Sone et al., 1985).

1.2.3. Polisacáridos de *G. lucidum*

Más de 200 tipos de polisacáridos han sido aislados del cuerpo fructífero, las esporas y micelio, o separados del caldo de cultivos sumergidos de *G. lucidum* (Huie y Di, 2004). Los polisacáridos constituyen aproximadamente el 45% en peso seco y la mayoría tienen un peso molecular que va desde 4×10^5 a 1×10^6 Da. Glicoproteínas y polisacáridos de *G. lucidum* tales como β -D-glucanos y heteropolisacáridos, se han aislado y caracterizado (Wasser, 2005) siendo los β -(1,3)(1,6)-D-glucanos las principales especies de polisacáridos presentes en extractos de este hongo (Paterson, 2006).

1.2.4. β -D-glucanos

Los glucanos son polímeros de glucosa unidos por enlaces glicosídicos, dependiendo del tipo de enlace pueden ser α -glucanos (almidón, dextrano, glucógeno, etc.) o β -glucanos (zymosano, curdlano, celulosa, lentinano etc.). Estas moléculas tienen diferentes funciones en las células, pueden servir como reserva energética, elementos estructurales, componentes de proteínas, etc. (Madigan et al., 2003; Prescott et al., 1999).

Los β -D-glucanos pueden ser obtenidos de hongos, bacterias y plantas principalmente. En el caso de los hongos y algunos cereales como la cebada, trigo y avena, los β -D-glucanos son componentes estructurales de la pared celular y varían en su composición según su origen. Los β -D-glucanos obtenidos a partir de granos de cereales se encuentran formados en su mayoría, por una mezcla de enlaces glicosídicos β -(1,3) y β -(1,4). Mientras que los β -D-glucanos secretados por algunas bacterias como *Agrobacterium* sp. están constituidos de un eje lineal de enlaces β -(1,3) de grupos glucopiranosil (Laroche y Michaud, 2007).

Como se muestra en la figura 3, los β -D-glucanos provenientes de hongos y levaduras incluyendo a *G. lucidum*, principalmente poseen una cadena de grupos glucopiranosil unidos por enlaces β -(1,3), con diversos grados de ramificación en la posición C6, formando enlaces β -(1,6) (Wasser, 2005). La relación en el número de enlaces β -(1,3) y β -(1,6) así como la estructura de la red de los β -D-glucanos varía significativamente dependiendo de la especie (Lalgé, 2007). Además de los β -(1,3)(1,6)-D-glucanos, *G. lucidum* también posee β -D-glucanos con cadenas heteropolisacáridas de xilosa, manosa, galactosa y ácido urónico, así como complejos β -D-glucanos-proteína (Chen et al., 1998; Cheong et al., 1999; Gao et al., 2002).

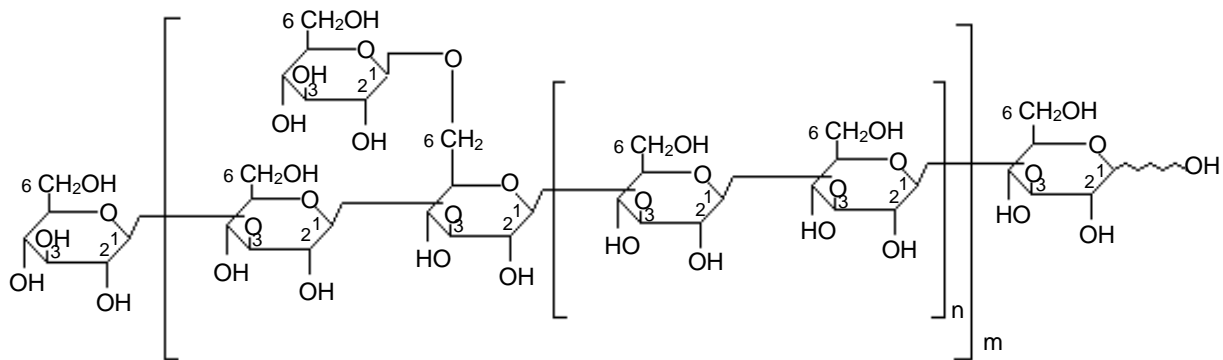


Figura 3. β -(1,3)(1,6)-D-glucanos (Hung et al., 2008).

En los últimos años se han desarrollado algunas investigaciones en torno a los β -D-glucanos obtenidos a partir de hongos y se ha demostrado que los β -D-Glucanos de *G. lucidum* son capaces de prevenir oncogénesis y metástasis indirectamente, a través de la activación de la respuesta inmune del organismo hospedero, estimulando a las células NKC (natural killer cells), células B, células T y macrófagos, lo anterior resulta en un incremento en la producción de citocinas tales como interleucinas (ILs), interferones (IFNs) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), estas citocinas suelen provocar necrosis en células cancerosas (Lee et al., 2003; Wasser, 2005). Wang et al. (1997) reportaron que polisacáridos aislados del cuerpo fructífero de *G. lucidum* potencializan la producción de IL-1 e IL-6, del TNF- α así como del IFN- γ en macrófagos y linfocitos T de origen humano, así mismo, observaron que las citocinas producidas tienen la capacidad de inhibir la proliferación y multiplicación de células leucémicas humanas. Polisacáridos de *G. lucidum* también tienen la capacidad de provocar inhibición de la apoptosis de neutrofilos humanos, mediada por FAS, a través de la activación de la ruta fosfatidilinositol (PI) 3-cinasa/Akt. Lo anterior puede ocasionar actividad antitumoral mediante el estímulo de la respuesta inmune (Hsu et al., 2002). Berovic et al. (2003) demostraron que los polisacáridos, especialmente los β -D-glucanos, derivados del micelio de *G. lucidum* producido en cultivo sumergido, son capaces de inducir la síntesis del TNF- α en células humanas mononucleares de sangre periférica, en cantidades similares a las inducidas por el romurtide, adyuvante inmunológico, que se suministra a pacientes con cáncer, que son

tratados con radioterapia y quimioterapia. También se ha observado que polisacáridos de este basidiomiceto promueven el inicio de una respuesta inmune, mediante la maduración *in vitro* de células dendríticas derivadas de medula ósea de murinos (Cao y Lin, 2002). Por otra parte Kim y Kim (1999) encontraron que polisacáridos solubles en agua extraídos del basidioma de *G. lucidum*, son capaces de prevenir daños en el ADN, ocasionados por radicales hidroxilo y radiaciones UV, lo que indica que estos polisacáridos poseen efectos antioxidantes y radioprotectores.

1.2.5. Metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos

La ruta metabólica para la síntesis de β -(1,3)-D-glucanos ha sido propuesta para diversos microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, plantas, levaduras y algunos basidiomicetos como *Laccaria bicolor*, *Malassezia globosa* y *Ustilago maydis* (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00500.html>), ruta que es muy similar a la diseñada por Zhong y Tang (2004) para *G. lucidum*. Con base en estos antecedentes la figura 4 muestra la ruta metabólica para la síntesis de β -(1,3)-D-glucanos, así como las enzimas que participan en cada una de las reacciones que intervienen en la síntesis de estos polisacáridos.

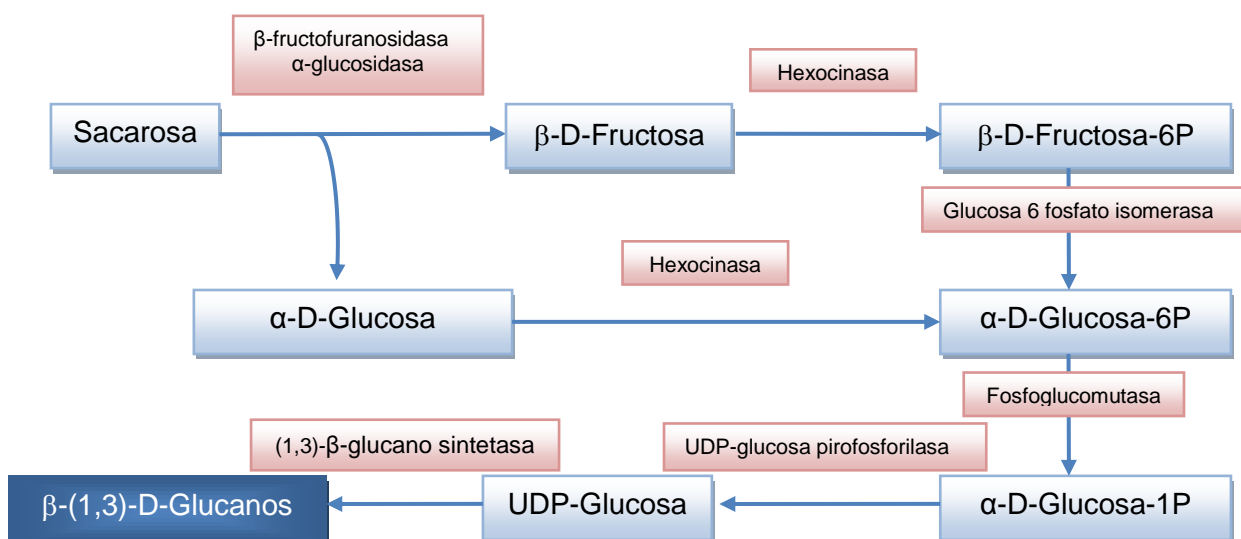


Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos y enzimas participantes.

Debido a que la cadena principal de los polisacáridos presentes en *G. lucidum* se encuentra formada por los β -(1,3)-D-glucanos, resulta de gran interés identificar los genes que codifican para las enzimas mencionadas anteriormente, en esta especie.

1.2.6. Producción y mercado de *G. lucidum* y sus derivados

En el 2002 la producción mundial de *G. lucidum* fue de alrededor 5000 toneladas, de las cuales 3800 toneladas fueron producidas en China (Lai et al., 2004).

G. lucidum se ha preparado en diversos tipos de formulaciones, estos incluyen rodajas y polvo de cuerpos fructíferos, extractos preparados a base de agua y/o solventes orgánicos, esporas, bebidas, jarabes, y lociones de uso externo. Al menos 100 diferentes marcas de productos a base de *G. lucidum* se venden en el mercado. En el 2004 se calculó un volumen de ganancia anual mundial de estos productos de aproximadamente 2.16 billones de dólares (Lai et al., 2004). A nivel mundial la producción de β -glucanos a partir de hongos se realiza principalmente mediante la obtención del cuerpo fructífero de basidiomicetos (proceso que dura hasta 5 meses), siendo *G. lucidum* y *Schizophyllum commune* de los más importantes. El comercio de estos productos ascendió a 7 mil millones de dólares en el 2007, siendo *G. lucidum* el más vendido (Halpern, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos

El conocimiento de los genes que se encargan de la síntesis de las enzimas participantes en el metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos es muy escaso, de hecho para *Ganoderma lucidum* aun no se tiene ninguna información acerca de estos genes. A la fecha, sólo se conoce la secuencia codificante para estas enzimas en algunos basidiomicetos tales como *Laccaria bicolor*, *Malassezia globosa*, *Ustilago maydis*, *Filobasidiella neoformans*, entre otros. En la tabla 3 se puede observar el nombre de la enzima, los basidiomicetos para los que se cuenta con la secuencia del gen y la clave de acceso al GenBank de cada secuencia.

2.2. Genoma de *G. lucidum*

Debido a la gran importancia que tiene *G. lucidum* en los países asiáticos, se ha obtenido la secuencia de ciertos genes correspondientes a enzimas de esta especie, la tabla 4 muestra algunos ejemplos de los genes disponibles así como su clave de acceso al GenBank.

Con la finalidad de tener más información acerca de este basidiomiceto, la Universidad Yang-Ming en colaboración con el Hospital General Veterano de Taipei, están trabajando en la secuenciación del genoma completo de *G. lucidum* (<http://www.genamics.com/cgi-bin/genamics/genomes/genomesearch.cgi?field=ID&query=710>). En la actualidad, son pocos los reportes de genomas completos que se tienen para basidiomicetos, estos corresponden a *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* B-3501A, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21, *Laccaria bicolor*, *Moniliophthora perniciososa*, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Tilletia indica*, *Tilletia walkeri*, *Trametes cingulata* y *Ustilago maydis* (NCBI genome).

