



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Presentada para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Por

YANIK IXCHEL MALDONADO ASTUDILLO
INGENIERA BIOQUÍMICA

Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. por apareamiento de
neohaplontes compatibles

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO.

México, D. F. Agosto del 2007.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D. F. el día 24 del mes de Agosto del año 2007, la que suscribe Yanik Ixchel Maldonado Astudillo alumna del Programa de Maestría en Bioprocesos con número de registro B040713, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Gustavo Valencia del Toro manifiesta que no tiene inconveniente en que el Instituto Politécnico Nacional difunda el trabajo intitulado “Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp.”, 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 gvalencia@acei.upibi.ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Yanik Ixchel Maldonado Astudillo

Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:30 horas del día 2 del mes de Julio del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

OBTENCIÓN DE CEPAS HÍBRIDAS DE *Pleurotus* spp. POR APAREAMIENTO DE NEOHAPLONTES COMPATIBLES

Presentada por la alumna:

Maldonado Astudillo Yanik Ixchel
Apellido paterno materno nombre(s)

Con registro: B 0 4 0 7 1 3

aspirante al grado de: **Maestro en Ciencias en Bioprocesos**

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO

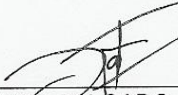

DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO



M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR

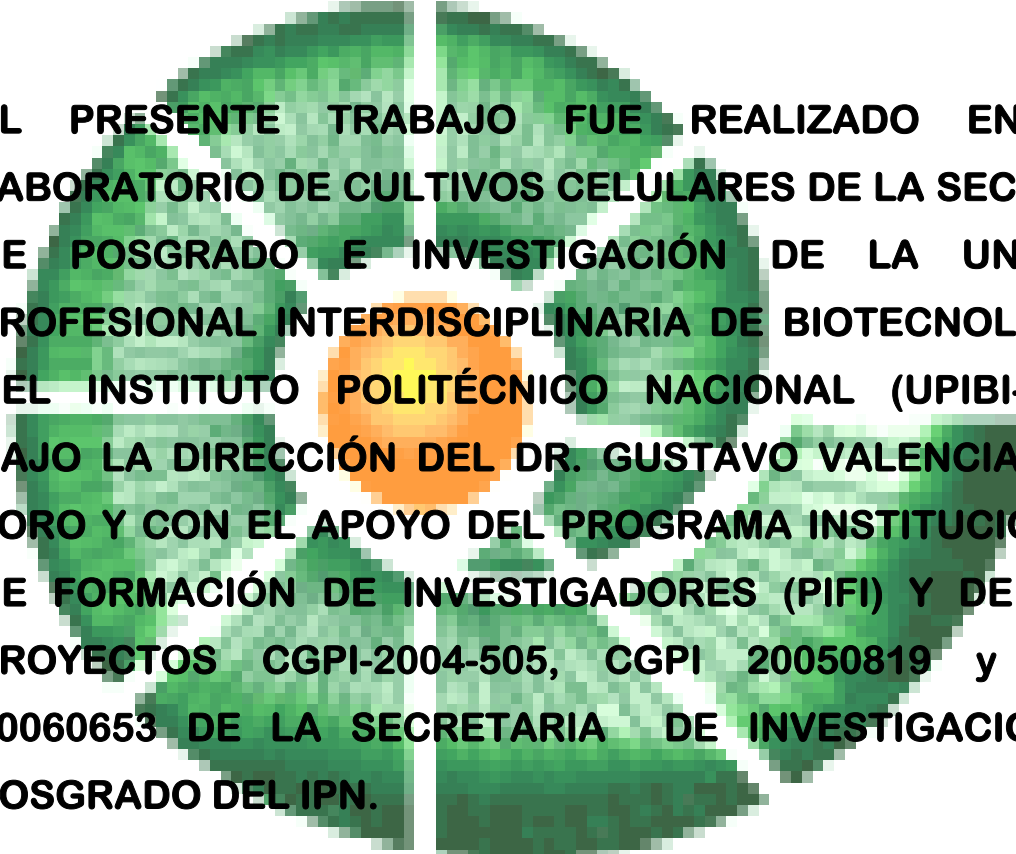

DR. FABIÁN ROBLES MARTÍNEZ


DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. EDGAR SALGADO MANJARREZ


INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES DE LA SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (UPIBI-IPN), BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO Y CON EL APOYO DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES (PIFI) Y DE LOS PROYECTOS CGPI-2004-505, CGPI 20050819 y SIP-20060653 DE LA SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL IPN.

AGRADEZCO A LA COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CGPI-IPN, HOY SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN, SIP) POR LAS BECAS OTORGADAS DURANTE EL PERIODO AGOSTO 2004 A DICIEMBRE DE 2006, CON LAS CUALES FUE POSIBLE REALIZAR ÉSTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de un trabajo involucra el esfuerzo conjunto de innumerables personas, quienes contribuyen en diferentes aspectos a la realización del mismo y quienes forman ya parte importante en la vida académica de un estudiante.

Por ello, agradezco principalmente a mi director de tesis, Dr. Gustavo Valencia del Toro, por haber dirigido este trabajo de investigación, por todo su apoyo, asesoría, amistad y sobre todo, por toda la paciencia brindada.

A mi Comité Tutorial, por sus enriquecedores comentarios y aportaciones al trabajo:

- Dr. Enrique Durán Páramo de laUPIBI-IPN
- C. Dra. María Eugenia Garín Aguilar de la FES-Iztacala-UNAM.
- Dr. Fabián Robles Martínez de laUPIBI-IPN
- Dr. Ramón Villanueva Arce de laUPIBI-IPN

Al Dr. Germán F. Gutiérrez Hernández, por su valiosa amistad, asesoría y todo el apoyo brindado durante mi estancia en la Unidad.

Al Departamento de Bioprocesos de laUPIBI-IPN:

- P.I.B. César Agustín Jiménez Sierra e I.B. Héctor Molina Jiménez del Laboratorio de Investigación de biotecnología, por su apoyo técnico y sobre todo, amistad brindada.
- M. en C. Paola Zárate del Laboratorio de Biotecnología molecular, por su apoyo técnico.

A mis amigos y compañeros de posgrado: M. en C. Karina Cruz, I.B. Dagoberto Durán, I.A. Sagrario Veyna, M. en C. Diana Sáenz y Biol. Leticia Aguilar, así como a P.I.B. Fernando Zúñiga, I.A. Alonso Jafet Romero, I.A. Noé R. García, Lupita Molina, Marcelo, Jesús y Mirna por todos los momentos agradables, sonrisas y compañía que ayudaron a pasar los malos ratos e hicieron más placentera mi estancia en la unidad.

A mis familiares: Oscar, Iván, Celene, Irasema, Yola y Minervo; tíos: Esther, Francisco, Héctor, Rocío, Lolis, Adela, Enrique, Emma, Gerardo, Gildo y Benjamín y primos: Adriana, Bere, Dulce, Haydeé y Benjamín por todo el cariño, apoyo, paciencia y sobre todo, amistad incondicional.

DEDICATORIA

*Por todo lo que significan en mi vida,
por sus consejos que con paciencia siempre me brindan;
por ese apoyo incondicional que solo en ustedes he encontrado;
por la fortaleza, valor y confianza que fomentan,
por las risas, lágrimas, felicidad y tristezas que nos ayudan a madurar
y por el amor infinito que marca el camino que me guía a seguir en este proceso
continuo de superación personal.*

*Por ello y por todo lo que con palabras y en una sola vida no se puede expresar,
dedico este trabajo a:*

*Mi esposo **Javier***

*Mi hijo **Itzam Balam***

*Mis padres **Xóchitl, Lolita y Benjamín***

*Mis hermanos **Yan Pallac, Rayma Ileri y Nicté Zuhuy***

*Pero sobre todo, ofrendo esto y todo lo que soy a **la vida y la causalidad**,
por habernos permitido a todos ser parte de nosotros mismos
y juntos como unidad, con nuestras virtudes y defectos
conformar nuestro **TODO** en esta realidad...*

C O N T E N I D O

	Página
Índice de cuadros	i
Índice de figuras	iii
Índice de ecuaciones	iv
Abreviaturas utilizadas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Características de los hongos	1
1.2. Taxonomía de <i>Pleurotus</i> spp.	2
1.3. Importancia biotecnológica de la producción de hongos comestibles	6
1.3.1. Importancia ambiental de los basidiomicetos	8
1.3.2. Importancia farmacológica de los basidiomicetos	9
1.3.3. Importancia alimentaria de los basidiomicetos	12
1.4. Producción industrial de <i>Pleurotus</i> spp.	14
1.5. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> spp.	16
1.6. Sistemas de compatibilidad sexual en los hongos.	20
1.6.1. Sistema de compatibilidad homotálico	20
1.6.2. Sistema de compatibilidad heterotálico	21
1.6.2.1. Estructura genética del sistema de incompatibilidad en hongos heterotálicos	22
1.7. Función de los factores de incompatibilidad en <i>Pleurotus</i>	24
2. ANTECEDENTES	
2.1. Métodos de monocariotización de hongos	26
2.2. El proceso de hibridación entre basidiomicetos	28
2.2.1. Métodos de hibridación de <i>Pleurotus</i>	30
2.3. Control genético y morfológico del proceso de fructificación	31
2.4. Métodos de extracción de ADN en hongos	32
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. Material biológico	36
5.2. Medios de cultivo	36
5.2.1. Medio extracto de malta-agar (EMA)	37
5.2.2. Medio extracto de malta desproteínizado (EMD)	37
5.2.3. Soluciones monocariotizantes	38
5.2.3.1. Peptona de carne con glucosa (PPG)	38
5.2.3.2. Glicina con glucosa (GG)	38

5.3. Tiempo medio de invasión micelial (T _m) y Crecimiento micelial acumulado (C _{ma})	39
5.4. Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes)	39
5.4.1. Determinación de los parámetros de compatibilidad	40
5.5. Hibridación de neohaplontes compatibles	41
5.6. Producción de cuerpos fructíferos	41
5.6.1. Preparación del inóculo	41
5.6.2. Preparación del sustrato	42
5.6.3. Obtención de esporóforos	42
5.6.3.1. Inoculación del sustrato	42
5.6.3.2. Incubación del sustrato inoculado	43
5.6.3.3. Inducción de la fructificación	43
5.6.4. Cosecha de cuerpos fructíferos	43
5.7. Determinación de los parámetros de productividad	44
5.7.1. Precocidad	45
5.7.2. Eficiencia biológica	45
5.7.3. Rendimiento	45
5.7.4. Tasa de productividad	46
5.8. Determinación de las características morfológicas de cuerpos fructíferos	46
5.8.1. Color de carpóforos y esporada	46
5.8.2. Tamaño de carpóforos	47
5.8.3. Peso de cuerpos fructíferos	47
5.9. Protocolo para la obtención de ADN genómico	47
5.9.1. Preparación de soluciones	48
5.9.1.1. Soluciones base	48
5.9.1.2. Amortiguadores	50
5.9.2. Preparación de las muestras	51
5.9.3. Metodología para la extracción de ADNg	51
5.9.4. Análisis cuantitativo de ADNg	53
5.9.5. Análisis cualitativo de ADNg	53
5.10. Análisis estadístico de resultados	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. Recuperación de material biológico	55
6.2. Morfología micelial de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. recuperadas	57
6.3. Selección de cepas parentales	60
6.4. Características morfológicas de cuerpos fructíferos de cepas parentales	61
6.5. Evaluación de medios monocariotizantes	62
6.6. Obtención de neohaplontes	63
6.6.1. Influencia del tiempo de homogenizado	64
6.6.2. Influencia del volumen de inóculo	65
6.6.3. Influencia del tiempo de incubación	66
6.7. Morfología micelial de neohaplontes	68
6.8. Comportamiento micelial de neohaplontes	70
6.9. Obtención de cepas híbridas	76
6.10. Morfología micelial de cepas parentales, híbridas y neohaplontes	77

6.11. Determinación del Tiempo medio de invasión micelial (T_m) de cepas parentales, híbridas y neohaplontes	78
6.12. Determinación del Crecimiento micelial acumulado (C_{ma}) de cepas parentales, híbridas y neohaplontes	80
6.13. Etapas de producción de cuerpos fructíferos	84
6.14. Parámetros de productividad de cepas parentales e híbridas	87
6.15. Características morfológicas de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas	92
6.15.1. Color y forma de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas	92
6.15.2. Tamaño de basidiomas de cepas parentales e híbridas	96
6.15.3. Peso de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas	101
6.16. Análisis comparativo entre variables de interés comercial de cepas parentales e híbridas	103
6.17. Análisis de correlación de resultados	105
6.17.1. Correlación entre variables cuantitativas de productividad	106
6.17.2. Correlación entre variables cuantitativas de morfología	108
6.18. Obtención de material genético	110
7. CONCLUSIONES	114
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

ÍNDICE DE CUADROS

		Pagina
Cuadro 1.1.	Características de la división Eumycota.	4
Cuadro 1.2.	Aplicaciones biotecnológicas de <i>Pleurotus</i> .	7
Cuadro 1.3.	Funciones del sistema enzimático de <i>Pleurotus</i> .	8
Cuadro 1.4.	Componentes activos con efecto medicinal de basidiomicetos.	10
Cuadro 1.5.	Composición química de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus</i> spp. cultivados en sustrato comercial pasteurizado.	12
Cuadro 1.6.	Perfil de aminoácidos esenciales de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México.	13
Cuadro 1.7.	Composición media de micro y macroelementos en cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> cultivados en bagazo de caña sin suplementación.	13
Cuadro 1.8.	Contenido vitamínico de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México.	14
Cuadro 2.1.	Métodos utilizados para monocariotizar hongos.	27
Cuadro 5.1.	Material biológico de <i>Pleurotus</i> spp. utilizado.	36
Cuadro 5.2.	Especificaciones para la preparación del amortiguador de extracción de ADNg	50
Cuadro 5.3.	Especificaciones para la preparación del amortiguador de dilución de ADNg	51
Cuadro 6.1.	Tiempo medio de invasión micelial de material biológico recuperado.	55
Cuadro 6.2.	Morfología micelial de material biológico recuperado.	58
Cuadro 6.3.	Cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> spp. para el proceso de desdicariotización química.	60
Cuadro 6.4.	Características observadas en los dos medios monocariotizantes (GG y PPG) empleando <i>Pleurotus</i> spp.	63
Cuadro 6.5.	Morfología micelial de neohaplontes obtenidos.	69
Cuadro 6.6.	Características de neohaplontes obtenidos de la cepa IE200.	72
Cuadro 6.7.	Características de neohaplontes obtenidos de la cepa ECS127R.	73
Cuadro 6.8.	Características de neohaplontes obtenidos de la cepa RP.	74
Cuadro 6.9.	Características morfológicas de los híbridos IE200xECS127R, parentales y neohaplontes de <i>Pleurotus</i> crecidos en medio EMA.	78
Cuadro 6.10.	Tiempos de invasión y Crecimiento micelial acumulado de las cepas parentales, híbridas y neohaplontes de <i>Pleurotus</i> crecidos en medio EMA.	79
Cuadro 6.11.	Etapas de producción de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> cultivadas en paja estéril.	85

Cuadro 6.12.	Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (1ª cosecha).	88
Cuadro 6.13.	Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (2ª cosecha).	89
Cuadro 6.14.	Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (Total).	90
Cuadro 6.15.	Morfología de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i> .	93
Cuadro 6.16.	Tamaño de carpóforos de las cepas utilizadas (1ª cosecha).	97
Cuadro 6.17.	Tamaño de carpóforos de las cepas utilizadas (2ª cosecha).	98
Cuadro 6.18.	Peso de carpóforos de las cepas utilizadas (1ª cosecha).	101
Cuadro 6.19.	Peso de carpóforos de las cepas utilizadas (2ª cosecha).	102
Cuadro 6.20.	Análisis comparativo de características de producción entre cepas parentales e híbridos obtenidos de <i>Pleurotus</i> .	104
Cuadro 6.21.	Coefficientes de correlación entre variables cuantitativas de productividad de cepas de <i>Pleurotus</i> .	109
Cuadro 6.22.	Coefficientes de correlación entre variables cuantitativas de morfología de cepas de <i>Pleurotus</i> .	109
Cuadro 6.13.	ADNg aislado de las diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> utilizadas.	110

 ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Esquema del cuerpo fructífero de los basidiomicetos.	2
Figura 1.2. Morfología del píleo de <i>Pleurotus</i> spp.	5
Figura 1.3. Ciclo sexual de <i>Pleurotus</i> spp.	17
Figura 1.4. Micrografías de micelios de <i>Pleurotus</i> spp.	18
Figura 1.5. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> spp.	19
Figura 5.1. Etapas del ciclo de producción de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus</i> .	44
Figura 5.2. Metodología utilizada para la extracción de ADNg.	52
Figura 6.1. Tiempo medio de invasión micelial del material biológico utilizado.	56
Figura 6.2. Morfología micelial de cepas de <i>Pleurotus</i> utilizadas.	58
Figura 6.3. Cuerpos fructíferos de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. que fueron sometidas al proceso de desdicariorización química.	61
Figura 6.4. Efecto del tiempo de homogenizado sobre la recuperación de neohaplontes de <i>Pleurotus</i> spp.	65
Figura 6.5. Efecto del volumen de inóculo sobre la recuperación de neohaplontes de <i>Pleurotus</i> spp.	66
Figura 6.6. Efecto del tiempo de incubación en la solución desdicariorizante sobre la recuperación de neohaplontes de <i>Pleurotus</i> spp.	67
Figura 6.7. Crecimiento micelial acumulado (mm/día) de neohaplontes obtenidos de la cepa IE200 de <i>Pleurotus</i> sp. crecidos en medio EMA.	70
Figura 6.8. Crecimiento micelial acumulado de neohaplontes obtenidos de la cepa ECS127R de <i>Pleurotus</i> sp. crecidos en medio EMA.	71
Figura 6.9. Crecimiento micelial acumulado de neohaplontes obtenidos de la cepa RP de <i>Pleurotus</i> sp. crecidos en medio EMA.	71
Figura 6.10. Crecimiento micelial acumulado de los híbridos IE200xECS127R de <i>Pleurotus</i> spp. y sus respectivos parentales y neohaplontes crecidos en medio sólido (EMA).	81
Figura 6.11. Etapas para la fructificación de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> .	84
Figura 6.12. Morfología de esporas de cepas de <i>Pleurotus</i> utilizadas.	94
Figura 6.13. Morfología de cuerpos fructíferos de cepas de <i>Pleurotus</i> utilizadas.	94
Figura 6.14. Porcentaje medio de fructificaciones de las cepas parentales e híbridos (cosecha 1) agrupadas por tamaño de píleos desarrollados.	100
Figura 6.15. Porcentaje medio de fructificaciones de las cepas parentales e híbridos (cosecha 2) agrupadas por tamaño de píleos desarrollados.	100
Figura 6.16. ADNg aislado de cepas de <i>Pleurotus</i> .	111

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Eficiencia biológica.	45
Ecuación 2. Rendimiento.	45
Ecuación 3. Tasa de productividad.	46
Ecuación 4. Peso medio de cuerpos fructíferos cosechados.	47
Ecuación 5. Pureza de ADN.	53
Ecuación 6. Concentración de ADN.	53

ABREVIATURAS UTILIZADAS

%H: Porcentaje de humedad.

AAO: Enzima Alcohol Aril Oxidasa.

Abs: Absorbancia.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNg: Ácido Dexosirribonucleico genómico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BME: β -mercaptoetanol, 2-mercaptoetanol.

C1: Tiempo de inicio de la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros.

C2: Tiempo de inicio de la segunda cosecha de cuerpos fructíferos maduros.

Cma: Crecimiento micelial acumulado.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

ddH₂O: Agua bidestilada.

DD-RAPD: Despliegamiento Diferencial del ADN Polimórfico.

dH₂O: Agua destilada.

Dmay: Diámetro mayor del píleo.

Dmen: Diámetro menor del píleo.

Est: Estípite.

EB: Eficiencia biológica.

EDTA: Etilendiaminotetraacetato.

EMA: Medio Agar-extracto de malta.

EMD: Solución extracto de malta desproteinizada.

EtOH: Etanol.

FD: Factor de dilución.

GG: Solución glicina-glucosa.

MnP: Enzima Manganese Peroxidasa.

Nh: Neohaplontes.

PAH (HPA): Hidrocarburos Poliaromáticos.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Phf: Peso de hongos frescos cosechados.

Pm: Peso medio de cuerpos fructíferos.

PPG: Solución Peptona-P – Glucosa.

Pu: Peso unitario de cuerpos fructíferos.

R: Rendimiento.

RAPD: Amplificación Aleatoria del ADN polimórfico.

rpm: Revoluciones por minutos.

rxn: Reacciones.

SEVAG: Mezcla cloroformo - alcohol isoamílico.

TBE: Buffer Tris borato-EDTA.

TE: Buffer Tris-EDTA.

Tfp: Tiempo de formación de primordios.

Ti: Tiempo de invasión del sustrato.

Tm: Tiempo medio de invasión micelial.

TP: Tasa de productividad.

Tris: Tris(hidroximetil)amino-metano.

VP: Enzima Versátil Peroxidasa.

xg: Gravedades.

RESUMEN

La producción mundial de hongos comestibles registró un incremento anual de 6.2 millones de toneladas para el 2004, de las cuales 38,708 toneladas fueron producidas en México lo que constituye un 59% del total de la producción de los países latinoamericanos, por lo que nuestro país es considerado el 18° productor de hongos frescos a nivel mundial. Para la producción de *Pleurotus* se requiere incrementar el número de cepas fúngicas cultivables mediante el desarrollo de programas de hibridación eficaces y de conservación de su germoplasma.

En este trabajo se obtuvieron cepas híbridas de *Pleurotus* spp. y se caracterizaron desde el punto de vista morfológico y de productividad, para ello se reactivaron 12 cepas de diferentes especies del género *Pleurotus*, de las cuales se eligieron 3 (RP, IE200 y ECS127R). Dichas cepas fueron sometidas al proceso de desdicarionización química utilizando dos soluciones peptona glucosa (PPG) y glicina glucosa (GG), se realizó la recuperación asimétrica de los neohaplontes (Nhs) para cada una de las cepas. Se determinó la morfología micelial y velocidad de crecimiento de los Nhs y las cepas parentales. Se obtuvieron dos híbridos a partir de los Nhs de las cepas parentales IE200 y ECS127R. Las eficiencias biológicas (%EB) de las cepas híbridas IE200₁xECS127R_a (24.91%) e IE200₁xECS127R_f (19.85%) fueron mayores con respecto a las cepas parentales IE200 (19.2%) y ECS127R (14.5%). En cuanto a la morfología de los cuerpos fructíferos, los híbridos presentaron el color blanco para los primordios, carpóforos y esporadas, similar a la cepa parental IE200, así como, la forma de las láminas (subdecurrente) y del píleo (pétalo de flor). Se obtuvieron carpóforos con diámetros del píleo entre 10 y 15 cm, para las cepas híbridas, lo que se consideraron como cepas fúngicas con alto potencial para el cultivo comercial de setas. Finalmente, el método de extracción de ácidos nucleicos utilizado, permitió obtener ADN geonómico de buena calidad, mismo que puede ser posteriormente utilizado para estudios genéticos de las cepas híbridas obtenidas.

ABSTRACT

The world production of edible mushrooms registered an annual increment of 6.2 million ton in 2004 and 38,708 ton were produced in Mexico which represents 59% of Latin American total production. For this situation Mexico occupies the 18th place fresh edible mushrooms cultivation in worldwide. In oyster mushroom (*Pleurotus*) production it's necessary to implementation of effective breeding programs to produce fungal strains with important attributes for the cultivation and germoplasm conservation.

Three *Pleurotus* spp. strains (RP, IE200 and ECS127R) were chemical dikaryotized to obtain their monokaryotic components (neohaplonts) using two solutions peptona glucose (PPG) and glicine glucose (GG), the process allowed the asymmetric recovery of neohaplonts (Nhs) for each one. The mycelial morphology and mycelial growth rate of the Nhs and parental strains were determined. When the neohaplonts were paired two hybrid strains were obtained from parental strains IE200 and ECS127R, so then morphologic and productivity characteristics of Nhs and parental strains were evaluated. The biological efficiency (%EB) of hybrid strains IE200₁xECS127R_a (24.91%) and IE200₁xECS127R_f (19.85%) were highest than parental strains IE200 (19.2%) and ECS127R (14.5%). As for the fruit bodies morphology, the hybrids produced white primordia, fruit bodies and spore prints, similar to parental strain IE200, as well as, the form of gills (subdecurrent) and the pileus (flower petal). Fruit bodies hybrid strains with 10 to 15 cm pileus diameters were obtained, therefore were considered as fungal strains with high potential for the commercial mushrooms culture. Finally, the method of nucleic acids extraction used, allowed obtaining genomic DNA of good quality, which it could be used for genetic studies of hybrid strains obtained.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de los hongos

Los hongos, tradicionalmente se han definido con base en sus características, como organismos eucarióticos, productores de esporas, sin clorofila, con nutrición heterótrofa por absorción, capaces de reproducirse sexual y/o asexualmente, cuyos filamentos usualmente son estructuras somáticas ramificadas conocidas como hifas y típicamente son rodeadas por una pared celular rígida (Guzmán y col., 1993; Alexopoulos y col., 1996).

De manera general, los hongos son organismos cosmopolitas ya que son capaces de vivir en casi todos los hábitats posibles aunque también existen especies endémicas de alguna región determinada. Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía y de carbono para la síntesis de estructuras celulares. La pared rígida (compuesta en mayor proporción por quitina y otros polisacáridos estructurales) con la que cuenta la mayoría de las especies fúngicas ligninocelulósicas, les impide fagocitar su alimento y por ello deben absorber nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de biopolímeros tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, por acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas que liberan al medio (Guzmán y col., 1993; Deacon, 1993; Moore-Landecker, 1996). Al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas y ambientales específicas, el micelio dicariótico comienza a formar estructuras reproductoras

denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos) y este proceso es acompañado por la transcripción de genes específicos que producen abundante ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Futoshi y col., 2004). En el cuerpo fructífero de los hongos macroscópicos, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado (Figura 1.1).

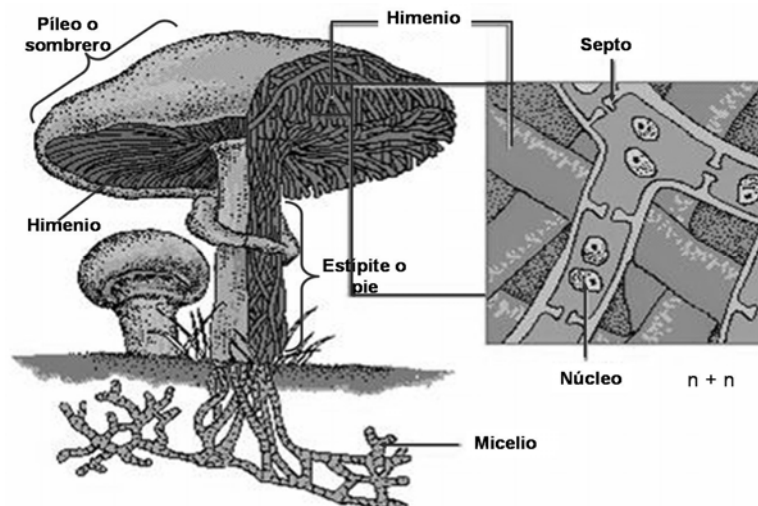


Figura 1.1. Esquema del cuerpo fructífero de los basidiomicetos (modificada de <http://docencia.udea.edu.co>)

1.2. Taxonomía de *Pleurotus* spp.

Dada la amplia variedad de hongos y su complejidad estructural, fisiológica y morfológica, ha sido necesario clasificarlos según sus características más intrínsecas. A través del tiempo estos organismos han sido agrupados de diferentes maneras; sin embargo, aún existe controversia con respecto a la ubicación taxonómica de estas especies, algunos autores como Moore-Landecker

(1996) consideran que los hongos están distribuidos en los reinos protocista, chromista y fungi, considerando cinco divisiones en este último reino (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y una división de forma Deuteromycota); por otro lado, Guzmán y col. (1993), Alexopoulos y col. (1996) así como Herrera y Ulloa (1998) ubican a todos los hongos dentro del reino fungi o myceteae y, con algunas diferencias, lo dividen en gymnomycota o también llamado myxomycota, mastygomycota y amastygomycota o lo correspondiente a la división eumycota.

Considerando la clasificación realizada por Herrera y Ulloa (1998), encontramos que el reino fungi consta de dos divisiones naturales: Myxomycota y Eumycota, así como una división artificial de líquenes, misma que incluye organismos mixtos constituidos por algas y hongos asociados simbióticamente. La división Myxomycota incluye a ciertos hongos gelatinosos (p. e. *Enteridium lycoperdon*), por otro lado, a los hongos pertenecientes a la división Eumycota se les conoce como hongos verdaderos o perfectos y se dividen en cuatro grupos o subdivisiones: Phycomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota. Los ficomicetos se caracterizan por tener hifas sin divisiones o septos (cenocíticas), contrario a los demás que poseen hifas tabicadas (septadas) mientras que los hongos de la división deuteromycota, a diferencia de los pertenecientes a las otras subdivisiones, solo se reproducen asexualmente. Como se puede observar en el Cuadro 1.1, las especies de estas dos subdivisiones son micromicetos, es decir, solo forman cuerpos fructíferos microscópicos mientras que los basidiomicetos incluyen solo géneros macroscópicos como *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agaricus*, *Amanita*, entre otros (Herrera y Ulloa, 1998) y es en esta subdivisión en donde se encuentran agrupados la mayor parte de los hongos comestibles.

Cuadro 1.1. Características de la división Eumycota*

Subdivisiones	<i>Phycomycota</i>	<i>Deuteromycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Características				
Hifas	Cenocíticas	Septadas	Septadas	Septadas
Reproducción	Sexual y asexual	Asexual	Sexual y asexual	Sexual y asexual
Tipo de cuerpos fructíferos	Micromicetos	Micromicetos	Micromicetos y Macromicetos	Macromicetos
Ejemplos	<i>Mucor, Rhizopus, Glomus</i>	<i>Candida, Rhodotorula, Aspergillus, Penicillium, Trichoderma</i>	<i>Saccharomyces, Claviceps, Tuber</i> (trufas) y <i>Morchella</i> (colmenilla)	<i>Amanita, Ustilago</i> (huitlacoche), <i>Agaricus</i> (champiñón), <i>Coprinus, Pleurotus</i> (setas), <i>Lentinula</i> (shittake)

* Adaptado de Guzmán y col. 1993 y Herrera y Ulloa, 1998.

De manera general, la ubicación taxonómica del género *Pleurotus* se presenta a continuación (Herrera y Ulloa, 1998):

Reino: Fungi [*fungus* = florecimiento o excrecencia de la tierra (Guzmán, 1993)],

División: Eumycota,

Subdivisión: Basidiomycotina,

Clase: Holobasidiomycetes,

Subclase: Hymenomycetidae,

Orden: Agaricales,

Familia: Tricholomataceae,

Género: *Pleurotus* [del griego *Pleuro* = formado lateralmente o en posición lateral (Stamets y Chilton, 1983)]

Actualmente, los taxónomos han encontrado problemas para clasificar a las especies del género *Pleurotus*, inicialmente se basaron en las características morfológicas de sus cuerpos fructíferos (color, forma, tamaño, etc.) no obstante, la influencia que ejercen los factores ambientales

hicieron de estas características fenotípicas, parámetros insuficientes para la determinación taxonómica (Zervakis y col., 2001). De manera general, se considera que las especies del género *Pleurotus* poseen cuerpos fructíferos con un píleo liso o algo escamoso hacia el centro, en forma de embudo, de pétalo de flor o de concha de ostra (Figura 1.2), con himenóforo lamelado y de consistencia típicamente carnosa o correosa; de colores que van desde el grisáceo, café y hasta rosados; carecen de estípites (sésiles) o bien este es lateral o excéntrico y corto aunque a veces puede ser mediano o largo; sus láminas son poco o nada unidas entre sí en la base, generalmente decurrentes o en algunos casos subdecurrentes; su carne es blanda y correosa con olor y sabor agradables (Zadrazil, 1974 ; García y col., 1998; Herrera y Ulloa, 1998).



Figura 1.2. Morfología del píleo de *Pleurotus* spp. (Herrera y Ulloa, 1998).
a) Embudado; b) Pétalo de flor; c) Concha de ostra.

Otros factores que se han tomado como referencia para la ubicación taxonómica de las especies del género *Pleurotus* son los patrones de compatibilidad entre cepas. En estudios de compatibilidad realizados entre dicarion-monocarion por Vilgalys y col. (1993) con 170 cepas provenientes de colecciones estadounidenses y canadienses, se reportó la existencia de solo 3 grupos interestériles a partir de los cuales se define actualmente el complejo *Pleurotus ostreatus* mismo que está conformado por especies que anteriormente eran consideradas distintas entre sí. Por otro lado, Petersen y Huges (1999) estudiaron al complejo *Pleurotus djamor* y concluyeron

que este grupo está formado por las cepas coloridas *salmonostramieneus* u *ostreatusroseus* (rosa) y *opuntiae* (gris) y la cepa blanca *Pleurotus djamor*.

