

C3072

1
2ep



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y POSGRADO DEL C. C. H.

SELECCIÓN DE CEPAS DE *PLEUROTUS* *OSTREATUS* PARA EL CULTIVO COMERCIAL POR APAREAMIENTOS ENTRE NEOHAPLONTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A
JOSE ARMANDO ARIAS GARCIA

MEXICO, D.F.

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SELECCIÓN DE CEPAS DE *PLEUROTUS OSTREATUS* PARA EL CULTIVO COMERCIAL POR APAREAMIENTOS ENTRE NEOHAPLONTES

Este trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Hermilo Leal Lara.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hermilo Leal Lara por sus asesorías durante esta parte de mi preparación académica

A los miembros del jurado asignado por sus valiosas sugerencias

Al CONACyT por su apoyo al recibir una beca con número de registro 88412 para la realización de los estudios de posgrado

A la Universidad de Guadalajara por haber permitido superarme académicamente

A la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM y U de G por su apoyo para realizar estancias de investigación que permitieron concluir la investigación.

A los amigos y compañeros de trabajo del Departamento de Botánica y Zoología.

A los compañeros del laboratorio 324 de la Fac. de Química, UNAM

A todas aquellas personas que participaron en la realización de este trabajo

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	2
1.1 Importancia del cultivo de hongos comestibles	2
1.2 Situación actual del cultivo de hongos comestibles en México	3
1.3 Biología de <i>Pleurotus</i>	5
1.3.1 Características taxonómicas	5
1.3.2 Valor nutritivo y medicinal	6
1.3.3 Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	6
1.3.4 Ciclo sexual	7
1.4 Obtención de cepas mejoradas de <i>Pleurotus</i>	9
1.4.1 Apareamientos monocarión-monocarión	9
1.4.2 Apareamientos dicarión-monocarión	9
1.4.3 Apareamientos entre neohaplontes	10
1.4.4 Identificación de cepas mejoradas	11
1.5 Objetivos	13
Hipotesis	14
II MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	15
2.2 Medios de cultivo	16
2.2.1 Medio extracto de malta con agar (EMA)	16
2.2.2 Medio extracto de malta desproteínizado con agar (DPMA)	16
2.2.3 Medio de agar agua (AA)	16
2.2.4 Medio de almidón con 2 desoxiglucosa (2DG)	17
2.2.5 Solución desdicarizadora	17
2.3 Condiciones de cultivo para la caracterización de cepas	17
2.3.1 Obtención de crecimiento vegetativo	17
2.3.2 Inducción de la fructificación	18
2.3.3 Sustrato lignocelulósico	18
2.3.3.1 Preparación de inóculo	18
2.3.3.2 Preparación del sustrato lignocelulósico	18
2.3.3.3 Siembra del sustrato y cosecha de esporóforos	19
2.4 Condiciones para la producción de micelios monocarióticos	20
2.4.1 Producción de neohaplontes	20
2.4.2 Aislamiento de micelios monospóricos	21
2.5 Apareamientos y determinación de apareamientos positivos	21
2.6 Evaluación de la resistencia a 2DG	22
2.6.1 Propagación en medio de almidón con 2DG	22
2.6.2 Determinación de biomasa producida	22
2.6.3 Determinación de la resistencia a 2DG	23
2.7 Análisis de datos	23