Tabla 3. Genes involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos en basidiomicetos

Enzima (gen)	Basidiomicetos con la secuencia del gen conocida	Clave de acceso GenBank	Ref.
α -glucosidasa (invertasa)	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_571239	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_769635	[2]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_754746	[3]
β -fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_567775	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_767540	[2]
	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	XM_002392791	[4]
Hexocinasa	<i>Ustilago maydis</i>	XM_754659	[3]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_568853	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_771977	[2]
Glucosa-6-fosfatoisomerasa	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001878852	[5]
	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	XM_002393366	[4]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_753227	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731969	[6]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_569228	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_772275	[2]
Fosfoglucomutasa	<i>Postia placenta</i>	XM_002470747	[7]
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001882522	[5]
	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	XM_002387932	[4]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001732684	[6]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_568570	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_766767	[2]
UDP-glucosa pirofosforilasa	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001875113	[5]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_751540	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731843	[6]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_569599	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_771767	[2]
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001880080	[5]
(1,3)- β -glucano sintetasa	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	XM_002395860	[4]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_756638	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731224	[6]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21	XM_568719	[1]
	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A	XM_766698	[2]
	* <i>Filobasidiella neoformans</i>	AF102882	[8]
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001878747	[5]
<i>Ustilago maydis</i>	XM_752693	[3]	
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XM_001833221	[9]	
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	XM_002392134	[4]	

**Filobasidiella neoformans* es la forma anamorfia o asexual de *Cryptococcus neoformans* por lo que en los siguientes apartados se le mencionara con el nombre de *Cryptococcus neoformans*. [1] Loftus et al., (2005); [2] Fung et al., (2008); [3] Birren et al., (2006); [4] Mondego et al., (2008); [5] Martin et al., (2008); [6] Xu et al., (2007); [7] Martinez et al., (2009); [8] Thompson et al., (1999); [9] Birren et al., (2008).

Tabla 4. Genes correspondientes a enzimas de *G. lucidum*

Enzima (gen)	Clave de acceso GenBank	Ref.
Escualeno sintetasa	DQ494675	[10]
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	DQ404345S2	[11]
3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa	EU263990	[12]
Lacasa	AY485825	[13]
Farnesil-difosfato sintetasa	EU399544	[14]
Manganeso peroxidasa	EU526904	[15]
Ribonucleasa T2	AB330060	[16]

[10] Zhao et al., (2007); [11] Fei et al., (2006); [12] Shang et al., (2008); [13] Zhang y Ma (2003); [14] Ding et al., (2008); [15] Huang et al., (2009b); [16] Itagaki, (2007)

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial la producción de β -D-glucanos a partir de hongos se realiza principalmente mediante la obtención de basidiomas de diferentes especies de hongos (proceso que puede durar hasta 5 meses), siendo *Ganoderma lucidum* uno de los más importantes. Por lo que producir β -D-glucanos a partir de una fermentación sumergida podría reducir considerablemente los tiempos de operación. Dicho proceso podría ser optimizado con el conocimiento de los genes que están involucrados en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos ya que se sentarían las bases para el desarrollo de cepas de *G. lucidum* mejoradas, con un mayor aprovechamiento de los nutrientes y una mayor producción de estos polisacáridos.

4. OBJETIVOS

- Diseñar iniciadores para identificar la secuencia de los genes correspondientes a las enzimas involucradas en el metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos (α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa) en *Ganoderma lucidum*.
- Obtener la secuencia de los genes correspondientes a las enzimas α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa de *Ganoderma lucidum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estrategia experimental

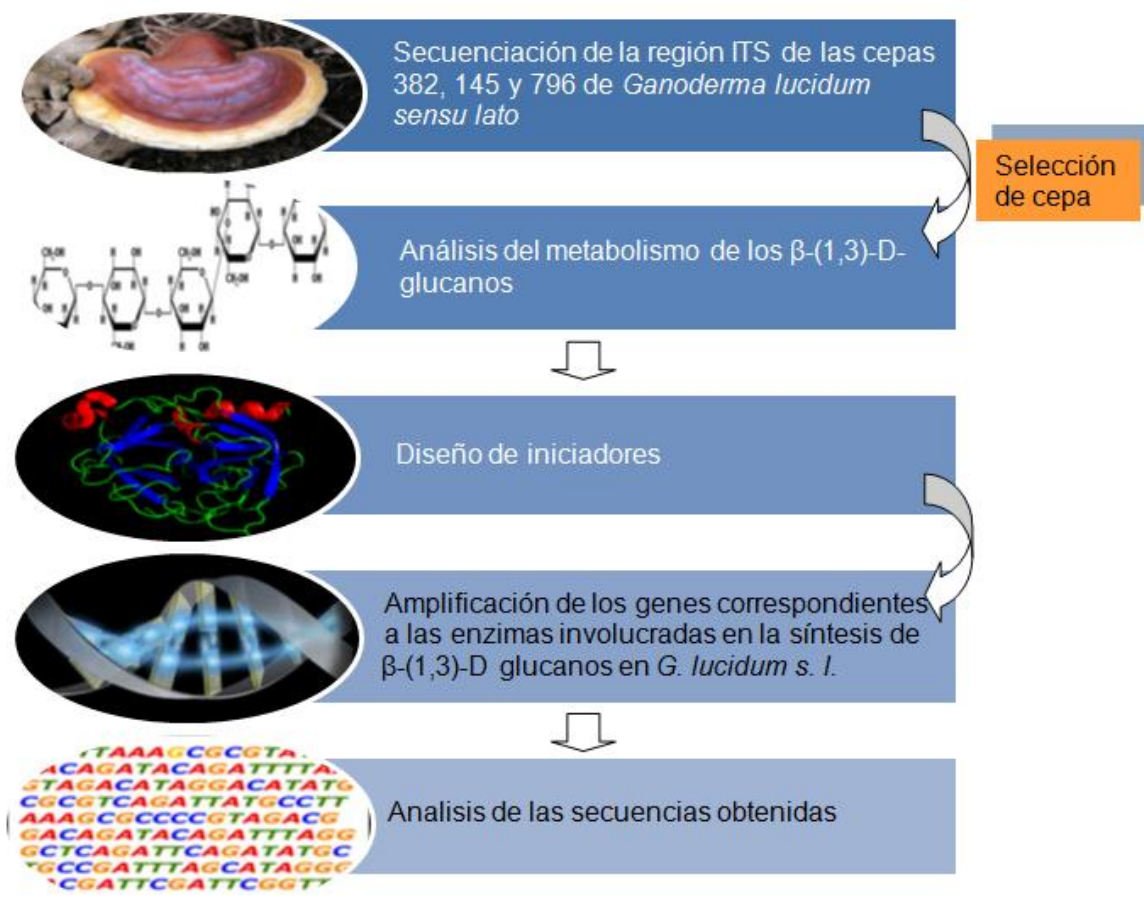


Figura 5. Estrategia experimental para la obtención de secuencias correspondientes a los genes involucrados en la síntesis de β -(1,3)-D-Glucanos.

5.2. Conservación de las cepas

Se utilizaron las cepas 145 y 382 de *G. lucidum s. l.* donadas por el Colegio de Postgraduados de Puebla (COLPOS) así como la cepa 796 donada por el Instituto de Ecología de Xalapa Ver. (INECOL). Se mantuvieron en agar MY (dextrosa 30 g/L, extracto de malta 3 g/L, extracto de levadura 5 g/L, peptona de caseína 3 g/L y agar 15 g/L) a 4°C.

5.3. Secuenciación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de *G. lucidum* s.l.

Con el objetivo de verificar que las 3 cepas fueran efectivamente *G. lucidum* y no alguna otra especie, se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 de cada una de las 3 cepas disponibles. Para esto, fue necesario extraer su ADN y posteriormente realizar una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para cada muestra. Posteriormente, con base en los resultados de secuenciación obtenidos, se eligió la cepa que sería utilizada en los experimentos posteriores.

5.3.1. Extracción de ADN de *G. lucidum* s. l.

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando *ChargeSwitch gDNA plant Kit* de Invitrogen (EUA) siguiendo el protocolo que se presenta a continuación. Se tomaron 20 mg del micelio de *G. lucidum* s. l. crecido en agar MY y se pulverizó en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido. Se colocó en un tubo de microcentrifuga y se le adicionó 1 mL de solución L18 a temperatura ambiente. Se adicionaron 2 µL de RnasaA y se homogenizó con vortex. Se añadieron 100 µL de SDS al 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 400 µL de la solución N5 al lisado y se mezcló con vortex hasta formar un precipitado. Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, formando un sobrenadante claro, que fue transferido a un tubo de microcentrifuga. Se adicionaron 100 µL del detergente D1 y 40 µL de las perlas magnéticas al tubo que contenía el sobrenadante y se mezcló con la pipeta. El tubo se incubó a temperatura ambiente por 1 min y posteriormente se colocó sobre un magneto (magnarack de Invitogen) hasta que se formó una pastilla. Sin remover el tubo del magneto se aspiró y descargó el sobrenadante evitando resuspender la pastilla. Se alejó el tubo del magneto para adicionarle 1 mL de la solución W12 y se mezcló con la pipeta. Se colocó el tubo nuevamente sobre el magneto hasta observar la formación de la pastilla y sin remover el tubo del magneto, se aspiró y

descargó el sobrenadante evitando resuspender la pastilla. Repitiendo el proceso de lavado, se quitó nuevamente el tubo del magneto y se le adicionó 1 mL de la solución W12 y se mezcló con la pipeta. Se colocó el tubo sobre el magneto hasta que se formó la pastilla, sin remover el tubo del magneto, se aspiró y descargó el sobrenadante. Se alejó del magneto el tubo que contenía la pastilla y se le adicionaron 150 μ L de la solución E6, se mezcló con la pipeta de 15-30 veces hasta que las perlas quedaron completamente dispersas y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 min. Se colocó el tubo sobre el magneto hasta que se formó la pastilla y sin removerlo de este, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga estéril. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%.

5.3.2. Amplificación por PCR de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de *G. lucidum s.l.*

Para cada reacción de PCR se utilizó la programación y los iniciadores (ITS1-F e ITS4-B) reportados por Gardes y Bruns (1993). En la tabla 5 se puede visualizar la concentración de los reactivos utilizados en cada reacción, mientras que la tabla 6 muestra la secuencia de ambos iniciadores así como el programa de PCR utilizado. Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la reacción de PCR

Mezcla					
Buffer [10 X]	^a dNTP's [10 mM]	Iniciadores [10 μ M]	MgCl ₂ [50 mM]	^a Taq polimerasa [5 U/ μ L]	*ADN
1X	0.2 mM	0.2 μ M	3 mM	1 U	-

^a Taq DNA Polimerasa de Invitrogen (Brasil) y dNTP Mix de Invitrogen (EUA)

* 1 μ L de la solución de ADN, para reacciones de 20 μ L

Tabla 6. Iniciadores y programa de PCR utilizados (Gardes y Bruns, 1993)

Iniciadores	Programa de PCR		Ciclos
ITS1-F [CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA]	94°C	85 s	} 13
	95°C	35 s	
	55°C	55 s	
	72°C	45 s	
ITS4-B [CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG]	95°C	35 s	} 13
	55°C	55 s	
	72°C	120 s	
	95°C	35 s	} 9
	55°C	55 s	
	72°C	180 s	
	72°C	10 min	

5.4. Análisis del metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos y diseño de iniciadores

Se analizó la ruta metabólica de los β -(1,3)-D-glucanos propuesta por Zhong y Tang (2004) para *G. lucidum*. Posteriormente se realizó la búsqueda de la secuencias de los genes correspondientes a las enzimas que participan en la síntesis de estos polisacáridos (α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y (1,3)- β -glucano sintetasa) en organismos similares a *G. lucidum*, debido a que estos genes aun no han sido elucidados para esta especie. Se consultó la base de datos del GenBank.

Una vez obtenidas las secuencias de los genes (de dos o tres especies de hongos) correspondientes a una misma enzima, se llevó a cabo el alineamiento de estas con la ayuda del software Vector NTI y posteriormente se eligieron las regiones conservadas al inicio en medio y al final de las secuencias alineadas. En la figura 6 se puede observar un ejemplo del alineamiento de 3 secuencias correspondientes al gen que codifica para la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa en

Cryptococcus neoformans, *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*. Las flechas indican el principio y fin de la región conservada en las tres secuencias, que fue considerada como iniciador. En esta región es visible la variabilidad de nucleótidos en las posiciones 3, 9, 15 y 18 (marcadas en azul y blanco), lo cual sugirió el uso de 4 bases degeneradas (Bd), una en cada posición. El uso de estas bases se debió principalmente a que los iniciadores se diseñaron utilizando como base hongos de distinto orden, clase e incluso filo, por lo que el manejo de estas, podría incrementar la probabilidad de amplificar la región de interés. Este procedimiento se siguió para el diseño de 3 pares de iniciadores (sentido y antisentido) para cada enzima. Cabe mencionar que la selección de los organismos a utilizar en el alineamiento de secuencias para cada enzima, estuvo en función de las regiones que se mantenían conservadas en la mayoría de los organismos.