Sin embargo, se ha observado que las características morfológicas y los experimentos de compatibilidad (basados principalmente en la aplicación del concepto de especie biológica), no son suficientes para obtener una clara noción taxonómica óptima, por lo que la aplicación de criterios moleculares es necesaria para proveer información relevante de las relaciones taxonómicas entre poblaciones de *Pleurotus* y sus procesos de especiación pertinentes (Zervakis y col., 2001). La importancia de determinar la identidad taxonómica de los organismos pertenecientes al género *Pleurotus*, radica en que ello facilitará el establecimiento de las condiciones óptimas de manipulación, ya sea con fines de conservación o transformación y para su cultivo a nivel industrial. De igual forma, el entendimiento de las relaciones taxonómicas entre las especies y la aplicación de técnicas moleculares modernas, son de gran importancia para el desarrollo satisfactorio de programas de hibridación de hongos, así mismo, para la identificación apropiada de este material biológico y la autenticación de cepas (Zervakis y Venturella, 2002).

1.3. Importancia biotecnológica de la producción de hongos comestibles

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que poco a poco va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Hasta 1980, las cuatro especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo eran *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* spp. (Seta, ostra), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Volvariella volvacea*. Desde entonces el género *Agaricus* ha sido el hongo comestible más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte, *Lentinula edodes* es

producido en su mayor parte en Japón, *Volvariella* en países Asiáticos y *Pleurotus* en México y Sudamérica (Chang, 1999).

En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, han incrementado su popularidad mundial en los últimos años, debido a su habilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas (22-28°C) y su capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de cereales (Bonatti y col., 2004), papel (Baysal y col., 2003), pulpa de café (Salmones y col., 2005), viruta de madera (Pérez y Mata, 2005), residuos vegetales así como desechos lignocelulósicos de la industria alimenticia (Cohen y col., 2002; Shashirekha y col., 2002); para la preparación y acondicionamiento de estos sustratos, se han utilizado varias técnicas tales como la inmersión en agua caliente, pasteurización, esterilización con inyección de vapor, composteo, etc. (Vogel y Salmones, 2000; Valencia-del Toro, 2003; Moda y col., 2005).

Cuadro 1.2. Aplicaciones biotecnológicas de *Pleurotus*.

Ambiental	Farmacológica	Alimentaria
Bioconversión de residuos agroindustriales.	Producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico.	Alimento humano de alto valor nutritivo.
Biodegradación de xenobióticos, Hidrocarburos poliaromáticos y otros contaminantes industriales.		Producción de proteínas con uso industrial potencial.

Zervakis y Venturella (2002), consideran que cada cepa tiene un potencial bioquímico distinto, por ejemplo, en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual puede ser utilizado como criterio para identificar la calidad de cepas que sean convenientes para programas de hibridación. Por otro lado, *Pleurotus* y muchos otros basidiomicetos, producen compuestos de

interés industrial tales como ácidos orgánicos (Takao, 1965), vitaminas, aminoácidos, enzimas (Cohen y col., 2002) y otros metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas (Marino y col., 2003). Gracias a estas características, los hongos tienen diversas aplicaciones en distintos ámbitos biotecnológicos tales como el ambiental, farmacológico y alimentario (Cuadro 1.2).

1.3.1. Importancia ambiental de los basidiomicetos

Al igual que la celulosa, la lignina es un biopolímero vegetal muy abundante en la biosfera; es un compuesto aromático que provee rigidez, impermeabilidad al agua y resistencia al ataque microbiano hacia las paredes vegetales; debido a sus características estructurales, este compuesto impone una barrera física y química que restringe su degradabilidad (Cohen y col., 2002). Los sustratos utilizados para el cultivo de basidiomicetos, están conformados básicamente por compuestos ligninocelulósicos y para degradarlos, estos organismos poseen un complejo sistema enzimático entre las que destacan las enzimas celulasa, hemicelulasa, manganeso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP), alcohol aril oxidasa (AAO) y lacasa, mismas que son capaces de hidrolizar los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina de diversos materiales (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Funciones del sistema enzimático de *Pleurotus*.

Enzima	Función
Manganeso peroxidasa (MnP) Versátil peroxidasa (VP)	Oxidación (dependiente de H ₂ O ₂) de lignina y derivados fenólicos.
Lacasa	Oxidación de orto y para-difenoles y aminas aromáticas por la remoción de un e ⁻ y H ⁺ de un grupo OH para formar un radical libre.
Alcohol Aril Oxidasa (AAO)	Oxidación extracelular de alcoholes aromáticos a sus correspondientes aldehídos. Enzima generadora de H ₂ O ₂ .

Adaptado de Cohen y col., 2002

Boyle y col. en 1992, demostraron que la degradación de la lignina por los hongos de la pudrición blanca (como también se les conoce a los basidiomicetos), es extracelular, de forma oxidativa no específica y está regulada por una serie de condiciones (Mn, pH) independientes de los efectos ejercidos por ellas sobre el crecimiento fúngico y el proceso de degradación culmina en la producción independiente de dióxido de carbono y otros productos solubles. Del mismo modo, los basidiomicetos tienen la capacidad de biodegradar y mineralizar compuestos xenobióticos tales como hidrocarburos poliaromáticos (HPA) como el fenantreno, colorantes industriales y otros contaminantes del suelo tales como atrazina, diaminas, fenoles, etc. (Bezalel y col., 1996a,b) debido a que la conformación estructural de estos compuestos (fenólica) es similar a la que presenta la lignina y los productos de la oxidación no son necesariamente utilizados como fuente de carbono y energía por la célula (Field y col., 1992; Cohen y col., 2002). Las enzimas ligninolíticas pueden decrecer la biotoxicidad para los hongos y presumiblemente, también incrementar la disponibilidad de HPA a futuros procesos de degradación (Cohen y col., 2002).

Por todo lo anterior, estos organismos son considerados candidatos ideales para la bioconversión de desechos ligninocelulósicos producidos por la agricultura e industrias procesadoras de vegetales reduciendo, en última instancia, la contaminación generada por dichos procesos.

1.3.2. Importancia farmacológica de los basidiomicetos

Como se muestra en el Cuadro 1.4, los organismos pertenecientes al género *Pleurotus*, al igual que otros basidiomicetos, producen una serie de biomoléculas con actividades biológicas importantes incluyendo lectinas, proteínas, polisacáridos y glucoproteínas con actividades

antiproliferativas y antitumorales, proteasas y ribonucleasas (Cohen y col., 2002; Ng y Wang, 2004).

Cuadro 1.4. Componentes activos con efecto medicinal de Basidiomicetos

Efecto Medicinal	Componentes bioactivos
Antibiótico	Micelio Polisacáridos
Antibacterial	D-glucanas
Antiviral	Polisacáridos Proteínas
Inmunomodulación	Polisacáridos Proteínas-polisacáridos
Antitumoral	D-glucanas Lectinas
Hipocolesterolémico	Cuerpo fructífero Lovastatina
Hematológico	Lectinas
Antioxidantes	D-glucanas
Antialérgico	Extractos etanólicos
Antiinflamatorios	Extractos metanólicos

Modificado de Cohen y col., 2002 y Lindequist y col., 2005.

Las lectinas son proteínas de alto peso molecular, unidas de manera específica e irreversible a carbohidratos, han sido encontradas en una amplia variedad de organismos, incluyendo a los hongos y son ampliamente utilizadas como sondas para el estudio de carbohidratos. Algunas lectinas aisladas de cuerpos fructíferos de basidiomicetos, muestran una actividad tóxica contra insectos, lo cual sugiere que la función biológica de estos compuestos en los hongos puede ser de autodefensa (Iijima y col., 2003; Futoshi y col., 2004). La contribución *in vivo* de las lectinas, al igual que otras proteínas con efecto antitumoral de hongos, no ha sido esclarecida por completo aún; sin embargo, se ha demostrado que los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* en ratas, protegen de ciertos efectos cancerígenos y disminuye la toxicidad de la ciclofosfamida (Lindequist y col.,

2005). Por su parte, Bobek y col., en 1998, concluyeron que una dieta de 5% en base seca de *Pleurotus ostreatus*, reduce los cambios patológicos del cáncer de colon inducido por la dimetilhidrazina en ratas y dicho efecto lo explican por las propiedades antioxidantes de este basidiomiceto y por su contenido de fibra; un año después, estos mismos autores demostraron que una dieta del 10% de este mismo hongo, reduce significativamente la incidencia y el tamaño de las placas arterioescleróticas en conejos a la vez que se observa un efecto hipocolesterolémico, combinado con la inhibición de la peroxidación de lípidos (Bobek y col., 1999).

También se han encontrado efectos antimutagénicos y de reducción tumoral en extractos metanólicos de *Pleurotus pulmonarius* (José y col., 2002), *P. ostreatus* y *Lactarius vellereus* y de extractos acuosos de *A. bisporus* y *Ganoderma lucidum* los cuales son atribuidos a la enzima tirosinasa (Shi y col., 2004). Por otro lado, José y col. (2002) demostraron que los extractos metanólicos de cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius* suministrados en ratas (500 a 1000 mg/kg) tienen efectos antiinflamatorios debido a que ayudaron a disminuir el edema de patas inducido por carragenina y formalina y dicha actividad fue equiparable a la que presentó el diclofenaco, lo cual fue atribuido a la actividad antioxidante de dicho extracto.

Por su parte, las ribonucleasas (RNAsas) pertenecen a un importante grupo de enzimas proteolíticas (Ye y Ng, 2002), tienen una amplia variedad de actividades, incluyendo antivirales, inmunomoduladoras y antineoplásticas (Ng y Wang, 2004; Lull y col., 2005). Todos estos componentes celulares además de los metabolitos secundarios producidos por los basidiomicetos, afectan el sistema inmune del huésped y de esta forma pueden ser utilizados para tratar una amplia variedad de enfermedades entre las que destaca el cáncer de estómago, hígado, esófago, etc. (Cohen y col., 2002).

1.3.3. Importancia alimentaria de los basidiomicetos

En lo que respecta al campo alimentario, los hongos comestibles y en especial los del género *Pleurotus*, constituyen una buena fuente de nutrientes; sin embargo, se ha reportado que la composición química de los cuerpos fructíferos, depende básicamente del tipo de cepa (Cuadro 1.5), la composición del sustrato (solo o suplementado), técnicas de cultivo, así como la edad y etapa de desarrollo del hongo (Cardona, 2001; Moda y col., 2005).

Cuadro 1.5. Composición química de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. cultivados en sustrato comercial pasteurizado

Parámetro*	Cepas		
	IE136	POROS	INI8
Humedad**	93.3	92.2	92.8
Proteína (N x 4.38)	27.8	28.2	26.7
Fibra cruda	11.1	11.0	11.9
Lípidos	4.58	4.61	5.19
Cenizas	4.42	4.04	3.60

* g/100 g base seca ** g/100 g base fresca
Fuente: Valencia-del Toro y col., 2006.

Uno de los principales atributos nutricionales de los hongos comestibles es su alto contenido proteico (~25%), el cual es equiparable al de la leche (25.2%) y frijol (24.2%) y más alto que el reportado para el arroz (7.3%), maíz (11.2%) y trigo (13.2%) (Martínez-Carrera y col., 2004). Sin embargo, la calidad proteica de un producto, está determinada por su valor biológico (contenido de aminoácidos esenciales) y digestibilidad más que por el contenido proteínico total. Como lo muestra el Cuadro 1.6, los tres principales hongos comestibles cultivados con fines comerciales en nuestro país, están compuestos por todos los aminoácidos esenciales (Bano y col., 1963; Martínez-Carrera y col., 2004) y ellos comprenden del 25 al 40% del contenido total de proteína

(Crisan y Sands, 1978). También, se ha determinado en promedio un 98% de digestibilidad proteica en diferentes cepas del género *Pleurotus* (Valencia-del Toro y col., 2006) lo que corrobora que las proteínas de estos organismos, son de alta calidad.

Cuadro 1.6. Perfil de aminoácidos esenciales de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México

Hongo	Aminoácidos esenciales*								
	Cis	Phe	Ile	Leu	Lis	Met	Tyr	Tre	Val
<i>Pleurotus</i>	28	111	82	139	126	35	219	106	112
<i>Agaricus</i>	23	107	91	153	143	33	283	111	121
<i>Lentinula</i>	24	91	79	133	122	29	265	98	124

* Base húmeda (mg/100 g hongos frescos)
Modificado de Martínez-Carrera y col., 2004.

Cuadro 1.7. Composición media de micro y macroelementos en cuerpos fructíferos de *Pleurotus sajor-caju* cultivados en bagazo de caña sin suplementación

MACROELEMENTOS*		MICROELEMENTOS**	
Ca	102	N	17.4
Al	42	K	4.32
Na	215	P	1.97
Fe	163		
Zn	192	Mg	0.46
Cu	14		
Mn	21	S	0.77
B	3.0		

* µg/g en base seca ** % Base seca
Modificado de Moda y col., 2005.

Además de su alto contenido proteico, los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos están compuestos de carbohidratos (incluyendo fibra dietética tales como D-glucanas, quitina y sustancias pécticas), minerales (Cuadro 1.7) y vitaminas (Cuadro 1.8), así como un bajo contenido de grasa el cual fluctúa entre el 3 y el 5% total en base seca (Sturion y Oetterer, 1995; Justo y col., 1998; Manzi, y col., 1999; Bonnati y col., 2004) con predominancia en el pileo y de

la cual, entre 70 y 80% corresponden al ácido linoleico (18:2) (Hiroi, 1982); de esta forma, el consumo de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles resulta muy adecuado debido a que aporta un buen número de nutrientes básicos para la dieta humana.

Cuadro 1.8. Contenido vitamínico de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México*.

Componente	Contenido en base seca (mg/kg)		
	<i>Pleurotus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Lentinula</i>
Vitamina A (retinol)	0.035	0.022	0.031
Vitamina B ₁ (tiamina)	5.7	7.1	5.9
Vitamina B ₂ (riboflavina)	25	51	18
Vitamina B ₆ (piridoxina)	5.5	6.3	4.0
Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	0.006	0.008	0.008
Vitamina C (ac. ascórbico)	200	170	250
Vitamina D ₂ (ergosterol)	0.092	0.082	0.091
Vitamina D ₃ (colecalfiferol)	0.236	0.139	0.201

* Adaptado de Martínez-Carrera y col., 2004.

1.4. Producción industrial de *Pleurotus* spp.

La producción mundial de hongos comestibles (*Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y *Flammulina* principalmente) hasta 1996, fluctuaba en 4 909 000 ton/año (Chang, 1997); sin embargo, la demanda de los consumidores por estos alimentos ha ido en aumento, registrando un incremento en la producción mundial anual superior a 5 millones de toneladas en el 2001 (Valencia-del Toro, 2002) y a 6.2 millones de toneladas para el 2004, de las cuales 38 708 toneladas fueron producidas en México lo que constituye un 59% del total de la producción de los países latinoamericanos y por lo que nuestro país es considerado el 18° productor de hongos frescos a nivel mundial (Martínez-Carrera y col., 2004).

Lo anterior, tiene un importante impacto económico en México ya que el monto anual de operaciones comerciales en este rubro supera los 150 millones de dólares y los volúmenes de exportación aportan divisas a nuestro país por más de 4 millones de dólares anuales generando aproximadamente 20 mil empleos directos e indirectos. Por otro lado, el impacto ambiental que tuvo el cultivo de hongos comestibles en el 2004, reside en que se utilizaron y reciclaron alrededor de 386,000 toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera y col., 2004).

En lo que respecta a las especies del género *Pleurotus*, en 1986 su producción mundial estimada era de 169 000 toneladas anuales (Chang, 1996) de la cuales, en Estados Unidos se produjeron 880 ton incrementándose a 1 940 ton en el 2002 en ese mismo país (Royse, y col., 2004); mientras que en México, en el año 2003 se produjeron 2 190 ton/año de *Pleurotus*, siendo rebasado por el género *Agaricus* cuya producción anual estimada fluctuaba en 36 500 ton/año (Martínez-Carrera y col., 2004). A nivel industrial, la producción de *Pleurotus* está basada en un proceso de cultivo en sustrato sólido de cepas seleccionadas; debido a esto, existe una gran demanda del mercado y de los productores para mejorar los parámetros cuantitativos en los hongos comúnmente producidos, e incrementar el número de cepas fúngicas cultivables mediante el desarrollo de programas de hibridación eficaces y de conservación de su germoplasma, así como también, de la formulación y/o mejoramiento de sustratos apropiados y de las condiciones de cultivo para estas especies, con la finalidad de optimizar e impulsar la producción de *Pleurotus* a nivel industrial (Ramírez y col., 2000; Larraya y col., 2003).

1.5. Ciclo de vida de *Pleurotus* spp.

Para poder desarrollar un programa eficiente de hibridación y mejoramiento genético entre los hongos comestibles, es importante tener en cuenta los procesos celulares, genéticos, ambientales y fisiológicos que determinan la inducción y desarrollo de sus cuerpos fructíferos, por ello resulta imprescindible conocer su ciclo biológico con la finalidad de tener mayores elementos para mejorar su cultivo y partir de bases más sólidas para el desarrollo de programas de mejora genética. En el ciclo de vida de los basidiomicetos, se presentan tres fenómenos importantes (Moore-Landecker, 1996; Herrera y Ulloa, 1998):

- *Plasmogamia o anastomosis*: Fusión de dos células del micelio que se aparean, a través de la cual los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común.
- *Cariogamia*: Fusión de los núcleos.
- *Meiosis*: División nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide al estado haploide.

Como se muestra en la Figura 1.3, la fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denominan haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se llaman diplontes. En algunos basidiomicetos como en el caso de *Pleurotus*, la cariogamia no se lleva a cabo de manera inmediata a la plasmogamia de tal forma que se produce una fase dicariótica o dicariofase en la cual, se obtiene una célula denominada dicariocito o dicariote misma que posee dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad y cada uno de ellos se conoce como dicarion (Herrera y Ulloa, 1998).

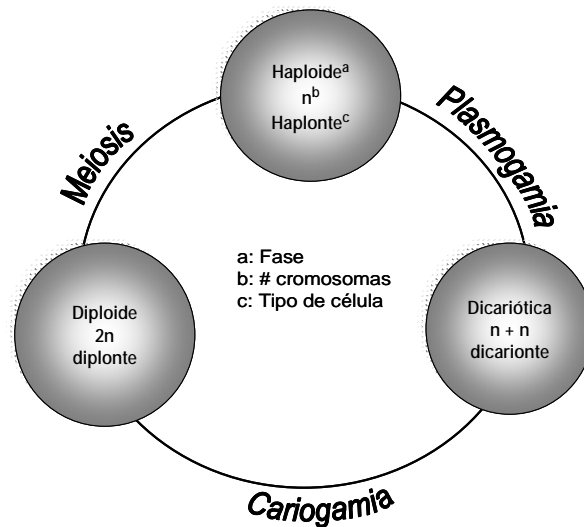


Figura 1.3. Ciclo sexual de *Pleurotus*.

La fase dicariótica es prerequisite para que se lleve a cabo la reproducción sexual del hongo aunque el micelio puede permanecer en estado vegetativo de manera ilimitada y normalmente solo en este estado del desarrollo se pueden formar células especializadas como los basidios que son las estructuras en las cuales se lleva a cabo la cariogamia dando comienzo a la fase diploide la cual está limitada a una generación nuclear simple y que inmediatamente después da paso al proceso de meiosis (Koltin y col., 1972).

De manera general, durante el ciclo biológico de *Pleurotus*, se presentan tres fases del desarrollo micelial correspondientes a los tipos primario, secundario y terciario. El micelio primario se forma a partir de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas en estado haploide cuyo único núcleo en cada compartimiento celular se encuentra separado por una estructura denominada septo o doliporo. El micelio secundario por su parte consta de células binucleadas o dicarióticas, deriva del micelio primario y se caracteriza por la presencia de fibulas [estructuras que permiten la migración nuclear entre hifas en proceso continuo de elongación

(Figura 1.4)] y finalmente, el micelio terciario se origina a partir del micelio secundario, se encuentra organizado en tejidos especializados que forman los cuerpos fructíferos y es el tipo de micelio característico en la reproducción sexual de este basidiomiceto (Koltin y col., 1972; Guzmán y col., 1993; Herrera y Ulloa, 1998).

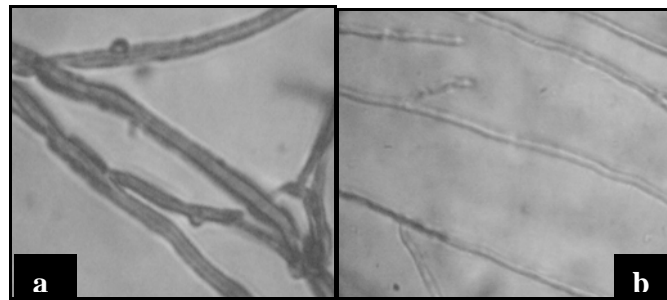


Figura 1.4. Micrografías de micelios de *Pleurotus* spp. (a) dicariótico (con fibulas) y (b) monocariótico (sin fibulas).

En la Figura 1.5 se puede apreciar el ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Pleurotus* mediante el cual, la germinación de una basidiospora produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides quienes al ramificarse conforman al micelio, mismo que continúa creciendo de forma monocariótica hasta que pueda realizarse la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Después de que ambas células se fusionan, el septo o doliporo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariones en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de este último, se obtienen núcleos haploides (quienes poseen de manera aislada un factor de incompatibilidad),

que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio y una vez allí, son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio monocariótico y comienzan nuevamente el ciclo (Larraya y col., 1999; Ramírez y col., 2000; Valencia-del Toro, 2002).

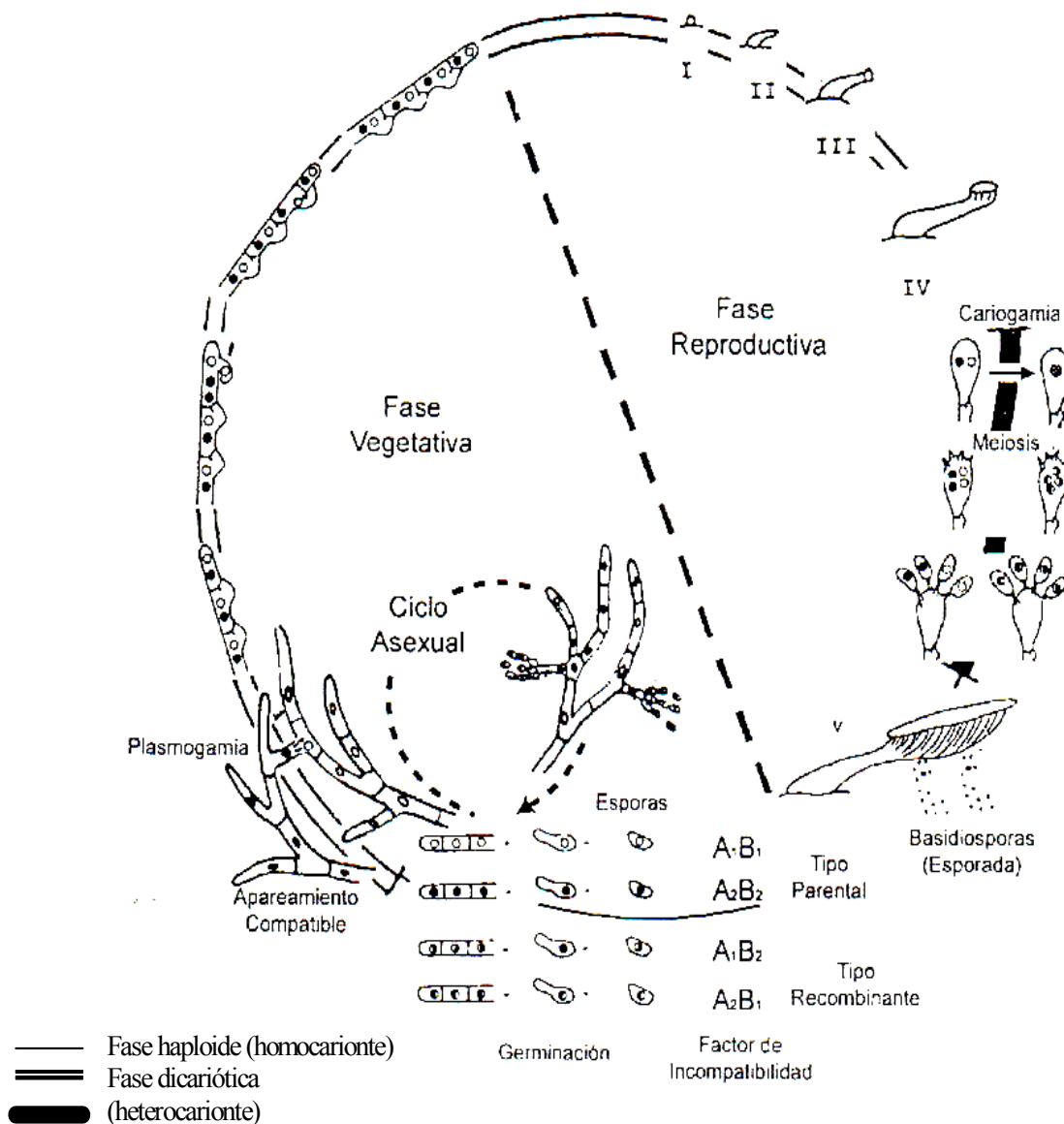


Figura 1.5. Ciclo de vida de *Pleurotus* spp. (Tomado de: Valencia-del Toro, 2002)

1.6. Sistemas de compatibilidad sexual en los hongos

En los basidiomicetos existen dos tipos de especies en cuanto a fertilidad se refiere: las auto fértiles (homotálicas) y auto estériles (heterotálicas). La primera es la forma más común de reproducción sexual entre los organismos del reino fungi; sin embargo, en los basidiomicetos el heterotalismo ocupa casi el 90%, del cual un estimado del 65% despliega el sistema de apareamiento tetrapolar (Valencia-del Toro, 2002).

1.6.1. Sistema de compatibilidad homotálica

En este sistema, el cuerpo fructífero puede ser producido por un solo micelio monospórico y la transición de la fase haploide a la dicariofase, ocurre en ausencia de una interacción de compatibilidad con otro micelio (Herrera y Ulloa, 1998). Puede haber dos tipos: primario y secundario.

- a) **Homotalismo primario u homocariótico:** El micelio es homocariótico y se origina de un solo núcleo meiótico que puede progresar a través de heterocariosis hasta el final del ciclo sexual. *Coprinus sterquilinus*, *Volvariella volvacea* y *Sistotrema brinkmanni* pueden ser citados como ejemplos de este tipo de especies, las cuales son capaces de sufrir la transición de micelio monocariótico haploide, derivado de una basidiospora simple a un dicarion con fibulas y con ello completar su reproducción sexual (Koltin y col., 1972; Guzmán y col., 1993).
- b) **Homotalismo secundario o heterocariótico:** Consta de un micelio dicariótico fértil originado a partir de una espóra con dos núcleos meióticos provenientes de dos tipos de apareamiento; en este tipo de homotalismo, el genotipo de un núcleo individual restringe

la reproducción sexual de un homocarión aunque la distribución de los productos meióticos en los basidios es tal, que típicamente ambos núcleos poseen genotipos complementarios dentro de una simple espora y el micelio derivado de tal espora heterocariótica, posee la capacidad de formar un dicarión y completar así la reproducción sexual (Koltin y col., 1972; Valencia-del Toro, 2002).

1.6.2. Sistema de compatibilidad heterotálica

Entre las especies heterotálicas es necesario el apareamiento de diferentes micelios homocarióticos para poder completar su ciclo sexual. De manera general se pueden observar dos sistemas de heterotalismo en los basidiomicetes (Guzmán y col., 1993; Herrera y Ulloa, 1998):

- a) **Compatibilidad unifactorial o bipolar:** Está controlada por un solo factor (factor **A**) de un par de cromosomas homólogos que necesitan aparearse sexualmente para dar origen a un par de genes alelos o alelomorfos compatibles (A_1A_2) mientras que las otras posibles combinaciones (A_1A_1 y A_2A_2) serán estériles al no ser compatibles entre sí. *Agaricus bisporus* (Ramírez y col., 2000), *Auricularia aurícula* y *Pholiota nameko* (Guzmán y col., 1993) son ejemplos de especies que despliegan este tipo de compatibilidad.
- b) **Compatibilidad bifactorial o tetrapolar:** Está controlada por dos factores (**A** y **B**) ubicados en cromosomas diferentes debido a la segregación meiótica. Cada factor posee un par de genes alelos que controlan el mismo tipo de caracteres en cada locus en posición idéntica respecto a su cromosoma homólogo y forman parejas de genes (A_1A_2 , B_1B_2). Solo será fértil aquel apareamiento sexual que reúna los cuatro alelos diferentes para formar un micelio heterocigótico, de esta forma se producirán basidiosporas con los siguientes genotipos: A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 dependiendo del arreglo de los

cromosomas homólogos producido durante la meiosis. Además de las especies del género *Pleurotus*, Guzmán y col. (1993) citan como ejemplos de hongos comestibles con este tipo de compatibilidad a *Auricularia polytricha*, *Coprinus fimetarius*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus boryanus*, *L. edodes* y *L. lepideus*.

Casi de manera general, los hongos superiores desarrollan un solo tipo de compatibilidad; sin embargo, hay reportes de un conjunto de especies relacionadas dentro de las cuales se despliegan ambos sistemas de compatibilidad sexual; un caso extremo de esta relación lo constituye *Sistotrema brinkmanni*, este hongo comprende un mínimo de tres especies y cada una de ellas presenta cada uno de los patrones básicos de sexualidad: homotalismo primario, heterotalismo unifactorial y heterotalismo bifactorial (Koltin y col., 1972).

1.6.2.1. Estructura genética del sistema de incompatibilidad en *Pleurotus* spp.

El sistema de incompatibilidad presente en las especies heterotálicas bifactoriales, está conformado por dos loci independientes entre sí (A y B), estos factores han sido llamados loci de incompatibilidad o genes de apareamiento y cada uno de ellos está conformado a su vez por uno o más subloci fuertemente unidos y que son considerados funcionalmente equivalentes debido a que la compatibilidad de un locus del tipo de apareamiento dado requiere heterocigosis de uno de los dos subloci, estas regiones genéticas constan de múltiples alelos [hasta más de 100 alelos del tipo de apareamiento por locus de incompatibilidad (Raper, 1966)] y la diversidad en este número de alelos es atribuida a todas las combinaciones alélicas posibles de dichos subloci a través del proceso de recombinación (Ramírez y col., 2000; Larraya y col., 2001; James y col., 2004).

En estudios realizados en especies del complejo *Pleurotus ostreatus*, Larraya y col. (2001) concluyen que el gen A está controlado por un solo locus multialélico dentro de los cuales, se identificaron nueve miembros funcionalmente diferentes; mientras que el gen B, está conformado por dos subloci (matB α y matB β) con quince alelos B funcionalmente diferentes. Aunado a esto, en estudios moleculares realizados en *Pleurotus ostreatus*, Larraya y col. (1999a) identificaron ocho diferentes tipos de apareamiento en lugar de los cuatro mencionados anteriormente y atribuyen dicho hallazgo como consecuencia de la formación de nuevas clases de incompatibilidad B de tipo no parental, mientras que Eugenio y Anderson (1968) quienes también reportan la aparición de más tipos de incompatibilidad, lo atribuyen a la recombinación genética intra-factores existente. Se ha reportado de manera general, en especies como *Coprinus cinereus* y *Schizophyllum commune* que en los genes que regulan el tipo de apareamiento hay presencia de más alelos A que B (Koltin y col., 1967; Larraya y col., 1999a); sin embargo, en el caso de algunas especies de *Pleurotus*, este comportamiento se contradice (Ramírez y col., 2000; Vilgalys y col., 1993) ya que Larraya y col. (1999a) encontraron siete alelos A y ocho alelos B en cuatro cepas de *Pleurotus ostreatus*. Según James y col. (2004) en trabajos realizados en *P. djamor*, si la estructura del gen A en *Pleurotus* es de un locus simple como lo reportan Larraya y col. (2001) y éste es del tipo no recombinante, entonces debe estar compuesto de un número alélico sin precedentes (~50-100). Aunque la estructura de estos genes es incierta, parece evidente que dicha conformación genética varía entre las distintas especies del género *Pleurotus*.

Por otro lado, se ha descrito que cada sublocus del tipo de apareamiento A en estas mismas especies, codifica dominios proteicos que al ser funcionales, deberán formar heterodímeros; la estructura de este locus es compleja y consiste de una estructura central de dos genes que

codifican ambos tipos proteicos presentes en el heterodímero, transcritos en direcciones divergentes que parecen duplicarse de una a tres veces entre cada especie (Ramírez y col., 2000). Los genes responsables del tipo de apareamiento **B** codifican feromonas lipopeptídicas y receptores de feromonas acopladas a la proteína G; su estructura consta de una unidad central formada por un gen sencillo que codifica para un receptor de feromonas de la membrana y un número variable de genes (de 2 a 7) que codifican feromonas (Koltin y col., 1972; Larraya y col., 1999a; Ramírez y col., 2000; James y col., 2004).