III	RESULTADOS	24
3.1	Caracterización y selección de cepas dicarióticas de <i>Pleurotus</i> spp. en paja de trigo.	24
3.1.1	Inicio de la fructificación	24
3.1.2	Producción semanal y total	24
3.1.3	Producción semanal acumulada	26
3.1.4	Características de fructificación en el rendimiento máximo significativo	26
3.1.4.1	Características de producción	27
3.1.4.2	Características de los esporóforos	27
3.1.4.2.1	Color de esporóforos	27
3.1.4.2.2	Peso unitario promedio	33
3.1.5	Tasa de producción	33
3.1.6	Características de cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> spp.	33
3.2	Desarrollo de metodología para la identificación de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. con altos rendimientos.	36
3.2.1	Efecto de la 2DG sobre el crecimiento de <i>Pleurotus</i> .	36
3.3	Obtención y selección de dicariones híbridos de <i>P. ostreatus</i>	46
3.3.1	Recuperación de neohaplontes de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	46
3.3.2	Aislamiento de progenie monocariótica de IBUG-67	48
3.3.3	Apareamientos monocarión-monocarión	48
3.3.4	Apareamientos dicarión-monocarión	49
3.3.5	Selección de dicariones híbridos de <i>P. ostreatus</i>	50
3.3.5.1	Color de esporóforos de cepas parentales seleccionadas	50
3.3.5.2	Color de esporóforos de cepas híbridas obtenidas	51
3.3.5.3	Resistencia 2DG de dicariones híbridos	52
3.3.5.4	Cepas híbridas dicarióticas seleccionadas	53
3.4	Caracterización de híbridos seleccionados de <i>Pleurotus</i> spp.	53
3.4.1	Inicio de la fructificación sobre paja de trigo de los híbridos de <i>Pleurotus</i> spp.	55
3.4.2	Producción semanal y total	55
3.4.3	Producción semanal acumulada	56
3.4.4	Características de fructificación	59
3.5	Análisis comparativo de cepas padres e híbridas	62
3.6	Estudio genético del carácter de resistencia a 2DG en <i>Pleurotus</i> spp.	64
3.6.1	Determinación de la resistencia a 2DG de neohaplontes de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	64
3.6.2	Segregación del carácter de resistencia a 2DG	64
3.6.3	Distribución del carácter en los cuatro tipos de apareamiento	67
IV	DISCUSIÓN	72
V.	CONCLUSIONES	82
VI.	LITERATURA CITADA	84

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

		Pagina
Tabla 1	Cepas de <i>Pleurotus</i> spp. empleadas	15
Tabla 2	Inicio de la fructificación de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp. sobre paja de trigo	25
Tabla 3	Producción semanal y total de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp. sobre paja de trigo	27
Tabla 4	Producción semanal acumulada de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	29
Tabla 5	Características de fructificación (rendimiento máximo, eficiencia biológica, tiempo de fructificación y tipo de esporóforos) de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	32
Tabla 6	Tasa de producción en el rendimiento máximo significativo de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	34
Tabla 7	Características generales de cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> spp. sobre paja de trigo	35
Tabla 8	Efecto de la 2DG en la velocidad de crecimiento de diferentes cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	37
Tabla 9	Efecto de la concentración de 2DG sobre la producción de biomasa (mg/caja) de <i>Pleurotus</i> spp.	40
Tabla 10	Coefficientes de correlación entre la resistencia a 2DG y los parámetros de selección de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	43
Tabla 11	Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes) de cepas dicarióticas de <i>Pleurotus</i> spp.	47
Tabla 12	Apareamientos entre neohaplontes de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> spp. (monocarión-monocarión y dicarión-monocarión)	49
Tabla 13	Color de esporóforos en paja de trigo y agar EMA de las cepas dicarióticas parentales de <i>Pleurotus</i> spp.	51
Tabla 14	Color de esporóforos de apareamientos dicarióticos entre neohaplontes	52
Tabla 15	Resistencia a 2DG de los dicariones obtenidos por apareamiento entre neohaplontes	54
Tabla 16	Cepas dicarióticas híbridas seleccionadas con base en el color de fructificaciones en EMA y resistencia a 2DG	55
Tabla 17	Inicio de la fructificación sobre paja de trigo de híbridos de <i>Pleurotus</i> spp.	56
Tabla 18	Producción semanal y total en paja de trigo de dicariones híbridos obtenidos por apareamiento entre neohaplontes	57
Tabla 19	Producción semanal acumulada sobre paja de trigo de dicariones híbridos obtenidos por apareamiento entre neohaplontes	58
Tabla 20	Características de fructificación (rendimiento máximo, eficiencia biológica, tiempo de fructificación y tipo de esporóforos) sobre paja de trigo de los híbridos dicarióticos seleccionados	60
Tabla 21	Tasa de producción en el rendimiento máximo sobre paja de trigo de dicariones híbridos seleccionados	61
Tabla 22	Comparación de las características de producción y resistencia a 2DG de las cepas parentales de <i>Pleurotus</i> spp. y de híbridos obtenidos por apareamiento entre neohaplontes	63
Tabla 23	Producción de biomasa y sensibilidad a 2DG de componentes monocarióticos de dicariones de <i>Pleurotus</i> spp.	65
Tabla 24	Selección de híbridos de <i>Pleurotus</i> spp. con base en la constitución genotípica de sus componentes monocarióticos	66
Tabla 25	Número de genes responsables de la resistencia a 2DG en cepas productivas de <i>Pleurotus</i> spp.	68
Tabla 26	Distribución de monocariones resistentes a 2DG en los 4 tipos de compatibilidad de la progenie del híbrido P14,xP17, (R x R)	69