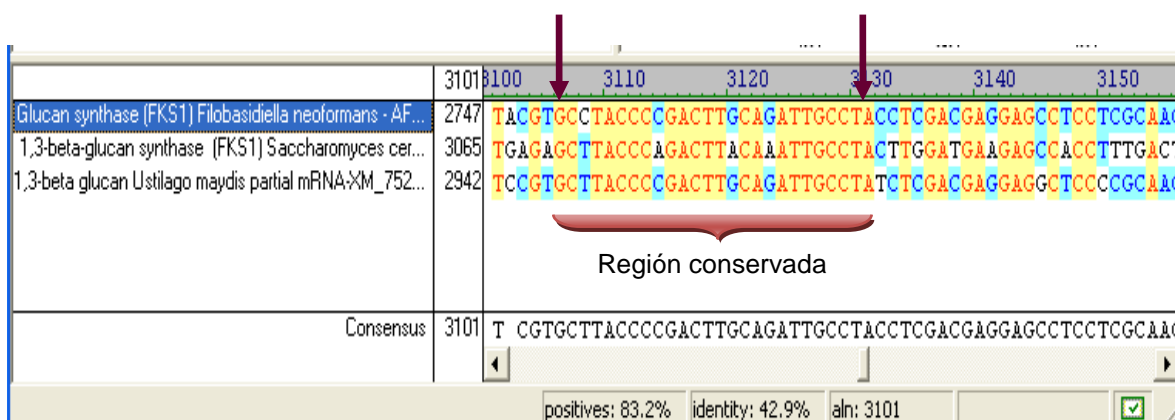


Figura 6. Región conservada en el alineamiento de secuencias para el diseño de iniciadores. Región conservada del gen que codifica para la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa en *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*.

Cada iniciador fue sometido a un proceso de análisis en el cual se consideraron ciertas características tales como % GC, temperatura de alineamiento (T_a), formación de dímeros y horquillas así como el número de bases degeneradas (Roux, 1995). La tabla 7 muestra los organismos que fueron utilizados como base en el diseño de iniciadores para cada enzima, así como la clave de acceso al GenBank de la secuencia.

Tabla 7. Organismos utilizados como base en el diseño de iniciadores

Enzima (gen)	Organismos	Clave de acceso GenBank	Ref.
α -glucosidasa (invertasa)	<i>Ustilago maydis</i>	XM_754746	[3]
	<i>Pichia stipitis</i>	XM_001387191	[17]
β -fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_101096	[18]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_754659	[3]
	<i>Ashbya gossypii</i>	NM_212212	[19]
	<i>Aspergillus niger</i>	XM_001393172	[20]
Hexocinasa	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001878852	[5]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_753227	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731969	[6]
Glucosa-6-fosfato-isomerasa	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001882522	[5]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001732684	[6]
Fosfoglucomutasa	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001875113	[5]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_751540	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731843	[6]
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001880080	[5]
UDP-glucosa pirofosforilasa	<i>Ustilago maydis</i>	XM_756638	[3]
	<i>Malassezia globosa</i>	XM_001731224	[6]
	<i>Laccaria bicolor</i>	XM_001880080	[5]
(1,3)- β -glucano sintetasa	<i>Cryptococcus neoformans</i>	AF102882	[8]
	<i>Ustilago maydis</i>	XM_752693	[3]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AY395693	[21]

[3] Birren et al., (2006); [5] Martin et al., (2008); [6] Xu et al., (2007); [8] Thompson et al., (1999); [17] Jeffries et al., (2007); [18] Yamada et al., (2009); [19] Dietrich et al., (2004); [20] Pel et al., (2007); [21] Ohya et al., (2004)

5.5. Búsqueda de las secuencias correspondientes a los iniciadores diseñados en el genoma de *G. lucidum s.l.*

Una vez sintetizados los iniciadores correspondientes a cada una de las enzimas involucradas en el metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos, se procedió a realizar una PCR utilizando dichos iniciadores y ADN extraído de la cepa de *G. lucidum s.l.* seleccionada. El programa de PCR fue específico para cada par de iniciadores. En la tabla 8 se puede observar la concentración de los reactivos utilizados en cada reacción mientras que la tabla 9 muestra los iniciadores y el programa de PCR que se reprodujo en cada caso. El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 8. Reactivos utilizados en la reacción de PCR

Mezcla					
Buffer [10 X]	^a dNTP's [10 mM]	Iniciadores [10 µM]	MgCl ₂ [50 mM]	^a Taq polimerasa [5 U/µL]	*ADN
1X	0.2 mM	0.2 µM	3 mM	1 U	-

^aTaq DNA Polimerasa de Invitrogen (Brasil) y dNTP Mix de Invitrogen (EUA)

* 1µL de la solución de ADN para reacciones de 20 µL

Tabla 9. Programa de PCR utilizado para cada par de iniciadores

Enzima	[†] Iniciadores	Programa de PCR	Ciclos
α-glucosidasa	AGL178UmF AGL997UmR	94°C	30 s
	AGL64UmF AGL1152UmR	*50-65°C 72°C	30 s 60 s
	AGL194UmF AGL1018UmR		
	UDP74LbF UDP851LbR	94°C	30 s
UDP-glucosa pirofosforilasa	UDP447LbF UDP1170LbR	*48-63°C 72° C	30 s 60 s
	UDP500LbF UDP1118LbR		
	BGS2113UmF BGS3097UmR	94°C	30 s
(1,3)-β-glucanos sintetasa	BGS547UmF BGS2113UmR	*45-60°C 72°C	30 s 90 s
	BGS2947UmF BGS3561UmR	94°C	30 s
		*55-70°C 72°C	30 s 60 s

* Gradiente de temperatura dependiendo de las características fisicoquímicas de los iniciadores

[†] La secuencia y características de los iniciadores se muestra en la sección de resultados y discusión

Tabla 9 (Continuación). Programa de PCR utilizado para cada par de iniciadores

Enzima	[†] Iniciadores	Programa de PCR	Ciclos	
β-fructofuranosidasa	BFF417UmF BFF885UmR	94°C *46-63°C	30 s 30 s	35
	BFF388UmF BFF1239UmR	72° C	60 s	
	BFF658UmF BFF1128UmR	94°C *50-65°C 72° C	30 s 30 s 60 s	35
	FOS394LbF FOS1039LbR			
Fosfoglucomutasa	FOS309LbF FOS1504LbR	94°C *57-69°C 72°C	30 s 30 s 90 s	35
	FOS394LbF FOS1504LbR			
	FOS31LbF FOS1123LbR	94°C *47-60°C 72° C	30 s 30 s 90 s	35
Glucosa-6-fosfato isomerasa	GL6295LbF GL6982LbR			
	GL6571LbF GL61528LbR	94°C *56-69°C	30 s 30 s	35
	GL6802LbF GL61528LbR	72°C	60 s	
	GL6571LbF GL61066LbR			

* Gradiente de temperatura dependiendo de las características fisicoquímicas de los iniciadores

[†] La secuencia y características de los iniciadores se muestra en la sección de resultados y discusión

Tabla 9 (Continuación). Programa de PCR utilizado para cada par de iniciadores

Enzima	[†] Iniciadores	Programa de PCR	Ciclos	
Hexocinasa	HEX241LbF	94°C	30 s	
	HEX1028LbR			
		*46-61°C	30 s	35
	HEX241LbF	72°C	60 s	
	HEX1030LbR			
	HEX559LbF	94°C	30 s	
	HEX1227LbR			
		*40-60°C	30 s	35
	HEX313LbF	72°C	90 s	
	HEX1447LbR			

* Gradiente de temperatura dependiendo de las características fisicoquímicas de los iniciadores

[†] La secuencia y características de los iniciadores se muestra en la sección de resultados y discusión

Una vez obtenidos los geles de electroforesis para cada par de iniciadores, se realizaron variaciones en la concentración de MgCl₂ (1, 2 y 4 mM), con la finalidad de optimizar la reacción de PCR (Roux, 1995). Estas variaciones sólo se llevaron a cabo para las reacciones que produjeron fragmentos del peso molecular esperado.

Los productos de PCR que mostraron una banda se enviaron a secuenciar, mientras que aquellos productos que resultaron en 2 o más bandas fueron sometidos a un proceso de purificación a partir de un gel agarosa, seleccionando las bandas correspondientes al peso molecular esperado. Una vez purificados dichos fragmentos se secuenciaron.

5.6. Purificación de ADN por electroforesis

Las reacciones de PCR (50 µL) que produjeron dos o mas bandas fueron separadas en un gel de agarosa al 1.5% con la finalidad de purificar solo el fragmento de peso molecular esperado. Dicha purificación se llevó a cabo empleando *QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN (Alemania) como se presenta a continuación. Se cortó la fracción del gel de agarosa que contenía el fragmento de interés con una navaja estéril y se depositó en un tubo de 2 mL. Posteriormente

se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG a un volumen del gel (100 mg ~ 100 µL) y se incubó 10 min a 50°C mezclando con vortex cada 2 min. La columna de purificación se colocó en un tubo de 2 mL, se le adicionó la muestra que contenía el fragmento de gel disuelto y se centrifugó 1 min a 13000 rpm, se removió el líquido resultante y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo de recolección. Se adicionaron 500 µL de buffer QG a la columna y se centrifugó 1 min a 13000 rpm, se desechó el líquido resultante y la columna se depositó en el mismo tubo de recolección. Se adicionaron 750 µL de buffer PE a la columna y se centrifugó 1 min a 13000 rpm, se retiró el líquido resultante y se centrifugó nuevamente 1 min a 13000 rpm para eliminar los residuos. A continuación la columna fue colocada en un tubo estéril de 1.5 mL y se adicionaron 30 µL del Buffer de elución al centro de ésta, se incubó 5 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó 1 min a 13000 rpm. El fragmento de interés se analizó en un gel de agarosa al 1.5%. Una vez purificados los fragmentos de peso molecular esperado se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

5.7. Secuenciación

Los productos de PCR que mostraron una banda, fueron purificados. Para ello se utilizó *Purelink PCR Purification Kit* de Invitrogen (EUA) siguiendo el protocolo que se presenta a continuación. Se adicionaron cuatro volúmenes del buffer de unión HC a un volumen del producto de PCR (50 µL) y se mezcló, posteriormente la mezcla fue transferida a una columna de purificación, se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 10000 rpm y el líquido resultante fue desechado. Se adicionaron 650 µL del buffer de lavado a la columna y se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 10000 rpm, se desechó el líquido resultante. Se centrifugó nuevamente la columna a temperatura ambiente por 3 min a máxima velocidad para remover el buffer de lavado residual. La columna se pasó a un tubo nuevo de recolección y se hicieron pasar 50 µL del buffer de elución por el centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1

min y trascurrido el tiempo se centrifugó a máxima velocidad por 2 min. El producto de PCR purificado se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de *Ganoderma lucidum* s.l.

Se realizó la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas 382, 145 y 796 de *G. lucidum* s.l. utilizando los iniciadores ITS1-F e ITS4-B reportados por Gardes y Bruns (1993) obteniendo como resultado bandas de 600 pb aproximadamente (Figura 7).

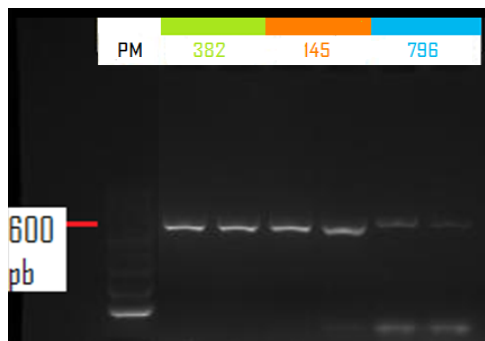


Figura 7. Amplificación de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 de *G. lucidum* s.l. En el primer carril del gel se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo y tercero las muestras correspondientes a la cepa 382, en el cuarto y quinto las muestras de la cepa 145 y en el sexto y séptimo las muestras de la cepa 796.

Una vez obtenidas las secuencias de la región ITS de las tres cepas, se compararon contra la base de datos del GenBank por medio del algoritmo BLAST (megablast) (Altschul et al., 1997). En la tabla 10 se muestran las secuencias de los ITS de las cepas, el organismo del GenBank con mayor similitud, el porcentaje de cobertura, así como el porcentaje de semejanza entre ambas secuencias. Como se puede observar en las tablas referidas, la secuencia de las cepas 382 y 145 se diferenciaron entre ellas solo por un nucleótido, el cual se encuentra resaltado en rojo. Esta diferencia encontrada se debe a la ecología, morfología, y principalmente a la distancia evolutiva que se ha presentado en esta especie (Moncalvo et al., 1995). Por otra parte, las dos cepas mantienen una similitud del 98% con la cepa GI-22 de *G. lucidum* (Huang et al., 2009a). Los resultados del BLAST para la cepa 796 mostraron que ésta mantiene un porcentaje de similitud del 98% con la secuencia de la cepa DP107 de *Ganoderma resinaceum* (Guglielmo et al., 2008). Por lo anterior, se dedujo que lo correcto sería trabajar

con la cepa 382 o la cepa 145 de *G. lucidum* s. l. No obstante, sin considerar algún criterio de selección entre ambas cepas, se decidió trabajar en los experimentos posteriores con la cepa 382.