1.7. Función de los factores de la incompatibilidad

El desarrollo sexual en los hongos heterotálicos, generalmente se inicia hasta que un monocarión es apareado con otro individuo compatible, por ello se hace evidente que la transición del estado monocariótico al estado dicariótico solo se puede llevar a cabo si ambos constituyentes nucleares son compatibles entre si; es decir, si llevan diferentes alelos en ambos loci (Raper, 1966). De esta forma, los factores de incompatibilidad son considerados bifuncionales ya que por un lado, sirven como medios de reconocimiento y a la vez, contienen genes regulatorios capaces de controlar la secuencia morfogénica del ciclo sexual completo y ello ha sido confirmado gracias a estudios citológicos y bioquímicos realizados entre heterocariones y homocariones mutantes (Koltin y col., 1972). En el caso de *S. commune* y *C. cinereus* se ha demostrado que los genes A son responsables de eventos tales como el apareamiento nuclear en el dicarionte, formación y septación de fibulas y coordinación de la división nuclear; mientras que los genes B, son responsables de la migración nuclear a través de las hifas, disolución septal y fusión de las fibulas para asegurar la correcta formación de la fase dicariótica después de la división celular (Koltin y col., 1972; Larraya y col., 1999a; Ramírez y col., 2000).

También es importante resaltar la función que tienen los loci de incompatibilidad en la velocidad de crecimiento micelial en los hongos superiores. La velocidad de crecimiento micelial es una característica cuantitativa variable entre especies y sus condiciones de almacenamiento y manipulación, está correlacionada con el rendimiento de la producción de cuerpos fructíferos y el incremento de la ventaja exhibida por el micelio contra sus competidores, especialmente con el género *Trichoderma*, a cuya infección son muy susceptibles las especies de *Pleurotus* y dicha contaminación está relacionada con las variaciones de este parámetro (Larraya y col., 2002). De manera general, con los datos de análisis genético de los factores que regulan la variabilidad de las velocidades de crecimiento micelial, obtenidos por Larraya y col. (2001), se sugiere que durante la evolución de la conformación genética de las especies Agaricales dentro de los programas de hibridación, ciertas regiones genómicas conservadas por los diferentes monocariones aislados, poseen los genes y alelos que regulan la velocidad de crecimiento micelial y afectan los parámetros de rendimiento de cuerpos fructíferos en la última etapa de la producción (Larraya y col., 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1. Métodos de monocariotización de hongos

A pesar de que el estado dicariótico en el micelio de hongos superiores es relativamente estable, en algunas especies este micelio puede ser monocariotizado, es decir, separado en sus correspondientes unidades monocarióticas (Valencia-del Toro, 2002). La disociación de dicariones o monocariotización, está encaminada básicamente al estudio de los caracteres genéticos que gobiernan el sistema de compatibilidad entre basidiomicetos y a su posterior aplicación en el diseño de programas de hibridación de los mismos con la finalidad de obtener nuevos genotipos para uso industrial. Para la obtención de monocariones se han utilizado diferentes métodos físicos, biológicos y químicos (Cuadro 2.1); de los cuales, la regeneración de protoplastos (biológico) y la desdicariotización química han sido los más utilizados en los últimos años.

En lo referente al método de desdicariotización química, al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glicina, minerales e hidrolizados proteicos, Leal-Lara y Eger (1982) demostraron que las altas concentraciones de glicina aunadas a la deficiencia de iones fosfato y magnesio proveen una alta tasa de monocariotización (hasta del 100%) favoreciendo el crecimiento del micelio monocariótico mediante un efecto de aletargamiento del crecimiento; sin embargo, el mecanismo por el cual este proceso toma lugar es aún desconocido y para explicar su mecanismo, se ha planteado la siguiente hipótesis: la interrupción del dicarion por agentes químicos, resulta en un defecto en la fusión entre la célula gancho (fibula) y la penúltima célula

durante el proceso de fibulación, ello ocasiona que la célula gancho y la penúltima célula contengan un solo núcleo y se forme el micelio desdicarriotizado (Miles y Raper, 1956). Este método, además de ser útil para la obtención de las respectivas unidades monocarióticas de una cepa dicariótica, tiene la cualidad de proveer una alta tasa de variabilidad en algunos parámetros evaluados en los cultivos dicarióticos regenerados, tales como el incremento en la producción de algunas enzimas (Eichlerová y Homolka, 1999) y no existe evidencia de selección nuclear ni mutación (Leal-Lara y Eger, 1982).

Cuadro 2.1. Métodos utilizados para monocariotizar hongos.

	Método	Características	Año
	Taurocolato de sodio/ ácido cólico	Efecto en muy pocas especies. Alto nivel de selección nuclear.	1956, 1963, 1964, 1967
Químico ^a	Polimixina	Muerte selectiva de núcleos menos resistentes	1961
	Desdicarriotización ^b	No utiliza toxinas. Provee mecanismos selectivos de crecimiento de monocariones. No existe evidencia de selección nuclear ni mutación	1963, 1982, 1998, 1999, 2002
Físico ^a	Microcirugía	Bajo porcentaje de supervivencia celular. Solo un tipo nuclear recuperado.	1952 1972
	Cultivo sumergido	Eliminación de un núcleo.	1973
Biológico ^c	Regeneración de Protoplastos	Solo 20-40% de monocariosis. Variación en las propiedades biológicas (mutaciones).	1976, 1985 1994, 1999 2002, 2003

^a Leal-Lara y Eger, 1982.

^b Arias, 1998 ; Valencia-del Toro, 1999, 2002.

^c Magae y col., 1985; Fukumasa-Nakai y col., 1994; Larraya y col., 1999, 2002, 2003.

Una vez separados los componentes monocarióticos, la determinación del tipo de compatibilidad de cada uno de ellos puede realizarse mediante la aplicación de marcadores moleculares unidos a los factores de compatibilidad (A y B en el caso de *Pleurotus*). A este respecto, estudios de compatibilidad entre 170 cepas de *Pleurotus ostreatus* de colecciones estadounidenses y canadienses realizados en 1993 por Vilgaliys y col., demostraron la existencia de 3 especies

interestériles (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. populinus*) y a su conjunto lo denominaron complejo *Pleurotus ostreatus*. Recientemente, mediante estudios de compatibilidad entre aislados de diferentes cepas del género *Pleurotus* y con la aplicación de técnicas de biología molecular, se ha tratado de elucidar la estructura genética y diversidad de dichas especies así como de los loci responsables del tipo de compatibilidad entre ellas (Larraya y col., 1999a,b; Isikhuemhen y col., 2000; Zervakis y col., 2001, 2004; James y col., 2004).

2.2. El proceso de hibridación entre basidiomicetos

El principal requerimiento para la hibridación, es la disponibilidad de organismos con diversidad genética y la extinción de una especie fúngica puede significar la pérdida de un vasto número de genes únicos, por lo cual, es esencial establecer un banco de germoplasma a través de la colección de aislados silvestres de cepas de hongos comestibles disponibles, las cuales difieren en características y cuyas combinaciones genéticas pueden ser obtenidas mediante cruza convencionales o por clonación genética utilizando la tecnología del ADN recombinante. También resulta importante el estudio de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas de los hongos para determinar sus tipos de apareamiento, las eficiencias en la degradación del sustrato, las tasas de crecimiento micelial y sus parámetros de cultivo (Zervakis y Venturella, 2002).

Los procesos de hibridación y selección (mejoramiento, evaluación y mantenimiento de nuevos genotipos) entre las distintas especies fúngicas, han mejorado a diferentes niveles entre las distintas especies; sin embargo, el complejo sistema de compatibilidad que posee la mayor parte de los basidiomicetos comestibles, constituye una barrera genética que dificulta el desarrollo de

procesos eficientes de hibridación para dichas especies; aunado a esto, los datos contradictorios del tamaño y la organización genética de dichos organismos, obstaculizan la construcción de mapas genéticos necesarios para identificar genes de interés (Ramírez y col., 2000). Por otro lado, la cuantificación de los parámetros de rendimiento o calidad de los cuerpos fructíferos, en muchas ocasiones están sujetos a condiciones ambientales, de manejo de germoplasma y de las características y tratamientos del sustrato empleado para su propagación y cultivo. Aparentemente, dichos parámetros son también heredados en una forma compleja, debido a esto, no existe mucha información disponible de su control genético y por otro lado, la integración de técnicas de biología molecular a nivel industrial o semi-industrial no son rentables (Larraya y col., 2003); sin embargo, el desarrollo de huellas de ADN con la metodología RAPD, ha contribuido inmensamente a la autenticación de cepas y su manipulación genética (Zervakis y Venturella, 2002).

Labarère y Bois (2001) y Ramírez y col. (2000), consideran que los siguientes aspectos deben ser tomados en cuenta para el desarrollo de programas de hibridación eficientes para hongos comestibles:

- La definición del objetivo (características del hongo deseado).
- Elección de un método de hibridación adaptado al objetivo y a los hongos preexistentes para el programa de trabajo.
- Buen conocimiento del ciclo de vida del hongo usado y los puntos importantes para la diferenciación de los cuerpos fructíferos.
- El sistema genético que controla el tipo de compatibilidad entre especies.
- La estructura y organización genética del hongo.

- La identificación de genes involucrados en el control de los parámetros cuantitativos de productividad.

2.2.1. Métodos de hibridación de *Pleurotus*

Tomando en cuenta que la hibridación es un medio por el cual, algunas características genéticas deseadas presentes en diferentes cepas pueden ser combinadas y con ello, obtener nuevas cepas y variedades con características mejoradas, resulta conveniente su aplicación con la finalidad de mejorar los cultivos con baja inversión (Labarère y Bois, 2001). En lo referente a la hibridación de basidiomicetos y especialmente de especies del género *Pleurotus*, se han utilizado diferentes métodos tales como apareamientos entre monospóricos, dicarion-monocarion (también llamado fenómeno Buller) y neohaplontes compatibles.

El método convencional para obtener cepas híbridas de *Pleurotus* consiste en fructificar las cepas que van a ser mejoradas para obtener la progenie monocariótica, producto de la meiosis de los núcleos dicarióticos y que es liberada durante el proceso de esporulación. Una vez que se obtiene la progenie monospórica, es necesario realizar apareamientos entre ellos en todas las combinaciones posibles para identificar los tipos de compatibilidad y posteriormente, se realizan cruzamientos entre micelios monocarióticos compatibles para obtener las cepas híbridas (Arias, 1998; Labarère y Bois, 2001). Actualmente, este método es utilizado para el estudio de *Pleurotus*; sin embargo, el tiempo requerido para fructificar las cepas constituye una desventaja, misma que no se presenta en el método de apareamiento de neohaplontes, el cual consiste en desdicarionizar una cepa con características deseadas para separar sus componentes monocarióticos, también llamados neohaplontes por Fries y Aschan (1952) quienes los refieren

como el micelio monocariótico derivado de un dicarion sin la intervención de la cariogamia y meiosis]. Cuando se obtienen los diferentes neohaplontes de cada cepa dicariótica seleccionada, se cruzan entre sí para determinar los patrones de compatibilidad y con ello, obtener los híbridos. Con este método se tiene la ventaja de reducir el tiempo requerido para aislar los genotipos de las cepas dicarióticas, debido a que no es necesario obtener los cuerpos fructíferos para obtener las progenies.

2.3. Control genético y morfológico del proceso de fructificación

La morfogénesis de cuerpos fructíferos de los hongos es un campo ampliamente investigado en la actualidad, tanto a nivel fisiológico como genético. Estudios recientes muestran que existe una serie de genes expresados exclusivamente en alguna fase del desarrollo de los cuerpos fructíferos de diferentes basidiomicetos (Lacourt y col., 2002; Lee y col., 2002; Sunagawa y Magae, 2005), entre los que se encuentran los genes hidrofóbicos que son de los más abundantes en los basidiomicetos; sin embargo, utilizando el método DD-RAPD, Sunagawa y Magae (2005) no detectaron hidrofobinas como genes específicos del desarrollo del carpóforo en *P. ostreatus*, información que contradice los reportes de estudios de detección *In situ* realizados por Peñas y col. en 1998 en estas mismas especies, en donde lograron identificar y aislar un gen de hidrofobina presente en el cuerpo fructífero pero ausente en el micelio mono y dicariótico.

De manera general se puede decir que el micelio dicariótico es prerrequisito para el desarrollo de los cuerpos fructíferos en los basidiomicetos y ya que los genes de compatibilidad determinan el establecimiento de este tipo de micelio en basidiomicetos como *Pleurotus*, estos loci también controlan la iniciación del desarrollo de sus cuerpos fructíferos. Sin embargo, existe evidencia de

fructificaciones precoces de *Peniophora ludoviciana*, *Schizophyllum commune*, *Sistotrema brinkmanni* y *Fomes cajanderi* ocurridas en ausencia de una dicariofase; es decir, sobre micelio monocariótico, o bien, sin una dicariofase bien definida como en el caso de *Agaricus bisporus* (Koltin y col., 1972).

Por otro lado, se ha comprobado que en la morfogénesis de los carpóforos de las especies de *Pleurotus*, no solo influyen aspectos genéticos, sino también la coloración, tamaño y forma del cuerpo fructífero está influenciada por factores ambientales como la intensidad luminosa y temperatura (Eger y col., 1974; Marino y col., 2003). Se ha determinado que la respuesta morfogenética en *Pleurotus*, depende principalmente del intervalo de longitud de onda situado entre 200-400 nm, correspondiente del ultravioleta al color azul respectivamente (Tan, 1977) y que a 28°C y 900 lux, el píleo de una cepa de *P. ostreatus* presenta un color gris y a 15°C y 120 lux, se torna blanco; por otro lado, los carpóforos de esta misma cepa, producidos a 28°C son menos resistentes al manejo que aquellos que se incuban a 15°C (Marino y col., 2003). También se observó que al disminuir la intensidad de luz, el estípite se alarga y adelgaza y el píleo se reduce parcialmente y que el incremento en la duración e intensidad luminosa disminuye el número de primordios; por otro lado, se ha reportado que la luz verde retarda el crecimiento micelial, produce la formación de primordios y su elongación aunque el desarrollo de esporóforos solo se induce con luz blanca (Zadrazil, 1978; Danai, 1998).

2.4. Métodos utilizados para la obtención de ADN genómico en hongos

Para coadyuvar al desarrollo de programas de hibridación eficientes para hongos comestibles, pueden emplearse algunas técnicas moleculares que faciliten la selección de rasgos cuantitativos tales como la tasa de crecimiento, rendimiento agronómico, acumulación de nutrientes de interés,

así como también de características de resistencia a patógenos y formación de esporas (Ramírez y col., 2000). Sin embargo, el análisis genético de muchas especies de hongos utilizando técnicas de biología molecular, resultan ser procesos lentos debido, inicialmente, a los métodos de extracción de ADN utilizados (Graham y col., 1994) por ello, la elección y estandarización de un método de extracción de material genético que sea adecuado para su uso en estudios moleculares, constituye un punto importante dentro de la investigación.

A través del tiempo se han utilizado y modificado diferentes metodologías para el proceso de obtención de ADN genómico en plantas y hongos. Dependiendo de la especie que se pretenda utilizar, se pueden aplicar procesos de rompimiento mecánico de membranas para liberar núcleos, lisis celular y extracción con amortiguadores (compuestas de sales, bromuro de hexadeciltrimetil amonio o Triton), seguidas de extracciones con Fenol-Cloroformo, sucesivas centrifugaciones y precipitación con alcoholes, principalmente etanol e isopropanol y, con la finalidad de obtener ADN más limpio y puro, se puede acoplar en la metodología el uso de enzimas tales como la ARNasa y proteinasa K, así como lavados con fenol equilibrado.

Actualmente existen reportes de diferentes metodologías para la extracción de ADN genómico de organismos vegetales como los protocolos de Murray y Thompson (1980), Dellaporta y col., (1983) y Saghai-Maroff y col., (1984) y debido a la similitud estructural entre plantas y hongos, se han realizado modificaciones a estas metodologías y se han aplicado en hongos fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Kuramae-Izioka, 1997), hongos filamentosos (Garber y Yoder, 1983; Raeder y Broda, 1985; Ashktorab y Cohen, 1992; Graham y col., 1994) y hongos comestibles tales como *Coprinus cinereus* (Zolan y Pukkila, 1986) y diferentes especies de *Pleurotus* (González y Labarere, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento significativo a nivel mundial del cultivo de los hongos comestibles del género *Pleurotus*, hace necesaria la implementación de métodos que permitan la obtención de cepas híbridas y germoplasma apto para su cultivo a nivel industrial (más precoces, con mayores eficiencias biológicas, rendimiento de cuerpos fructíferos y tasas de producción) y con atributos adecuados para su producción comercial (mayor tamaño y peso de carpóforos). Del mismo modo, es necesaria la introducción de técnicas de biología molecular que coadyuven a la caracterización más precisa de los genotipos obtenidos, para este fin es imprescindible la aplicación y estandarización de un método viable que permita la obtención de ADN genómico con niveles de pureza y calidad aceptable tanto de las colonias mono como dicarióticas de las cepas utilizadas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- ❖ Caracterizar a nivel morfológico y de productividad, cepas híbridas de *Pleurotus* spp. obtenidas por medio del apareamiento de neohaplontes compatibles.

4.1. Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar las cepas de *Pleurotus* spp. que presenten las mejores características de producción.
- Recuperar los componentes monocarióticos (neohaplontes) de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* spp. mediante desdicariorización química.
- Determinar el fenotipo y comportamiento micelial de los neohaplontes obtenidos.
- Obtener cepas híbridas por medio del apareamiento de neohaplontes compatibles.
- Determinar las diferencias fenotípicas y el comportamiento micelial de cepas parentales, híbridas y neohaplontes.
- Determinar los parámetros de productividad de las cepas dicarióticas utilizadas.
- Caracterizar morfológicamente los cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas.
- Obtener los coeficientes de correlación de los parámetros cuantitativos de productividad y morfología entre cepas parentales e híbridas.
- Extraer material genético (ADN_g) de cepas parentales, híbridas y neohaplontes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron 14 cepas del género *Pleurotus* (Cuadro 5.1) las cuales se encuentran en la colección de cepas del laboratorio de cultivos celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN). Dichas cepas fueron crecidas en medio extracto de malta-agar (EMA) y almacenadas en refrigeración hasta su uso.

Cuadro 5.1. Material biológico de *Pleurotus* spp. utilizado

Cepas (clave)	Procedencia	Especie reportada
ECS127R	Ecosur, Chiapas	<i>Pleurotus</i> sp.
IAP	Edo. Veracruz	<i>Pleurotus</i> sp.
IB67	U de Guadalajara	<i>Pleurotus</i> sp.
IE136	Inst. Ecología, Mex.	<i>Pleurotus Columbinus</i>
IE200	Inst. Ecología, Mex.	<i>Pleurotus djamur</i>
IE202	Inst. Ecología, Mex.	<i>Pleurotus djamur</i>
LEBEN	Cepa comercial	<i>Pleurotus</i> sp.
P15	Pleos, Italia	<i>Pleurotus</i> sp.
PCM	UNAM, D. F.	<i>Pleurotus</i> sp.
PLEUS	Xico, Puebla	<i>Pleurotus</i> sp.
POROS	México, D.F.	<i>Pleurotus ostreatusroseaus</i>
RP	Productor en D. F.	<i>Pleurotus</i> sp.
UAP7	U. De Puebla	<i>Pleurotus</i> sp.
UAP9	U. De Puebla	<i>Pleurotus</i> sp.

5.2. Medios de cultivo

Se utilizaron cultivos en medio sólido (placa) y en medio líquido. Para el cultivo en placa el medio que se utilizó fue extracto de malta-agar (EMA o medio Eger) (Eger y col., 1976) mientras

que para el cultivo en medio líquido se utilizó peptona P (oxid)-glucosa (PPG) (Leal-Lara y Eger, 1982), glicina-glucosa (GG) (Leal-Lara y Eger, 1982) y extracto de malta desproteínizado (EMD).

5.2.1. Medio extracto de malta-agar (EMA)

Para preparar 1 L de este medio de cultivo, se depositaron 20 g de extracto de malta y 15 g de agar bacteriológico en un matraz Erlenmeyer, se adicionó gradualmente 1 L de agua destilada para solubilizar los componentes y se dejó reposar tapado y con agitación ocasional durante 20 min. El medio se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min. El vaciado del medio en cajas petri estériles (plásticas desechables de 9 cm de diámetro) se realizó en una campana de flujo laminar, posteriormente se dejó solidificar el medio y se incubó a 28°C durante 24 h para prueba de esterilidad. Las cajas cuyo medio no presentó contaminación se guardaron en bolsas de polipapel en refrigeración con la finalidad de evitar contaminación y deshidratación del medio.

5.2.2. Medio de extracto de malta desproteínizado (EMD)

Se solubilizaron 80 g de extracto de malta en 1 L de agua bidestilada y se elevó el pH en 1.5 unidades con respecto al valor inicial, con una solución de hidróxido de sodio 1 N. Posteriormente se adicionaron 5.6 g de cloruro de calcio anhidro y se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión durante 20 min; transcurrido este tiempo, la solución caliente se filtró para eliminar los sólidos precipitados. La solución se diluyó en 6 L de agua bidestilada y se colocaron alícuotas de 30 mL en frascos tapados mismos que se esterizaron a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min.

Una vez fríos, los frascos se incubaron a 28°C durante 24 h para prueba de esterilidad y finalmente se refrigeraron hasta su uso.

5.2.3. Soluciones monocariotizantes

Se evaluó el efecto de dos soluciones monocariotizantes sobre el proceso de desdicariotización química de las cepas seleccionadas. El proceso de preparación de cada una de ellas se describe a continuación.

5.2.3.1. Medio Peptona P (oxoid) con glucosa (PPG)

Para preparar 1 L de este medio, se solubilizaron 20 g de glucosa anhidra y 20 g de peptona de carne P (Oxoid cat. LP0037) en 1 L de agua bidestilada con agitación y calentamiento moderados. De este medio se tomaron alícuotas de 30 mL y se colocaron en matraces erlenmeyer tapados, mismos que fueron esterilizados a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min. Una vez fríos, se incubaron a 28°C durante 24 h para prueba de esterilidad y se refrigeraron hasta su uso.

5.2.3.2. Medio Glicina con glucosa (GG)

Para preparar 1 L de este medio, se solubilizaron 20 g de glucosa anhidra y 5.6 g de glicina (Sigma cat. G-7126) en 1 L de agua bidestilada. De esta solución se tomaron alícuotas de 30 mL y se colocaron en matraces erlenmeyer de 125 mL tapados y posteriormente se esterilizaron a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min. Una vez fríos, se incubaron a 28°C durante 24 h para prueba de esterilidad y finalmente se refrigeraron hasta su uso.

5.3. Tiempo medio de invasión micelial (Tm) y Crecimiento micelial acumulado (Cma)

Para la determinación del Tm, se utilizó el método reportado por Larraya y col. (2002) en el cual, se midió el tiempo (días) de invasión micelial de una caja petri de 9 cm de diámetro con medio EMA al ser inoculada con un fragmento de 10 mm de diámetro de agar conteniendo micelio de cada una de las cepas utilizadas, la cuantificación del tiempo de invasión micelial se estimó por el tiempo en el cual el micelio alcanzó el diámetro total de la caja. Por otro lado, se midió el Crecimiento micelial acumulado (Cma) (reportado como velocidad de crecimiento micelial como por Salmones y col., 1997) con la relación existente entre el diámetro (mm) del crecimiento micelial alcanzado en cada uno de los días subsecuentes a la inoculación y hasta la completa invasión de las cajas. Se realizaron tres repeticiones para cada cepa mono y dicariótica en ambas determinaciones.

5.4. Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes)

Para la realización del proceso de desdicarionización química de las cepas seleccionadas y la recuperación de sus neohaplontes, se realizaron diferentes cultivos variando los parámetros de tiempo de homogenizado (60 y 90 s), volumen de inóculo (50, 100 y 150 μ L) y tiempo de incubación (24-120 h) en dos soluciones monocariotizantes (PPG y GG). Para ello, la totalidad del micelio de un cultivo en placa, cuyo crecimiento ocupaba 2/3 partes de una caja petri con medio EMA, fue homogenizado durante 60 y 90 s en un homogenizador que contenía 50 mL de agua bidestilada (estéril). Se tomaron alícuotas de 50, 100 y 150 μ L del homogenizado y se depositaron en cada matraz que contenía 30 mL de solución PPG o GG, posteriormente se incubaron a temperatura de 25-28°C durante 24, 48 y 72 h en la solución PPG y durante 24, 48,

72, 96 y 120 h en la solución GG. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de cada matraz fue homogenizado nuevamente por 60 s con 20 mL de agua bidestilada estéril y se tomaron alícuotas de esta solución para inocular cajas petri con medio EMA, mismas que fueron incubadas a 28°C hasta que en el desarrollo de las colonias se pudo observar microscópicamente la presencia o ausencia de fíbulas (estructuras formadas durante el crecimiento celular en células dicarióticas). Aquellas colonias que presentaron hifas sin fíbulas (neohaplontes) fueron aisladas y resembradas en cajas petri con medio EMA y una vez que invadieron la caja, se verificó nuevamente la ausencia de fíbulas. Una vez que se recuperaron los neohaplontes, éstos fueron propagados y enumerados individualmente en cajas petri con medio EMA para determinar su morfología y crecimiento micelial.

5.4.1. Determinación de los parámetros de compatibilidad

Los neohaplontes obtenidos fueron apareados entre sí para determinar la existencia de ambos componentes nucleares de las cepas dicarióticas parentales. Para determinar la compatibilidad entre dos colonias monocarióticas, del margen del crecimiento micelial de una colonia se cortó un trozo cúbico de agar de aproximadamente 4 mm de lado y se colocó en una caja petri con medio EMA, al lado de este fragmento se colocó otro trozo de igual tamaño proveniente de un monocarión distinto. Se realizaron entre 6 y 8 apareamientos en cada caja hasta completar la combinación de todos los neohaplontes obtenidos. Después de 2 a 5 días de incubación, se determinó microscópicamente la presencia o ausencia de fíbulas en las colonias formadas por cada apareamiento para identificar los dos tipos característicos de neohaplontes para cada cepa.

5.5. Hibridación de neohaplontes compatibles

Para obtener las cepas híbridas, se utilizó el método reportado por Valencia-del Toro (2002). El apareamiento se realizó cortando de la periferia de una colonia monocariótica un trozo cúbico de agar de aproximadamente 4 mm de lado, mismo que fue colocado en una caja petri con 10 mL de medio EMA al lado de otro fragmento similar de un monocariote distinto. Se realizaron entre 6 y 8 apareamientos por caja y se incubaron a 28°C durante 5-6 días. Si al realizar la revisión microscópica en cada apareamiento se determinó la presencia de fíbulas en por lo menos tres diferentes puntos situados de manera equidistante de la periferia de la colonia, la cruce fue considerada positiva. La presencia de fíbulas implicó que los dos micelios monocarióticos apareados fueron compatibles y por lo tanto se llevó a cabo la reconstitución del dicarion. Una vez identificados los apareamientos compatibles entre los diferentes monocariones de cada cepa, estos fueron resembrados en cajas petri con medio EMA hasta la total invasión micelial.

5.6. Producción de cuerpos fructíferos

La preparación del sustrato e inóculo se realizó utilizando el método reportado por Valencia-del Toro (2002), el cual se describe a continuación.

5.6.1. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó en granos de trigo lavados y remojados a temperatura ambiente durante 24 h; posteriormente, se drenó el exceso de agua y se colocaron 200g de trigo en bolsas de polipapel y se esterilizaron a 121°C y 15 lb de presión durante 30 min. Una vez que

el grano se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 10 mL de un homogenizado (la totalidad de una caja petri invadida con micelio, en 50 mL de ddH₂O por 60 s) de cada cepa crecida en medio EMA y se incubaron en una cámara oscura a 28°C hasta que el micelio invadió totalmente el grano.

5.6.2. Preparación del sustrato

Se empleó paja de trigo, la cual se picó en trozos de aproximadamente 2-4 cm de longitud, se sumergió en un recipiente con agua para hidratarla durante 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se drenó el exceso de agua. El sustrato se empacó en bolsas de polipapel (1 kg por bolsa) y se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión durante 60 min. El porcentaje de humedad del grano se midió por triplicado utilizando el método 2.2.A de Pearson (1976) y la cuantificación se realizó por diferencia de peso.

5.6.3. Obtención de esporóforos

Para obtener los cuerpos fructíferos se utilizaron los métodos reportados por Jiménez-Hernández (2000) y Baysal y col. (2003) mismos que se describen brevemente a continuación.

5.6.3.1. Inoculación del sustrato

El sustrato estéril y frío se inoculó asépticamente con los granos de trigo invadido con micelio (~5 g inóculo/100 g sustrato húmedo), las bolsas se comprimieron, sellaron y etiquetaron realizando 10 repeticiones para cada cepa.

5.6.3.2. Incubación del sustrato inoculado

Las bolsas de sustrato ya inoculadas se colocaron en una cámara oscura a 28°C. Después de 5 días de incubación, las bolsas se perforaron (con la finalidad de permitir el intercambio gaseoso) y posteriormente se colocaron en la misma cámara hasta que el micelio invadió completamente el sustrato. Durante este periodo se llevaron a cabo revisiones visuales constantes para observar el desarrollo del micelio y registrar los tiempos de invasión (Ti) y formación de primordios (Tfp).

5.6.3.3. Inducción de la fructificación

Una vez que el sustrato se invadido y los primordios comenzaron a evidenciarse, las bolsas se cortaron en las zonas de crecimiento para favorecer el desarrollo de los cuerpos fructíferos y se llevaron a una cámara de fructificación en la que se indujo la formación de los carpóforos con humedad (85-95%), temperatura (15°C), ventilación y luz (12 h/día) específicos.

5.6.3.4. Cosecha de cuerpos fructíferos

Se registró el tiempo de corte de la primera y segunda cosecha de cuerpos fructíferos maduros (C1 y C2 respectivamente). Los carpóforos se cortaron desde su base antes de ocurrir el proceso de esporulación, se les determinó sus características morfológicas y cuantificó los parámetros de productividad por cosecha así como la total.

5.7. Determinación de los parámetros de productividad

Para evaluar la productividad en cada una de las cepas, se registró el peso de los hongos obtenidos por bolsa y por día de corte. Los tiempos de invasión (T_i), formación de primordios (T_{fp}), precocidad (P) así como 1ª y 2ª cosecha (C_1 y C_2 respectivamente), se determinaron como se muestra en la Figura 5.1.

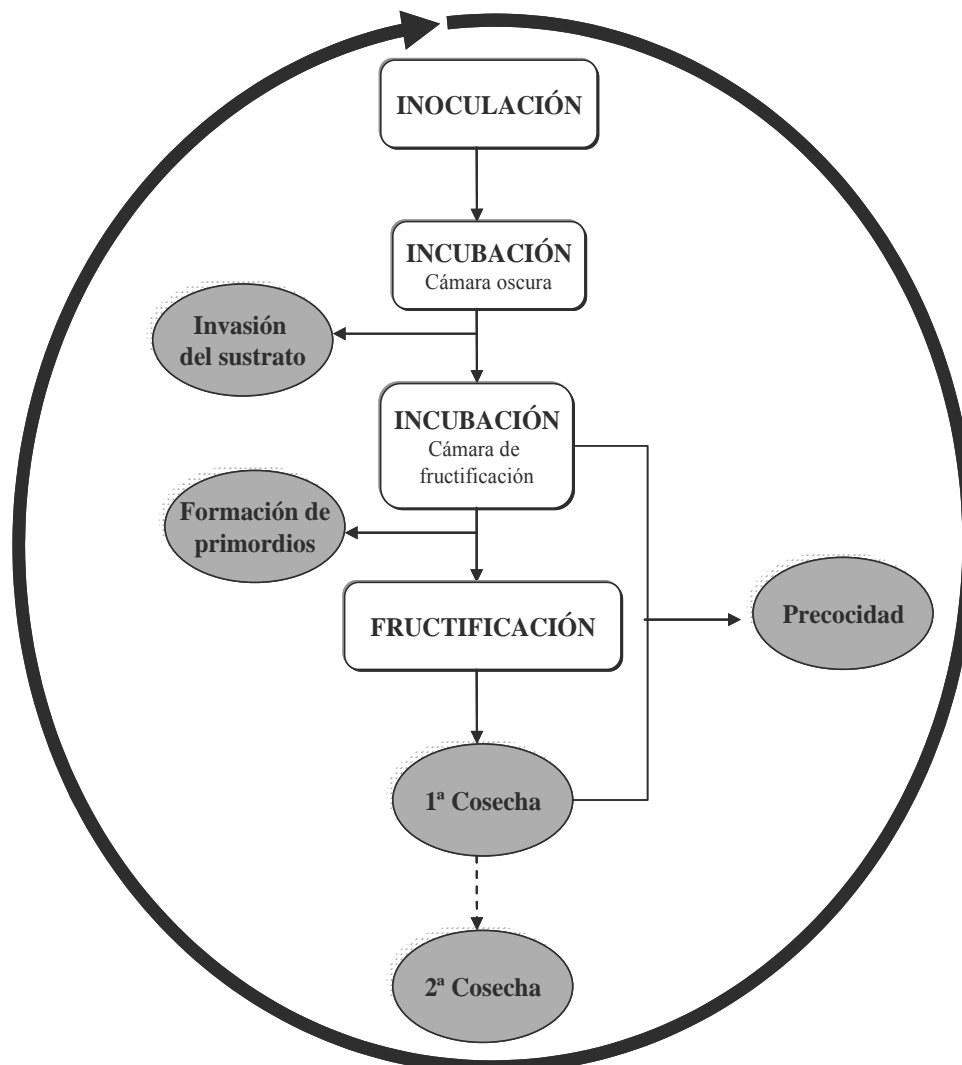


Figura 5.1. Etapas del ciclo de producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*.