Tabla 27	Distribución de monocariones resistentes a 2DG en los 4 tipos de compatibilidad de la progenie del híbrido P10 ₂ xP15 ₁ (R ⁺ xR ⁺)	70
Tabla 28	Distribución de monocariones resistentes a 2DG en los 4 tipos de compatibilidad de la progenie del híbrido P14 ₁ xP18 ₁ (R ⁺ xR)	70
Tabla 29	Segregación del carácter de resistencia a 2DG en los 4 tipos de compatibilidad de las progenies de 3 híbridos de <i>Pleurotus</i> spp	71
Figura 1	Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
Figura 2	Correlación de la velocidad de crecimiento en 2DG con el rendimiento máximo de <i>Pleurotus</i> spp. sobre paja de trigo	38
Figura 3	Correlación de la resistencia a 2DG con el rendimiento máximo de <i>Pleurotus</i> spp. sobre paja de trigo	39
Figura 4	Correlación de la resistencia a 2DG (0.1 g/l) con las características de producción de diferentes cepas dicarióticas de <i>Pleurotus</i> spp. en paja de trigo	45

Se obtuvieron y seleccionaron cepas híbridas de *P. ostreatus* con potencial para el cultivo comercial. Estas presentaron un rendimiento máximo significativo en un lapso de tiempo corto, con altos rendimientos y los esporóforos fueron más grandes. De un total de 17 cepas de *Pleurotus* spp. del banco de germoplasma fueron cultivadas y se eligieron 7 que presentaron las mejores características en paja de trigo para realizar un mejoramiento genético. Los criterios de elección fueron fructificación temprana, altos rendimientos con cortos periodos de cultivo y esporóforos más grandes con la finalidad de ofrecer cepas con potencial para reducir los costos de producción en el proceso comercial. Paralelamente se desarrolló un método, con base en la resistencia a la 2 desoxiglucosa (2DG), análogo tóxico de la glucosa, para identificar las cepas más productivas, sin cultivarlas en planta piloto. Se evaluó la resistencia a 2DG de las cepas parentales en diferentes concentraciones de 2DG (0.0, 0.01, 0.05 y 0.1 g/l). Se encontró una correlación entre la resistencia a 2DG y el rendimiento máximo. A una concentración de 0.1 g/l de 2DG fue posible identificar a 9 de las 10 cepas con altos rendimientos. De 6 cepas seleccionadas, por desdicarriotización se obtuvieron los componentes monocarióticos (neohaplontes), y de una cepa que no se logró desdicarriotizar se obtuvo la progenie monospórica. Con los micelios de estas cepas se realizaron apareamientos monocarión-monocarión, lográndose la formación de 13 híbridos. Estos se caracterizaron y seleccionaron 6 en cuanto al color de las fructificaciones en medio extracto de malta con agar (EMA) así como la resistencia a 2DG. Las fructificaciones de los híbridos seleccionados fueron 4 de color blanco y 2 gris. La resistencia a 2DG fue desde 10% hasta 57%. Se comprobó que los híbridos obtenidos presentaron mejores características que las cepas parentales, aunque requirieron de 62.3 días para iniciar la fructificación a diferencia de los 36.8 días para las cepas parentales. El tiempo para obtener el rendimiento máximo significativo fue en 28.5 días, con eficiencias biológicas de 95.8%, una tasa de producción de 1.203 y esporóforos más grandes con un promedio de 18.5 g/hongo. Finalmente se analizó la progenie de 3 híbridos y se determinó que probablemente la resistencia a 2DG depende de un solo gen que no está asociado a los tipos de compatibilidad ya que muestra una segregación de 1:1:1:1 de acuerdo a los cuatro tipos de apareamiento.