Tabla 10. Análisis de similitud de las secuencias ITS de las cepas 382, 145 y 796, con secuencias depositadas en el GenBank

Cepa	Secuencia	Organismo	Cobertura	Similitud	Ref.					
382	CATTATCGAG TTTTGACCGG GTTGTAGCTG	<i>G. lucidum</i> *[GU213483]	100%	98%	[22]					
	GCCTTCCGAG GCATGTGCAC GCCCTGCTCA									
	TCCACTCTAC ACCTGTGCAC TTACTGTGGG									
	CTTCAGATCG CGAGGCAGGC TCTTTACCGG									
	GCTTGCGGAG CGCATCTGTG CCTGCGTTTA									
	TCACAAACTC TATAAAGTAA CAGAATGTGT									
	ATTGCGATGT AACGCATCTA TATACAACCT									
	TCAGCAACGG ATCTCTTGGC TCTCGCATCG									
	ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA									
	TGTGAATTGC AGAATTCAGT GAATCATCGA									
	ATCTTTGAAC GCACCTTGCG CTCCTTG GTA									
	TTCCGAGGAG CATGCCTGTT TGAGTGTCAT									
	GAAATCTTCA ACCTACAAGC TTTTGTGGTT									
	TGTAGGCTTG GACTTGGAGG CTTGTCCGGCC									
	GTTATTGGTC GGCTCCTCTT AAATGCATTA									
	GCTTGGTTCT TTGCGGATCG GCTTTCGGTG									
	TGATAATATC TACGCCGCGA CCGTGAAGCG									
	TTTGACGAGC TTCTAACCGT CTTATAGACA									
	GCTTTATGAC CTCTGACCTC AAATCAGGTA									
	GGACTACCCG CTGAACTTAA GCATATCA									
	145					CATTATCGAG TTTTGACCGG GTTGTAGCTG	<i>G. lucidum</i> *[GU213483]	100%	98%	[22]
						GCCTTCCGAG GCATGTGCAC GCCCTGCTCA				
						TCCACTCTAC ACCTGTGCAC TTACTGTGGG				
						CTTCAGATCG CGAGGCAGGC TCTTTACCGG				
						GCTTGCGGAG CGCATCTGTG CCTGCGTTTA				
TCACAAACTC TATAAAGTAA CAGAATGTGT										
ATTGCGATGT AACGCATCTA TATACAACCT										
TCAGCAACGG ATCTCTTGGC TCTCGCATCG										
ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA										
TGTGAATTGC AGAATTCAGT GAATCATCGA										
ATCTTTGAAC GCACCTTGCG CTCCTTG GTA										
TTCCGAGGAG CATGCCTGTT TGAGTGTCAT										
GAAATCTTCA ACCTACAAGC TTTTGTGGTT										
TGTAGGCTTG GACTTGGAGG CTTGTCCGGCC										
GTTATTGGTC GGCTCCTCTT AAATGCATTA										
GCTTGGTTCC TTGCGGATCG GCTTTCGGTG										
TGATAATATC TACGCCGCGA CCGTGAAGCG										
TTTGACGAGC TTCTAACCGT CTTATAGACA										
GCTTTATGAC CTCTGACCTC AAATCAGGTA										
GGACTACCCG CTGAACTTAA GCATATCA										

*Clave de acceso GenBank. [22] Huang et al., (2009a); [23] Guglielmo et al., (2008); [24] Arulpandi y Kalaichelvan, (2010); [25] Harsh et al., (2010); [26] Su et al., (2008)

Tabla 10 (Continuación). Análisis de similitud de las secuencias ITS de las cepas 382, 145 y 796, con secuencias depositadas en el GenBank

Cepa	Secuencia	Organismo	Cobertura	Similitud	Ref
796	GTTTTGACTG GGTGTAGCT GGCCTTCCGA	<i>G. resinaceum</i> *[AM906064]	100%	98%	[23]
	GGCATGTGCA CGCCCTGCTC ATCCACTCTA				
	CACCTGTGCA CTTACTGTGG GTTCCAGACG	<i>G. lucidum</i> *[FJ463923]	100%	97%	[24]
	TTGTGGAAGC GGGCTCCTTA TGGAGCTTGT				
	GGATCGGCGT GCCTGTGCCT GCGTTTATCA	<i>G. weberianum</i> *[GU726935]	100%	96%	[25]
	CAAACCTAT AAAGTATTAG AATGTGTATT				
	GCGATGTAAC GCATCTATAT ACAACTTTCA	<i>G. subamboinens</i> *[DQ425006]	100%	96%	[26]
	GCAACGGATC TCTTGGCTCT CGCATCGATG				
	AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT				
	GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC				
	TTTGAACGCA CCTTGGCCTC CTTGGTATTC				
	CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATGAA				
	ATCTTCAACT TACAGATCTT TGCGGGTTTG				
	TAGGCTTGG A CTT				

*Clave de acceso GenBank. [22] Huang et al., (2009a); [23] Guglielmo et al., (2008); [24] Arulpani y Kalaichelvan, (2010); [25] Harsh et al., (2010); [26] Su et al., (2008)

6.2. Diseño de iniciadores

Se diseñaron 3 pares de iniciadores para los genes que sintetizan cada una de las enzimas involucradas en el metabolismo de los β -(1,3)-D-glucanos (α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y la 1,3- β -glucano sintetasa) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00500.html>). Puesto que no se contaba con secuencias de estas enzimas en basidiomicetos filogenéticamente cercanos a *G. lucidum*, todos los iniciadores fueron degenerados. La tabla 11 muestra la secuencia de cada iniciador, su tamaño (que osciló entre 17 y 25 nucleótidos de los cuales del 43 al 70% fueron Guaninas y Citosinas), el número de bases degeneradas (Bd), el cual estuvo en función de la variabilidad de las regiones conservadas entre las diferentes secuencias alineadas, la temperatura de alineamiento (T_a) y finalmente los organismos utilizados en cada caso. Como se observa en la tabla 11 los iniciadores diseñados mostraron temperaturas de

alineamiento variables (46-65°C), razón por la cual se implementaron distintos gradientes de Ta en las PCR.

Por otra parte, el uso de bases degeneradas no fue el mismo en todos los casos, ya que en algunos alineamientos las regiones eran más conservadas que en otros, independientemente de los organismos utilizados como base para el diseño de los iniciadores en cada enzima. Por ejemplo, para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa se utilizaron secuencias correspondientes a *Laccaria bicolor* (Martin et al., 2008), *Ustilago maydis* (Birren et al., 2006) y *Malassezia globosa* (Xu et al., 2007), teniendo como resultado iniciadores con 3, 4 y 5 bases degeneradas, lo cual indica que a pesar de que los tres hongos utilizados son basidiomicetos, la secuencia del gen que codifica para esta enzima no es tan parecida entre ellos. Por otra parte para la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa se utilizaron secuencias de *Cryptococcus neoformans* (Thompson et al., 1999), *Ustilago maydis* (Birren et al., 2006) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ohyama et al., 2004), teniendo como resultado iniciadores con el mismo número de bases degeneradas (3, 4 y 5) a pesar de que los dos primeros hongos son basidiomicetos y el segundo ascomiceto. Por lo anterior se pudo observar que este gen mantiene ciertas regiones conservadas incluso en hongos que pertenecen a distintos Fila.

Tabla 11. Secuencia y características de los iniciadores diseñados

Secuencia	Nombre	Tamaño (nt's)	GC (%)	Bd	Ta (°C)	m.o.
CACATTGAYTTCAARWCRGCYACC	UDP74LbF	24	45.8	5	56.9	Lac, Ust, Mal
CCGTGMGKCAGATTGAGCAY	UDP447LbF	20	57.5	3	55.7	Lac, Ust, Mal
ATCCTSATGAMCTCKTTCAACACG	UDP500LbF	24	45.8	3	56.5	Lac, Ust, Mal
TTGAYGTCDGCYTTSGTCTTGTC	UDP851LbR	23	49.3	4	57.2	Lac, Ust, Mal
GAARTGCTTGATRGCMMGCWCC	UDP1118LbR	21	54.8	4	56.2	Lac, Ust, Mal
CTTGACMGGMARGAARCGCK	UDP1170LbR	20	57.5	5	57.0	Lac, Ust, Mal
AAGCCRTTYGAGSGCCARAA	FOS31LbF	20	52.5	4	58.7	Lac, Ust, Mal
CAAGGCYACYGGBGGYATC	FOS309LbF	19	64.0	4	55.7	Lac, Ust, Mal
AAYGGCGGTCCCHGCRCCWGA	FOS394LbF	20	66.7	4	64.6	Lac, Ust, Mal
CCAAAGAAAYTCCAGCCDGTGKG	FOS1039LbR	23	53.6	3	60.9	Lac, Ust, Mal
TCCTTYTCSGGATRTGGTC	FOS1123LbR	20	55.0	3	55.0	Lac, Ust, Mal
CCGGTGCCRCTMARRCGGAA	FOS1504LbR	20	65.0	4	62.6	Lac, Ust, Mal
ATCTGGCCYGCTTCTTACAAGGA	AGL64UmF	23	50.0	1	58.0	Ust y Pich
CCRATGTACGATCWCCCCARG	AGL178UmF	22	59.1	3	57.6	Ust y Pich
CCCARGWCGAYATGGGCTACG	AGL194UmF	21	61.9	3	58.5	Ust y Pich
GTCATKCCGATYCTTGTCCTYGG	AGL1152UmR	24	52.1	3	60.1	Ust y Pich
GRCCAWGCGTCKGTRCCYTC	AGL997UmR	20	65.0	5	57.9	Ust y Pich
TCGTGGTTYTCMAWGAAMACRGT	AGL1018UmR	23	43.5	5	56.2	Ust y Pich
GAGGACCGCGCCGTWCTGCA	GL6295LbF	20	70.0	1	63.9	Lac y Mal
GGAACACAYATSGCTGAGACGCT	GL6571LbF	23	54.3	2	58.6	Lac y Mal
TTCTGGGACTGGTYGGTGG	GL6802LbF	20	62.5	1	58.0	Lac y Mal
GCGCCGWARAAGTYGTTGTACCA	GL6982LbR	23	52.2	3	60.0	Lac y Mal
CCATTGGAYTCCATRTCWCCCTG	GL61066LbR	23	52.2	3	58.0	Lac y Mal
ACCTTWCCAAGCTCRACGCCCAT	GL61528LbR	23	54.3	2	61.7	Lac y Mal
GCYTACCCMGACTTRCARATTGCC	BGS2947UmF	24	54.2	4	60.4	Ust,Fil, Sac
CAYGCMGACTACATTGGYGG	BGS547UmF	20	57.5	3	55.0	Ust,Fil, Sac
TCKCARGTMTGGAAYGCCRT	BGS2113UmF	20	52.5	5	54.9	Ust,Fil, Sac
CCRTCWCCRAGAATDGGGTTACC	BGS3097UmR	23	53.6	4	57.6	Ust,Fil, Sac
TGCTTGATRCGRCCACWC GA	BGS3561UmR	21	57.1	3	60.9	Ust,Fil, Sac
AYGGCRTTCCAACACYTGMGA	BGS2113UmR	20	52.5	5	54.9	Ust,Fil, Sac
CGATCCMYSCACSGGCCTYT	BFF417UmF	20	67.5	5	63.2	Ust y Asp
CTCTACACSKCCGTCTCCWWSCT	BFF658UmF	23	58.7	5	57.5	Ust y Asp
TGGATGAACGAYCCHWRYGGTC	BFF388UmF	22	53.8	5	58.4	Ust, Ash, Ara
CCACCGMGATGASKGYRTAC	BFF885UmR	21	61.9	5	57.7	Ust y Asp
GGCTSGKYASAKCCCTCG	BFF1128UmR	18	69.4	5	54.7	Ust y Asp
CCSYRRTCGAGKAAGCCC	BFF1239UmR	18	66.7	5	53.9	Ust y Asp
CMWATGWTMCCDWCTTCGT	HEX241LbF	20	46.7	6	49.0	Lac, Ust, Mal
GGWGGMACVAAYMTDCG	HEX313LbF	17	55.9	6	46.3	Lac, Ust, Mal
ATCGACMRTGGYVWYCTCA	HEX559LbF	19	50.9	6	50.2	Lac, Ust, Mal
CCTWGAAGAGCACMSCT	HEX1028LbR	19	60.5	4	52.6	Lac y Ust
CTGCCCWAGGAARAGCACYCC	HEX1030LbR	21	61.9	3	58.1	Lac y Mal
CTCARDCKCGCWGMMCGT	HEX1227LbR	18	63.0	6	53.7	Lac, Ust, Mal
GTATGGCWGCAATGAYGGC	HEX1447LbR	20	57.5	2	57.3	Lac y Mal

Tamaño (nt's): Tamaño del iniciador en nucleótidos; GC (%): Porcentaje de Guaninas y Citosinas en el iniciador; Bd: Numero de bases degeneradas; Ta (°C): Temperatura de alineamiento; m.o.: microorganismos tomados como base en el diseño de cada iniciador; Lac: *Laccaria bicolor*; Mal: *Malassezia globosa*; Ust: *Ustilago maydis*; Fil: *Filobasidiella neoformans*; Sac: *Saccharomyces cerevisiae*; Pich: *Pichia stipitis*; Asp: *Aspergillus niger*; Ara: *Arabidopsis thaliana*; Ash: *Ashbya gossypii*.