5.7.1. Precocidad

La precocidad se midió como el número de días transcurrido desde el inicio de la incubación en condiciones de fructificación hasta la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros (ver Figura 5.1) en cada una de las bolsas (Larraya y col., 2003; Idareta y col., 2004).

5.7.2. Eficiencia biológica

Para calcular el porcentaje de eficiencia biológica, se utilizó la siguiente ecuación (Tchierpe y Hartmann, 1977; citados por Valencia del Toro, 2002):

$$EB (\%) = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{Peso del sustrato seco (g)}} \times 100 \quad [\text{ec. 1}]$$

En donde, el peso del sustrato seco se obtuvo por diferencia con respecto a la humedad del sustrato determinada en la sección 5.6.2.

5.7.3. Rendimiento

El porcentaje de rendimiento de hongos frescos se calculó con la siguiente ecuación (Zadrazil y Kurtzaman, 1982; citados por Jiménez-Hernández, 2000):

$$R = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{Peso del sustrato húmedo (g)}} \times 100 \quad [\text{ec. 2}]$$

5.7.4. Tasa de productividad

La tasa de producción o promedio diario de eficiencia biológica (Royse, 1989) se calculó con la siguiente ecuación:

$$TP = \frac{EB (\%)}{\text{ciclo de producción}} \quad [\text{ec. 3}]$$

El ciclo de producción se refiere al número de días transcurridos desde la inoculación del sustrato, hasta la última cosecha de cuerpos fructíferos en cada una de las bolsas (Figura 5.1).

5.8. Determinación de las características morfológicas de cuerpos fructíferos

Las características que se tomaron en cuenta para determinar la morfología de los cuerpos fructíferos de las cepas parentales e híbridas obtenidas, fueron la coloración de primordios, carpóforos y esporada, el tamaño de los basidiomas determinado por sus diámetros mayor (D_{may}) y menor (D_{men}) así como el peso unitario (P_u) y el peso medio por cosecha (P_m). La metodología utilizada para la cuantificación de dichas características se describe a continuación.

5.8.1. Color de carpóforos y esporada

Para la determinación del color de los primordios y cuerpos fructíferos así como de la esporada de cada cepa, se identificó visualmente el campo cromático correspondiente a cada una de ellas

en el atlas de colores de Küppers (1996) en el cual, las letras indican el campo cromático y los subíndices el porcentaje de cada uno de ellos en la mezcla cromática correspondiente.

5.8.2. Tamaño de carpóforos

Para determinar el tamaño del estípite y los diámetros mayor (D_{may}) y menor del píleo (D_{men}) de una muestra representativa de cada cosecha se utilizó un vernier. Una vez colectados estos datos, los basidiocarpos se clasificaron dentro de cuatro grupos de acuerdo con el diámetro mayor (D_{may}) alcanzado por su píleo como se indica a continuación (Mata y Guzmán, 1993):

G_1 : Menores de 5 cm G_2 : De 5 a 9.9 cm G_3 : De 10 a 14.9 cm G_4 : 15 cm o más

5.8.3. Peso de cuerpos fructíferos

Una vez cosechados los cuerpos fructíferos de cada cepa, se registró el peso unitario (P_u) de cada cosecha en una balanza granataria. El peso medio de cuerpos fructíferos cosechados (P_m) en cada brote, se cuantificó utilizando la siguiente ecuación (Royse, 2004):

$$P_m = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{Número total de hongos}} \quad [\text{ec. 4}]$$

5.9. Protocolo para la obtención de ADN genómico

El protocolo utilizado para la obtención de ADNg, incluye la preparación de las soluciones, tanto los amortiguadores necesarios, las soluciones requeridas para el análisis de calidad del ADN así

como la preparación de las muestras de cuerpos fructíferos y micelio que serán utilizados en el proceso de extracción, estas metodologías se encuentran descritas brevemente a continuación.

5.9.1. Preparación de soluciones

La metodología para la preparación de soluciones está basada en los protocolos descritos en el manual CIMMYT (2005) con algunas modificaciones detalladas a continuación.

5.9.1.1. Soluciones base

Las soluciones base o stock utilizadas fueron las siguientes:

- **Acetato de amonio (7.5 M):** Se disolvieron 5.781 g de acetato de amonio (Sigma cat. A1542) en agua ddH₂O fría y estéril a un volumen de aforo final de 10 mL, la solución resultante se agitó vigorosamente y posteriormente se filtró asépticamente y se almacenó a 4 °C.
- **Azul de bromofenol:** Para preparar 10 mL de este colorante, se disolvieron 0.05 g de azul de bromofenol en polvo (Sigma cat. B0126) en 10 mL de una solución de sacarosa al 40% [400 g de sacarosa (Sigma cat. S0389) en 1 L de ddH₂O] y se almacenó en refrigeración a 4°C.
- **Bromuro de etidio (10 mg/mL):** Para preparar la solución stock, se disolvieron 100 mg de bromuro de etidio (Sigma cat. E7637) en 10 mL de ddH₂O estéril dentro de un frasco de vidrio hermético, el cual se tapó con papel aluminio para evitar su exposición a la luz y se almacenó a 4°C. Nota: *Teniendo en cuenta que el bromuro de etidio es extremadamente mutagénico, es necesario utilizar guantes, equipo apropiado y las precauciones necesarias para su manipulación.*

Para teñir el gel agarosa después de haber realizado la electroforesis, se diluyeron 100 μ L de la solución anterior en 1 L de ddH₂O y se almacenó en un recipiente plástico y hermético a temperatura ambiente hasta por 2 meses. Transcurrido este tiempo, es necesario preparar nuevamente la solución con la finalidad de asegurar una buena tinción de las bandas en el gel.

- **Cloruro de sodio (5 M):** Se disolvieron 292.2 g de NaCl (Sigma cat. S3014) en \approx 750 mL de ddH₂O, posteriormente se aforó la solución a 1 L y se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos. Se almacenó a 4°C hasta su uso.
- **EDTA 0.5 M (pH 8.0):** Para preparar 1L de esta solución, se disolvieron 186.12 g de EDTA disódico en \approx 750 mL de ddH₂O; posteriormente, la solución se ajustó a un pH de 8 adicionando perlas de NaOH (Baker cat. 3722) y/o NaOH 1N; finalmente, la solución se llevó a un aforo de 1 L, se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos y se almacenó en refrigeración a 4°C.
- **Gel de agarosa 1%:** Se depositaron 0.12 g de agarosa (Sigma cat. A4718) y 12 mL del amortiguador TBE 1X en un matraz erlenmeyer de 125 mL, posteriormente se tapó el matraz y se calentó sobre la flama de un mechero bunsen hasta fundir completamente la agarosa en el amortiguador (Opción: *fundir la agarosa en horno de microondas con agitación ocasional*).

Una vez fundida la agarosa y antes de que la solución comenzara a ebulir, fue retirada de la flama y se mantuvo en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente (Opción: *sumergir el matraz en hielo para disminuir la temperatura más rápidamente*).

Finalmente, con ayuda de una pipeta, se realizó el vaciado de la solución sobre una placa para electroforesis de 8x7 cm (previamente lavada 2 veces con ddH₂O y alcohol) en una cámara de electroforesis Easy cast B1A.

- **Solución Tris HCl 1M (pH 7.5 o pH 8.0):** Se disolvieron 121 g de Trizma-Base en ≈ 750 mL de ddH₂O y se añadió HCl concentrado (≈ 75 ml HCl = pH 7.5 y ≈ 49 ml HCl = pH 8.0) hasta alcanzar el pH deseado. Posteriormente, se aforó a 1 L y se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos y se almacenó a 4°C hasta su uso.

5.9.1.2. Amortiguadores

Los amortiguadores utilizados fueron los que a continuación se describen:

- **Amortiguador de extracción de ADNg:** Se preparó de acuerdo con las consideraciones especificadas en el Cuadro 5.2. La solución se mezcló en condiciones asépticas a temperatura ambiente; sin embargo, es necesario calentar el amortiguador a 60-65°C antes de agregar el CTAB (Sigma cat. H6269) y el BME (Sigma cat. M3148).

Cuadro 5.2. Especificaciones para la preparación del amortiguador de extracción de ADNg

Solución stock		Concentración Final	Volúmen final deseado	
			5 mL	10 mL
5 M	NaCl	1.4 M	1.4 mL	2.8 mL
0.5 M	EDTA	20 mM	0.2 mL	0.4 mL
1 M	Tris HCl (pH 8)	100 mM	0.5 mL	1 mL
	BME	2% v/v	0.1 mL	0.2 mL
	CTAB	2% p/v	0.1 g	0.2 g
	ddH ₂ O estéril		2.8 mL	5.6 mL

- **Amortiguador TBE 10X (pH 8.3):** Se disolvieron 108 g de trizma-base (Sigma cat. T1503), 55 g de ácido bórico (Baker cat. 0084-20) y 9.3 g de EDTA (Sigma cat. E5134) en un volumen de aforo de 1 L, esta solución se esterilizó y almacenó en un frasco hermético a temperatura ambiente hasta su uso.

- **Amortiguador TE-8 1X:** El amortiguador de dilución se preparó asepticamente bajo las condiciones especificadas en el Cuadro 5.3 y se almacenó tapado a 4°C hasta su uso.

Cuadro 5.3. Especificaciones para la preparación del amortiguador de dilución de ADNg

Solución Stock		Concentración final	Volúmen final deseado		
			10 mL	50 mL	100 mL
0.5 M	EDTA (pH 8)	1 mM	20 µL	100 µL	200 µL
1 M	Tris HCl (pH 8)	10 mM	0.1 mL	0.5 mL	1 mL
	ddH ₂ O estéril		9.88 mL	49.4 mL	98.8 mL

5.9.2. Preparación de las muestras

Se utilizó hongo fresco para la extracción de ADNg de las cepas dicarióticas (parentales e híbridas), así como micelio sedimentado de cultivos miceliares en medio EMD con 15 días de incubación para las cepas dicarióticas y 30 días de incubación para los monocariones. Los cuerpos fructíferos de las cepas dicarióticas fueron lavados 2 veces con ddH₂O estéril y secados a 38°C por 4-5 h; posteriormente se guardaron en bolsas limpias y herméticas a -20°C hasta su uso. Por su parte, la biomasa de los cultivos miceliares se recolectó asepticamente por filtración y se lavó 2 veces con 5 mL de ddH₂O estéril, posteriormente se introdujo en cajas petri estériles para secarse a 38°C durante 5-6 h y se mantuvo herméticamente cerrado a -20°C hasta su uso.

5.9.3. Metodología para la extracción de ADNg

La Figura 5.2, muestra la metodología utilizada para la extracción de ADNg, la cual está basada en el método reportado por Graham y col. (1994) con las siguientes modificaciones: Se pesaron 0.2 g de micelio seco y pulverizado, al cual se le añadieron 500 µL del amortiguador de

extracción [2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA], mismo al que se le adicionó 2% de BME. La incubación se realizó en baño maría a 60°C por 20 min y todas las centrifugaciones se llevaron a 12 000 rpm en una microcentrífuga Microfuge 18 (Beckman Coulter). El ADN precipitado se lavó en tres ocasiones con 1 mL de EtOH 70% y secó por inversión de tubos hasta la completa evaporación del EtOH. La muestra fue resuspendida en amortiguador TE-8 a una concentración de 1X con agitación suave y se almacenó a 4°C.

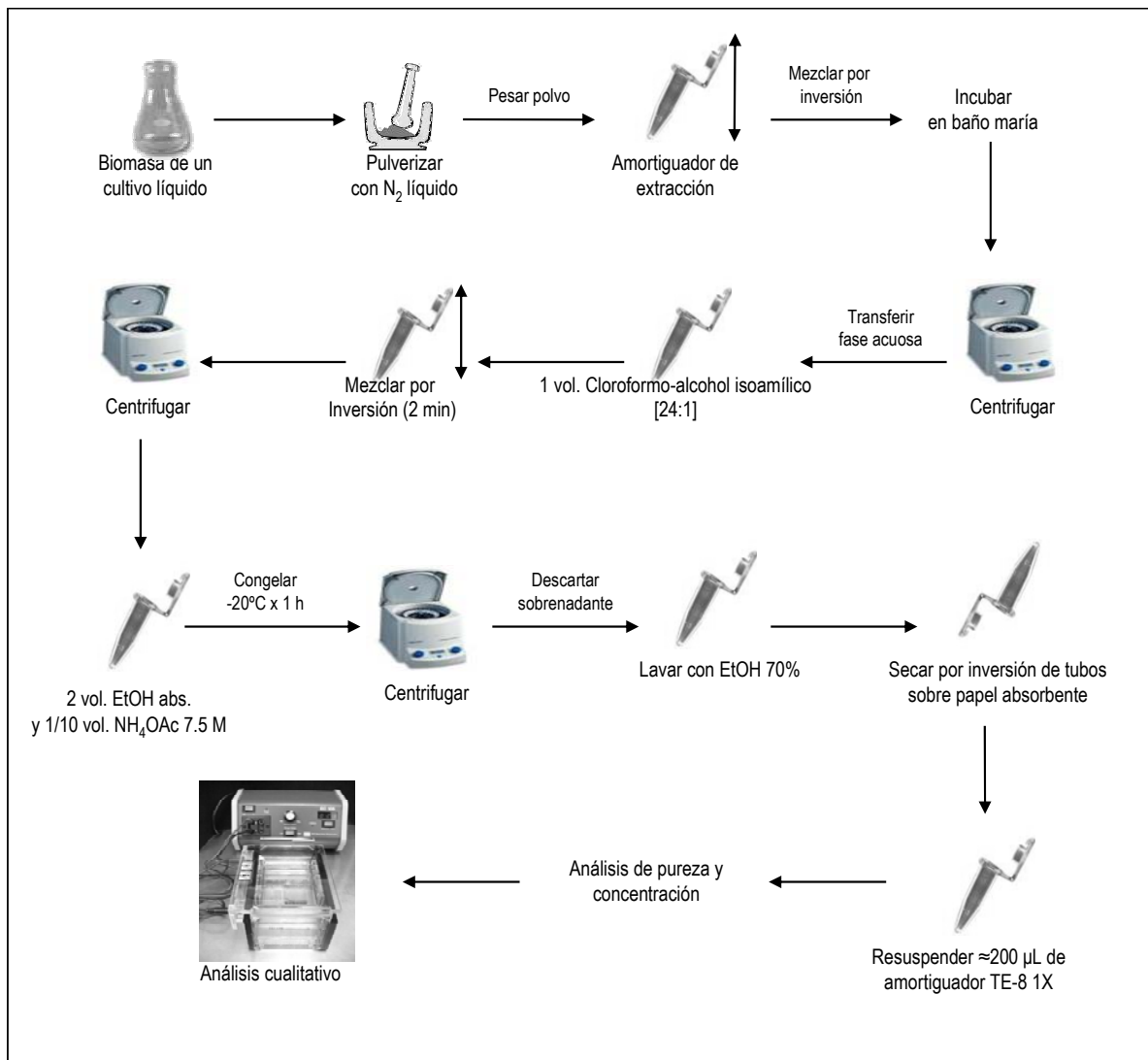


Figura 5.4. Metodología utilizada para la extracción de ADNg.

5.9.4. Análisis cuantitativo de ADNg

Se realizaron diluciones del ADN obtenido con amortiguador TE IX como disolvente y se midió su absorbancia en luz ultravioleta a 260 y 280 nm. La pureza del ADN se determinó según la como se muestra en la ecuación 5 (CIMMYT, 2005; Rodríguez y col., 2004) y el grado de pureza óptimo es de 1.8 a 2.0.

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Absorbancia}_{260\text{nm}}}{\text{Absorbancia}_{280\text{nm}}} \quad [\text{ec. 5}]$$

La concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de ADN se calculó con la ecuación 6 (CIMMYT, 2005), en donde FD es el factor de dilución de la muestra (volumen de aforo/volumen de alícuota) mientras que 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1000 son factores de conversión constantes para ADNg.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia}_{260\text{nm}} \times \text{FD} \times 50 \mu\text{g} / \mu\text{L}}{1000} \quad [\text{ec. 6}]$$

5.9.5. Análisis cualitativo de ADNg

Se corrieron 200 ng de cada una de las muestras en electroforesis en gel de agarosa 0.7% a 72 V por 1 h en corriente continua, utilizando como referencia 200 ng del marcador de peso molecular Lambda digerido con Hind III (Sigma cat. D9780). El gel fue revelado en una solución de bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 min y enjuagado durante 10-15 min en amortiguador TBE 1X para desteñir. El gel se colocó bajo luz UV para visualizar las bandas y determinar el peso molecular de cada una de ellas utilizando el software Kodak Gel Logic 940 Imaging

System. Se considera ADNg de buena calidad, cuando la banda está íntegra, sin barridos por degradación de material genético o contaminación y es de alto peso molecular.

5.9. Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows® ver. 12.0 y las pruebas utilizadas para el análisis de cada uno de los parámetros medidos se detalla a continuación:

- Para comparar los tiempos de invasión micelial (T_m), invasión del sustrato (T_i), formación de primordios (T_{fp}), primera (C1) y segunda (C2) cosecha de cuerpos fructíferos, tamaños de estípite, pileo (D_{may} y D_{men}) y peso unitario de cuerpos fructíferos (P_u), así como los parámetros de productividad de las cepas dicarióticas tales como el peso de hongos frescos cosechados (Phf), la eficiencia biológica (EB), tasa de productividad (TP), rendimiento (R) y precocidad (P) se aplicó un ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($p < 0.05$) para detectar diferencias estadísticas significativas en cada parámetro.
- En el caso de los crecimientos miceliales acumulados (Cma) de los neohaplontes y cepas dicarióticas, se aplicó una prueba de ANOVA de medidas repetidas y un análisis post hoc de Duncan ($p < 0.05$) para identificar la localización de diferencias significativas.
- Para comparar los parámetros cuantitativos entre cepas parentales e híbridas, se aplicó una prueba t-student de muestras independientes para verificar la igualdad de medias.
- El análisis de correlación de Pearson se realizó con la finalidad de identificar el grado de asociación entre las variables medidas, considerando un nivel de significancia de dos colas con un valor α de 0.05 para ambas pruebas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Recuperación de material biológico y determinación de su Tiempo medio de invasión micelial (Tm)

Doce de las catorce cepas disponibles fueron recuperadas exitosamente (Cuadro 6.1). Las cepas P15 y POROS no pudieron ser propagadas debido probablemente a las condiciones drásticas de almacenamiento a las que fueron sometidas previamente.

Cuadro 6.1. Tiempo medio de invasión micelial de material biológico recuperado.

CEPA	Tm* (días)
RP	5.0 ± 0 ^a
UAP 9	5.0 ± 1 ^a
ECS127R	5.6 ± 0.6 ^b
IE200	5.3 ± 0.6 ^b
LEBEN	5.3 ± 0.6 ^b
IAP	8.3 ± 0.6 ^c
IE202	7.3 ± 1.5 ^c
PCM	7.3 ± 0.6 ^c
PLEUS	7.3 ± 0.6 ^c
UAP 7	7.0 ± 1 ^c
IE136	9.7 ± 1.5 ^d
IB67	13.0 ± 2 ^e

* Promedio de tres repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$)

Al determinar los T_m de las cepas recuperadas, el ANOVA de una vía indicó diferencias estadísticas significativas entre ellos y la prueba post hoc de Duncan reveló la formación de 5 grupos distintos. Dentro del primer grupo se encontraron las cepas RP y UAP9 consideradas las más vigorosas ya que invadieron con mayor rapidez el medio; en el segundo grupo se localizan las cepa ECS127R, IE200 y la cepa comercial LEBEN mientras que en el conjunto 3 se agrupó el mayor número de cepas (IAP, IE202, PCM, PLEUS y UAP7) y finalmente, en los grupos 4 y 5 se localizaron las cepas IE136 e IB67 respectivamente, siendo ésta última la que requirió más tiempo para colonizar el medio de cultivo (13 días) y por ello presentó los mayores valores de T_m (Figura 6.1).

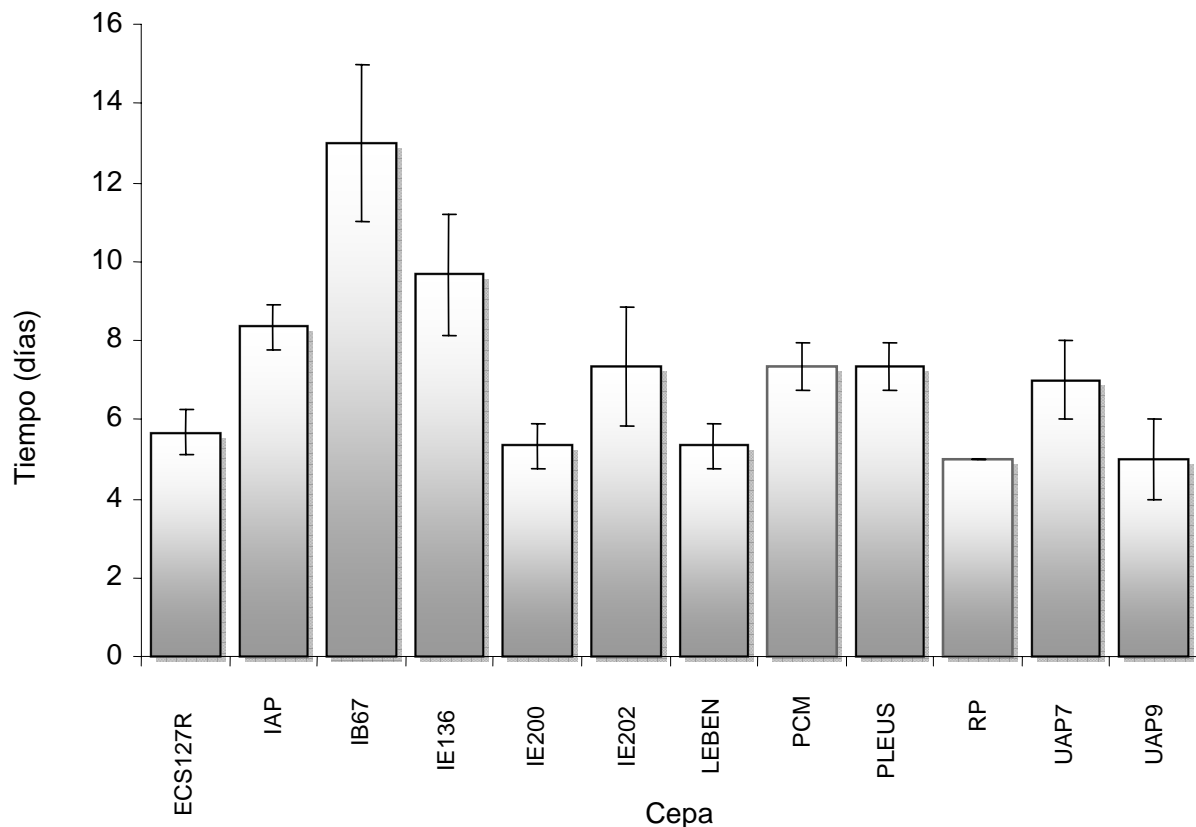


Figura 6.1. Tiempo medio de invasión micelial del material biológico utilizado.
[Promedio de tres repeticiones, las líneas indican su respectiva desviación estándar]

En la literatura, existen numerosos reportes de velocidades de crecimiento de diferentes basidiomicetos como son *Schizophyllum commune* (Simchen, 1966; Clark y Anderson, 2004), *Coprinus cinereus* (Kües, 2000) así como diversas especies del género *Pleurotus* (Salmones y col., 1997; Ramírez y col., 2000; Larraya y col., 2001, 2002, 2003); al comparar los resultados reportados por estos autores con los datos obtenidos en el presente trabajo, se puede observar que aunque hay discrepancias en cuanto al término utilizado para nombrarlo, el tiempo medio de invasión micelial (Tm) así como el crecimiento micelial acumulado (Cma), son parámetros de fácil medición, que son útiles para comparar el comportamiento micelial y fenotípico de las cepas mono y dicarióticas así como para dilucidar, de manera indirecta, el rendimiento del cultivo de dichas cepas. De esta forma, como Clark y Anderson (2004) concluyen, las colonias más grandes y de rápido crecimiento tienen el potencial de producir un mayor número de cuerpos fructíferos y esporas que las colonias más pequeñas, además de contribuir con un mayor número de gametos y genes viables para la producción de estos organismos.

6.2. Morfología micelial de las cepas de *Pleurotus* spp. utilizadas

Las cepas recuperadas fueron crecidas en cajas petri con medio extracto de malta-agar, la Figura 6.2 muestra los diferentes tipos de morfología micelial observados en las cepas recuperadas la cual fue de los tipos algodonoso (Figura 6.2a) o filamentosos (Figura 6.2b) con abundancia regular o exuberante.

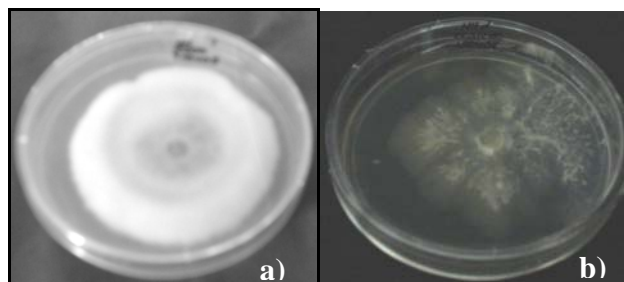


Figura 6.2. Morfología micelial de cepas de *Pleurotus* utilizadas.
a) Crecimiento algodonoso y exuberante; b) crecimiento filamentosos y regular

Como se puede observar en el Cuadro 6.2, la mayoría de las cepas mostraron morfología de tipo algodonoso (IAP, IB67, IE136, IE200, IE202, PCM, RP, UAP7 y UAP9) y solo las cepas ECS127R, LEBEN y PLEUS presentaron fenotipo filamentosos; con respecto a la abundancia, el micelio exuberante predominó sobre el micelio con abundancia regular, siendo las cepas ECS127R, IE200, LEBEN y RP quienes desplegaron la morfología con esta última abundancia.

Cuadro 6.2. Morfología micelial de material biológico recuperado.

CEPA	Morfología micelial	
	Tipo	Abundancia
ECS127R	F	R
IAP	A	Ex
IB67	A	Ex
IE136	A	Ex
IE200	A	Ex
IE202	A	Ex
LEBEN	F	R
PCM	A	Ex
PLEUS	F	Ex
RP	A	Ex
UAP 7	A	Ex
UAP 9	A	Ex

Tipo: A = Algodonoso, F = Filamentosos
Abundancia: Ex = Exuberante, R = regular

El fenotipo micelial observado en el presente trabajo, es muy similar al que reporta Valencia-del Toro (2002) para estas mismas cepas sin explicar la diferencia en dicha característica. Por su parte, Clark y Anderson (2004) también reportan diferencias morfológicas en el micelio de *Schizophyllum commune* (organismo macroscópico que al igual que *Pleurotus* pertenece al orden de los agaricales, pero que difieren en familia) concluyendo que la morfología que presentan los dicariones se ve afectada por varios factores. Por un lado se encuentra la influencia de la luz durante el crecimiento vegetativo de las colonias, ya que observaron que las cepas que crecían en presencia de luz desarrollaban una morfología anormal o asimétrica además de que disminuían su velocidad de crecimiento; por otro lado, determinan que la diferencia fenotípica tiene una base genética que especifica el tipo de morfología que desplegará el dicarion; y finalmente, determinan la presencia de un compuesto extracelular inhibitorio del crecimiento, mismo que solo fue encontrado cuando el micelio presentó la morfología asimétrica de lento crecimiento y por ello, ejerce una influencia determinante tanto en la morfología como en la velocidad de crecimiento. Además, estos autores sometieron las cepas de *Schizophyllum commune* a procesos de selección y evolución mediante la inducción de su crecimiento bajo condiciones de limitación de nutrientes y con inserción de núcleos mutantes mediante el fenómeno Buller, los resultados obtenidos en dicho trabajo mostraron que el micelio dicariótico de los basidiomicetos responde al proceso de selección natural, incrementando su velocidad de crecimiento con evidencia de coadaptación entre los núcleos constituyentes del estado dicariótico del micelio, además de que ambos núcleos pueden sufrir episodios de recombinación somática durante el crecimiento vegetativo. Al observar cambios fenotípicos en las cepas probadas durante este proceso evolutivo, Clark y Anderson concluyeron que la plasticidad fenotípica que presenta el micelio dicariótico durante la evolución puede ser debida tanto a la mutación, como a la coadaptación y recombinación somática de los constituyentes del mismo.

6.3. Selección de cepas parentales

Una vez reactivadas las cepas, fueron seleccionadas 3 de ellas para ser sometidas al proceso de desdicarización química, tomando en cuenta principalmente los parámetros reportados (Valencia de Toro, 2002) tanto de coloración (eligiendo cepas con colores contrastantes), productividad (con los mayores valores de eficiencias biológicas) y origen (endémicas de nuestro país), así como los menores valores de Tm obtenidos en este trabajo (que fluctúan entre 5 a 5.6 días). El Cuadro 6.3 muestra las cepas seleccionadas y las características de cada uno de los parámetros antes mencionados.

Cuadro 6.3. Cepas seleccionadas de *Pleurotus* spp. para el proceso de desdicarización química

Cepa	Procedencia	Eficiencia biológica ^a	Color del carpóforo ^b	Tm (días)
ECS127R	Ecosur-Chiapas	95.1 ± 33	Rosa (N ₃₀ A ₄₀ M ₄₀)	5.6 ± 0.6
IE200	Inst. Ecología, Mex.	102.1 ± 20	Blanco (N ₀₀ A ₀₀ M ₀₀)	5.3 ± 0.6
RP	Productor, D.F.	127.1 ± 29	Rosa (N ₁₀ A ₄₀ M ₄₀)	5.0 ± 0

^a Valencia-del Toro, 2002. ^b Küppers, 1996

Es importante mencionar que la diversidad en la coloración de los productos alimenticios genera una respuesta de aceptación favorable de los mismos, tal como lo reportaron Valencia-del Toro y Leal-Lara (1999) quienes consideran que la introducción en el mercado de setas de diversos colores, puede impulsar la comercialización de este hongo; por otro lado, Larraya y col. (2003), concluyeron que las cepas que presentan menores valores numéricos de Tm, tienen la posibilidad de invadir más rápidamente el sustrato y por lo tanto, ser buenas candidatas para procesos de mejora genética.

6.4. Características morfológicas de cuerpos fructíferos de cepas parentales

Para verificar las características morfológicas de las cepas seleccionadas, estas fueron inducidas a fructificar en bolsas con 150 g de paja estéril y como se puede apreciar en la Figura 6.3, los carpóforos de las cepas RP y ECS127R presentaron morfología característica del género (Herrera y Ulloa, 1998) y coloración rosa (en diferentes tonalidades), mientras que los cuerpos fructíferos de la cepa IE200 fueron blancos y en forma de pétalo de flor; los píleos de las tres cepas fueron lisos y de consistencia carnosa, suaves y firmes al manejo, con estípites pequeños y correosos.



Figura 6.3. Cuerpos fructíferos de cepas de *Pleurotus* spp. que fueron sometidas al proceso de dicarionización química.
a) ECS127R; b) IE200; c) RP

Se ha reportado que el complejo *P. djamor* está conformado por varias cepas que presentan colores blancos y rosas (Valencia-del Toro, 2002), por un lado se encuentran cepas pertenecientes a la especie *P. djamor* var. *roseus* que producen carpóforos blancos, por otro se encuentra la especie *P. salmoneostramenius* o también llamada *ostreatusroseus* que produce cuerpos fructíferos de color rosa y finalmente, la especie *P. opuntiae* que rinde carpóforos grises (Corner, 1981; Petersen y Hughes, 1999). En estudios de compatibilidad realizados por Valencia-del Toro (2002), se concluyó que la cepa RP se encuentra dentro del mismo grupo interestéril de la cepa

IE200 misma que, según información del donante (Instituto de Ecología), está agrupada dentro del complejo *P. djamor* var. *djamor* y que produjo tanto carpóforos como esporada blanca. Por la morfología observada (carpóforos y esporada rosa) y los estudios de compatibilidad reportados previamente, se podría inferir que la cepa RP pertenece al complejo *P. djamor* de la variedad *salmonostramineus*.