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

1.1 Importancia del cultivo de hongos comestibles

El cultivo de hongos comestibles ha tomado gran importancia en el reciclamiento de desechos agroindustriales y ha adquirido una creciente participación en la solución de uno de los principales problemas de la humanidad: la necesidad de alimentar a una creciente población (Chang y Hayes, 1978; Chang y Quimio, 1982; Chang y Miles, 1984).

La producción mundial de hongos comestibles cultivados se ha incrementado en forma estable desde la Segunda Guerra Mundial, y aunque hubo fluctuaciones de producción en varios países durante este tiempo, la producción mundial en 1986 fue de 4 273 000 toneladas, la cual se incrementó 96.4% para 1991 (Flegg, 1995). Cabe resaltar que en 1983-1984 *Pleurotus* ocupó el sexto lugar de producción mundial con 32 000 toneladas de hongos frescos después de *Agaricus*, *Lentinus*, *Volvariella*, *Flammulina* y *Auricularia* (Chang y Miles, 1989). En 1991 pasó al segundo lugar con 917 000 toneladas superado sólo por *Agaricus* que tuvo una producción de 1 590 000 toneladas. En el caso de *Agaricus* algunos países como Holanda y la República de Irlanda exportan una considerable proporción de su producción, mientras que otros son netamente importadores, por ejemplo El Reino Unido y Alemania. En 1990 el país que más exportó fue Holanda, que vendió su producción de 96,020 toneladas, al menos a 8 países que incluyen a Alemania, Francia, Bélgica, Luxemburgo, Canadá, Dinamarca, Israel y el Reino Unido (Flegg, 1992).

Los esporóforos producidos son apreciados por su sabor agradable y representan una gran fuente de proteínas que pueden enriquecer la dieta humana en países en desarrollo y presentan diversos compuestos con propiedades medicinales (Stamets, 1993). Además, el sustrato residual adquiere un valor como fertilizante y acondicionador de suelos para el crecimiento de plantas (Maher, 1991; Oei, 1991).

Para el cultivo de hongos comestibles se emplean sustratos lignocelulósicos, es decir, materiales compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina que

son transformados en alimento humano. Estos sustratos son desechos o subproductos de granjas, cultivos o industrias. La mayoría de los hongos utilizan las pajas de cereales como sustrato y aunque estas pajas pueden ser utilizadas como alimento, fertilizante y energía se estima que de un 36 a 60 % de las cosechas de trigo, arroz, maíz, cebada, avena y centeno son quemadas, y en algunos lugares esta cantidad llega al 100%, ocasionando problemas de contaminación y gasto excesivo de energía (Chang y Miles, 1984).

1.2 Situación actual del cultivo de hongos comestibles en México

La producción comercial de hongos en México es una actividad importante desde diversos puntos de vista entre el económico, social y ecológico. En 1990 el monto anual de operaciones superó los 22 millones de dólares, generó alrededor de 5 mil empleos, y un volumen de producción cercana a 9 mil toneladas de hongos por año, los cuales se obtuvieron a partir de mas o menos 70 mil toneladas de desechos agroindustriales (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

México es un país excepcionalmente rico en especies de hongos, debido fundamentalmente a la variedad de climas que tiene, lo que se refleja en la compleja vegetación que lo cubre. En efecto, existen en el país desde selvas tropicales del sureste, hasta los desiertos del norte, pasando por los bosques subtropicales y los de coníferas de las montañas. Por otra parte, la tradición por consumir hongos en México, se ha dado desde la época prehispánica (Guzmán, 1985). Así tenemos que Guzmán (1977) registró más de 400 nombres populares de hongos comestibles en México, que representan alrededor de 200 especies diferentes, de las cuales potencialmente se pueden cultivar alrededor de 10 (Guzmán, 1983).

En México el cultivo de hongos comestibles ha resultado una buena alternativa para la agricultura, lográndose obtener resultados de producción en poco espacio, en un tiempo relativamente corto y a bajo costo. Por ello algunos residuos lignocelulósicos que son desechados en cada región del país han sido evaluados en su potencial como sustrato para el cultivo de *Pleurotus*, resultando favorablemente su utilización. Entre ellos se reporta paja de trigo (Sánchez y Viniegra, 1996), bagazo de maguey tequilero

(Soto-Velazco *et al.*, 1991a), rastrojo de maíz con bagazo de caña de azúcar (Soto-Velazco *et al.*, 1991b), pulpa de café (Guzmán y Martínez-Carrera, 1987), lirio acuático (De León Chocooj *et al.*, 1993), bagazo de caña de azúcar y de maguey tequilero (Cedano *et al.*, 1993). Se ha propuesto que después del cultivo de hongos el sustrato degradado por el hongo puede ser empleado como alimento animal, acondicionadores de suelo y fertilizante; sin embargo, aun no han sido evaluados los sustratos residuales.