6.3. Identificación de secuencias en el genoma de *G. lucidum s. l.*

Se probaron los iniciadores diseñados para cada uno de los genes. Los productos de las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% lográndose obtener fragmentos del peso molecular esperado en la mayoría de los casos. Sin embargo, debido a la degeneración de los iniciadores, en cada producto de PCR se obtuvo más de una banda. Estos resultados se presentan con detalle en la tabla 12, que muestra los iniciadores utilizados, el tamaño esperado y el tamaño obtenido de los fragmentos amplificados, así como la Ta óptima para cada caso. En las figuras 8-10 se pueden observar las bandas conseguidas con cada par de iniciadores, y su respectivo peso molecular.

Tabla 12. Fragmentos obtenidos por PCR con cada par de iniciadores.

Enzima	Iniciadores	Tamaño esperado (pb)	Tamaño aprox. obtenido (pb)	Ta optima (°C)
α-glucosidasa	AGL178UmF AGL997UmR	819	650 y 450	50
	AGL64UmF AGL1152UmR	1088	---	---
	AGL194UmF AGL1018UmR	824	---	---
UDP-glucosa pirofosforilasa	UDP74LbF UDP851LbR	777	---	---
	UDP447LbF UDP1170LbR	723	---	---
	UDP500LbF UDP1118LbR	618	600, 800 y 1200	56.1

Tabla 12 (Continuación). Fragmentos obtenidos por PCR con cada par de iniciadores.

Enzima	Iniciadores	Tamaño esperado (pb)	Tamaño aprox. obtenido (pb)	Ta optima (°C)
(1,3)- β -glucano sintetasa	BGS2113UmF BGS3097UmR	984	500 y 1000	54.4
	BGS547UmF BGS2113UmR	1566	600, 1000 y 1500	57.1
	BGS2947UmF BGS3561UmR	614	600 y 800	55
β -fructofuranosidasa	BFF417UmF BFF885UmR	468	---	---
	BFF388UmF BFF1239UmR	851	500 y 700	55.2
	BFF658UmF BFF1128UmR	470	500 y 900	50
Fosfoglucomutasa	FOS394LbF FOS1039LbR	645	---	---
	FOS309LbF FOS1504LbR	1195	300, 350, 500, 700, 800, 1000 y 1100	61.5
	FOS394LbF FOS1504LbR	1110	---	---
	FOS31LbF FOS1123LbR	1092	400, 600, 700 y 1100	47
Glucosa-6-fosfato isomerasa	GL6295LbF GL6982LbR	687	---	---
	GL6571LbF GL61528LbR	957	---	---
	GL6802LbF GL61528LbR	726	---	---
	GL6571LbF GL61066LbR	495	---	---

Tabla 12 (Continuación). Fragmentos obtenidos por PCR con cada par de iniciadores.

Enzima	Iniciadores	Tamaño esperado (pb)	Tamaño aprox. obtenido (pb)	Ta optima (°C)
Hexocinasa	HEX241LbF HEX1028LbR	787	200, 600 y 850	52.9
	HEX241LbF HEX1030LbR	789	250, 400, 600, 750 y 850	47.4
	HEX559LbF HEX1227LbR	668	200, 700, 900 y 1400	52.9
	HEX313LbF HEX1447LbR	1134	300, 450, 700, 800 y 1100	47.4

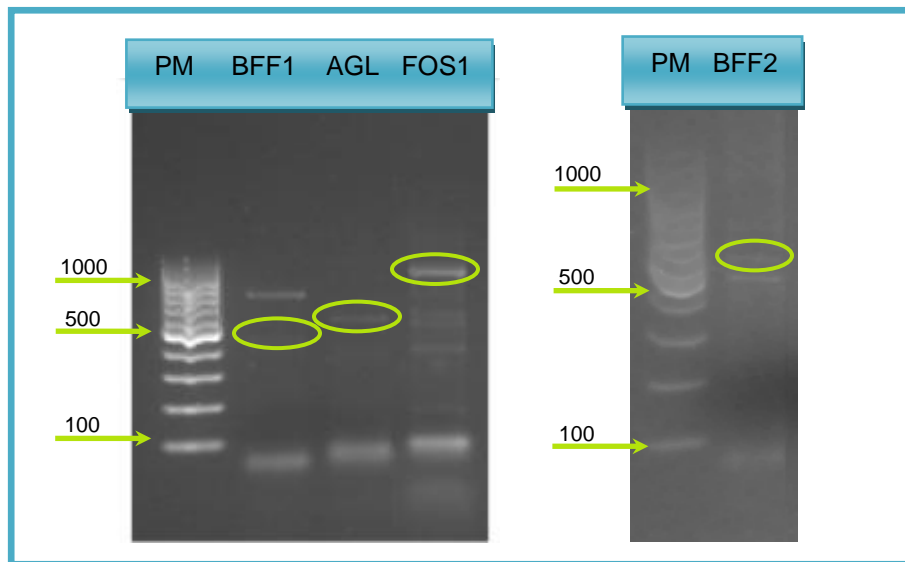


Figura 8. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas β -fructofuranosidasa, α -glucosidasa y Fosfoglucomutasa. PM: Marcador de peso molecular; BFF1: β -fructofuranosidasa utilizando los iniciadores BFF658UmF y BFF1128UmR; AGL: α -glucosidasa utilizando los iniciadores AGL178UmF y AGL997UmR; FOS1: Fosfoglucomutasa utilizando los iniciadores FOS31LbF y FOS1123LbR; BFF2: β -fructofuranosidasa utilizando los iniciadores BFF388UmF y BFF1239UmR. La banda del peso molecular cercano al esperado en cada muestra se exhibe marcada con un óvalo.

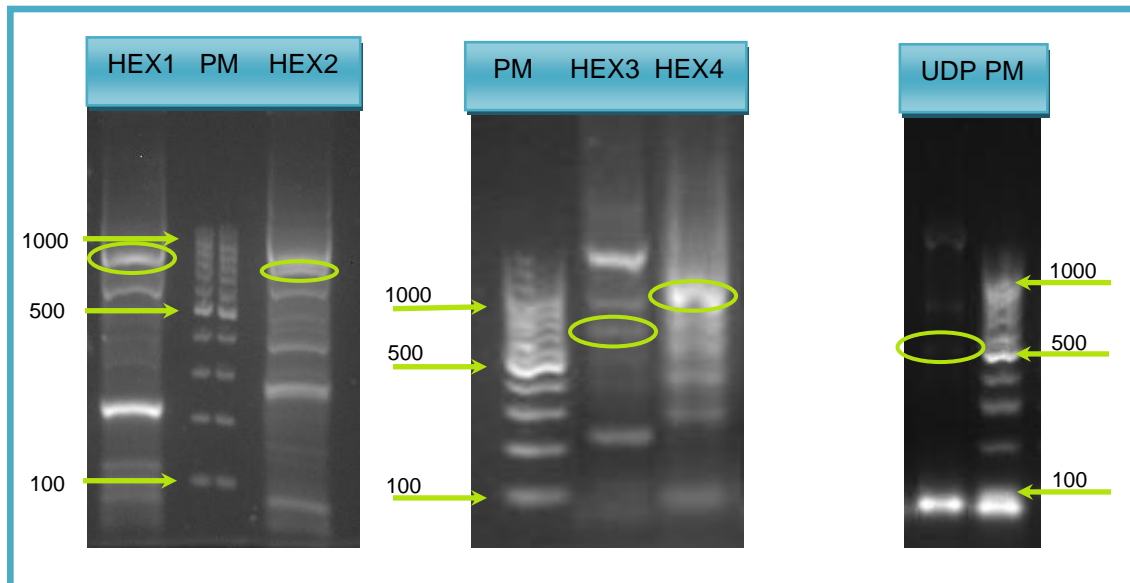


Figura 9. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas Hexocinasa y UDP-glucosa pirofosforilasa. PM: Marcador de peso molecular; HEX1: Hexocinasa utilizando los iniciadores HEX241LbF y HEX1028LbR; HEX2: Hexocinasa utilizando los iniciadores HEX241LbF y HEX1030LbR; HEX3: Hexocinasa utilizando los iniciadores HEX559LbF y HEX1227LbR; HEX4: Hexocinasa utilizando los iniciadores HEX313LbF y HEX1447LbR; UDP: UDP-glucosa pirofosforilasa utilizando los iniciadores UDP500LbF y UDP1118LbR. La banda del peso molecular cercano al esperado en cada muestra se exhibe marcada con un óvalo.

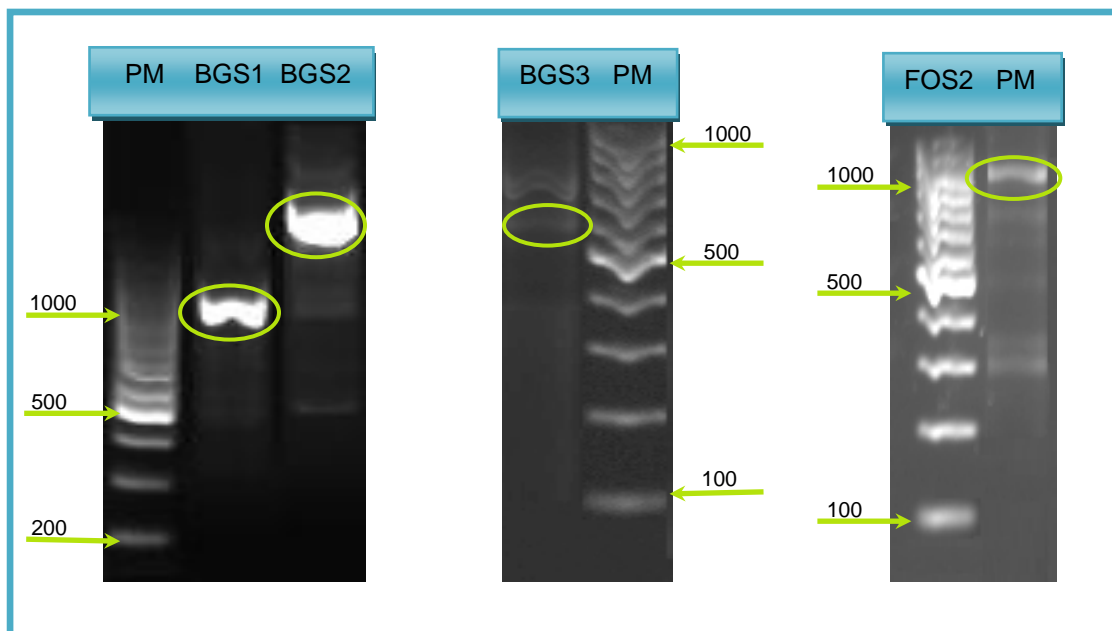


Figura 10. Productos de las PCR realizadas para amplificar los genes correspondientes a las enzimas (1,3)-β-glucano sintetasa y Fosfoglucomutasa. PM: Marcador de peso molecular; BGS1: (1,3)-β-glucano sintetasa utilizando los iniciadores BGS2113UmF y BGS3097UmR; BGS2: (1,3)-β-glucano sintetasa utilizando los iniciadores BGS547UmF y BGS2113UmR; BGS3: (1,3)-β-glucano sintetasa utilizando los iniciadores BGS2947UmF y BGS3561UmR; FOS2: Fosfoglucomutasa utilizando los iniciadores FOS309LbF y FOS1504LbR. La banda del peso molecular cercano al esperado en cada muestra se exhibe marcada con un óvalo.

También, se probaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1, 2 y 4 mM) en las reacciones que resultaron positivas. En algunos casos no se presentó cambio en las bandas resultantes, mientras que en otros fue visible un aumento o disminución en la intensidad de estas. En la tabla 13 se expone la concentración óptima de $MgCl_2$ para cada reacción. De todos los iniciadores diseñados, solo aquellos que se mencionan en la tabla 13 amplificaron fragmentos del peso molecular esperado.