6.5. Evaluación de medios monocariotizantes

Para el proceso de descariotización química, se prepararon dos soluciones monocariotizantes: Glicina-Glucosa (GG) y Peptona P (oxid)-Glucosa (PPG) con la finalidad de determinar el crecimiento micelial de las cepas probadas. Como lo muestra el Cuadro 6.4, utilizando las concentraciones de GG y PPG reportadas por Leal-Lara y Eger (1982), el crecimiento micelial en el medio PPG comenzó a evidenciarse en menor tiempo que en el medio GG; de igual forma, al colocar homogenizado obtenido con PPG en cajas petri con medio EMA, el crecimiento de colonias se observó a partir de las 48 h de incubación, en contraste, con el homogenizado obtenido a partir del medio GG el crecimiento de colonias se hizo evidente entre las 72-120 h de incubación. Bajo las condiciones evaluadas en este experimento, se observó que la formación de colonias en la solución PPG es mayor en un intervalo de tiempo menor, haciendo un comparativo con lo reportado por Leal-Lara y Eger en 1982 en donde el efecto monocariotizante de la solución GG se observó en un tiempo de 18-20 días, que fue un intervalo de tiempo tres veces mayor que en la solución PPG que fue de 6-7 días. Por otro lado, Sánchez (2004) reporta que las especies del género *Pleurotus* crecen un intervalo amplio de pH, siendo entre 5 y 6 los valores óptimos de crecimiento; sin embargo, este intervalo varía entre las distintas especies, de esta

forma Srivastava y Bano (1970) concluyeron que aunque *P. djamor* puede crecer en intervalos de pH desde 4 a 9, presenta un pH óptimo de 5.5.

Cuadro 6.4. Características observadas en los dos medios monocariotizantes (GG y PPG) empleando *Pleurotus* spp.

MEDIO	Proporción [X:Glucosa]g	Tiempo (h) de crecimiento micelial evidente		pH
		Medio líquido	Medio sólido	
Glicina-Glucosa (GG)	5.6 : 20	72	72-120	7.1
Peptona P-Glucosa (PPG)	20 : 20	24	48	6.6

Nota: X indica la proporción (g) de glicina o peptona P utilizada en cada caso.

Aunque en el presente trabajo no se pudo determinar el efecto monocariotizante de ambas soluciones, si fue posible observar la diferencia en el tiempo de crecimiento de las colonias al utilizar ambas. Estos datos fueron importantes porque nos permitieron elegir al medio PPG para el proceso de descariotización química de las cepas seleccionadas en el presente trabajo, considerando que el tiempo requerido para el crecimiento micelial evidente en este medio es aproximadamente tres veces menor que en el medio GG y que por otro lado, el pH de la solución PPG es el más cercano al pH óptimo de crecimiento para cepas del complejo *P. djamor*.

6.6. Obtención de neohaplontes

Las cepas parentales fueron sometidas al proceso de descariotización química utilizando el medio PPG como solución monocariotizante; de esta forma, se aisló un total de 33 neohaplontes, de los cuales, 17 correspondieron a la cepa IE200 y 8 para cada una de las cepas ECS127R y RP. A dichos neohaplontes se les realizaron pruebas de compatibilidad intraespecímen para

determinar la presencia de ambos tipos de compatibilidad presentes en el micelio dicariótico de cada cepa; sin embargo, en las 3 cepas que fueron desdicariorizadas en el presente estudio, la recuperación de monocariones fue asimétrica, es decir, únicamente se pudo recuperar un tipo de neohaplonte. Este comportamiento inicialmente fue atribuido a la falta de un mayor número de neohaplontes por cada cepa para lograr la recuperación de ambos genotipos, tal como lo reportaron Valencia-del Toro y Leal-Lara (1999); sin embargo, en trabajos previos realizados con estas mismas cepas, se logró la recuperación simétrica de ambos componentes monocarióticos con un número pequeño de colonias aisladas (Valencia-del Toro y Leal-Lara, 1999; Valencia-del Toro, 2002). Por su parte, Arias (1998) también reportó un comportamiento asimétrico en varias cepas de *Pleurotus*, atribuyendo dicho comportamiento a una posible pérdida en la viabilidad ocasionada durante el proceso de desdicariorización; debido a esto, se decidió evaluar la posible influencia ejercida por cada una de las etapas de la desdicariorización química sobre la recuperación de neohaplontes.

6.6.1. Influencia del tiempo de homogenizado

Utilizando el medio PPG, se probaron dos diferentes tiempos de homogenizado del micelio y como se puede observar en la Figura 6.4, fue a 90 segundos donde se obtuvo el mayor número de neohaplontes para las tres cepas, lo anterior puede ser atribuido a que el micelio dicariótico es expuesto por más tiempo a un rompimiento mecánico sin que aparentemente se sometiera a un estrés excesivo a la célula ya que como reporta Arias (1998), cuando las condiciones de desdicariorización son muy agresivas (tiempos de homogenizado mayores a 2.5 minutos, entre otros), no se logra obtener micelio monocariótico.

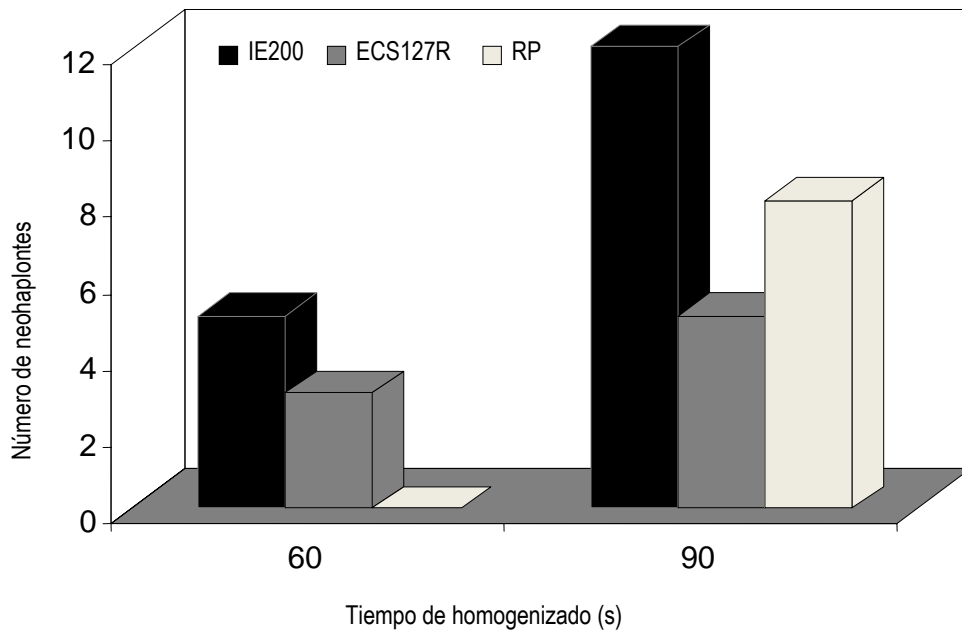


Figura 6.4. Efecto del tiempo de homogenizado sobre la recuperación de neohaplontes de *Pleurotus* spp.

6.6.2. Influencia del volumen de inóculo

El volumen de inóculo (Figura 6.5) colocado en la solución, también influyó en el proceso de recuperación de neohaplontes, observándose una distribución de tipo normal para las cepas IE200 y ECS127R en donde se puede apreciar que al aumentar el volumen de inóculo de 50 a 100 μL , la recuperación de neohaplontes fue mayor debido a que se incrementa la concentración del micelio que entra en contacto con la solución monocariotizante; sin embargo, con 150 μL de inóculo, los pellets se forman con mayor rapidez y al ocupar mayor volumen dentro de la solución, tienden a fusionarse entre sí reconstituyendo el micelio dicariótico y disminuyendo la cantidad de colonias monocarióticas aisladas.

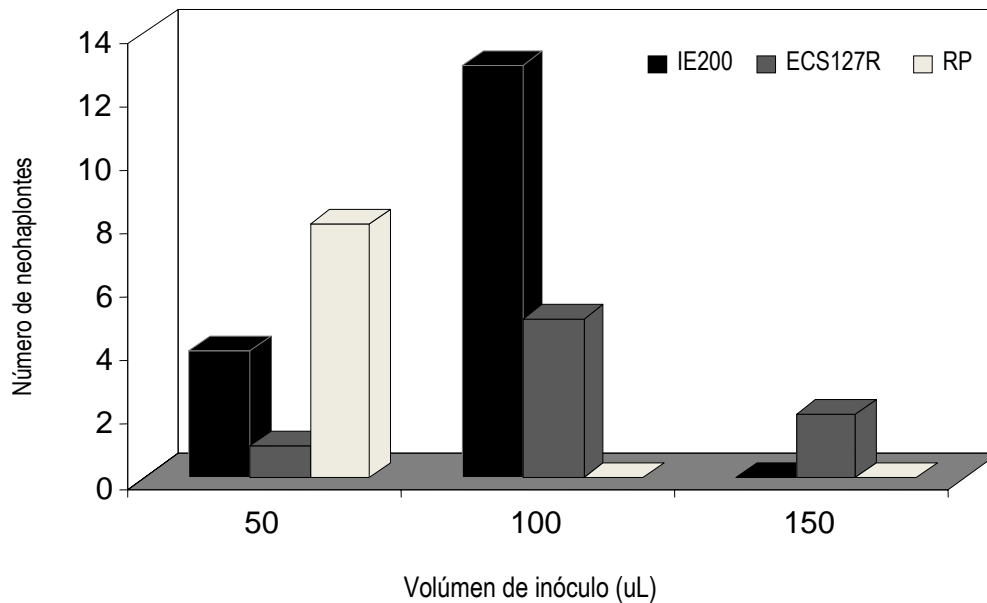


Figura 6.5. Efecto del volumen de inóculo sobre la recuperación de neohaplontes de *Pleurotus* spp.

A este respecto, Leal-Lara y Eger (1982) reportan que un incremento gradual de 20 a 150 μL de inóculo en soluciones de peptona de carne-glucosa, mejoró el crecimiento micelial de los monocariones mientras que en las soluciones de PPG y GG, al incrementar el volumen de inóculo (hasta 500 μL), la monocariotización se redujo drásticamente. Aunado a esto, estos autores también reportan que si se utiliza en lugar de 25 mL, solo 10 mL o menos de la solución monocariotizante, el efecto desdicariotizante resulta incompleto.

6.6.3. Influencia del tiempo de incubación

En la Figura 6.6, se observa que a las 24 horas de incubación en la solución monocariotizante, no se logran obtener colonias monocarióticas debido probablemente al poco tiempo de contacto entre el micelio y la solución desdicariotizante o bien, a que la formación de micelio

monocariótico fue muy lento; sin embargo, en el caso de las cepas IE200 y RP el aumento es gradual con respecto al tiempo de incubación mientras que para la cepa ECS127R, el mayor número de colonias monocarióticas aisladas fue a las 48 h de incubación. Leal-Lara y Eger (1982) explican que en periodos de incubación prolongados, los pellets en crecimiento pueden hacer contacto entre sí dentro de la solución monocariotizante y ello repercute en la aparición de sectores dicarióticos dentro del volumen del líquido y finalmente el micelio que crece en la superficie de la solución es dicariótico.

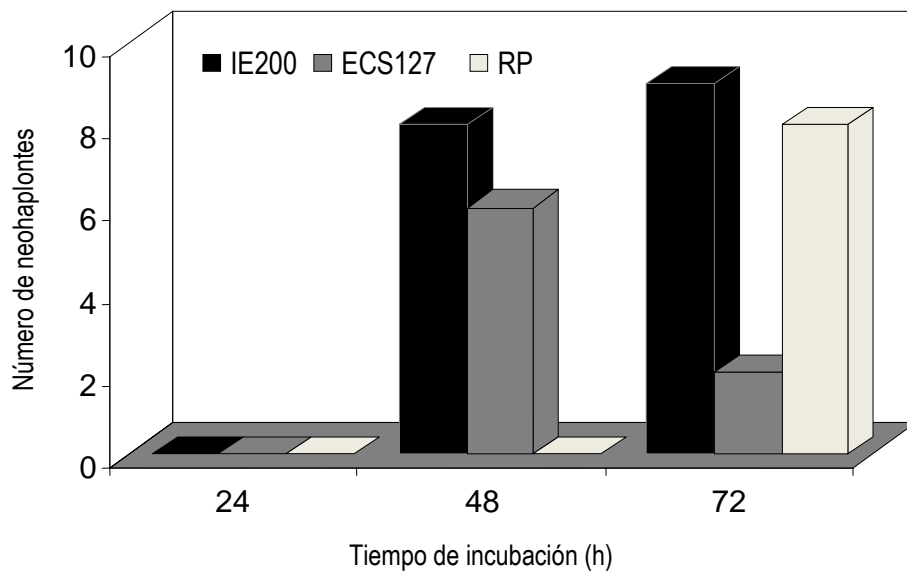


Figura 6.6. Efecto del tiempo de incubación en la solución desdicariotizante sobre la recuperación de neohaplontes.

Con los datos obtenidos, se observa que los tres parámetros evaluados (tiempo de homogenizado, volumen de inóculo y tiempo de incubación) pueden tener influencia sobre el número de neohaplontes recuperados en todas las cepas pero se requiere realizar experimentos con un número mayor de repeticiones; por otro lado, dicha influencia varía dependiendo de la sensibilidad que tenga cada una de las cepas al proceso de monocariotización. A este respecto,

Arteaga-Santillán y col. (1996), postularon que cada componente monocariótico de una cepa, puede presentar diferente susceptibilidad a los distintos fenómenos que se han propuesto para explicar la desdicariorización, ya sea el efecto de sustancias tóxicas o bien, la alteración del proceso de reproducción del material nuclear del protoplasma o de la pared celular dicariótica. Aunado a esto, en estudios realizados en cepas de *P. ostreatus*, Eichlerová y Homolka (1999) demostraron que las frecuencias de aparición o recuperación de los tipos de apareamiento son variables ya que de los 30 neohaplontes recuperados por estos autores, 17 correspondieron al tipo A_2B_2 (57%), 11 al tipo A_1B_1 (37%), 1 al tipo A_1B_2 (3%) y 1 al tipo de apareamiento A_2B_1 (3%), es decir, hay más probabilidad de recuperar los tipos de apareamiento parentales que los recombinantes. De esta forma, se puede observar que la recuperación simétrica o asimétrica de los componentes monocarióticos puede obedecer a diversas causas como son la frecuencia de aparición de los tipos de apareamiento, el número de colonias monocarióticas aisladas así como a la sensibilidad de las cepas y los núcleos hacia cada una de las etapas del proceso de desdicariorización química.

6.7. Morfología micelial de neohaplontes

Una vez recuperados los neohaplontes, se les determinó su fenotipo a nivel micelial. El Cuadro 6.5 muestra la frecuencia de aparición de ambos tipos de morfología en los neohaplontes; en el caso de la cepa ECS127R el 75% correspondió a la morfología algodonosa y exuberante y solo el 25% a la morfología filamentosa y regular, mientras que en la cepa IE200 la diferencia en la frecuencia de aparición fue menor, prevaleciendo la morfología algodonosa (59%) sobre la filamentosa (41%) y finalmente, el 100% de los monocariones de la cepa RP desplegaron la morfología algodonosa y exuberante.

Cuadro 6.5. Morfología micelial de neohaplontes obtenidos

Cepa	Núm. total de neohaplontes	Morfología micelial	
		Algodonoso/exuberante	Filamentoso/regular
ECS127R	8	6 (75 %)	2 (25 %)
IE200	17	10 (58.82 %)	7 (41.18 %)
RP	8	8 (100 %)	0

Con estos datos se observa que los neohaplontes obtenidos presentaron ambos fenotipos predominantes en las cepas dicarióticas y, en cuanto a la morfología que desplegaron sus respectivos progenitores, se observó que en las cepas IE200 y RP ambos presentaron predominancia en la morfología expresada en su progenitor (algodonosa exuberante) mientras que los monocariones de la cepa ECS127R presentaron menor predominancia (25%) de la morfología expresada por su cepa progenitora, siendo mayor el fenotipo algodonoso. En estudios realizados en cepas de *P. ostreatus*, Eichlerová y Homolka (1999) reportaron diferencias en la morfología de colonias monocarióticas con respecto a su parental dicariótico, los resultados de su trabajo no lograron esclarecer el motivo de dicho comportamiento, sin embargo, determinaron que la morfología micelial de los monocariones no estaba correlacionada con la actividad enzimática de la cepa o su tasa de crecimiento.

De manera general, se puede observar que entre las cepas dicarióticas utilizadas en el presente trabajo se despliegan ambos tipos de morfología, siendo la morfología algodonosa la predominante sobre el fenotipo filamentoso, incluyendo a los monocariones que a excepción de la cepa RP, presentaron ambos tipos morfológicos; esto sugiere que el genotipo que determina la morfología micelial es heterocigótico y en el cual están presentes los alelos que establecen estas diferencias fenotípicas, mismas que serán expresadas según las leyes de Mendel y que pueden ser

alteradas por diferentes procesos como lo es el silenciamiento de genes, estudiado por J. F. de Jong y col. (2006) en cepas de *S. commune*.

6.8 Comportamiento micelial de neohaplontes

A cada neohaplonte obtenido de las tres cepas desdicariorizadas se le determinó su Crecimiento micelial acumulado (Cma) o velocidad de crecimiento lineal como lo reportan otros autores como Clark y Anderson (2004), Larraya y col. (2001), Salmones y col. (1997) entre otros; el cual está representado como el incremento del diámetro de la colonia de cada uno de los monocariones con respecto a los días de incubación. Las Figuras 6.7, 6.8 y 6.9 representan los Cma de los neohaplontes de las cepas IE200, ECS127R y RP respectivamente.

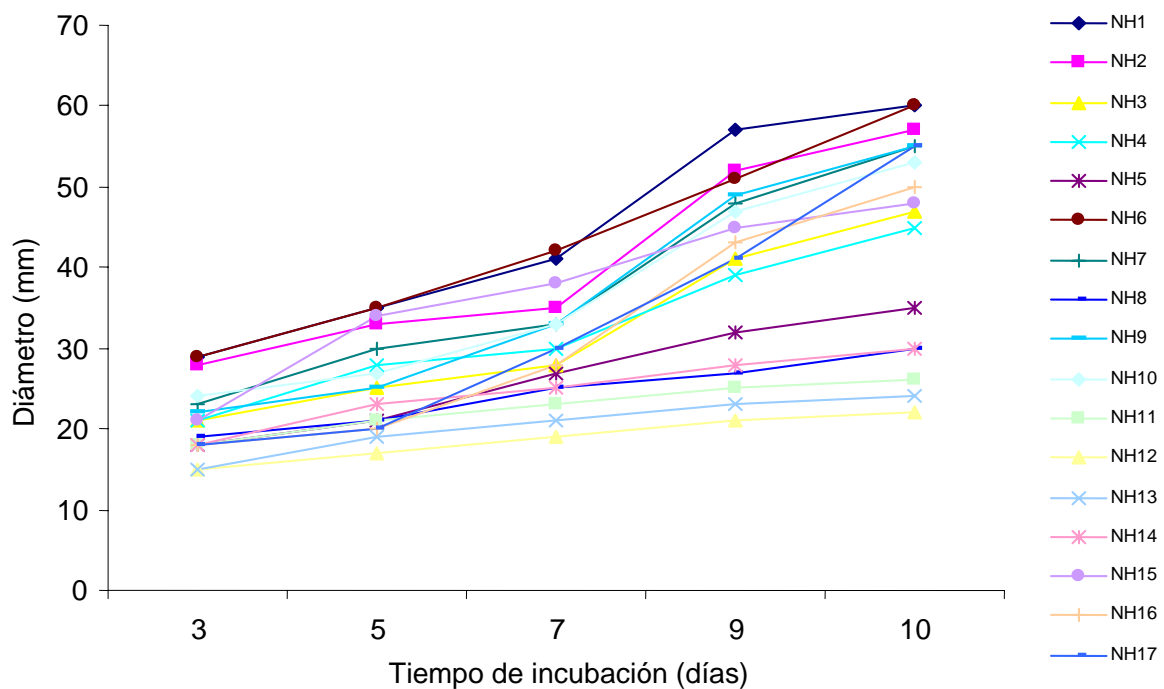


Figura 6.7. Crecimiento micelial acumulado (mm/día) de neohaplontes obtenidos de la cepa IE200 de *Pleurotus* sp. crecidos en medio EMA.

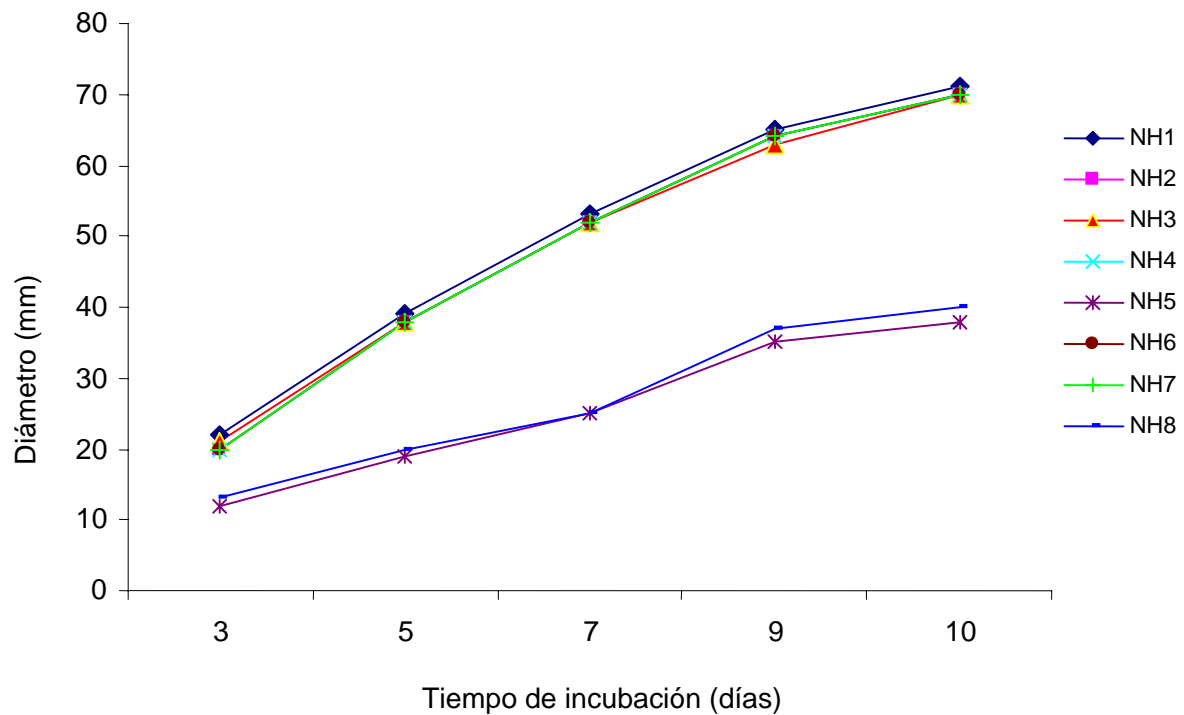


Figura 6.8. Crecimiento micelial acumulado (mm/día) de neohaplontes obtenidos de la cepa ECS127R de *Pleurotus* sp. crecidos en medio EMA

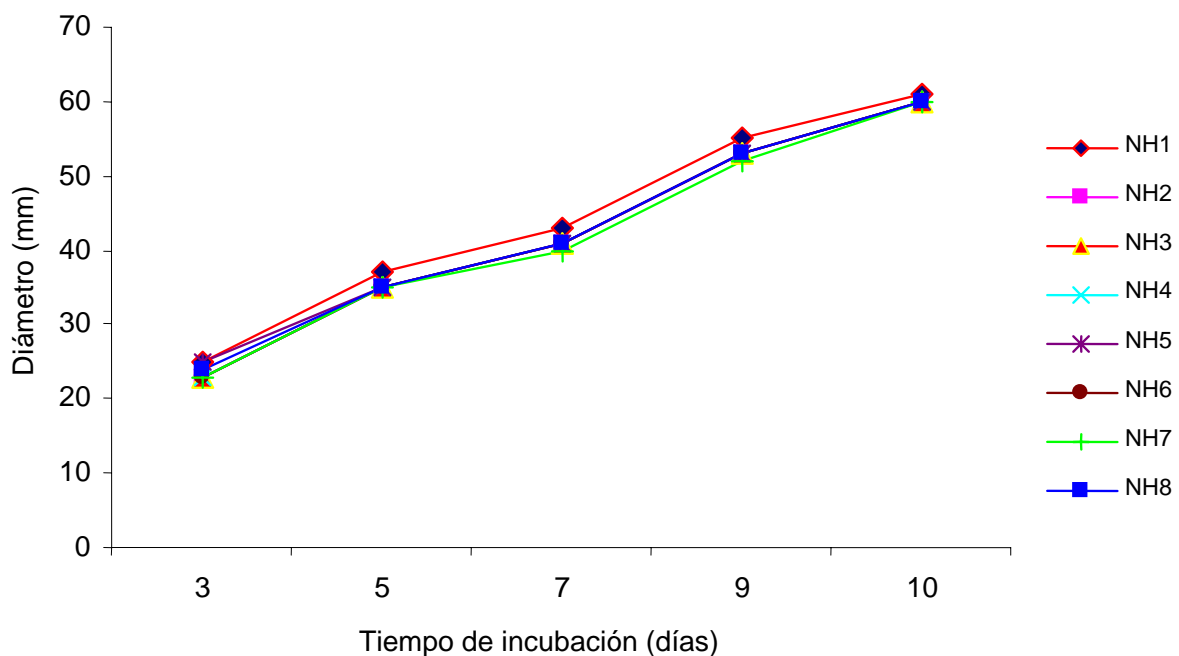


Figura 6.9. Crecimiento micelial acumulado (mm/día) de neohaplontes obtenidos de la cepa RP de *Pleurotus* sp. crecidos en medio EMA

Como se muestra en las Figuras 6.7 y 6.8 se distinguen dos perfiles de crecimiento en el que los neohaplontes cuya morfología fue algodonosa y exuberante alcanzaron, en el mismo intervalo de tiempo, diámetros más grandes que los neohaplontes con morfología filamentosa y regular cuyo diámetro a los 10 días no superó los 40 mm; en el caso de los neohaplontes obtenidos de la cepa RP, todos ellos presentaron la misma morfología (algodonosa), por lo cual, la velocidad media de crecimiento micelial se observó constante y homogénea (Figura 6.9). Sin embargo, para poder determinar con mayor precisión una posible relación entre el fenotipo micelial de la colonia y la velocidad de crecimiento de los neohaplontes, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas y los resultados se detallan a continuación.

Cuadro 6.6. Características de neohaplontes obtenidos de la cepa IE200

Neohaplonte	Morfología micelial		Clasificación para Cma*
	Tipo	Abundancia	
1	A	Ex	a
6	A	Ex	b
2	A	Ex	c
15	A	Ex	d
7	A	Ex	d
9	A	Ex	e
10	A	Ex	e
3	A	Ex	f
4	A	Ex	f
16	A	Ex	f
17	A	Ex	f
5	F	R	g
14	F	R	h
8	F	R	i
11	F	R	j
13	F	R	k
12	F	R	l

A = Algodonoso, F = Filamentoso, Ex = Exuberante, R = regular

* Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los Cma para cada neohaplonte. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$)

En el caso de la cepa IE200, el ANOVA reveló la existencia de diferencias estadísticas significativas y la prueba de Duncan, la formación de 12 grupos (Cuadro 6.6). En el grupo 'a' se localizó el neohaplonte 1, mismo que presentó morfología algodonosa y exuberante al igual que los neohaplontes de los grupos b (neohaplonte 6), c (neohaplonte 2), d (neohaplontes 7 y 15), e (neohaplontes 9 y 10) y f (neohaplontes 3, 4, 16 y 17), mientras que los monocariones con morfología filamentosa y regular se localizaron dentro de los grupos g (neohaplonte 5), h (neohaplonte 14), i (neohaplonte 8), j (neohaplonte 11), k (neohaplonte 13) y l (neohaplonte 12).

Cuadro 6.7 Características de neohaplontes obtenidos de la cepa ECS127R

Neohaplonte	Morfología micelial		Clasificación para Cma*
	Tipo	Abundancia	
1	A	Ex	a
2	A	Ex	b
3	A	Ex	b
4	A	Ex	b
6	A	Ex	b
7	A	Ex	b
8	F	R	c
5	F	R	d

A = Algodonoso, F = Filamentoso, Ex = Exuberante, R = regular

* Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los Cma para cada neohaplonte. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$)

En el caso de los neohaplontes de la cepa ECS127R, el ANOVA también reveló diferencias estadísticas significativas en sus Cma y la prueba post hoc de Duncan las clasificó dentro de 4 grupos (Cuadro 6.7). Dentro del primer grupo se localizó al neohaplonte 1, mismo que presentó morfología algodonosa y exuberante, mientras que los neohaplontes 2, 3, 4, 6 y 7 se localizaron dentro de un segundo grupo (grupo b) y presentaron la misma morfología que el neohaplonte del primer grupo; por otro lado, los neohaplontes 8 (grupo c) y 5 (grupo d) fueron los que presentaron la morfología filamentosa y regular y ambos fueron estadísticamente distintos entre

sí. Finalmente, el ANOVA aplicado en los diferentes neohaplontes obtenidos de la cepa RP, no reveló diferencia estadística significativa entre sus Cma y todos ellos presentaron morfología algodonosa y exuberante (Cuadro 6.8).

Cuadro 6.8 Características de neohaplontes obtenidos de la cepa RP

Neohaplonte	Morfología micelial		Clasificación para Cma *
	Tipo	Abundancia	
1	A	Ex	a
2	A	Ex	a
3	A	Ex	a
4	A	Ex	a
5	A	Ex	a
6	A	Ex	a
7	A	Ex	a
8	A	Ex	a

A = Algodonoso, F = Filamentoso, Ex = Exuberante, R = regular

* Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los Cma para cada neohaplonte. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$)

Con los datos obtenidos se observa que aunque el ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias estadísticas significativas entre los Cma de los neohaplontes de la cepa IE200, la prueba post hoc de Duncan clasificó a los neohaplontes con fenotipo algodonoso entre los grupos a-f (los de mayor crecimiento en la Figura 6.7) mientras que los neohaplontes con fenotipo filamentoso estuvieron localizados entre los grupos g-l siendo estos últimos los que presentaron menor velocidad de crecimiento. Lo mismo sucedió entre los neohaplontes de la cepa ECS127R, mientras que los monocariones de la cepa RP, acorde con lo representado en la Figura 6.9, no mostraron diferencia estadística significativa.

La relación entre el fenotipo micelial de las colonias monocarióticas y la velocidad de crecimiento o elongación micelial, ha sido reportada anteriormente en diferentes especies de

basidiomicetos, encontrando datos contradictorios en la literatura. Por un lado Eichlerová y Homolka (1999) reportaron diferencias en la morfología de monocariones derivados de basidiosporas de *Pleurotus ostreatus* con respecto a la tasa de crecimiento micelial; sin embargo, estos autores no encontraron relación aparente entre ambos parámetros ni con respecto al tipo de apareamiento. Por otro lado, Clark y Anderson (2004) concluyeron que el fenotipo de los monocariones aislados de *Schizophyllum commune* está relacionado con la velocidad lineal de crecimiento micelial y que dicha relación tiene una base genética, en donde la interacción de los genes o epistasis es la principal fuente de variación entre estos parámetros.

Por otro lado, Simchen (1966) observó que los monocariones de *S. commune* que poseían cierto tipo de apareamiento, crecían más rápidamente; por su parte, Larraya y col. (2001) reportaron diferencias en los tiempos de invasión micelial en monocariones aislados por cultivos monospóricos de *P. ostreatus*, atribuyendo dichas diferencias al tipo de alelo de incompatibilidad presente en cada monocarión; concluyeron que los monocariones con los alelos A2 ó *matBα1* (B1 y B3), crecieron más rápidamente que aquellos que poseían los alelos de apareamiento A1 o *matBα2* (B2 y B4) respectivamente, y ello se atribuyó a una posible selección preferencial al establecer el cultivo monospórico. También mencionan que las frecuencias de aparición de los cuatro tipos de apareamiento B, aunque son muy variables entre los individuos, se distribuyen de la siguiente forma: 52.5% (B1), 31.6% (B2), 9.2% (B3) y 6.7% (B4). Estos datos sugieren que existen más posibilidades de aislar monocariones con los tipos de apareamiento parentales, es decir, B1 (que crecen con mayor rapidez) y B2 (cuyo crecimiento es inferior) sobre los no parentales [similar a lo reportado por Eichlerová y Homolka (1999) para los tipos de apareamiento de *P. ostreatus*] y que la diferencia en las tasas de crecimiento de estos

monocariones puede ser ocasionada por ciertas regiones genómicas preservadas durante la evolución de estos organismos.