Dada la disponibilidad de desechos agroindustriales y la alternativa para la agricultura que representa el cultivo de hongos comestibles, se ha despertado un gran interés por su cultivo comercial. En 1990, la producción anual estimada de hongos en México de *Pleurotus* fue de alrededor de 356 toneladas (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). Para 1997 la producción estimada fue de 1825 toneladas, lo que representa un incremento del 413% durante este periodo (Sobal *et al.*, 1997). Sin embargo, el consumo *per cápita* de hongos comestibles en México es de solo 0.1 kg. En cambio en los Estados Unidos este fue de 0.95 kg y en Inglaterra y Canadá en más de 2 kg (Martínez-Carrera *et al.*, 1993) y el de *Pleurotus* es de tan solo 20 g.

Royse y Zaki (1991) reportaron que la producción de hongos comestibles en los Estados Unidos se incrementó debido a una demanda en el mercado por parte del consumidor y por la relativa alta rentabilidad del cultivo. Asimismo mencionaron la importancia de una cepa con características importantes para el mercado estadounidense, entre ellas la presencia de un color atractivo.

Por lo tanto uno de los factores que pueden favorecer un aumento en el consumo y por lo tanto en el cultivo de *Pleurotus* es la disponibilidad de cepas con distintas morfologías o incrementar los rendimientos. Como ejemplo, se tienen varios productos vegetales con diversas características organolépticas entre ellas, sabor, olor, color, tamaño y altos rendimientos, tal es el caso del mango, el plátano, la papa, el maíz, el arroz.

1.3 Biología de *Pleurotus*

El género *Pleurotus* comprende hongos cosmopolitas a los que se les encuentra creciendo en forma silvestre sobre troncos o en restos vegetales. Son comestibles y muy apreciadas por su olor y sabor agradable. En México se le conoce con varios nombres comunes, tales como: seta, oreja blanca, oreja de izote, oreja de cazahuate y oreja de maguey (Guzmán, 1977).

1.3.1 Características taxonómicas

Existe una gran confusión taxonómica del género *Pleurotus*, especialmente para aquéllas especies que pertenecen al complejo de *Pleurotus ostreatus*. El problema reside en que existe una gran variabilidad morfológica que puede ser atribuida a muchos factores, tales como condiciones ambientales, plasticidad fenotípica y variación genética (Vilgalys *et al.*, 1993). Según Singer (1975) el género *Pleurotus* se puede dividir en 4 secciones, corroboradas mediante variación isoenzimática por Matsumoto *et al.* (1995) con un total de 39 especies. Sin embargo, el concepto de especie es muy controversial ya que los caracteres morfológicos, tales como color del pileo, color y tamaño de esporas, empleados para separar las especies son muy influenciados por el medio (Petersen y Hughes, 1993).

Zervakis y Labarere (1992) detectaron una gran diversidad genética de *Pleurotus* por medio de análisis isoenzimático de 23 cepas en donde consideraron que se trataban de solo 9 especies. Vilgalys y Sun (1994) realizaron apareamientos de cepas con diferente origen geográfico y encontraron 8 grupos interesteriles o especies biológicas. A partir de 11 morfotaxa de Europa Zervakis y Balis (1996) identificaron 8 especies biológicas. Mediante un análisis de restricción del DNA ribosomal, Iracabal, Zervakis y Labarere (1995) demostraron la variación entre especies del género *Pleurotus*. En la actualidad Vilgalys *et al.* (1996) por medio de apareamientos y estudios moleculares en donde utilizó la subunidad más grande del ribosomal, encontraron una correlación entre este DNA y los grupos de interesterilidad, identificaron 15 especies biológicas, en donde a cada una se le asoció con una o más especies morfológicas.