Tabla 13. Concentración óptima de $MgCl_2$ en la PCR para cada par de iniciadores

Enzima	Iniciadores	[$MgCl_2$]
α -glucosidasa	AGL178UmF y AGL997UmR	2 mM
(1,3)- β -glucano sintetasa	BGS2113UmF y BGS3097UmR	3 mM
	BGS547UmF y BGS2113UmR	3 mM
	BGS2947UmF y BGS3561UmR	3 mM
β -fructofuranosidasa	BFF388UmF y BFF1239UmR	3 mM
	BFF658UmF y BFF1128UmR	3 mM
Fosfoglucomutasa	FOS309LbF y FOS1504LbR	3 mM
	FOS31LbF y FOS1123LbR	4 mM
Hexocinasa	HEX241LbF y HEX1028LbR	4 mM
	HEX241LbF y HEX1030LbR	4 mM
	HEX559LbF y HEX1227LbR	3 mM
	HEX313LbF y HEX1447LbR	3 mM

Una vez establecida la mejor concentración de $MgCl_2$ para cada par de iniciadores, se llevaron a cabo reacciones de 100 μ L, estas fueron separadas en un gel de agarosa y las bandas correspondientes al peso molecular esperado se cortaron y purificaron. Consecutivamente los productos ya purificados se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

6.4. Secuenciación

Se enviaron 12 muestras purificadas a secuenciar (Tabla 13), y se obtuvo la secuencia de 4 muestras. En la tabla 14 se muestran los iniciadores utilizados, el tamaño aproximado del fragmento que se envió a secuenciar y el tamaño de la secuencia obtenida. Cabe mencionar que se llevó a cabo la secuenciación de las 2 cadenas (sentido y antisentido). Las primeras tres muestras pertenecen a la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa y la cuarta a la enzima β -fructofuranosidasa. En las reacciones de secuenciación restantes (8 muestras) solo se obtuvo una débil, sucia y corta señal imposible de interpretar (figura 11), lo cual nos lleva a la hipótesis de que el uso de iniciadores degenerados en las reacciones de secuenciación haya provocado estos errores. En algunos manuales de secuenciación por ejemplo, en *la guía para la secuenciación automática de ADN de la Universidad de La Laguna, España* (http://www.segai.ull.es/serviceFiles/25_GuiaSecuenciacionAutomaticaADN.pdf) se describen las posibles causas de este tipo de errores. Analizando las opciones señaladas en esta guía es posible inferir que el problema estuvo en los iniciadores degenerados, ya que inicialmente en cada producto de PCR se obtuvieron 2 o más fragmentos amplificados y aunque cada muestra se sometió al proceso de purificación en gel de agarosa con la finalidad de obtener solo el fragmento de interés, pudo quedar una baja concentración (no visible en gel) de fragmentos que pudieran ser detectados en la reacción de secuenciación, lo que provocaría que los iniciadores no solo se unieran al fragmento de interés, sino que también a aquellos que contaminan la muestra. También se observó que las 4 muestras secuenciadas no produjeron más de 3 bandas (ver figuras 8 y 10), es decir, mostraron más especificidad que las muestras restantes. No obstante suponemos que esta baja contaminación también produjo efectos negativos en la reacción de secuenciación, ya que en algunos casos el tamaño del fragmento secuenciado fue mucho menor que el fragmento que se esperaba obtener (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de la secuenciación de los fragmentos obtenidos con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR], [BGS547UmF y BGS2113UmR], [BGS2947UmF y BGS3561UmR] y [BFF658UmF y BFF1128UmR]

Enzima	Iniciadores (muestra)	Tamaño aprox. de la banda cortada (pb)	Tamaño del fragmento secuenciado (pb)
(1,3)- β -glucano sintetasa	BGS2113UmF y BGS3097UmR	1000	885
	BGS547UmF y BGS2113UmR	1500	510
	BGS2947UmF y BGS3561UmR	600	269
β -fructofuranosidasa	BFF658UmF y BFF1128UmR	500	457

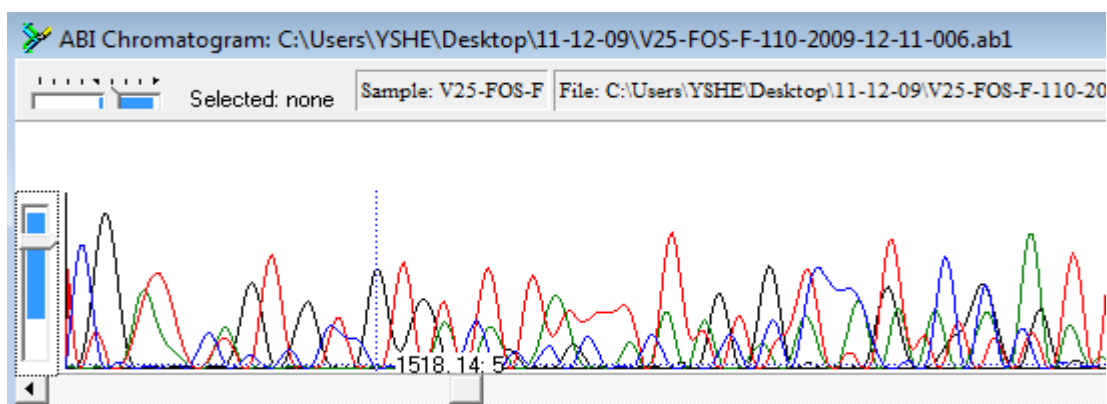


Figura 11. Cromatograma incorrecto del fragmento amplificado con los iniciadores FOS31LbF y FOS1123LbR. Resultado de la secuenciación del fragmento amplificado con los iniciadores FOS31LbF y FOS1123LbR para la enzima Fosfoglucomutasa.

Por lo anterior, se recomienda utilizar algún vector de clonación para cada muestra purificada, con la finalidad de evitar el uso de estos iniciadores (degenerados) en las reacciones de secuenciación.

Las secuencias fueron editadas con el software Sequencher 4.7, y con el objetivo de comparar las secuencias de nucleótidos editadas contra la base de datos del Gen Bank, se utilizó el algoritmo BLAST (blast n) (Altschul et al., 1997). Al realizar la comparación de las 4 secuencias de nucleótidos, se encontró que la secuencia amplificada con los iniciadores BGS2947UmF y BGS3561UmR de la (1,3)- β -glucano sintetasa y la secuencia obtenida con los iniciadores BFF658UmF

y BFF1128UmR de la β -fructofuranosidasa no mostraron similitud alguna con los genes de interés. Sin embargo, la secuencia obtenida con los iniciadores BGS2113UmF y BGS3097UmR y la secuencia obtenida con los iniciadores BGS547UmF y BGS2113UmR correspondientes a la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa, mostraron similitud con el gen de la (1,3)- β -glucano sintetasa de diferentes hongos. La tabla 15 muestra los resultados del BLAST obtenidos para las últimas 2 secuencias mencionadas.

Tabla 15. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR], con secuencias depositadas en el GenBank.

Muestra (iniciadores)	Similitud (gen)	Similitud (organismo)	Cobertura (%)	Similitud (%)	Ref.
Fragmento1 (BGS547UmF y BGS2113UmR)	(1,3)- β -glucano sintetasa	<i>Laccaria bicolor</i> [XM_001875351]	99	75	[5]
		<i>Coprinopsis cinerea</i> [XM_001833221]	98	75	[9]
		<i>Ustilago maydis</i> [XM_752693]	72	78	[3]
		<i>Cryptococcus neoformans</i> [XM_568719]	68	74	[1]
		<i>Cryptococcus neoformans</i> [AF102882]	68	72	[8]
Fragmento 2 (BGS2113UmF y BGS3097UmR)	(1,3)- β -glucano sintetasa	<i>Coprinopsis cinerea</i> [XM_001833221]	99	75	[9]
		<i>Moniliophthora perniciosa</i> [XM_002392134]	99	75	[4]
		<i>Laccaria bicolor</i> [XM_001875351]	100	74	[5]
		<i>Ustilago maydis</i> [XM_752693]	90	74	[3]
		<i>Cryptococcus neoformans</i> [XM_568719]	84	73	[1]
		<i>Cryptococcus neoformans</i> [AF102882]	84	73	[8]

* Clave de acceso al GenBank. [1] Loftus et al., (2005); [3] Birren et al., (2006); [4] Mondego et al., (2008); [5] Martin et al., (2008); [8] Thompson et al., (1999); [9] Birren et al., (2008).

Los resultados anteriores muestran que existe una gran similitud entre los fragmentos obtenidos y el gen de la (1,3)- β -glucano sintetasa de algunos basidiomicetos, estando incluidos los dos hongos utilizados para el diseño de iniciadores de esta enzima, *Cryptococcus neoformans-AF102882* (Thompson et al., 1999) y *Ustilago maydis-XM_752693* (Birren et al., 2006) . En la tabla 16 se presentan las dos secuencias de nucleótidos y sus correspondientes secuencias de aminoácidos obtenidas en este estudio.

Tabla 16. Secuencias obtenidas con los iniciadores [BGS547UmF y BGS2113UmR] y [BGS2113UmF y BGS3097UmR]

Muestra (iniciadores)	Nucleótidos	Aminoácidos
Fragmento1 (BGS547UmF BGS2113UmR)	CGAAAGTGGTACTTTCGCCCCACAGCTCAACCTCGATGATGCTGT TGGTCAGGTACAGAACCCCGGTCTGCAGCGCCTCCGGAGCGTGA AGGGCAAGCCACAGACCGCCGGGAGCAAGTCTTTGGATAGCGCC CTCAACCGCTGGCGGAACGCAATGAACAGCATGAGCCAGTACGA CCGTCTCCGACAGGTGCTCTCTACCTCCTCTGCTGGGGTGAAG CGGGCAACGTTTCGGTTCACACCGGAATGCTTGTGCTTCATCTTC AAGTGCGCCGATGACTACTACCGGAGTCCGGAGTGCCAGAACCG GATAGACCCGGTTCGGAGGGTCTGTACCTTGAGACTGTGGTCA AGCCTCTCTACCGCTTTATGAGGGATCAGGGCTACGAGGTTGTC GATGGCAAGTTTGTCCGTAGGGAAAAGGACCACGACCAGATCAT TGTTTACGACGACATTAACCAGCTCTTCTGGTACCCAGAGGGTA TCGCGAAGATTGTCCTCCAGGATAAC	RKWFYFAPQLNLDDAV GQVQNPGLQRLRSVK GKPQTAGSKSLDSAL NRWRNAMNSMSQYDR LRQVALYLLCWGEAG NVRFTPECLCFIFKC ADDYYRSPECQNRID PVPEGLYLETVVKPL YRFMRDQGYEVVDGK FVRREKDHQDIIGYD DINQLFWYPEGIAKI VLQDN
Fragmento 2 (BGS2113UmF BGS3097UmR)	CACGTCCAGCGTCTCCTGTACCACCAAGTCGACAGTCCTGACGG TCGTGCTACCCTCCGTGCACCTCCCTTCTTTACCGCGAACAACG GCAACGAATCGCAGTTCTTCCCCGTCGGTGGAGAGGCTGAGCGT CGTCTTTTCGTTCTTTGCGTCGTCCCTCACGACTGCTCTTCCGGA GCCTCTCCCTGTTGACGCCATGCCCACGTTACGGTTCCTTGTAC CGCACTACTCTGAGAAGATCCTGTTGAGTCTGCGGGAGATCATC AGGGAAGAGGACCAGAACACCCGTGTCACGCTGCTTGAGTATCT CAAGCAACTGCACCCTGTGAGTGGGACAACCTCGTTAAGGATA CTAAGATCCTCGCCGAGGAATCCGAGACTACGACCTTCGACGCC ACGCAGAGCACGAACGAGAAGTCGGGCAATAAGCGGACGGACGA CCTTCCCTTCTACTGCATCGGTTTCAAGACGGCCGACCGGAGT ACACTCTCCGTACGCGTATCTGGGCTTCCCTGCGCGCGCAGACG CTTTACCGCACTGTCTCCGGTATGATGAACTACTCCAAGGCCAT CAAGCTCCTCTACCGCGTCGAGAACCCCGAGATCGTTTCAGCGCT TTGCTGGCAACACGGATCGCCTTGAGCGTGAACCTCGAGCGCATG TCCCGCCGGAAGTTCAAGTTCACGGTCTCAATGCAGCGGTATGC CAAGTTCAACAAGGAGGAACCTGGAGAACCGCGARTTCTTGCTCC GTGCCTACCCCGACCTGCAGATCGCATACTGGACGAAGAGCCT GCGCCCAAGGCGGAGATCCGCGCCTCTTCTCGACCCTCATCGA TGGCCACTCCGAGATTGACGAGCAGACTGGGAAGCGGAAGCCCA AGTTC	HVQRLLYHQVDSPDG RRTLRAPPPFTANNG NESQFFPVGGEAERR LSFFASSLTTALPEP LPVDAMPTFTVLVPH YSEKILLSLREIIRE EDQNTRVTLLEYLQK LHPVEWDNFVKDKI LAESETTTTFDATQS TNEKSGNKRTDDLFP YICIGFKTAAPEYTLR TRIWASLRAQTLYRT VSGMMNYSKAIKLLY RVENPQIVQRFAGNT DRLERELERMSRRKF KFTVSMQRYAKFNKE ELENAEFLLRAYPDL QIAYLDEEPAPKGGD PRLFSTLIDGHSEID EQTGKRKPKF

El gen correspondiente a la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa en *C. neoformans-AF102882* está constituido por 8023 nucleótidos (Thompson et al., 1999), mientras que la secuencia reportada de este gen se encuentra incompleta en el resto de los hongos mencionados en la tabla 15. La ubicación de los fragmentos 1 y 2 de *G. lucidum s. l.* obtenidos en este trabajo, en el gen de la (1,3)- β -glucano sintetasa de *C. neoformans-AF102882* (Thompson et al., 1999) se puede observar en la figura 12. El fragmento 1 abarca del nucleótido 2391 al 2921, mientras que el fragmento 2 se extiende desde el nucleótido 4025 al 4918.