Complementando los datos obtenidos con esta información, podríamos sugerir que tanto el fenotipo micelial como el tipo de apareamiento y la velocidad de crecimiento micelial están íntimamente correlacionados entre sí, siendo un complejo sistema genético el responsable de determinar la expresión de todas estas características entre los monocariones y tomando como base las leyes de la herencia, serían estos mismos genes los que establecerían su interacción en el dicarion. De esta forma, considerando que la morfología algodonosa de los neohaplontes obtenidos presenta los mayores valores de C_{ma}, se podría inferir que la diferencia en las velocidades de invasión de los neohaplontes es ocasionada por alelos homólogos a los alelos B1 o A2 reportados para *P. ostreatus*; sin embargo, la relación existente entre las velocidades de crecimiento y la morfología entre los monocariones, se contraponen a lo observado en las cepas dicarióticas recuperadas inicialmente, debido a que ambas cepas que invadieron con mayor rapidez el medio de cultivo (RP y UAP9) presentaron la morfología algodonosa al igual que la cepa IB67 quien tuvo los mayores valores de T_m, es decir, fue la cepa más lenta en colonizar el medio de cultivo. Debido a ello, para corroborar dichos resultados es necesario realizar pruebas moleculares más completas mediante el uso de marcadores RAPD capaces de unirse a las regiones genómicas involucradas en el control de estos caracteres.

6.9. Obtención de cepas híbridas

Se logró recuperar un tipo parental de neohaplonte para cada cepa y se realizaron apareamientos interespecímen entre los monocariones obtenidos de las tres cepas desdicarionizadas; sin

embargo, solo los neohaplontes de las cepas IE200 y ECS127R mostraron ser compatibles entre si. Se realizaron cruzas entre los neohaplontes de morfología algodonosa (ECS127R_a) y filamentosa (ECS127R_f) de la cepa ECS127R con el neohaplonte (IE200₁) de morfología algodonosa de la cepa IE200, con las cuales se obtuvieron las cepas híbridas IE200₁xECS127R_a e IE200₁xECS127R_f respectivamente, con la finalidad de evaluar su comportamiento micelial al conformarse el micelio dicariótico híbrido.

6.10. Morfología micelial de cepas parentales, híbridos y neohaplontes

Una vez realizadas las cruzas interespecímen entre los neohaplontes de las cepas IE200 y ECS127R, se determinó la morfología a nivel de micelio de las cepas híbridas y como se puede observar en el Cuadro 6.9, el fenotipo micelial que desplegaron los híbridos es similar a la que se observó en la cepa parental ECS127R (filamentosa y regular) y su respectivo neohaplonte ECS127R_f; de la misma forma, los neohaplontes IE200₁ y ECS127R_a presentaron la misma morfología (de tipo algodonoso y abundancia exuberante).

Kües (2000) observó diferencias en la morfología micelial entre monocariones y dicariones de *Coprinus cinereus* (un hongo macroscópico perteneciente al mismo orden que *Pleurotus* pero de diferente familia) concluyendo que dichas diferencias se deben principalmente a variaciones en la cantidad y estructura de su micelio aerial producido; es decir, en el caso de los monocariones, las hifas son usualmente delgadas con un diámetro promedio de 3 µm y se separan entre ellas en un ángulo de 70-75°, mientras que las hifas de los dicariones miden en promedio 7 µm de diámetro con un ángulo relativo de 10-45°, debido a ello, su micelio aerial es más denso y protuberante y tienden a crecer con mayor rapidez que los monocariones.

Cuadro 6.9. Características morfológicas de los híbridos IE200xECS127R, parentales y neohaplontes de *Pleurotus* crecidos en medio EMA

Cepa	Morfología micelial	
	Tipo	Abundancia
IE200	A	Ex
ECS127R	F	R
IE200 ₁	A	Ex
ECS127R _a	A	Ex
ECS127R _f	F	R
IE200 ₁ xECS127R _a	F	R
IE200 ₁ XECS127R _f	F	R

A = Algodonoso, F = Filamentoso, EX = Exuberante, R = regular.

Por otro lado, Clark y Anderson (2004) también reportaron diferencias fenotípicas entre el micelio de cepas monocarióticas y dicarióticas de *S. commune* concluyendo que dichas variaciones dependen del estado ploidal del micelio y que los dicariones tiene mayor potencial para expresar cambios fenotípicos a través de la mutación que los monocariones además de que ambos estados difieren en sus niveles de expresión de la variabilidad genética, siendo la dominancia la principal fuente de variación entre los dicariones.

6.11. Determinación del Tiempo medio de invasión micelial (T_m) de cepas parentales, híbridas y neohaplontes

Al determinar el tiempo de invasión micelial (T_m) entre las cepas parentales, sus respectivos neohaplontes y las cepas híbridas obtenidas, el ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas entre ellas (Cuadro 6.9). La prueba Duncan reveló la formación de 5 grupos en ambos parámetros, en donde el primer grupo estuvo formado por la cepa parental

ECS127R quien presentó el menor Tm (8.3 días) seguida de las cepas híbridas (localizadas en el grupo b) con Tm de 9 a 9.7 días en promedio. El tercer grupo se formó por la cepa parental IE200 quien presentó valores de Tm de 11 días, los neohaplontes IE200₁ y ECS127R_a se encontraron agrupados juntos dentro de un cuarto grupo, presentando ambos la misma morfología (algodonosa) y presentaron valores de Tm de 13.7 y 14.7 respectivamente y finalmente, el neohaplonte ECS127R_f que presentó morfología filamentosa, se localizó en el grupo 'e' y presentó valores de Tm de 29 días en promedio, siendo la colonia más lenta en colonizar el medio de cultivo.

Cuadro 6.10. Tiempos de invasión y Crecimiento micelial acumulado de las cepas parentales, híbridas y neohaplontes de *Pleurotus* crecidos en medio EMA

Cepa	Tm* (días)	Clasificación para Cma**
ECS127R	8.3 ± 0.33 ^a	a
IE200 ₁ xECS127R _a	9.7 ± 0.33 ^b	b
IE200 ₁ XECS127R _f	9.0 ± 0 ^b	b
IE200	11.0 ± 0 ^c	c
ECS127R _a	14.7 ± 0.33 ^d	c
IE200 ₁	13.7 ± 0.33 ^d	d
ECS127R _f	29.0 ± 1 ^e	e

* Promedio de tres repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

** Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

Larraya y col. (2002) reportan Tm de poblaciones mono y dicarióticas de *P. ostreatus* en medio sólido, los valores obtenidos para las cepas dicarióticas fluctuaron entre 8.35 y 12.38 días mientras que el monocarión utilizado para obtener dichos dicariones utilizó en promedio, 15.10 días para invadir totalmente el medio; por su parte, Salmones y col. (1997), reportan tiempos de

invasión en medio EMA para las cepas pertenecientes a *P. djamor* (entre 10-16 días), donde el crecimiento de estas cepas fue más rápido que el observado en *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* en ese mismo estudio; con las cepas utilizadas en el presente trabajo, se observó que todas las cepas dicarióticas mostraron T_m que se encuentran dentro del intervalo de tiempo (8.3-11 días) reportado por estos autores.

6.12. Determinación del Crecimiento micelial acumulado (Cma) de cepas parentales, híbridas y neohaplontes

La Figura 6.10 muestra el crecimiento micelial acumulado (Cma) de las cepas progenitoras, sus respectivos monocariones y los híbridos obtenidos por el apareamiento interespecímen de los mismos; en dicha Figura se puede apreciar el incremento del diámetro de las colonias de cada una de las cepas utilizadas con respecto al tiempo de incubación. Como se puede observar, hasta el segundo día de incubación la diferencia entre los Cma de las cepas no era muy notoria, sin embargo, a partir del tercer día de incubación cada una de las cepas mostró tendencias de crecimiento diferentes, encontrando que la cepa parental ECS127R creció con mayor rapidez que las demás mientras que el ECS127R_f mostró ser el de menor crecimiento durante los 10 días de incubación. Por otro lado, hasta el quinto día de incubación las cepas híbridas crecieron prácticamente juntas, siendo en el sexto día de incubación cuando el híbrido IE200₁xECS127R_f incrementó ligeramente su crecimiento; del mismo modo, el crecimiento de los neohaplontes IE200₁ y ECS127R_a fueron superiores a la cepa parental IE200 hasta el segundo y cuarto día respectivamente, posteriormente, su velocidad de crecimiento disminuyó para que finalmente, la cepa parental presentara un crecimiento mayor.

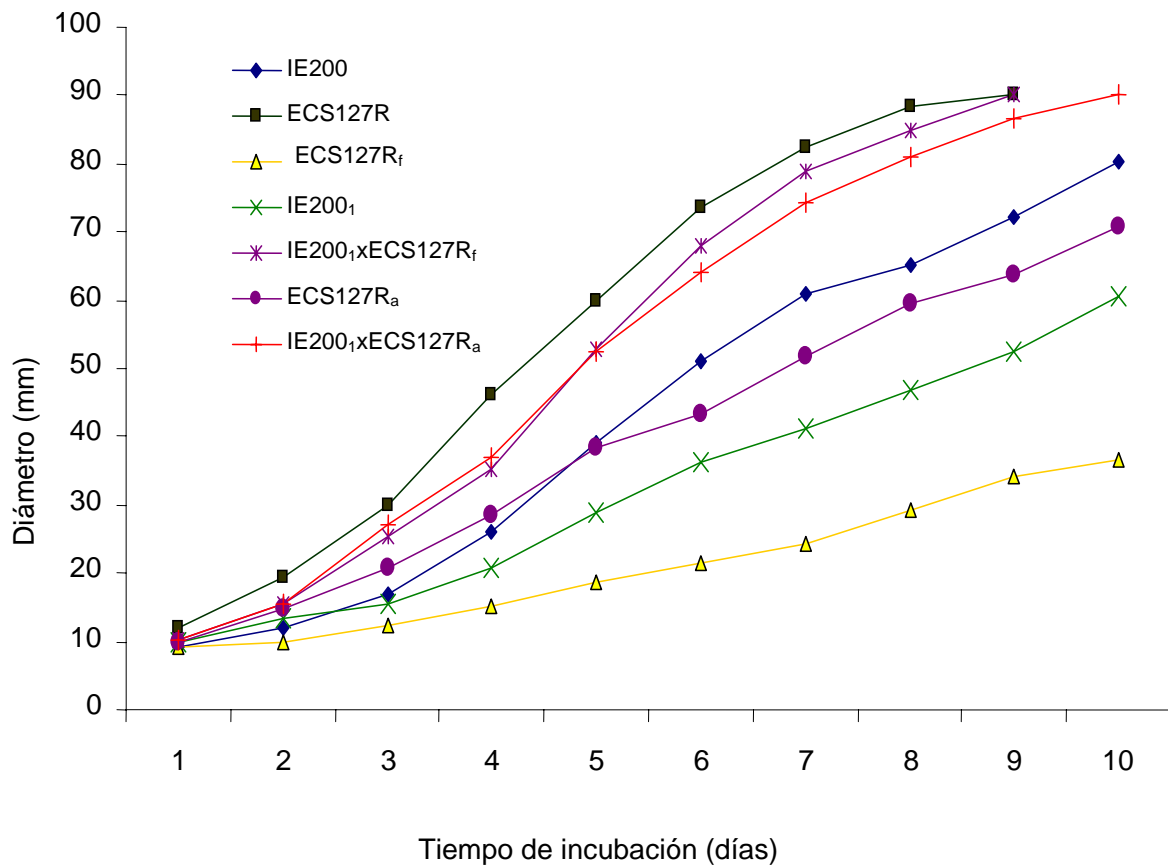


Figura 6.10. Crecimiento micelial acumulado de los híbridos IE200xECS127R de *Pleurotus* spp. y sus respectivos parentales y neohaplontes crecidos en medio sólido (EMA)

A este respecto, Clark y Anderson (2004) reportaron un comportamiento similar en estudios realizados con *S. commune* en donde observaron que las velocidades de crecimiento en las colonias haploides fueron inicialmente mayores que en los dicariones; sin embargo, dicha velocidad se aletargó en el transcurso de los 18 meses que duró su experimento siendo finalmente los dicariones quienes crecieron con mayor rapidez. Aunado a esto, Eichlerová y Homolka (1999) concluyeron que de manera general, los monocariones de *P. ostreatus* crecieron más lento que sus respectivos parentales dicarióticos y que en lo referente a la morfología, las colonias de *P.*

ostreatus que presentaban morfología abundante, crecían con mayor rapidez que las demás; sin embargo, estos autores no encontraron relación aparente entre las velocidades de crecimiento y la morfología.

Para contrastar estadísticamente las velocidades lineales de crecimiento micelial mostradas en la Figura 6.10, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas el cual, al igual que en el caso de los Tm, mostró diferencias estadísticas significativas entre el Cma de las cepas bajo estudio y la prueba Duncan las ubicó en 5 grupos distintos (Cuadro 6.9). La cepa parental ECS127R se encontró dentro del primer grupo y fue la que invadió con mayor velocidad el medio; por otro lado, pese a las diferencias observadas en la Figura 6.10, los híbridos obtenidos se localizaron en el grupo 'b', mientras que (a diferencia de Tm) la cepa parental IE200 y el neohaplonte ECS127R_a se ubicaron dentro de un mismo grupo (grupo c) seguidos del neohaplonte IE200₁ (grupo d) y finalmente, el neohaplonte ECS127R_f fue el que invadió con mayor lentitud el medio y por ello presentó el mayor valor de Tm (29 días).

Salmones y col. en 1997, reportan diferencias en las velocidades de crecimiento de los dicariones obtenidos por las cruzas de monocariones de *P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, concluyendo que los monospóricos de *P. djamor* crecían con mayor velocidad y que, por su parte, en el crecimiento de las cruzas obtenidas entre los monocariones de esta especie, había evidencia de cierta variabilidad en sus Cma encontrando que un híbrido obtenido crecía con mayor lentitud que sus parentales y que por otro lado, los demás híbridos presentaban un crecimiento superior (8 a 10 días) que sus respectivas cepas progenitoras (10 a 12 días). Por otro lado, Ramírez y col. (2000) también reportaron diferencias en las velocidades de crecimiento de dicariones obtenidos en programas de hibridación de cepas de *P. ostreatus*, atribuyendo dichas

variaciones a la interacción entre los núcleos provenientes de cada monocarión que conforman a la célula dicariótica y a ciertas regiones genómicas constituidas por un sistema poligénico que están asociadas con las altas velocidades de crecimiento dicariótico. Larraya y col. (2002), por su parte, reportan variabilidad en las velocidades de crecimiento de monocariones de *P. ostreatus* (Tm de ~15 días) con respecto a los híbridos obtenidos por sus cruzas, quienes crecieron con mayor rapidez (Tm de 8.85 a 12.38 días); dicha variación continua, la atribuyen a un sistema poligénico y la sustentan en el hecho de que las diferencias en las velocidades de crecimiento monocariótico en hongos filamentosos, están asociadas con algunas regiones cromosomales y que finalmente, estas variaciones en *Pleurotus* repercuten en la variabilidad de la susceptibilidad de las cepas a contaminarse por organismos del género *Trichoderma*. Aunado a esto, Clark y Anderson (2004) también reportaron variaciones en las velocidades lineales de crecimiento micelial entre monocariones y dicariones de *S. commune* concluyendo que el incremento en dicho parámetro es una respuesta al proceso de selección natural y que está determinada por el estado ploidal del micelio, indicando finalmente que este comportamiento tiene una base genética.

Con toda esta información, es evidente que los cambios en las velocidades de crecimiento o Cma entre las cepas obedecen a cuestiones de índole genética, y como se detalló en el apartado 6.8 de este mismo trabajo, un sistema poligénico presente en los monocariones, es el principal candidato que determina la velocidad de crecimiento en los monocariones, mientras que en los parentales dicarióticos la combinación alélica determinará su expresión. Por su parte, los híbridos obtenidos presentan mayor predisposición a la heterozigosidad alélica lo cual puede ser la causa del incremento en las velocidades de crecimiento de dichas cruzas como lo reportan Clark y Anderson (2004).

6.13. Etapas de producción de cuerpos fructíferos

Para la segunda etapa de la estrategia experimental planteada en este trabajo, se contempló la fructificación de las cepas parentales e híbridos obtenidos monitoreando cada una de las etapas del cultivo (Figura 6.11). Siguiendo el protocolo descrito en la metodología, se utilizaron bolsas de trigo húmedo y estéril para inocular las 2 cepas parentales así como ambas cepas híbridas obtenidas.

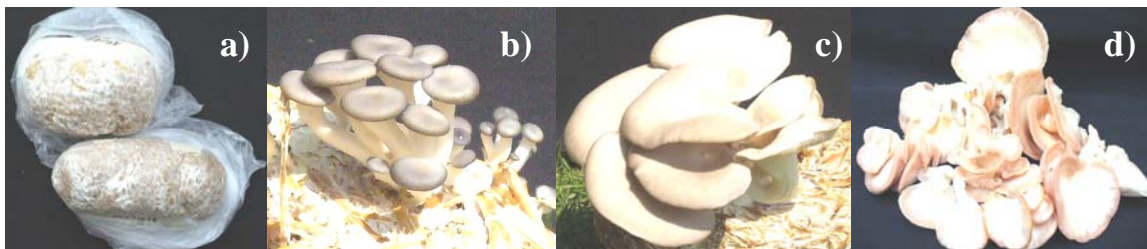


Figura 6.11. Etapas para la fructificación de diferentes cepas de *Pleurotus*.
a) Propagación del micelio b) primordios c) cuerpos fructíferos maduros d) cosecha

El Cuadro 6.11 muestra los tiempos requeridos en las etapas de producción; la prueba de ANOVA de una vía reveló diferencias estadísticas significativas entre las muestras y la prueba post hoc de Duncan clasificó dichas diferencias en dos grupos para los parámetros de tiempos de invasión (T_i), formación de primordios (T_{fp}), 1ª y 2ª cosecha (C1 y C2 respectivamente) de cuerpos fructíferos y en 3 grupos para el parámetro de precocidad (P). La cepa parental ECS127R al igual que ambas cepas híbridas, se localizaron dentro del primer grupo en los parámetros de T_i , T_{fp} , C1 y C2, indicando que invaden el sustrato con mayor rapidez (13.5 a 13.8 días) y por ello, presentan menores tiempos para la formación de primordios (14.8-15.6 días) y para rendir ambas cosechas de cuerpos fructíferos (de 20.5 a 22.1 y de 28.5 a 30 días respectivamente) que la cepa

IE200 quien tardó en promedio 2 días más que las demás cepas en invadir el sustrato y por ello, se localizó dentro del segundo grupo; sin embargo, la precocidad de ambas cepas híbridas (grupo a) con respecto a las cepas progenitoras ECS127R (grupo b) e IE200 (grupo c) fue estadísticamente diferente, observando que los híbridos obtenidos fueron más precoces con respecto a sus parentales, es decir, presentaron los menores valores numéricos de precocidad, mientras que la cepa IE200 fue la menos precoz debido a que presentó los mayores valores numéricos en dicho parámetro.

Cuadro 6.11. Etapas de producción de diferentes cepas de *Pleurotus* cultivadas en paja estéril

CEPA	Invasión Ti	Primordios Tfp	Cosecha 1 C1 (días)	Cosecha 2 C2	Precocidad P
IE200	15.67 ± 0.67 ^b	18 ± 0.58 ^b	25 ± 1 ^b	33 ± 1.5 ^b	9.3 ± 0.33 ^c
ECS127R	13.88 ± 0.3 ^a	14.88 ± 0.3 ^a	22.13 ± 0.64 ^a	30 ± 0.73 ^a	8.25 ± 0.37 ^b
IE200 _i xECS127R _a	13.63 ± 0.42 ^a	15.63 ± 0.42 ^a	20.75 ± 0.41 ^a	29.25 ± 0.7 ^a	7.13 ± 0.13 ^a
IE200 _i xECS127R _f	13.5 ± 0.33 ^a	15.5 ± 0.33 ^a	20.50 ± 0.33 ^a	28.5 0.38 ^a	7 ^a

* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

A este respecto, Larraya y col. (2003) reportan valores de precocidad de 7.19 para cepas de *P. ostreatus* cultivadas a 21°C y de 11.27 para las mismas cepas cultivadas a 15°C; en el presente trabajo se utilizaron cepas pertenecientes al complejo *P. djamor* cultivadas a 15° y se obtuvieron cepas híbridas más precoces que las reportadas para *P. ostreatus* bajo condiciones similares. Por otro lado, García y col. (2006) reportaron mayores tiempos de invasión del sustrato (18 días) en cepas de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* cultivadas en pulpa de café; mientras que Salmones y col. en 1997 reportaron menores tiempos de invasión del sustrato (10-13 días) en cepas de *P. djamor* cultivadas a nivel piloto, comparadas con *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* quienes requirieron entre

15-35 días y 21-75 días respectivamente; estos datos de invasión de sustrato son similares a los obtenidos en el presente trabajo para cepas del complejo *djamor*, esta característica es importante debido a que las cepas que invaden con mayor rapidez el sustrato son menos propensas a sufrir contaminación.

Con respecto a los tiempos de recolección de ambas cosechas, la prueba a posteriori de Duncan reveló la formación de dos grupos con diferencias estadísticas significativas, en donde las cepas híbridas y su parental ECS127R se encontraron dentro de un mismo grupo y la cepa IE200 fue la que tardó más tiempo en producir la segunda cosecha de cuerpos fructíferos. Contrastando estos datos con lo reportado en la literatura, se observa que los tiempos requeridos por todas las cepas utilizadas en este trabajo para producir la primera cosecha de cuerpos fructíferos (C1) fueron similares (20-25 días) a los reportados por Arias (1998) en algunas cepas de *P. djamor* (con valores que varían entre los 21 hasta los 50 días) y fueron superiores a los reportados por Salmenes y col. (1997) para cepas del mismo complejo (14-19 días); mientras que el tiempo requerido para la segunda cosecha de cuerpos fructíferos fue menor en el presente trabajo que los reportados por Valencia-del Toro y col. (2003) quienes obtienen tiempos de C2 de 33-36 días en promedio; aunado a esto, en el presente trabajo se observaron valores intercosecha de 8 días en promedio, mismos que son menores a los reportados por Valencia-del Toro y col. (2003) y que fluctúan entre 9 (*Pleurotus* spp.), 11 (*P. ostreatus*), 12 (*P. columbinus*) y hasta 16 días (*P. djamor*).

En cuanto a los tiempos de formación de primordios, se observó que en el presente trabajo fueron similares (14-18 días) a los reportados por Valencia-del Toro y col. (2003) para diferentes cepas coloridas de *Pleurotus* spp. (12-18 días), mayores con respecto a los reportados por Lara-Herrera

y col. (1998) y Salmones y col. (2005) en cepas de *P. djamor* mismos que fluctuaron entre 20 y 11-14 días respectivamente y menores en relación con los que reportaron García y col. (2006) en cepas de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* los cuales se localizaron en un intervalo de 18-25 días después de la inoculación del sustrato; sin embargo, todas estas diferencias se pueden atribuir al tipo y vigorosidad de las cepas así como a las condiciones de cultivo.

6.14. Parámetros de productividad de cepas parentales e híbridas

En lo que respecta a los parámetros cuantitativos de productividad como son la eficiencia biológica (EB), rendimiento de cuerpos fructíferos (R) y tasa de productividad (TP), se observó que en la primera cosecha se obtuvieron los mayores niveles de producción (Cuadro 6.12), encontrando una disminución en dichos parámetros de aproximadamente el 50% en la segunda cosecha en todas las cepas fructificadas. Estos datos concuerdan con los reportes de Lara-Herrera y col. (1998) para cepas de los complejos *Pleurotus djamor* y *P. ostreatus* y de Pérez y Mata (2005), quienes obtuvieron la mayor producción de cuerpos fructíferos en la primera cosecha, la cual llegó a representar más del 50% del total de hongos producidos; de la misma forma, García y col. (2006) observaron que las cepas de *P. ostreatus* que rindieron un máximo de dos cosechas, presentaron en el primer corte de cuerpos fructíferos hasta el 75% de su producción total, mientras que las cepas que produjeron cuatro cosechas alcanzaron hasta el 88% de su producción total en el segundo corte de carpóforos. De manera general, se podría inferir que los altos valores de productividad mostrados en las primeras cosechas son debidos, en gran parte, a una mayor concentración de nutrientes presentes en el sustrato durante el desarrollo de los primeros carpóforos y dichos nutrientes disminuyen progresivamente conforme aumenta el número de cuerpos fructíferos.

Cuadro 6.12. Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (1ª cosecha)

CEPA	Phf g	EB %	R %	TP %
IE200	53.20 ± 0.84 ^a	37.97 ± 0.6 ^a	5.32 ± 0.08 ^a	1.15 ± 0.04 ^a
ECS127R	73.15 ± 1.77 ^a	45.07 ± 1.3 ^a	6.32 ± 0.18 ^a	1.51 ± 0.05 ^b
IE200 _i xECS127R _a	78.01 ± 3.29 ^b	56.21 ± 2.37 ^b	7.8 ± 0.33 ^b	1.93 ± 0.1 ^c
IE200 _i xECS127R _f	85 ± 4.45 ^b	61.24 ± 3.2 ^b	8.5 ± 0.45 ^b	2.15 ± 0.1 ^c

Phf Peso de hongos frescos, *EB* Eficiencia biológica, *R* Rendimiento, *TP* Tasa de productividad
 * Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

De acuerdo con el análisis estadístico aplicado (ANOVA de una vía), se observa que en la primera cosecha las cepas progenitoras mostraron diferencias significativas en todos los parámetros de producción con respecto a sus híbridos; el post hoc de Duncan reveló que ambas cepas parentales se localizaron dentro de un mismo grupo (grupo a) distinto al de los híbridos (grupo b) en el Phf, EB y R de la primera cosecha, siendo los híbridos quienes presentaron los mejores niveles en cada uno de estos parámetros; sin embargo, en la TP se evidenciaron 3 grupos diferentes en donde los híbridos permanecieron dentro de un mismo grupo (grupo c) y las cepas parentales IE200 y ECS127R fueron separadas en dos conjuntos distintos (a y b respectivamente). La separación de las cepas parentales en grupos diferentes en el parámetro TP puede ser explicado con la consideración de que la TP es la relación existente entre la EB y el ciclo de cultivo, lo cual indica que aquellas cepas que presenten valores similares de EB también presentarán valores similares de TP siempre y cuando el tiempo de fructificación sea muy similar entre ellas tal y como lo reporta Arias (1998); de esta forma, se puede observar que la cepa IE200 presentó valores de EB sin diferencia estadística significativa con la cepa ECS127R pero esta cepa rindió su primera cosecha de cuerpos fructíferos en menor tiempo (22 días en promedio) que la cepa IE200 (25 días).

Cuadro 6.13. Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (2ª cosecha)

CEPA	Phf g	EB %	R %	TP %
IE200	26.93 ± 0.89 ^b	19.2 ± 0.6 ^a	2.69 ± 0.09 ^b	0.59 ± 0.04 ^a
ECS127R	20.31 ± 2.3 ^a	14.5 ± 1.6 ^a	2.03 ± 0.23 ^a	0.49 ± 0.06 ^a
IE200 ₁ xECS127R _a	34.58 ± 1.42 ^b	24.91 ± 1 ^b	3.46 ± 0.14 ^b	0.85 ± 0.02 ^b
IE200 ₁ xECS127R _f	27.55 ± 2.8 ^b	19.85 ± 2 ^a	2.76 ± 0.28 ^b	0.7 ± 0.07 ^b

Phf Peso de hongos frescos, *EB* Eficiencia biológica, *R* Rendimiento, *TP* Tasa de productividad
 * Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

En la segunda cosecha (Cuadro 6.13), el comportamiento no presentó la misma homogeneidad ya que el ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas en todos los parámetros de productividad y la prueba a posteriori de Duncan clasificó dichas diferencias en dos grupos, en donde el primero estuvo conformado por la cepa ECS127R quien presentó los menores valores de Phf (20.31 g) y rendimiento (2.03%) comparada con los híbridos y la cepa IE200 quienes se localizaron en el segundo grupo y alcanzaron valores de hasta 34.58 g de hongos frescos; sin embargo, solo la cepa híbrida IE200₁xECS127R_a mostró ser estadísticamente distinta a las demás cepas en el caso de la EB y fue localizada en el grupo b ya que presentó el mayor valor de dicho parámetro (24.9%) comparada con las demás cepas, cuyos valores de EB fluctuaban hasta de 19.85%. Por otro lado, la cepa ECS127R mostró un rendimiento estadísticamente diferente (grupo a) e inferior a las demás cepas (grupo b), quienes alcanzaron valores de R de 2.69 y 2.76% para las cepas IE200 e IE200₁xECS127R_f y de hasta 3.46% para el caso de la cepa híbrida IE200₁xECS127R_a; finalmente, el post hoc de Duncan situó a ambas cepas híbridas dentro del grupo b y fueron quienes presentaron los mayores valores de TP (de hasta 0.85% para el caso de la cepa IE200₁xECS127R_a) comparadas con las cepas parentales,

mismas que fueron localizadas en el grupo a y cuyos valores en dicho parámetro fueron inferiores al 0.6%.

Cabe mencionar que en cuanto a los Phf obtenidos en cada brote, se encontró que en la primera cosecha se captó un promedio de 72.6% del rendimiento total de la producción de cuerpos fructíferos, siendo las cepas híbridas quienes en conjunto, rindieron un promedio de 56% del Phf en la primera cosecha y el 40% de carpóforos frescos de la producción total en ciclos de cultivo de 28.5-33 días. Salmones y col. (1997) reportan un comportamiento similar de los Phf obtenidos en diferentes cosechas, en ellos se puede apreciar una disminución de los pesos promedio de los basidiocarpos de cepas de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor* desde la 1ª a la 4ª cosecha, encontrando una disminución de los Phf desde 247.4 hasta 70.9 g de hongos frescos de la 1ª a la 2ª cosecha para el caso *P. ostreatus*; de 2430.7 a 903.5 g para *P. pulmonarius* y de 238.2 a 63.6 para *P. djamor*; sin embargo, en el caso de este último complejo, una cepa parental y su respectiva cruce mostraron un comportamiento zigzagueante (con altas y bajas a lo largo de las cosechas obtenidas) sin explicar el motivo de dicha observación.

Cuadro 6.14. Parámetros de productividad de las cepas utilizadas (total)

CEPA	Precocidad (días)	Phf g	EB %	R %	TP %
IE200	9.3 ± 0.33 ^c	80.13 ± 0.58 ^a	57.7 ± 0.42 ^a	8.01 ± 0.06 ^a	1.76 ± 0.07 ^a
ECS127R	8.25 ± 0.37 ^b	86.46 ± 3.6 ^a	60.13 ± 2.6 ^a	8.35 ± 0.36 ^a	2.01 ± 0.1 ^a
IE200 ₁ xECS127R _a	7.13 ± 0.13 ^a	112.59 ± 2.5 ^b	81.11 ± 1.8 ^b	11.26 ± 0.25 ^b	2.74 ± 0.07 ^b
IE200 ₁ xECS127R _f	7 ^a	112.55 ± 2.4 ^b	81.09 ± 0.7 ^b	11.26 ± 0.24 ^b	2.85 ± 0.05 ^b

Phf Peso de hongos frescos, *EB* Eficiencia biológica, *R* Rendimiento, *TP* Tasa de productividad
* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

En lo que respecta a los parámetros de productividad totales, la prueba de Duncan muestra la formación de dos grupos con diferencias estadísticas significativas (Cuadro 6.14), separando en cada uno a las cepas parentales (grupo a) de las híbridas (grupo b) y en donde éstas últimas resultaron ser las cepas más productivas ya que alcanzaron valores de Phf de hasta 112 g (comparados con los 80-86 g de las parentales), EB de 81% (superior a los 57.7-60% de las cepas parentales), R de 11% (mayores a 8% de las parentales) y TP de hasta 2.8% en promedio.

Las EB medidas en este trabajo son mayores a las reportadas por Salmones y col. (1997) y Salmones y col. (2005) cuyos valores fluctuaban entre 18.4-72.4% y 30.5-40.4% respectivamente para cepas del complejo *P. djamor*; también a las que reportan Moda y col. (2005) para cepas de *P. sajor-caju* o *P. pulmonarius* (hasta de 30%) cultivadas en bagazo de caña suplementado y similares a los reportados por Arias (1998) en cepas de *P. djamor* (67.9-82.3%) y *P. ostreatus* (22.9-87.3%), Valencia-del Toro (2002) en cepas híbridas de *Pleurotus* spp. (40.9-93.5%), Royse y col. (2004) en *P. cornucopiae* (87.3%) cultivado en paja de trigo con adición de otros materiales y Lara-Herrera y col. (1998) para cepas de *P. djamor* var. *djamor* (68.9-79.7%). De la misma manera, las TP totales en el presente trabajo (1.76 a 2.85) son similares a las reportadas por Valencia-del Toro y col. (2003) en diferentes cepas coloridas de *Pleurotus* spp. (1.7-3.7) y superaron a las reportadas por Arias (1998) en cepas silvestres de *P. djamor* (0.45 a 0.59%) y Salmones y col. en 1997 (0.34-1.68) quienes también observaron que estos parámetros no presentan mucha variabilidad entre las cepas de *P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*.