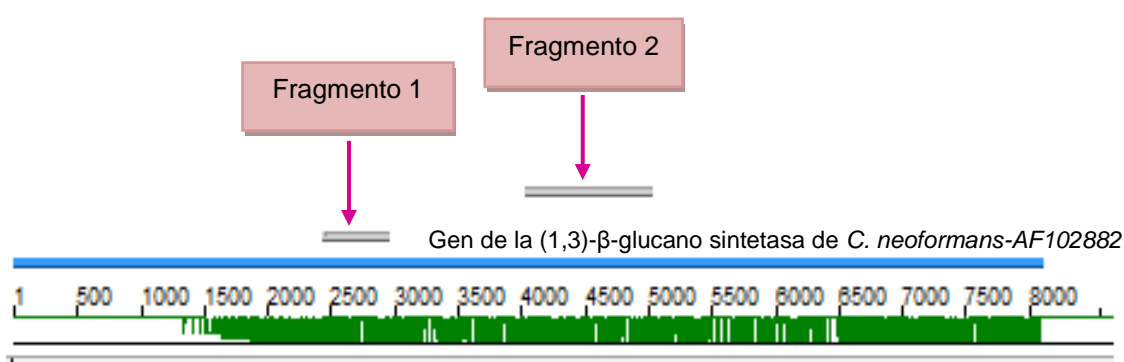


Figura 12. Ubicación de los fragmentos 1 y 2 de *G. lucidum s. l.* Fragmentos 1 y 2 de *G. lucidum s. l.* en el gen de la (1,3)- β -glucano sintetasa de *C. neoformans-AF-102882* (Thompson et al., 1999)

Posteriormente se alinearon por separado las secuencias de aminoácidos del fragmento 1 y el fragmento 2 de *G. lucidum s. l.*, con las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes de los organismos resultantes en el BLAST. Para ambos alineamientos se incluyó la secuencia de aminoácidos del gen (1,3)- β -glucano sintetasa de *Saccharomyces cerevisiae-AY395693* (Ohyama et al., 2004) ya que ésta también fue utilizada en el diseño de los iniciadores. Finalmente, con este alineamiento de aminoácidos, se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias, utilizando el Software MEGA versión 4 (Tamura et al., 2007) con el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Los resultados de este análisis se pueden visualizar en los arboles filogenéticos obtenidos (Figura 13 y 14), en los cuales se distinguen claramente las diferencias filogenéticas entre los

genes de las distintas especies de hongos y los fragmentos obtenidos con los iniciadores diseñados en este estudio.

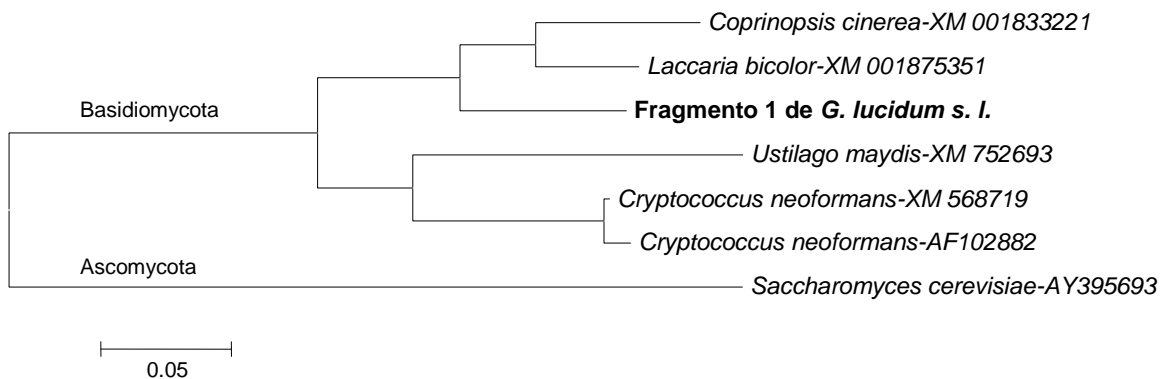


Figura 13. Árbol filogenético del fragmento 1 de *G. lucidum s. l.* obtenido con los iniciadores [BGS547UmF BGS2113UmR]

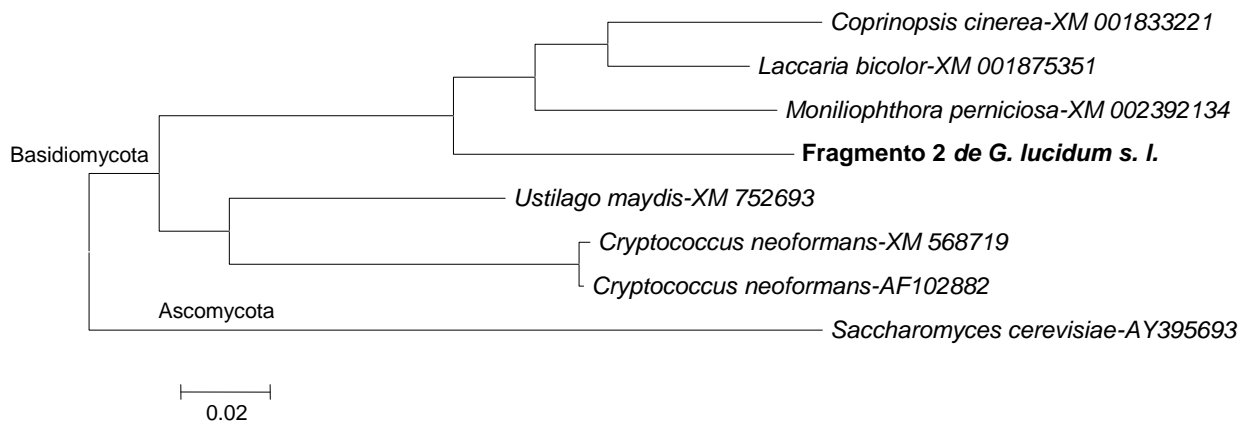


Figura 14. Árbol filogenético del fragmento 2 de *G. lucidum s. l.* obtenido con los iniciadores [BGS2113UmF y BGS3097UmR]

Como era de esperarse, el fragmento 1 del gen de la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa de *G. lucidum* s. l. mantiene una estrecha relación con los genes de esta enzima correspondientes a los basidiomicetos *C. cinerea*-XM 001833221 (Birren et al., 2008) y *L. bicolor*-XM 001875351 (Martin et al., 2008) (Figura 13) ya que al igual que *G. lucidum* ambos pertenecen a la clase de los Agaricomycetos, mientras que *U. maydis* y *C. neoformans* pertenecen a la clase de los Ustilagomycetos y de los Tremellomycetos respectivamente (NCBI taxonomy). De forma similar, el fragmento 2 de la misma enzima fue agrupado con los basidiomicetos *C. cinerea*-XM 001833221 (Birren et al., 2008), *L. bicolor*-XM 001875351 (Martin et al., 2008) y *M. pernicioso*-XM 002392134 (Mondego et al., 2008) (Figura 14) ya que este ultimo también pertenece a la clase de los Agaricomycetos (NCBI taxonomy). La secuencia del gen de la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa de *M. pernicioso*-XM 002392134 (Mondego et al., 2008) se encuentra incompleta y solo abarca una pequeña región del gen, por lo que fue imposible realizar la comparación del fragmento 1 de *G. lucidum* s. l. con la secuencia de *M. pernicioso*-XM 002392134 (Mondego et al., 2008).

Por los resultados obtenidos se puede afirmar que la secuencia de aminoácidos obtenida corresponde a la secuencia del gen que sintetiza la enzima (1,3)- β -glucano sintetasa en *G. lucidum*.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvo la secuencia de la región ITS de las cepas 382, 145 y 796 observando que las cepas 382 y 145 fueron similares en un 99 % a *G. lucidum*, mientras que la cepa 796 fue similar en un 98% a *G. resinaceum*.

Se diseñaron iniciadores degenerados para los genes que codifican cada una de las enzimas involucradas en la síntesis de los β -(1,3)-D-glucanos (α -glucosidasa, β -fructofuranosidasa, hexocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y la (1,3)- β -glucano sintetasa), obteniéndose amplificación para todos los genes excepto para el gen de la Glucosa-6-fosfato isomerasa.

La secuencia de aminoácidos obtenida con los iniciadores BGS547UmF y BGS2113UmR así como la secuencia obtenida con los iniciadores BGS2113UmF y BGS3097UmR mostraron gran similitud con las secuencias del gen de la (1,3)- β -glucano sintetasa de distintos basidiomicetos tales como *Coprinopsis cinerea*, *Moniliophthora perniciosa*, *Laccaria bicolor*, *Ustilago maydis* y *Cryptococcus neoformans*.

8. REFERENCIAS

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
2. Arulpandi, I., Kalaichelvan, P. T., 2010. *Ganoderma* from Southern India. GenBank: FJ463923.
3. Berovic, M., Habijanac, J., Zore, I., Wraber, B., Hodzar, D., Boh, B., Pohleven, F., 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol* 103, 77-86.
4. Berry, D. R., 1988. *Physiology of Industrial Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
5. Birren, B., Lander, E., Galagan, J., Nusbaum, C., Devon, K., Ma, L.-J., Jaffe, D., Butler, J., Alvarez, P., Gnerre, S., Grabherr, M., Kleber, M., Mauceli, E., Brockman, W., Rounsley, S., Young, S., LaButti, K., Pushparaj, V., DeCaprio, D., Crawford, M., Koehrsen, M., Engels, R., Montgomery, P., Pearson, M., Howarth, C., Larson, L., Luoma, S., White, J., Kodira, C., Zeng, Q., Alvarado, L., Yandava, C., O'leary, S., Dietrich, F., Pukkila, P., 2008. Annotation of the *Coprinopsis cinerea* genome. GenBank: XM_001833221.
6. Birren, B., Nusbaum, C., Abebe, A., Abouelleil, A., Adekoya, E., Ait-zahra, M., Allen, N., Allen, T., An, P., Anderson, M., Anderson, S., Arachchi, H., Armbruster, J., Bachantsang, P., Baldwin, J., Barry, A., Bayul, T., Blitshsteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Borowsky, M., Boukhgalter, B., Brunache, A., Butler, J., Calixte, N., Calvo, S., Camarata, J., Campo, K., Chang, J., Cheshatsang, Y., Citroen, M., Collymore, A., Considine, T., Cook, A., Cooke, P., Corum, B., Cuomo, C., David, R., Dawoe, T., Degray, S., Dodge, S., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Elkins, T., Engels, R., Erickson, J., Farina, A., Faro, S., Ferreira, P., Fischer, H., Fitzgerald, M., Foley, K., Gage, D., Galagan, J., Gearin, G., Gnerre, S., Gnrirke, A., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Hatcher, B., Heller, A., Higgins, H., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hulme, W., Husby, E., Iliev, I., Jaffe, D., Jones, C., Kamal, M., Kamat, A., Kamvysselis, M., Karlsson, E., Kells, C., Kieu, A., Kisner, P., Kodira, C., Kulbokas, E., Labutti, K., Lama, D., Landers, T., Leger, J., Levine, S., Lewis, D., Lewis, T., Lindblad-toh, K., Liu, X., Lokyitsang, T., Lokyitsang, Y., Lucien, O., Lui, A., Ma, L. J., Mabbitt, R., Macdonald, J., Maclean, C., Major, J., Manning, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., Mauceli, E., Mccarthy, M., Mcdonough, S., Mcghee, T., Meldrim, J., Meneus, L., Mesirov, J., Mihalev, A., Mihova, T., Mikkelsen, T., Mlenga, V., Moru, K., Mozes, J., Mulrain, L., Munson, G., Naylor, J., Newes, C., Nguyen, C., Nguyen, N., Nguyen, T., Nicol, R., Nielsen, C., Nizzari, M., Norbu, C., Norbu, N., O'donnell, P., Okoawo, O., O'leary, S., Omotosho, B., O'neill, K., Osman, S., Parker, S., Perrin, D., Phunkhang, P., Piqani, B., Purcell, S., Rachupka, T., Ramasamy, U., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Retta, R., Richardson, S., Rise, C., Rodriguez, J., Rogers, J., Rogov, P., Rutman, M., Schupbach, R., Seaman, C., Settipalli, S., Sharpe, T., Sheridan, J., Sherpa, N.,

- Shi, J., Smirnov, S., Smith, C., Sougnez, C., Spencer, B., Stalker, J., Stange-thomann, N., Stavropoulos, S., Stetson, K., Stone, C., Stone, S., Stubbs, M., Talamas, J., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Theodore, J., Thoulutsang, Y., Topham, K., Towey, S., Tsamla, T., Tsomo, N., Vallee, D., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vinson, J., Vo, A., Wade, C., Wang, S., Wangchuk, T., Wangdi, T., Whittaker, C., Wilkinson, J., Wu, Y., Wyman, D., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Yeager, S., Yee, E., Young, G., Zainoun, J., Zembeck, L., Zimmer, A., Zody, M., Lander, E., 2006. The genome sequence of *Ustilago maydis*. GenBank: XM_754746.
7. Blackwell, M., Spatafora, J. W., 2004. Fungi and their allies. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 7-21.
 8. Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L., 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnol Annu Rev 13, 265-301.
 9. Cao, L. Z., Lin, Z. B., 2002. Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Immunol Lett 83, 163-169.
 10. Chang, M. Y., Tsai, G. J., Houg, J. Y., 2006. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. Enzyme Microb Technol 38, 407-414.
 11. Chen, J. H., Zhou, J. P., Zhang, L. N., Nakumura, Y., Norisuye, T., 1998. Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Polymer J 30, 838-842.
 12. Cheong, J., Jung, W., Park, W., 1999. Characterization of an alkali-extracted peptidoglycan from Korean *Ganoderma lucidum*. Arch Pharm Res 22, 515-519.
 13. Cheung, W. M., Hui, W. S., Chu, P. W., Chiu, S. W., Ip, N. Y., 2000. *Ganoderma* extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. FEBS Lett 486, 291-296.
 14. Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pohlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R. A., Flavier, A., Gaffney, T. D., Philippsen, P., 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. Science 304, 304-307.
 15. Ding, Y. X., Ou-Yang, X., Shang, C. H., Ren, A., Shi, L., Li, Y. X., Zhao, M. W., 2008. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a farnesyl-diphosphate synthase gene from the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. Biosci Biotechnol Biochem 72, 1571-1579.
 16. El-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T., Otake, T., 1998. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry 49, 1651-1657.
 17. Fang, Q.-H., Zhong, J.-J., 2002a. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochemistry 37, 769-774.
 18. Fang, Q.-H., Zhong, J.-J., 2002b. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites, ganoderic acid and polysaccharide. Biochemical Engineering Journal 10, 61-65.

19. Fei, X., Zhao, M. W., Li, Y. X., 2006. Cloning and sequence analysis of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol* 44, 515-522.
20. Fung, E., Hyman, R. W., Rowley, D., Bruno, D., Miranda, M., Fukushima, M., Wickes, B. L., Fu, J., Davis, R. W., 2008. *Cryptococcus neoformans* serotype D sequencing. GenBank: XM_769635.
21. Gadd, G. M., 1988. Carbon nutrition and metabolism. In: Berry, D. R. (Ed.), *Physiology of Industrial Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 21-57.
22. Gao, Y., Zhou, S., Chen, G., Dai, X., Ye, J., 2002. A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. extract (ganopoly) in patients with advanced cancer. *Int J Med Mushrooms* 4, 207–214.
23. Gardes, M., Bruns, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2, 113-118.
24. Guglielmo, F., Gonthier, P., Garbelotto, M., Nicolotti, G., 2008. A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus s.l.* and *Phellinus s.l.* *FEMS Microbiol Lett* 282, 228-237.
25. Halpern, G. M., 2007. *Healing Mushrooms*. Squareone, Nueva York.
26. Harsh, N. S. K., Mohanty, P. S., Pandey, A., 2010. A new report of *Ganoderma weberianum* from north India evident from molecular study. GenBank: GU726935.
27. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvardeen, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111, 509-547.
28. Hsu, M. J., Lee, S. S., Lin, W. W., 2002. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 207-216.
29. Huang, L. H., Wu, Q. P., Yang, X. B., 2009a. Identification of *Ganoderma* spawns based on ITS sequence analysis. GenBank: GU213483.
30. Huang, S. T., Tzean, S. S., Tsai, B. Y., Hsieh, H. J., 2009b. Cloning and heterologous expression of a novel ligninolytic peroxidase gene from poroid brown-rot fungus *Antrodia cinnamomea*. *Microbiology* 155, 424-433.

31. Huie, C. W., Di, X., 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 812, 241-257.
32. Hung, W. T., Wang, S. H., Chen, C. H., Yang, W. B., 2008. Structure determination of beta-glucans from *Ganoderma lucidum* with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Molecules* 13, 1538-1550.
33. Itagaki, T., 2007. Ribonuclease GI30. GenBank: AB330060.
34. Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y. S., Passoth, V., Richardson, P. M., 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* 25, 319-326.
35. Kim, K. C., Kim, I. G., 1999. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *Int J Mol Med* 4, 273-277.
36. Lai, T., Gao, Y., Zhou, S., 2004. Global Marketing of Medicinal Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) Products and Safety Concerns. *Int J Med Mushrooms* 6, 189-194.
37. Laroche, C., Michaud, P., 2007. New developments and prospective applications for beta (1,3) glucans. *Recent Pat Biotechnol* 1, 59-73.
38. Latge, J. P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66, 279-290.
39. Lee, S. S., Lee, P. L., Chen, C. F., Wang, S. Y., Chen, K. Y., 2003. Antitumor Effects of Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 5, 1-16.
40. Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I. J., Fraser, J. A., Allen, J. E., Bosdet, I. E., Brent, M. R., Chiu, R., Doering, T. L., Donlin, M. J., D'Souza, C. A., Fox, D. S., Grinberg, V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B. J., Huang, J. C., Janbon, G., Jones, S. J., Koo, H. L., Krzywinski, M. I., Kwon-Chung, J. K., Lengeler, K. B., Maiti, R., Marra, M. A., Marra, R. E., Mathewson, C. A., Mitchell, T. G., Perte, M., Riggs, F. R., Salzberg, S. L., Schein, J. E., Shvartsbeyn, A., Shin, H., Shumway, M., Specht, C. A., Suh, B. B., Tenney, A., Utterback, T. R., Wickes, B. L., Wortman, J. R., Wye, N. H., Kronstad, J. W., Lodge, J. K., Heitman, J., Davis, R. W., Fraser, C. M., Hyman, R. W., 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307, 1321-1324.
41. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2003. Brock biology of microorganisms. Prentice Hall/Pearson Education, Upper Saddle River.
42. Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E. G., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buee, M., Brokstein, P., Canback, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P.,

- Kilaru, S., Labbe, J., Lin, Y. C., Legue, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M. P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kues, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouze, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tunlid, A., Tuskan, G., Grigoriev, I. V., 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452, 88-92.
43. Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C. P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, A. T., Kersten, P., Hammel, K. E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S. S., Larrondo, L. F., Canessa, P., Vicuna, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A. G., Lavin, J. L., Oguiza, J. A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Harris, P., Magnuson, J. K., Baker, S. E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P. J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C. L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I. V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R., Cullen, D., 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1954-1959.
 44. Monclavo, J. M., Wang, H. F., Hseu, R. S., 1995. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99, 1489-1499.
 45. Mondego, J. M., Carazzolle, M. F., Costa, G. G., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D. M., Cunha, A. F., Carrer, H., Vidal, R. O., Estrela, R. C., Garcia, O., Thomazella, D. P., de Oliveira, B. V., Pires, A. B., Rio, M. C., Araujo, M. R., de Moraes, M. H., Castro, L. A., Gramacho, K. P., Goncalves, M. S., Neto, J. P., Neto, A. G., Barbosa, L. V., Gultinan, M. J., Bailey, B. A., Meinhardt, L. W., Cascardo, J. C., Pereira, G. A., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* 9, 548.
 46. Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G. A., 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol* 7, 701-724.
 47. Muller, C. I., Kumagai, T., O'Kelly, J., Seeram, N. P., Heber, D., Koeffler, H. P., 2006. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leuk Res* 30, 841-848.
 48. Ohyama, T., Miyakoshi, S., Isono, F., 2004. FKS1 mutations responsible for selective resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to the novel 1,3-beta-glucan synthase inhibitor arborcandin C. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 319-322.
 49. Paterson, R. R., 2006. *Ganoderma* - a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, 1985-2001.
 50. Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X.,

- Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., Danchin, E. G., Debets, A. J., Dekker, P., van Dijck, P. W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A. J., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G. S., de Groot, P. W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J. P., van den Hondel, C. A., van der Heijden, R. T., van der Kaaij, R. M., Klis, F. M., Kools, H. J., Kubicek, C. P., van Kuyk, P. A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M. J., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M. A., Nielsen, J., Oliver, S. G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N. N., Ram, A. F., Rinas, U., Roubos, J. A., Sagt, C. M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P. J., Wedler, H., Wosten, H. A., Zeng, A. P., van Ooyen, A. J., Visser, J., Stam, H., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25, 221-231.
51. Pontón, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., Quindós, G., 2002. Hongos y Actinomicetos Alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao.
 52. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., 1999. *Microbiology*. WCB/McGraw-Hill, Boston.
 53. Rollán, M. G., 1984. *Setas de los árboles: Hongos basidiomicetos de la Madera*. Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid.
 54. Roux, K. H., 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl* 4, 185-194.
 55. Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
 56. Shang, C. H., Zhu, F., Li, N., Ou-Yang, X., Shi, L., Zhao, M. W., Li, Y. X., 2008. Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1333-1339.
 57. Sliva, D., English, D., Lyons, D., Lloyd, F. J., 2002a. Protein kinase C induces motility of breast cancers by upregulating secretion of urokinase-type plasminogen activator (uPA) through the activation of AP-1 and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 552-557.
 58. Sliva, D., Labarrere, C., Slivova, V., Sedlak, M., Lloyd, F. P., Jr., Ho, N. W. Y., 2002b. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298, 603-612.
 59. Sliva, D., Rizzo, M. T., English, D., 2002c. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF- κ B regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 3150-3157.
 60. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., Misaki, A., 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem* 49, 2641-2653.
 61. Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., Sliva, D., 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β 1 from prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 46-52.

62. Su, C. L., Zhang, J. S., Pan, Y. J., 2008. The genetic diversity of isolates of *Ganoderma* inferred from ITS sequences. GenBank: DQ425006.
63. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.
64. Tang, Y. J., Zhong, J. J., 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid Enzyme and Microbial Technology 31, 20-28.
65. Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R., Kurtz, M., 1999. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. J Bacteriol 181, 444-453.
66. Wainwright, M., 1995. Introducción a la biotecnología de los hongos. Acribia S.A., Zaragoza.
67. Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., Ho, C. K., 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int J Cancer 70, 699-705.
68. Wasser, S. P., 2005. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In: Coates, P. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J., White, J. D. (Eds.), Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 603-622.
69. Xie, J. T., Wang, C. Z., Wicks, S., Yin, J. J., Kong, J., Li, J., Li, Y. C., Yuan, C. S., 2006. *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells. Exp Oncol 28, 25-29.
70. Xu, J., Saunders, C. W., Hu, P., Grant, R. A., Boekhout, T., Kuramae, E. E., Kronstad, J. W., Deangelis, Y. M., Reeder, N. L., Johnstone, K. R., Leland, M., Fieno, A. M., Begley, W. M., Sun, Y., Lacey, M. P., Chaudhary, T., Keough, T., Chu, L., Sears, R., Yuan, B., Dawson, T. L., Jr., 2007. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 18730-18735.
71. Yamada, K., Liu, S. X., Sakano, H., Pham, P. K., Banh, J., Chung, M. K., Goldsmith, A. D., Lee, J. M., Quach, H. L., Toriumi, M., Yu, G., Bowser, L., Carninci, P., Chen, H., Cheuk, R., Hayashizaki, Y., Ishida, J., Jones, T., Kamiya, A., Karlin-Neumann, G., Kawai, J., Kim, C., Lam, B., Lin, J., Miranda, M., Narusaka, M., Nguyen, M., Palm, C. J., Sakurai, T., Satou, M., Seki, M., Shinn, P., Southwick, A., Shinozaki, K., Davis, R. W., Ecker, J. R., Theologis, A., 2009. *Arabidopsis* Full Length cDNA Clones. GenBank: NM_101096.
72. Zhang, Y., Ma, L., 2003. Cloning of a novel laccase gene from *Ganoderma lucidum* and its expression in yeast. GenBank: AY485825.
73. Zhao, M. W., Liang, W. Q., Zhang, D. B., Wang, N., Wang, C. G., Pan, Y. J., 2007. Cloning and characterization of squalene synthase (SQS) gene from *Ganoderma lucidum*. J Microbiol Biotechnol 17, 1106-1112.
74. Zhong, J. J., Tang, Y. J., 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. Adv Biochem Eng Biotechnol 87, 25-59.

Sitios Web

http://www.segai.ull.es/serviceFiles/25_GuiaSecuenciacionAutomaticaADN.pdf

<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00500.html>

<http://www.genamics.com/cgi-bin/genamics/genomes/genomesearch.cgi?field=ID&query=710>

(NCBI taxonomy) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

(NCBI genome) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>