Por otro lado, Larraya y col. (2003) mencionan que las cepas más precoces (menor valor numérico de precocidad) generalmente presentan mayores rendimientos de cuerpos fructíferos y dicha observación se hizo evidente en el presente trabajo ya que los análisis estadísticos

mostraron diferencias significativas en las precocidades de los híbridos con respecto a sus parentales y a su vez, las cepas mas precoces (IE200₁xECS127R_a y IE200₁xECS127R_f) produjeron el mayor rendimiento de carpóforos y los mejores niveles de productividad en ambas cosechas; sin embargo, el análisis estadístico de correlación de variables de Pearson permitirá relacionar dichas características con mayor certeza.

6.15. Características morfológicas de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas

Una vez cosechados los cuerpos fructíferos maduros de todas las cepas fructificadas, se determinaron las características fenotípicas de un grupo representativo de carpóforos cada cosecha y los resultados de dichas determinaciones se detallan a continuación.

6.15.1. Color y forma de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas

Para la determinación de la morfología de las cepas fructificadas, se tomaron muestras representativas de cada una de las cosechas, los colores y formas observadas se encuentran en el Cuadro 6.15 en la cual, se puede apreciar que para las cepas IE200 e híbridos, los primordios y cuerpos fructíferos conservaron la misma coloración (blanca), mientras que la cepa ECS127R mostró una ligera variación en la tonalidad de la coloración de los primordios con respecto a los carpóforos maduros cuyo color permaneció estable, este comportamiento puede ser atribuido a la poca estabilidad o fotosensibilidad de algunos pigmentos durante el desarrollo del basidiocarpo, tal como lo reportado por Jiménez-Hernández (2000) en otras cepas coloridas de *Pleurotus* spp.

Cuadro 6.15. Morfología de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus*.

CEPA	Color ^a			Forma ^b		Textura ^c	
	Primordio	Carpóforo	Esporada	Lámina	Píleo	Estípite	Píleo
IE200	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanca (N ₀₀ C ₀₀ A ₁₀)	Subdecurrente	Pétalo de flor	Correoso	Delgado y suave
ECS127R	Rosa (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)	Rosa claro (N ₀₀ A ₃₀ M ₄₀)	Durazno (N ₁₀ A ₃₀ M ₃₀)	Decurrente	Embudado	Correoso	Delgado y suave
IE200 ₁ xECS127R _a	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanca (N ₀₀ C ₀₀ A ₁₀)	Subdecurrente	Pétalo de flor	Correoso	Delgado y suave
IE200 ₁ xECS127R _f	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanco (N ₀₀ C ₀₀ A ₀₀)	Blanca (N ₀₀ C ₀₀ A ₁₀)	Subdecurrente	Pétalo de flor	Correoso	Delgado y suave

a Küppers, 1996; b Herrera y Ulloa, 1998; c Jiménez-Hernández, 2000.

Por otro lado, se encontraron dos formas distintas de los píleos de ambas cepas y una ligera variación en la forma de las láminas de cada una de ellas; la textura del estípite (correoso) y píleo (delgado y suave) permaneció constante y todas las cepas presentaron carpóforos carnosos con estípites laterales. En lo que respecta a la coloración de las esporas, se observó que tanto la cepa IE200 como ambas cepas híbridas presentaron el mismo color de esporada (blanca) mientras que la cepa ECS127R, presentó esporada color durazno. Además del color de la impronta de la esporada (Figura 6.12a), también se determinó la morfología microscópica de las esporas de las cepas parentales (Figura 6.12b) e híbridos obtenidos (Figura 6.12c), con la finalidad de aportar mayores elementos en la caracterización de estas especies; se observó que ambas morfologías fueron similares entre sí, es decir, del tipo elipsoidal como reportan Guzmán (1990), Herrera y Ulloa (1998) y para especies del género *Pleurotus*.

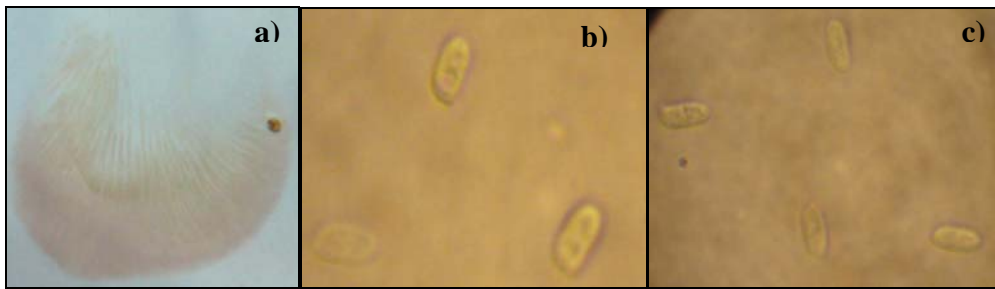


Figura 6.12. Morfología de esporas de cepas de *Pleurotus* utilizadas.
a) Impronta de esporada b) ECS127R c) IE200₁xECS127R_a

Corner (1981) concluyó que no hay diferencias esenciales entre las especies *P. ostreatusroseus* y *P. djamor*, excepto por el color de sus píleos y esporadas; las cepas pertenecientes a *P. ostreatusroseus* o *salmonostramineus* presentan carpóforos y basidiosporas rosas, mientras que en la segunda especie, las cepas tienen carpóforos y basidiosporas blancas como en el caso de la cepa IE200, misma que está ya descrita como *djamor*. Debido a estas características fenotípicas y que, al formar cepas híbridas con los neohaplontes aislados de ellas, ambas cepas fueron compatibles entre sí, se infiere que la cepa ECS127R forma parte del complejo *Pleurotus djamor* y de la especie *salmonostramineus*; sin embargo, debido a que estas características son inconclusas para determinar la ubicación taxonómica de las especies, es necesaria la implementación de técnicas moleculares que avalen dichas observaciones.



Figura 6.13. Morfología de cuerpos fructíferos de cepas de *Pleurotus* utilizadas.
a) IE200 (blanca) b) ECS127R (rosa) c) IE200₁xECS127R_a (blanca)

En cuanto al color de los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas con respecto a las parentales, se observó que ambos híbridos presentaron color de carpóforos blanco (Figura 6.13c), similar a la cepa parental IE200 (Figura 6.13a). Lo anterior puede ser debido a alguna de las siguientes causas:

- Por un lado, al conformar el micelio dicariótico (heterocigótico) con la información genética de ambos progenitores, se podría plantear la posibilidad de que existiera dominancia (Ley de la uniformidad de Mendel) del alelo que determina la coloración blanca (proveniente de la cepa IE200) sobre el alelo que determina la coloración rosa (proveniente de la cepa ECS127R) al expresarse en los híbridos formados (blancos). Esto se sustenta en estudios de la expresión de color en cepas de *Pleurotus* spp. realizados por Valencia-del Toro (2002), en los cuales se observa que las cruzas obtenidas entre la cepa IB67 (gris) con las cepas IE200 (blanca), PORO y RP (rosas) del complejo *P. djamor*, presentaron color de carpóforos grises; este comportamiento fue atribuido a una posible dominancia del gen o conjunto de genes que determinan esta característica o bien, al no presentarse dicho color en las demás cepas, se podría haber suscitado un fenómeno de desactivación de genes por diversos mecanismos tales como la intervención de factores extracromosomales o el silenciamiento de genes. Sin embargo, las características fenotípicas no observadas en la primera generación de híbridos, podrían ser expresados en su descendencia tal como lo estipula la segunda ley de Mendel (Ley de la disyunción de los alelos), siempre y cuando permanezcan en cromosomas separados y no hayan sufrido mutación.

- Por otro lado, se encuentra la posibilidad de la presencia de un gen denominado *alb*, mismo que fue reportado por Murakami y Takemaru (1990) en cepas rosas de *P. salmoneostramineus* en donde se obtuvo una mutante blanca mediante las cruces de los monospóricos de cepas con carpóforos rosas. Estos autores analizaron a nivel genético la progenie de basidiosporas de los híbridos producidos y mostraron que los basidiocarpos blancos y rosas se segregaban en una razón de 1:1 y al aparear nuevamente las cepas albinas entre sí, observaron que los dicariones formados presentaban cuerpos fructíferos blancos, por lo que concluyeron que la formación de carpóforos albinos es un carácter heredable y que además puede afectar la pigmentación de las esporas, ya que las cepas albinas presentaron también basidiosporas blancas; finalmente, reportan que el gen *alb* es un gen de tipo recesivo y que aparentemente, no se encuentra ligado a los factores de compatibilidad de estas especies, además de que tiene la facultad de mutar con facilidad y encontrarse ampliamente distribuido en la tierra.

Cualquiera que sea la causa a la que obedezca la coloración de los híbridos, es necesario implementar técnicas de biología molecular con las cuales se corrobore alguna de las hipótesis planteadas y con ello, contribuir con mayor certeza en el estudio y la caracterización de estas especies.

6.15.2. Tamaño de basidiomas de cepas parentales e híbridas

En lo que respecta al tamaño de los carpóforos, se observó que el píleo de todas las cepas fructificadas fue más grande que su respectivo estípite. Sin embargo, el ANOVA de una vía reveló la presencia de diferencias estadísticas significativas en el tamaño del estípite y los

diámetros mayores y menores (Dmay y Dmen respectivamente) de los cuerpos fructíferos de la primera cosecha, por lo que la prueba a posteriori de Duncan las agrupó en dos diferentes conjuntos (Cuadro 6.16).

Cuadro 6.16. Tamaño de carpóforos de las cepas utilizadas (1ª cosecha)

CEPA	Estípite (cm)	Píleo (cm)	
		Dmay	Dmen
IE200	0.96 ± 0.16 ^b	5.95 ± 0.23 ^a	4.98 ± 0.33 ^a
ECS127R	0.74 ± 0.08 ^a	7.59 ± 0.4 ^b	5.36 ± 0.42 ^b
IE200 ₁ xECS127R _a	0.81 ± 0.12 ^a	8.84 ± 0.93 ^b	7.44 ± 0.9 ^b
IE200 ₁ xECS127R _f	1.45 ± 0.17 ^b	8.64 ± 0.23 ^b	5.49 ± 0.13 ^b

* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

Para el caso del tamaño del estípite, se observó que la cepa parental ECS127R al igual que la cepa híbrida IE200₁xECS127R_a se encontraron dentro del primer grupo (grupo a) y fueron las que presentaron los estípites más pequeños comparados con las cepas IE200 e IE200₁xECS127R_f quienes se encontraron en el grupo b y presentaron mayores tamaños de estípites (hasta 1.45 cm). En el caso del tamaño de píleo, el post hoc de Duncan agrupó a ambas cepas híbridas al igual que la cepa ECS127R dentro de un mismo conjunto (grupo b) y fueron las cepas que presentaron los mayores diámetros de píleo, es decir, fueron las cepas que rindieron los carpóforos más grandes con valores desde 7.59 hasta 8.84 cm de Dmay. Por otro lado, el Cuadro 6.17 muestra los tamaños promedio de los cuerpos fructíferos obtenidos en la segunda cosecha, en donde el ANOVA de una vía reveló que no existe diferencia estadística significativa en los tamaños de los carpóforos de todas las cepas fructificadas en estas características evaluadas.

Cuadro 6.17. Tamaño de carpóforos de las cepas utilizadas (2ª cosecha)

CEPA	Estípite (cm)	Píleo (cm)	
		D _{may}	D _{men}
IE200	0.69 ± 0.09 ^a	4.88 ± 0.12 ^a	4.51 ± 0.14 ^a
ECS127R	0.78 ± 0.1 ^a	5.15 ± 0.29 ^a	4.41 ± 0.27 ^a
IE200 _i xECS127R _a	1.06 ± 0.21 ^a	6.64 ± 1.2 ^a	5.74 ± 1.2 ^a
IE200 _i xECS127R _f	0.96 ± 0.1 ^a	5.13 ± 0.23 ^a	4.6 ± 0.2 ^a

* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

Comparando estos datos con los reportados por Magae y col. (1985) y Valencia-del Toro y col. (2003), se observa que las cepas fructificadas en el presente trabajo presentaron estípites más pequeños (hasta de 1.45 cm) que las cepas de *P. ostreatus* y cepas coloridas de diferentes especies de *Pleurotus* spp. utilizadas por dichos autores respectivamente, mismos que alcanzaron hasta 5 cm de longitud. Aunque hay evidencia de diferencias estadísticas significativas en el tamaño del estípite entre las cepas en la primera cosecha, en promedio, ninguno de ellos midió más de 2 cm en ambos brotes lo cual realza uno de sus atributos comerciales deseados ya que a nivel comercial, se prefieren cuerpos fructíferos sésiles o con estípite pequeño y píleos grandes (Paredes, 1996). Por otro lado, los tamaños de los carpóforos desarrollados en la primera cosecha en el presente trabajo, son similares a los que reportan Valencia-del Toro y col. (2003) quienes obtienen diámetros de píleos de hasta 9 cm para *P. djamor*, 8 cm para *P. ostreatus* y 12 cm para *P. columbinus* cultivados sobre paja de trigo estéril sin especificar el número de cosecha.

Tomando como base el D_{may} del píleo, los basidiocarpos de las cepas fructificadas fueron clasificados dentro de 3 grupos en ambas cosechas: G1 (menores de 5 cm), G2 (entre 5 y 9.9 cm) y G3 (entre 10 y 14.9 cm). Como se puede observar en la Figura 6.14, los carpóforos

pertenecientes al grupo G2 fueron los predominantes durante la primera cosecha en todas las cepas donde solo la cepa IE200 presentó carpóforos del grupo G1; por otro lado, se observó una disminución en los Dmay de los cuerpos fructíferos de todas las cepas en la segunda cosecha, por lo que el grupo G1 predominó sobre el G2 en dicho brote (Figura 6.15). Al fructificar cepas de *Pleurotus djamor*, Lara-Herrera y col. (1998) reportaron la presencia de cuerpos fructíferos de los grupos G1, G2 y G3 sin evidencia de carpóforos del grupo G4 (más de 15 cm) observando de manera general, que más del 65% de la producción total de basidiomas perteneció al grupo G1.

Por otro lado, la cepa híbrida IE200₁xECS127R_a fue la única que presentó fructificaciones del grupo G3 en ambas cosechas, lo cual constituyó un incremento en el Dmay de las fructificaciones de esta cepa con respecto a sus parentales. El incremento de tamaño de los cuerpos fructíferos de cruza con respecto a sus parentales, también ha sido reportado por Hernández-Ibarra y col. (1995) en cepas de *P. djamor* y *P. ostreatus* y dichos incrementos han sido superados por Salmenes y col. (1997) quienes obtuvieron mayores rendimientos de cuerpos fructíferos de los grupos G2 y G3 y obtuvieron carpóforos del grupo G4 en cepas híbridas de ambos complejos de especies con respecto a sus respectivas cepas parentales. Del mismo modo, Pérez y Mata (2005) obtuvieron incrementos en las fructificaciones del grupo G3 en las cepas híbridas de *Pleurotus ostreatus* con respecto a las cepas parentales, mientras que encontraron variaciones en los tamaños de los cuerpos fructíferos de los grupos G1 y G2 entre cepas parentales e híbridas. Por otro lado, la disminución en el tamaño de los cuerpos fructíferos de la primera a la segunda cosecha, también ha sido reportada por Vogel y Salmenes (2000) para cepas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* quienes observan disminuciones entre 0.5 a 1.5 cm en los diámetros de los píleos desarrollados entre dichas cosechas.

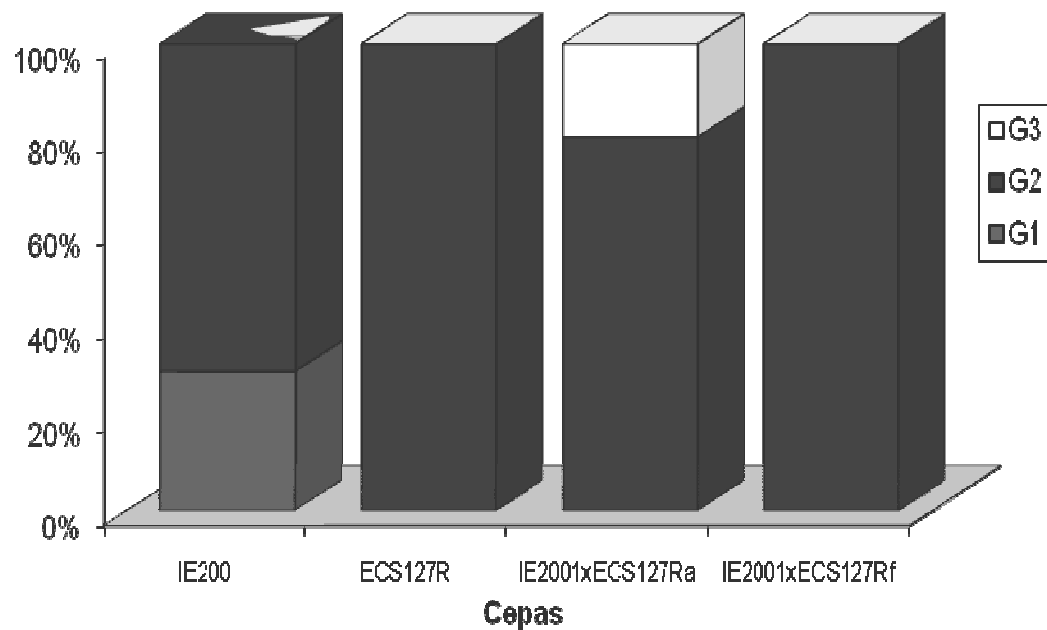


Figura 6.14. Porcentaje medio de fructificaciones de las cepas parentales e híbridos (Cosecha 1) agrupadas por tamaño de púelos desarrollados (n = 10).

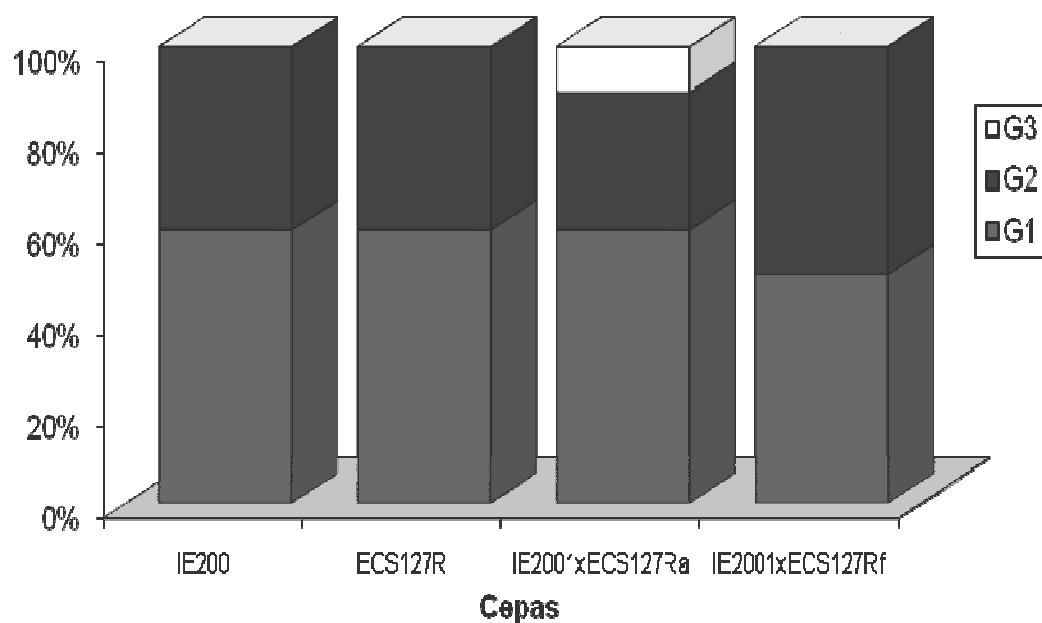


Figura 6.15. Porcentaje medio de fructificaciones de las cepas parentales e híbridos (Cosecha 2) agrupadas por tamaño de púelos desarrollados (n = 10).

6.15.3. Peso de cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas

El peso fue otra característica evaluada en el presente trabajo y en el cual, se observó variabilidad entre las cepas y el número de cosecha. El Cuadro 6.19 muestra los pesos unitarios promedio (Pu) de las fructificaciones de las diferentes cepas utilizadas así como los pesos medios de cuerpos fructíferos (Pm) colectados durante la primera cosecha, el ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas entre la cepa IE200 y las demás cepas, y el post hoc de Duncan clasificó a esta cepa dentro del grupo 'a' ya que fue quien presentó el menor peso unitario de sus carpóforos, mientras que las cepas híbridas al igual que la cepa ECS127R alcanzaron pesos unitarios promedio de hasta 8.59 g. De la misma forma, se observó que el Pm registrado para la cepa parental IE200 fue inferior con respecto al Pm que presentaron las cepas ECS127R, IE200₁xECS127R_a e IE200₁xECS127R_f con valores de 7.07, 8.77 y 8.25 respectivamente.

Cuadro 6.18. Peso de carpóforos de las cepas utilizadas (1ª cosecha)

CEPA	Peso (g)*	
	Unitario (Pu)	Pm
IE200	5.09 ± 0.2 ^a	5.11
ECS127R	7.43 ± 0.39 ^b	7.07
IE200 ₁ xECS127R _a	8.59 ± 0.78 ^b	8.77
IE200 ₁ xECS127R _f	8.29 ± 0.42 ^b	8.25

* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

En cuanto al peso desarrollado por los cuerpos fructíferos de la segunda cosecha, el ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas entre los pesos de cuerpos fructíferos desarrollados por las cepas parentales con respecto a ambas cepas híbridas, mismas que el post

hoc de Duncan separó en los grupos a y b respectivamente. Como se puede observar en el Cuadro 6.19, la cepa IE200₁xECS127R_a presentó mayor Pu y Pm de cuerpos fructíferos mientras que en esta cosecha, la cepa ECS127R produjo los carpóforos con menor Pm, observando también una disminución en ambos parámetros de aproximadamente el 45% en promedio en todas las cepas fructificadas en la segunda cosecha con respecto a la primera.

Cuadro 6.19. Peso de carpóforos de las cepas utilizadas (2^a cosecha)

CEPA	Peso (g)*	
	Unitario (Pu)	Pm
IE200	3.75 ± 0.24 ^a	3.77
ECS127R	3.7 ± 0.2 ^a	3.55
IE200 ₁ xECS127R _a	5.73 ± 0.99 ^b	5.34
IE200 ₁ xECS127R _f	4.25 ± 0.29 ^b	4.29

* Promedio de 10 repeticiones ± ESM. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre las muestras para cada variable. ANOVA de una vía, post hoc Duncan ($\alpha=0.05$).

Los pesos obtenidos son menores a los que reportan Valencia-del Toro y col. (2003) quienes obtienen pesos unitarios de 13 g para *P. djamor*, 12 para *P. ostreatus*, 8 g para *P. columbinus* y de 5-13 g para otras cepas coloridas de *Pleurotus* spp., mientras que los Pu promedio obtenidos en el presente trabajo se encuentran en el intervalo que reporta Arias (1998) quien obtiene pesos unitarios de cuerpos fructíferos de 5.5-10.8 g para cepas silvestres de *P. djamor*, 4-44 g para *P. ostreatus* y de 7.2 g para *P. sajor caju*, sin especificar el número de cosechas, al igual que los Pu que reporta Jiménez-Hernández (2000) mismos que fluctúan entre 5-13 g para diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Sin embargo, el tamaño y peso de los carpóforos está determinado por varios

factores como son el tipo y tratamiento del sustrato (Royse y col., 2004; Jiménez-Hernández, 2000; Valencia-del Toro y col., 2003), tipo y origen de la cepa así como de su vigorosidad.

6.16. Análisis comparativo entre cepas parentales e híbridas obtenidas

Una vez determinados los parámetros de productividad y las características morfológicas de las cepas fructificadas, se realizó un análisis comparativo de algunas características de interés comercial (EB, R, TP, Dmay y Pu así como del Tm y P) entre las cepas progenitoras (IE200 y ECS127R) y las híbridas obtenidas (IE200₁xECS127R_a e IE200₁xECS127R_f) con la finalidad de determinar si los híbridos obtenidos presentaron mejores características que sus respectivos parentales.

El cuadro 6.20 muestra los resultados del análisis estadístico aplicado, el cual reveló que no existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas parentales e híbridas en el Tiempo medio de invasión micelial (Tm) y tamaños de estípite, lo cual se puede observar desde que las medias en ambos grupos de cepas son similares en ambos parámetros, es decir, de 9.6 para las parentales y 9.3 días para las híbridas en el caso de Tm y de 0.85 y 1.13 cm respectivamente para el caso del estípite. Sin embargo, en el caso de la precocidad (P) si existió diferencia estadística significativa entre ambos grupos de cepas ya que las cepas híbridas presentaron un valor numérico de precocidad en promedio de 1.48 días menor que sus respectivas cepas parentales por lo cual, se pone en evidencia que las cepas híbridas fueron estadísticamente más precoces que sus respectivas cepas progenitoras.

Cuadro 6.20. Análisis comparativo de características de producción entre cepas parentales e híbridos obtenidos de *Pleurotus*.

Parámetro*	Valores **		Prueba t***
	Parentales	Híbridos	
Tm (días)	9.666 ± 0.615	9.333 ± 0.211	0.513 (0.619)
Precocidad (días)	8.545 ± 0.312	7.0625 ± 0.062	5.543 (<0.001)
EB (%)	59.477 ± 1.863	81.101 ± 1.195	10.254 (<0.001)
TP (%)	1.194 ± 0.083	2.794 ± 0.042	9.929 (<0.001)
R (%)	8.255 ± 0.258	11.256 ± 0.165	10.254 (<0.001)
Estípite (cm)	0.85 ± 0.089	1.131 ± 0.128	1.798 (0.082)
Dmay (cm)	6.768 ± 0.305	8.737 ± 0.463	3.545 (0.001)
Pu (g)	6.256 ± 0.369	8.437 ± 0.428	3.856 (0.001)

* Tm Tiempo medio de invasión micelial; EB Eficiencia biológica (g carpóforos frescos/100 g sustrato seco); TP Tasa de producción (EB/ciclo); R Rendimiento (g carpóforos frescos/100 g sustrato húmedo); Dmay Diámetro mayor de pileo; Pm peso medio de cuerpos fructíferos.

** Media ± ESM. *** Para igualdad de medias. T-student (significancia). Números en negritas indican la presencia de diferencias estadísticas significativas entre los grupos de muestras ($\alpha = 0.05$)

En el caso de la EB total, la diferencia promedio fue de hasta 21.6% más en las cepas híbridas con respecto a las parentales y la prueba t-student reveló una fuerte diferencia significativa entre ambos conjuntos de cepas; un comportamiento similar se observó en los parámetros de R y TP en donde las diferencias disminuyeron en 3 y 0.85 puntos respectivamente y el análisis estadístico mostró que si existen fuertes diferencias estadísticas significativas entre cepas parentales e híbridas. En cuanto a los Dmay y Pu registrados por los carpóforos en la primera cosecha, se evidenció la presencia de diferencias estadísticas significativas, observando que las cepas híbridas alcanzaron mayores pesos unitarios (Pu de hasta 2.18 g mayores) y diámetros superiores (Dmay de hasta 1.97 cm más) que las cepas parentales.

Como se puede observar, los híbridos obtenidos fueron estadísticamente más precoces y rindieron cuerpos fructíferos más grandes y de mayor peso, así como mejores parámetros de productividad totales que sus cepas progenitoras. Estos datos concuerdan con los reportes de Arias (1998), en donde los híbridos de *Pleurotus ostreatus* incrementan hasta 25% sus valores de EB con respecto a las cepas parentales; por otro lado, Pérez y Mata (2005) obtuvieron cepas híbridas de *Pleurotus ostreatus* con valores de EB y TP intermedios entre ambas cepas parentales cuando fueron cultivadas en paja de cebada y dichos híbridos presentaron EB y TP superiores a sus parentales al ser cultivados sobre viruta de pino; sin embargo, sobre este último sustrato, ambos parámetros disminuyeron hasta un 50% en promedio con respecto a los obtenidos en paja de cebada. En conjunto, estos datos contrastan con los reportados por Valencia-del Toro (2002) en diferentes cepas de *Pleurotus* spp. en donde se puede observar que de manera general, los híbridos obtenidos presentaron menores EB y tiempos de fructificación más largos que sus respectivos parentales.

6.17. Análisis de correlación de resultados

Con la finalidad de determinar con mayor precisión la relación existente entre los resultados de las variables cuantitativas determinadas en el presente estudio, se realizó un análisis de correlación utilizando el método Pearson con los resultados cuantitativos de productividad y morfología obtenidos en ambas cosechas, así como de la productividad total, el tiempo de invasión del sustrato (T_i), la precocidad (P) y el tiempo de invasión micelial (T_m). Los coeficientes de correlación obtenidos así como la significancia de dicha correlación se muestran en los Cuadros 6.21 y 6.22.

6.17.1. Correlación entre variables cuantitativas de productividad

El análisis de correlación aplicado a los parámetros de productividad evaluados (Cuadro 6.21), mostró relaciones interesantes entre algunas características de producción y crecimiento micelial, tal es el caso del tiempo medio de invasión micelial (T_m) en donde, dicho parámetro se vio positivamente correlacionado con el tiempo de invasión del sustrato (T_i) y la precocidad (P); esto muestra que las cepas que tardaron más tiempo en invadir el medio de cultivo (mayor valor numérico de T_m), también resultaron ser más lentas en invadir el sustrato y fueron cepas menos precoces (mayor valor numérico de precocidad). En estudios realizados con híbridos del género *Pleurotus*, Salmones y col. (1997) concluyen que la velocidad de crecimiento micelial, no está relacionada con la productividad de las cepas; del mismo modo, Pérez y Mata (2005) concluyen que el área micelial de los dicariones no se relaciona con la productividad de los mismos, ya que las cepas de *Pleurotus ostreatus* que fueron evaluadas por estos autores y que presentaron un rápido crecimiento micelial no siempre fueron las más productivas; en contraste, los análisis de correlación realizados por Larraya y col. (2002), muestran que el tiempo de invasión micelial está relacionado significativamente con el genotipo y concluyeron que esta característica cuantitativa, aunque exhibe mucha variación, está correlacionada con el rendimiento de la producción y el incremento de la ventaja del micelio contra sus competidores. En el presente trabajo, los coeficientes de correlación obtenidos entre el tiempo medio de invasión micelial (T_m) y los parámetros de productividad (EB, TP y R) fueron bajos (<0.5), es decir, no hubo evidencia estadística significativa de correlación entre el T_m y la productividad de las cepas, y solo la TP de la primera cosecha mostró una relación negativa significativa (<0.01) con el T_m , esto indica que a mayor tiempo de colonización de la cepa en el medio de cultivo, la tasa de producción en la

primera cosecha disminuyó y ello es debido a que el cálculo de este parámetro (TP) involucra el ciclo de cultivo y el T_i , mismo con el que tuvo correlación de -0.582 y un valor de significancia de 0.001. Además, el T_i también mostró relación con la P y los parámetros de productividad de la primera cosecha, indicando que las cepas más precoces invadieron el sustrato en menos tiempo y fueron más productivas al primer corte. Aunado a esto, se observó que la precocidad mostró una relación negativa y altamente significativa con los parámetros de productividad de la primera cosecha así como de los totales; esto indica que las cepas más precoces (menores valores numéricos de precocidad) presentaron el mayor rendimiento y productividad, estos datos coinciden con lo reportado por Larraya y col. (2003) quienes reportan coeficientes de correlación altos (hasta de -0.8) entre los valores de precocidad y rendimiento a dos diferentes temperaturas de fructificación (15 y 21 °C) en cepas de *Pleurotus ostreatus* y atribuyen dicha relación a un componente genético que delimita ambos parámetros, mismos que están relacionados entre sí. También se observó, al igual que lo reportado por estos mismos autores, que los coeficientes de correlación entre la precocidad y la productividad de la primera cosecha (hasta de 0.68) fueron menores que los obtenidos entre la precocidad y los parámetros de productividad totales (hasta de 0.75) y estos datos son atribuidos a que los genotipos más precoces también resultan ser más productivos en el primer corte.

En lo que respecta a la productividad en las dos diferentes cosechas, se observó una relación altamente significativa (hasta del 100%) entre la EB, TP y R de la primera cosecha con sus respectivos parámetros de productividad totales, mientras que en el caso de la segunda cosecha, la influencia que dichos parámetros tuvieron en la productividad total fue menor como lo muestra la disminución de los coeficientes de correlación (de hasta 0.9 en la primera cosecha hasta 0.6 en la segunda). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Larraya y col. (2003), quienes

concluyen que el rendimiento de la primera cosecha es un buen predictor del rendimiento total del cultivo.

6.17.2. Correlación entre variables cuantitativas de morfología

El Cuadro 6.22 muestra los coeficientes de correlación obtenidos entre las variables cuantitativas de morfología (Dmay, E, Pu) de ambas cosechas, así como entre la P, Ti y Tm. Como se puede observar, el tiempo de invasión micelial (Tm) mostró una relación negativa y estadísticamente significativa con los diámetros de los carpóforos (Dmay) de ambas cosechas así como con el peso unitario (Pu) de los cuerpos fructíferos de la primera cosecha, estos datos muestran que las cepas que colonizaron el medio de cultivo en mayor tiempo, presentaron carpóforos más pequeños en ambas cosechas y menor peso en el primer brote. Por su parte, el Ti y la P mostraron también estar correlacionados con los Dmay y Pu de los basidiocarpos de la primera cosecha, sin embargo, los coeficientes de correlación entre estas variables fueron más bajos (hasta de -0.5 para Ti y -0.6 para P) con respecto a los observados con el Tm, mismos que alcanzaron valores de hasta -0.83. Con estos datos se observó que de manera general, las cepas más precoces produjeron cuerpos fructíferos con píleos más grandes y ello se contrapone a lo reportado por Larraya y col. (2003), quienes encontraron una mayor producción de carpóforos pequeños en individuos con mayor precocidad.

Finalmente, los coeficientes de correlación bajos observados en los tamaños de estípite en ambos brotes de cuerpos fructíferos, muestran que no existió relación estadísticamente significativa entre esta característica y los demás parámetros evaluados, sugiriendo que el tamaño del estípite de los carpóforos está influenciado más por las condiciones de cultivo.

Cuadro 6.21. Coeficientes de correlación entre variables cuantitativas de productividad de cepas de *Pleurotus*.*

	Ti	P	EB1	TP1	R1	EB2	TP2	R2	EBt	TPt	Rt
Tm	0.654(0.02)	0.650(0.02)	-0.385(0.2)	-0.504(0.09)	-0.390(0.21)	0.180(0.58)	-0.038(0.91)	0.184(0.57)	-0.273(0.39)	-0.457(0.14)	-0.273(0.39)
Ti		0.600(0.001)	-0.391(0.044)	-0.582(0.001)	-0.390(0.044)	0.036(0.86)	-0.163(0.418)	0.042(0.834)	-0.310(0.116)	-0.524(0.005)	-0.310(0.116)
P			-0.588(0.001)	-0.69(<0.001)	-0.582(0.001)	-0.308(0.12)	-0.436(0.023)	-0.299(0.13)	-0.64(<0.001)	-0.75(<0.001)	-0.64(<0.001)
EB1				0.965(<0.001)	1.000(<0.001)	0.088(0.662)	0.173(0.387)	0.079(0.696)	0.883(<0.001)	0.850(<0.001)	0.883(<0.001)
TP1					0.964(<0.001)	0.107(0.595)	0.241(0.226)	0.098(0.628)	0.862(<0.001)	0.903(<0.001)	0.862(<0.001)
R1						0.078(0.699)	0.163(0.416)	0.069(0.733)	0.879(<0.001)	0.845(<0.001)	0.879(<0.001)
EB2							0.973(<0.001)	1.000(<0.001)	0.545(0.003)	0.500(0.008)	0.545(0.003)
TP2								0.972(<0.001)	0.603(0.001)	0.618(0.001)	0.603(0.001)
R2									0.537(0.004)	0.491(0.009)	0.537(0.004)
EBt										0.950(<0.001)	1.000(.)
TPt											0.950(<0.001)

* Coeficiente de correlación (significancia a dos colas).

Cuadro 6.22. Coeficientes de correlación de variables cuantitativas de morfología de cepas de *Pleurotus*.*

	Ti	P	Dmay1	E1	Pu1	Dmay2	E2	Pu2
Tm	0.654(0.02)	0.650(0.02)	-0.636(0.026)	0.009(0.978)	-0.839 (0.001)	-0.776(0.003)	0.017(0.958)	-0.195(0.544)
Ti		0.600(0.001)	-0.503(0.007)	0.045(0.822)	-0.460(0.016)	0.069(0.734)	0.044(0.827)	-0.025(0.900)
P			-0.591(0.001)	-0.196(0.327)	-0.603(0.001)	-0.220(0.271)	-0.025(0.901)	-0.315(0.109)
Dmay1				0.138(0.452)	0.878(<0.001)	0.148(0.418)	-0.005(0.977)	0.150(0.414)
E1					0.248(0.172)	-0.097(0.597)	0.175(0.338)	-0.081(0.659)
Pu1						0.283(0.116)	-0.037(0.843)	0.225(0.216)
Dmay2							-0.175(0.337)	0.907(<0.001)
E2								-0.046(0.802)

* Coeficiente de correlación (significancia a dos colas).

6.18. Extracción de material genético

Una vez caracterizado el fenotipo a nivel de micelio y cuerpos fructíferos tanto de las cepas progenitoras así como de sus híbridos, es necesario realizar una caracterización más profunda de este material biológico mediante el estudio del genotipo que determina la expresión fenotípica en dichas cepas; debido a ello, la extracción de material genético apropiado es un punto importante para tal fin.

Cuadro 6.23. ADNg aislado de las diferentes cepas de *Pleurotus* utilizadas

CEPA	Pureza*	Concentración* ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Peso molecular (kpb)	Masa (ng)
IE200	2.0 ± 0.01	1.07	27.49	302.1
ECS127R	1.2 ± 0.01	0.27 ± 0.01	20.01	11.08
IE200 ₁ xECS127R _a	1.7 ± 0.01	0.76	22.51	125.3
IE200 ₁ xECS127R _f	1.5 ± 0.02	0.2 ± 0.01	18.14	5.05
IE200 ₁	1.16	0.29 ± 0.01	21.88	51.04
ECS127R _a	1.9 ± 0.01	0.41	21.26	2.501
ECS127R _f	1.9 ± 0.02	6.5 ± 0.06	30.61	511.6

* Promedio de 3 repeticiones \pm ESM.

En el presente trabajo se utilizó y modificó el método de extracción de ADNg reportado por Graham y col. (1994) para esporangióforos de *Pseudocercospora*. Las modificaciones realizadas a dicho procedimiento permitieron obtener ADNg de muestras de micelio sedimentado cultivado en medio líquido (EMD) así como de cuerpos fructíferos de cultivos mono y dicarióticos de *Pleurotus djamor*, esta estrategia presentó algunas ventajas comparada con otros métodos previamente reportados para otras especies de hongos (Zolan y Pukkila, 1986) y plantas (CIMMYT, 2005), principalmente al disminuir el tiempo de extracción (de 6 a 3 horas aproximadamente) y por ello, de acuerdo con Graham y col. (1994), constituir un método de fácil

escalamiento. Sin embargo, la contaminación con proteínas fue inevitable en algunos casos, por ejemplo en el ADN obtenido de la cepa ECS127R y el neohaplonte IE200₁ en donde dicha contaminación repercutió en la pureza del ADN, la cual fue de 1.2 y 1.16 respectivamente (Cuadro 6.23); no obstante, para evitar esta disminución de pureza en las muestras, se puede acoplar una purificación fenólica al proceso de extracción. Por otro lado, también se observó que el material genético obtenido presentó niveles muy variables de concentración, encontrando intervalos desde 0.2 a 6.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo cual puede ser debido al contenido de agua residual en las muestras de micelio, previo al proceso de extracción.

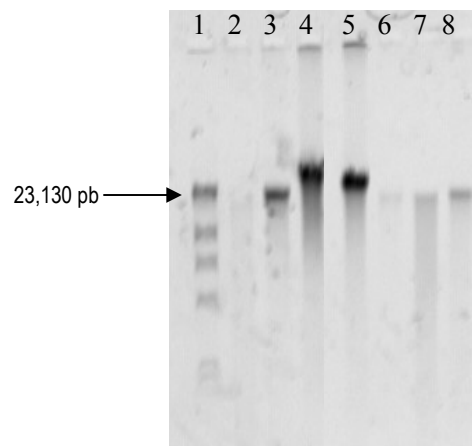


Figura 6.16. ADNg aislado de cepas de *Pleurotus*.
Carril 1. λ HindIII; carril 2. IE200₁xECS127R_f; carril 3. IE200₁xECS127R_a;
carril 4. ECS127R_f; Carril 5. IE200; Carril 6. ECS127R_a; carril 7. ECS127R carril 8. IE200₁

En cuanto a la prueba de calidad del ADN obtenido, se observó que las bandas pertenecientes al ADNg desplegadas en el gel fueron de alto peso molecular ($\approx 18-30$ Kpb), lo cual es una característica deseable para los procesos que involucran análisis RAPD y RFLP; también se obtuvieron bandas con mayor intensidad que otras (Figura 6.16) y esto se debió a las diferencias en concentración de cada una de las muestras, siendo la banda del carril 4 (ECS127R_f) la que

presentó mayor intensidad y concentración. Por su parte, las bandas que presentaron menor intensidad fueron las pertenecientes al neohaplonte ECS127R_a y el híbrido IE200₁xECS127R_f cuyas masas fueron de 2.5 y 5 ng respectivamente, lo anterior puede ser debido al volumen de dilución empleado en la carga de la muestra en el gel de electroforesis.

De esta forma, el material genético obtenido es útil para realizar estudios moleculares de estas cepas, tales como el Desplegamiento Aleatorio del ADN Polimórfico (RAPD) o los Polimorfismos en los Fragmentos Largos de Restricción (RFLP) para la generación de marcadores moleculares útiles en la construcción de mapas genéticos o estudios filogenéticos (Larraya y col., 2000); del mismo modo, se puede aplicar en métodos electroforéticos tales como la Electroforesis en Gel en Campo Pulsado (PFGE) (Larraya y col., 1999) o Electroforesis en Gel en Campo Homogéneo (CHEF) (Ramírez y col., 2000) para la separación de cromosomas y el estudio de cariotipos moleculares respectivamente, así como la citometría de flujo o fluorometría para determinar el número de cromosomas y estimar el tamaño de su genoma (Gregory y col., 2007).

Como se puede observar, las opciones son diversas y todas ellas están encaminadas al estudio del genoma de diferentes especies; aplicadas en los organismos del género *Pleurotus*, estas técnicas aportarían información relevante con la finalidad de tener bases más sólidas para un mejor entendimiento y aprovechamiento de estos recursos. Con la información generada en el presente trabajo, se han podido sentar las bases para la caracterización de las especies pertenecientes al complejo *P. djamor*, mismas que no han sido rigurosamente estudiadas ni caracterizadas como lo son las especies del complejo *P. ostreatus* cuyo fenotipo y mapa genómico ya han sido determinados (Larraya y col., 2000) y con ello, actualmente se están llevando a cabo procesos de

selección y mejoramiento genético con miras a aumentar su producción comercial. No obstante, aunque se pueden encontrar cepas del complejo *P. ostreatus* en ciertas regiones del continente Americano, su distribución geográfica predominante son los continentes Europeo y Asiático, mientras que *P. djamor* presenta especies más cosmopolitas y se distribuyen en todos los continentes (Calvo-Bado, 2001) principalmente en Malasia y están ampliamente distribuidas en zonas tropicales de nuestro país (Vilgalys y Sun, 1994), de aquí la importancia de estudiar y realizar una caracterización completa de estas especies con la finalidad de aportar mayores elementos para un aprovechamiento óptimo de los recursos naturales locales.

El presente trabajo proporcionó características morfológicas del micelio (tipo y abundancia aérea), cuerpos fructíferos (Color, forma, tamaño, peso) y esporas (Color y forma), así como algunas características fisiológicas (Tiempo medio de invasión micelial y Crecimiento micelial acumulado) y de productividad (EB, R, TP) de cepas del complejo *P. djamor*, monocariones obtenidos de ellas así como de cepas híbridas provenientes de sus cruces interespecímenes. La información aquí presentada constituye una aportación relevante para la caracterización de estas especies, debido a que se conjuntaron diferentes herramientas reportadas en la literatura para la caracterización de distintas especies fúngicas, mismas que apoyadas en técnicas estadísticas proporcionaron datos interesantes con respecto a la relación existente entre los parámetros evaluados; sin embargo, la aplicación de herramientas moleculares coadyuvará a la determinación más precisa de la ubicación taxonómica de estas cepas, además de esclarecer la base genética que determina la expresión de las características observadas.

7. CONCLUSIONES

- Las cepas ECS127R, IE200 y RP presentaron los mejores valores de acuerdo con los criterios de selección de este estudio (coloración contrastante, alta productividad, origen endémico y bajos valores de Tm), por lo cual fueron utilizadas en las pruebas realizadas.
- El número de colonias monocarióticas aisladas, la sensibilidad de las cepas y sus núcleos a las etapas del proceso de desdicarización química y la frecuencia de aparición de los tipos de apareamiento, fueron los causantes de la recuperación asimétrica de los componentes monocarióticos de las cepas ECS127R, IE200 y RP.
- Se encontró una relación directa entre el fenotipo algodonoso con abundancia exuberante y el crecimiento micelial más rápido para los neohaplontes de las cepas ECS127R, IE200, similar a la reportada previamente para el basidiomiceto *Schizophyllum commune*.
- El método de apareamiento de neohaplontes compatibles utilizado, condujo a la obtención de cepas híbridas con mayor productividad (~36% EB) que sus cepas progenitoras.
- El estado ploidal del micelio determinó las variaciones entre el fenotipo y las velocidades de crecimiento micelial de las cepas utilizadas.
- Las cepas híbridas obtenidas (IE200₁xECS127R_a y IE200₁xECS127R_b) fueron más precoces (>17%), rindieron parámetros de producción más altos (~36% EB, 134% TP y 36% R) y produjeron cuerpos fructíferos de mayor tamaño (>29%) y peso (>35%) que sus cepas progenitoras (ECS127R y IE200).
- La heterozigosidad del micelio dicariótico de las cepas híbridas o la presencia de un gen recesivo que induce el albinismo en cepas de *P. djamor*, son factores que pueden

determinar la diferencia en la coloración de los carpóforos entre las cepas híbridas y sus parentales.

- La correlación ($p \sim 0.02$) existente entre el Tiempo medio de invasión micelial, el Tiempo de invasión del sustrato y la Precocidad indicó que dichos parámetros son útiles para dilucidar la productividad de las cepas en la primera cosecha, por lo cual constituye un buen predictor del rendimiento total del cultivo.
- Las modificaciones realizadas al proceso de extracción de ADNg, permitieron la obtención de material genético con buenos niveles de pureza y concentración.
- La compatibilidad observada entre los neohaplontes obtenidos por desdicariorización química de las cepas IE200 y ECS127R aunado a la morfología de sus cuerpos fructíferos, permiten inferir que la cepa ECS127R forma parte del complejo *Pleurotus djamor* var. *salmoneostramineus*.
- La morfología observada en los cuerpos fructíferos y esporada, así como los estudios de compatibilidad reportados previamente, permiten inferir que la cepa RP pertenece al complejo *P. djamor* var. *salmoneostramineus*.
- Los altos valores de productividad, tamaño y peso, así como la precocidad y los menores tiempos de invasión micelial de los híbridos obtenidos, conducen a considerar a estas cepas como germoplasma apto para su cultivo a nivel comercial.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos**, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. (1996). Introductory mycology. 4^a edición. Editorial John Wiley and sons. New York. 869 pp.
- Arias**, G. A. (1998). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para el cultivo comercial por apareamiento entre neohaplontes. Tesis Maestría. UNAM. México, D.F.
- Arteaga-Santillán**, S.E., Ramírez-Carrillo, R., Leal-Lara, H. (1996). Desdicariorización excéntrica de *Lentinus* sp. Rev. Mex. Micol. **12**: 15-21.
- Ashktorab**, H., Cohen, R.J. (1992). Facile isolation of genomic DNA from filamentous fungi. BioTechniques. **13**: 198-200.
- Bano**, Z., Srinivasan, K. S., Srivastava, D. H. C. (1963). Amino Acid Composition of the Protein from a Mushroom (*Pleurotus* spp) Appl. Microbiol. **11**:184-187.
- Baysal**, E., Peker, H., Yalinkilic, M. K., Temiz, A. (2003). Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. Bioresource Tech. **89**: 95–97.
- Bezalel**, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. E. (1996a). Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology. **62**(1): 292–295.
- Bezalel**, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C. E. (1996b). Metabolism of phenanthrene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology. **62**(7): 2547-2553.
- Bobek** P., Galbavy, S., Ozdin, L. (1998). Effect of oyster mushroom (*P.ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. Oncol. Rep. **5**: 727–730.
- Bobek** P., Galbavy, S. (1999). Hypocholesteremic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. Nahrung. **43**: 339–42.
- Bonatti**, M., Karnopp, P., Soares, H. M., Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. Food Chemistry. **88**: 425–428.
- Boyle**, C. D., Kropp, B.R., Reid, I.D. (1992). Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. Applied and environmental microbiology. **58**(10): 3217-3224.

- Calvo-Bado, L.** (2001). Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. **En:** Sánchez, V.J.E., Royse, D.J. (eds.). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El colegio de la frontera sur. México. 71-79 pp.
- Cardona, U. L. F.** (2001). Revisión: Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Crónica forestal y del medio ambiente. **16:** 99-119.
- Chang, S. T.** (1996). Mushroom research and development-equality and mutual benefit. **En:** Royse, D.J. (ed). Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom products. Pennsylvania State University, 1-10 pp.
- Chang, S. T.** (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. International Journal of Medicinal Mushrooms **1:** 291-300.
- CIMMYT** (2005). Applied Molecular Genetics Laboratory. 3a edición. México, D.F. 86 pp.
- Clark, T.A., Anderson, J.B.** (2004). Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: evolution in long term culture. Genetics **167:** 1663-1675.
- Cohen R., Persky, L., Hadar, Y.** (2002). Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiol. and Biotech. **8:** 37-45.
- Corner, E.J.H.** (1981). The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus*. Men. Shiga. Univ. **23:**37-43.
- Crisan, E. V., Sands, A.** (1978). Nutritional value. **En:** Chang, S. T. y Hayes, W. A. (eds.). The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York : Academic Press. 251-293 pp.
- Danai, O., Olenik, I., Hadar, Y., Chet, I., Levanon, D.** (1998). The role of light in the morphogenesis of *Pleurotus ostreatus*. J. Mush. Sci. **2:** 33-39.
- Deacon, J. W.** (1993). Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa. Slp. 350 pp.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep. **1:** 19-21.
- Eger, G., Gottwald, H. D., Von Netzer, U.** (1974). The action of light and other factors on sporophore initiation in *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Science. **9:** 575-583.
- Eger, G., Eden, G., Wissig, E.** (1976). *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. Theoretical and applied genetics. **47:** 155-163.

- Eichlerová, I., Homolka, L. (1999).** Preparation and crossing of basidiospore-derived monokaryons –a useful tool for obtaining laccase and other ligninolytic enzyme higher-producing dikaryotic strains of *Pleurotus ostreatus*. **75**: 321-327.
- Eugenio, C. P., Anderson, N. A. (1968).** The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*. **60**: 627-634.
- Field, J.A., Jong, E., Feijoo, C.G., M de Bont, J.A. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and environmental microbiology*. **58**(7): 2219-2226.
- Fries, N. y Aschan, K. (1952).** The physiological heterogeneity of the dikariotic mycelium of *Polyporus abietinus* investigated with the aid of the micrurgical technique. *Sven. Bot. Tidskr.* **46**: 429-445.
- Fukumasa-Nakai, Y., Matsumoto, T., Komatsu, M. (1994).** Dedikariotization of the Shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 551-562.
- Futoshi, S., Ichijo, N., Yamaguchi, H., Nakatsumi, H., Ando, A., Iijima, N., Oguri, S., Uehara, K., Nagata, Y. (2004).** Molecular properties of mycelial aggregate specific lectin of *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **98**(4): 257-262.
- Garber, R.C., Yoder, O.C. (1983).** Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid components. *Anal. Biochem.* **135**:416-422.
- García, J. J., Pedraza, K. D., Silva, B. C., Andrade, M. R., Castillo, T. J. (1998).** Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 11-15 pp.
- García, O.N., Bermúdez, S.R.C., Gross, C.P., Hernández, H.M. (2006).** Cultivo de cepas de *Pleurotus* sp. Sobre pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología*. **23**: 99-101.
- González, P., Labarère, J. (2000).** Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology*. **146**: 209-221.
- Graham, G. C., Mayers, P., Henry, R. J (1994).** A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*. **16**(1):48-50.
- Gregory, T.R., Nicol, J.A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I.J., Murray, B.G., Kapraun, D.F., Greilhuber, J., Bennet, M.D. (2007).** Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*. **35**: D332-D338.

- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. (1993).** El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. México. 245 pp.
- Guzmán, G. (1990).** Identificación de los hongos: comestibles, venenosos y alucinantes. Editorial Limusa-Noriega, México.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1998).** El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica – UNAM. México. 552 pp.
- Hernández-Ibarra, H., Sánchez, V.J.E., Calvo-Bado, L.A. (1995).** Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* de la región de Tapachula, Chiapas, México. *Rev. Mex. Micol.* **11**: 29-38.
- Idareta, E., Larraya, L., Pisabarro, A. G., Ramírez, L. (2004).** Evaluación de parámetros de producción y de calidad en cultivo semi-industrial de cepas de seta ostra *Pleurotus ostreatus* obtenidas mediante selección asistida por marcadores moleculares. *Actas de horticultura n° 40. II Congreso de mejora genética de plantas.* 416-419 pp.
- Iijima, N., Amano, K., Ando, A., Nagata, Y. (2003).** Production of Fruiting-Body Lectins of *Pleurotus cornucopiae* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **95**(4): 416-418.
- Isikhuemhen, O. S., Moncalvo, J. M., Nerud, F., Vilgalys, R. (2000).** Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium*. *Mycology Research.* **104**(6): 732-737.
- James, T. Y., Liou, S. R., Vilgalys, R. (2004).** The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fungal Genetics and Biology,* **41**:813–825.
- J. F. de Jong, Deelstra, H.J., Wösten, H.A.B., Lugones, L.G. (2006).** RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Applied and environmental microbiology.* **72**(2): 1267-1269.
- Jiménez-Hernández, J. (2000).** Evaluación de la productividad y coloración de esporóforos de diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Tesis UNAM-Iztacala. Estado de México. 60 pp.
- Jose, N., Ajith, T. A., Jananrdhanan, K. K. (2002).** Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Que'l. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms.* **4**: 329–35.
- Justo, M. B., Guzmán, G. A., Mejía, E. G., Díaz, C. L. G., Martínez, G., Corona, E. B. (1998).** Composición química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición,* **48**(4): 359–363.

- Kang**, H. W., Park, D. S., Go, S. J., Eun, M. Y. (2002). Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Molecules and Cells*. **13**(2): 281-287
- Koltin**, Y., Stamberg, J., Lemke, P. A. (1972). Genetic Structure and Evolution of the Incompatibility Factors in Higher Fungi. *Bacteriological reviews*. **36**(2): 156-171.
- Koltin**, Y., Raper, J. R., Simchen, G. (1967). The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: the B factor. *Genetics*. **57**: 55-62
- Küppers**, H. (1996). Atlas de colores. Editorial Blume. España. 161 pp.
- Kuramae-Izioka**, E.E. (1997). A rapid, easy and high yield protocol for total DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar*. **16**: 683-689.
- Labarère**, J., Bois, F. (2001). La conservación y el uso de recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: Sánchez, V.J.E., Royse, D.J.(eds.). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El colegio de la frontera sur. México. 85-118 pp.
- Lacourt**, I., Duplessis, S., Abbà, S., Bonfante, P., Martin, F. (2002). Isolation and characterization of differentially expressed genes in the mycelium and fruit body of *Tuber borchii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(9): 4574–4582.
- Lara-Herrera**, I., Mata, G., Gaitán-Hernández, R. (1998). Evaluación del efecto de la criopreservación de cepas de *Pleurotus* spp. sobre la producción de carpóforos. *Revista Iberoamericana de Micología*. **15**: 44-47.
- Larraya**, L. M., Alfonso, M., Pisabarro, A. G., Ramírez, L. (2003). Mapping of genomic regions (Quantitative Trait Loci) controlling production and quality in industrial culture of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6): 3617-3625.
- Larraya**, L., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A. G. y Ramírez, L. (2002). Quantitative Trait Loci Controlling Vegetative Growth Rate in the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1109-1114.
- Larraya**, L., Pérez, G., Iribarren, I., Blanco, J. A., Alfonso, M., Pisabarro, A. G. y Ramírez, L. (2001). Relationship Between Monokaryotic Growth Rate and Mating Type in the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3385-3390.
- Larraya**, L.M., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G., Ramírez, L. (2000). Genetic Linkage Map of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(12): 5290-5300.

- Larraya, L. M., Peñas, M.M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A. G., Ramírez, L.** (1999a). Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* **34**: 486-493.
- Larraya, L. M., Pérez, G., Peñas, M. M., Baars, J. J. P., Mikosch, T. S. P., Pisabarro, A. G., Ramírez, L.** (1999b). Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology.* **65**(8): 3413-3417.
- Leal-Lara, H., Eger-Hummel, G.** (1982). A monokarionization method and its use for genetic studies in Word-rooting basidiomycetes. *Theoretical and applied genetics.* **61**: 65-68.
- Lee, S. H., Kim, B. G., Kim, K. J., Lee, J. S., Yun, D. W.** (2002). Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal genetics and biology.* **35**: 115-134.
- Lindequist, U., Timo, H. J., Niedermeyer., Wolf, D.** (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM.* **2**(3): 285–299.
- Lull, C., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. J.** (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation.* **2**: 63–80.
- Magae, Y., Kakimoto, Y., Kashiwagi, Y., Sasaki, T.** (1985). Fruiting body formation from regenerated mycelium of *Pleurotus ostreatus* protoplasts. *Applied and environmental microbiology.* **94**(2): 441-442.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L.** (1999). Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry,* **65**(4): 477–482.
- Marino, R. H., Ferreira, A., Eurya, K. E., Cardoso, Q. E.** (2003). Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of fructification. *Scientia Agricola.* **60**(3): 531-535.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Martínez, M., Mayett, Y.** (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Posgraduados. México. 44 pp.
- Mata G, Guzmán G.** (1993). Cultivation of *Lentinus boryanusin* wood shavings in Mexico. *Crypt. Bot.* **4**: 47-49.
- Moda, M. E., Horii, J., Fillet, S. M. E.** (2005). Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. *Sci. Agric.* **62**(2): 127-132.

- Moore-Landecker**, E. (1996). Fundamentals of the fungi. 4a edición. Editorial Prentice Hall. USA. 574 pp.
- Murakami**, S., Takemaru, T. (1990). Genetic studies of *Pleurotus salmoneostramineus* forming albino basidiocarpos. Rep. Tottori Mycol. Inst. **37**: 64-70.
- Murria**, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. **7**: 1869-1885.
- Ng**, T. B., Wang, H. X. (2004). A novel ribonuclease from fruiting bodies of the common edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Peptides. **25**: 1365-1368.
- Paredes**, P.Q. (1996). Evaluación de la productividad de diferentes cepas comerciales del hongo comestible *Pleurotus* spp. Tesis de licenciatura. UNAM, México.
- Pearson**, D. (1976). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia. España. 43-44 pp.
- Peñas**, M. M., Asgeirsdottir, S. A., Lasa, I., Culiñez-Macía, F. A., Pisabarro, A. G., Wessels, J. G. H., Ramírez, L. (1998). Identification, characterization and In Situ detection of a fruiting-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. **60**(10): 4028-4034.
- Pérez**, M.R., Mata, G. (2005). Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. Revista Mexicana de Micología. **20**: 53-59.
- Petersen**, R., Huges, K. (1999). Species and speciation in mushrooms. Bioscience. **49**(6): 440-452.
- Ramírez**, L., Larraya, L. M., Pisabarro, A. G. (2000). Molecular tools for breeding Basidiomycetes. International microbiology. **3**: 147-152.
- Raper**, J. R. (1966). Genetics of Sexuality in Higher Fungi. Ronald Press, New York.
- Rodríguez**, M. A., Gharaibeh, R., Marchat, L., López, C. C. (2004). Bases teóricas de los métodos experimentales más comunes en biología molecular. **En**: Luna, A. J. P., Orozco, O. E. (eds.). La frontera: genética molecular de la enfermedad. Tomo 1. Instituto Politécnico Nacional. México, 49-79 pp.
- Royse**, D. J., Rhodes, T. W., Ohga, S., Sanchez, J. E. (2004) Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. Bioresource Technology. **91**:85-91.

- Royse, D. J.** (2002). Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size and time to production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**: 527–531.
- Saghai-Maroff, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 8014-8018.
- Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R., Guzmán, G.** (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus* VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología*. **14**: 173-176.
- Salmones, D., Mata, G., Waliszewski, K. N.** (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource technology*. **96**: 537-544.
- Sánchez, J.E.** (2001). Crecimiento y fructificación. **En:** Sánchez, V.J.E., Royse, D.J.(eds.). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El colegio de la frontera sur. México. 51-66 pp.
- Shashirekha, M. N., Rajarathnam, S., Bano, Z.** (2002). Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Berk and Br.) Sacc. Produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. *Food chemistry*. **76**: 27-31.
- Shi, Y. L., James, A. E., Benzie, I. F. F., Buswell, J. A.** (2004). Genoprotective activity of edible and medicinal mushroom components. *Internat. Journal of Med. Mushrooms*. **6**: 1–14.
- Simchen, G.** (1966). Monokaryotic variation and haploid selection in *Schizophyllum commune*. *Heredity*. **21**: 241–263.
- Srivastava, H. C., Bano, Z.** (1970). Nutrition requirements of *Pleurotus flabellatus*. *Appl. Microbiol.* **19**: 166.
- Stamets, P., Chilton, J. S.** (1983). *The mushroom cultivator*. Ed. Agarikon Press Olimpia. Washington. 415p.
- Sturion, G. L., Oetterer, M.** (1995). Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **15**(2): 189–193.

- Sunagawa, M.,** Magae, Y. (2005). Isolation of genes differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. FEMS Microbiology Letters. **246**: 279-284.
- Tan, K. K.** (1977). Light-induced fungal development. **En:** Smith, J.E., Berry, R.D. (eds.). The filamentous fungi III. Edit. John Wiley and sons. U.S.A. 334-357 pp.
- Takao, S.** (1965). Organic acid production by Basidiomycetes. Applied Microbiology. **13**(5): 732-737.
- Valencia-del Toro, G.,** Leal-Lara, H. (1999). Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus* spp. con cuerpos fructíferos de diversos colores. Rev. Mex. Micol. **15**: 65–71.
- Valencia-del Toro, G.,** (2002) Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado. UNAM. México, D.F.
- Valencia-del Toro, G.,** Garín-Aguilar, M.E., Jiménez-Hernández, J., Leal-Lara, H. (2003). Producción de cepas coloridas de *Pleurotus* spp. en sustrato estéril y pasteurizado. Revista Mexicana de Micología. **17**: 1-5.
- Valencia-del Toro, G.,** Castelán, V. R., Garín-Aguilar, M. E., Leal-Lara, H. (2006). Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. Food Chemistry. **94**(4): 494-497.
- Vilgalys, R.,** Smith, A., Sun, B. L., Miller, O. K. (1993). Intersterility groups in *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. Canadian Journal of Botany. **71**: 113-128.
- Vilgalys, R.,** Sun, B.L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proceed. Nat. Acad. Sc. **91**:4599-4603.
- Vogel, F.,** Salmenes, D. (2000). Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas en una planta comercial. Rev. Iberoamericana de Micología. **17**: 138-141.
- Ye, X.Y.,** Ng, T.B. (2002). A novel and potent ribonuclease from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus pulmonarius*. Biochem and Biophys Res Commun. **293**: 857-861.
- Zadrazil, F.** (1974). The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United State and adjacent Canada. Can. J. Bot. **71**: 113-128.
- Zadrazil, F.** (1978). Cultivation of *Pleurotus*. **En:** Chang, S. T., Hayes, W. A. (Eds.) The biology and cultivation of edible mushrooms. Edit. Academic Press. New York, 521-557 pp.

- Zervakis, G., Venturella, G., Papadopoulou, K. (2001).** Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology*. **147**: 3183-3194.
- Zervakis, G., Venturella, G. (2002).** Mushroom breeding and cultivation enhances *ex situ* conservation of Mediterranean *Pleurotus* taxa. **En:** Engels, J.M.M., Rao, V.R., Brown, H.A.D., Jackson, M.T. (Eds.). *Managing Plant Genetic Diversity*. CABI Publishing, UK. 351-358 pp.
- Zervakis, G., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R. (2004).** Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*. **150**: 715-726.
- Zolan, M. E., Pukkila, P. J. (1986).** Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular Cellular Biology*. **6**(1): 195-200.