El género *Pleurotus* incluye hongos comestibles que pertenecen a la familia Tricholomataceae y orden Agaricales. El cuerpo fructífero es gimnocárpico, es decir, que durante la formación del cuerpo fructífero las láminas no están cubiertas por un velo. Presentan sombrero liso en forma de repisa, de 5-10 cm de ancho blanquecino, grisáceo o color café grisáceo. Láminas blanquecinas, poco o nada unidas entre sí en la base. Las esporas pueden medir de 8 a 12 μm por 3 a 4 μm y son hialinas. Su carne es blanca y correosa, con olor y sabor agradables. El estípote es corto y lateral, en ocasiones es excéntrico. Crece en zonas tropicales y subtropicales. Es saprobio y destructor de la madera; algunas veces se comporta como parásito.

1.3.2 Valor nutritivo y medicinal

Tradicionalmente se ha considerado a los hongos como un alimento de alta calidad, con sabor y textura apreciable sobre todo por su alto valor nutritivo. Esto es notable ya que constituyen una magnífica fuente de proteínas, por contener hasta un 35% con base seca. Este dato es significativo si se compara con el 13.2% del trigo y el 25.2% de la leche.

Los carbohidratos son los constituyentes que se encuentran en mayor porcentaje, con contenidos que van de 57.4 a 59.2%. La fibra cruda se encuentra en 12% (Bano, 1967). Del total de lípidos presentes, más del 80% son ácidos grasos insaturados y en particular, aproximadamente el 70% de éstos es ácido linoleico. Entre las vitaminas presentes se encuentran la B1, B2, C, D, Niacina y Ácido Pantoténico (Bano y Rajathnam, 1979). En cuanto a minerales, el potasio se encuentra en mayor porcentaje con cantidades que van desde 3260 a 4660 mg/100g, el fósforo se encuentra entre 760 y 1850 mg/100g y el magnesio de 192 a 292 mg/100g con base seca (Bano y Rajathnam, 1979).

1.3.3 Ciclo de vida de *Pleurotus*

El ciclo de vida de *Pleurotus* inicia con la germinación de las basidiosporas, las cuales originan el micelio primario, es decir, un conjunto de hifas septadas uninucleadas con capacidad de crecimiento indefinido pero incapaz de completar el ciclo de vida, por

lo que se hace necesaria la fusión de dos micelios primarios compatibles para que se forme el micelio secundario o dicariótico. Este se caracteriza por presentar hifas septadas con dos núcleos y por la presencia de estructuras en forma de gancho, llamadas fíbulas, las que permiten mantener el estado dicariótico del micelio. El micelio dicariótico también es capaz de mantenerse en crecimiento indefinido. En ciertas condiciones ambientales y por control genético (ciclo sexual) se induce la formación del micelio terciario o cuerpo fructífero. En el micelio terciario es donde se forman los basidios, estructura de reproducción sexual en la cual ocurre la cariogamia y rápidamente sufre la división reductora para la formación de 4 esporas en cada basidio y completar así el ciclo (figura 1).

1.3.4 Ciclo sexual

Pleurotus presenta un ciclo sexual heterotálico tetrapolar, es decir, que para completar el ciclo de vida es necesaria la fusión o plasmogamia de dos micelios primarios (talos) compatibles y la formación del micelio dicariótico con capacidad de reproducción. Este ciclo está controlado por dos mecanismos: la distribución de los cuatro núcleos posmeióticos en las basidiosporas, y un sistema de apareamiento, controlado por los factores genéticos conocidos como sistema de incompatibilidad.

Existen dos sistemas de incompatibilidad: unifactorial, en el cual la sexualidad está controlada por un solo factor A, con múltiples alelos, y el sistema bifactorial en donde el control está dado por dos factores genéticos no ligados con segregación independiente, A y B, cada uno con múltiples alelos. Estos sistemas son denominados bipolar y tetrapolar, respectivamente, dados por los patrones de fertilidad entre sus progenies en cada sistema. El micelio monocariótico lleva un solo alelo de cada uno de los factores de incompatibilidad y es infértil o autoestéril. La fertilidad resulta cuando dos núcleos con diferentes alelos de cada factor están presentes en los micelios monocarióticos a aparearse, para formar un micelio dicariótico fértil. Se fusionan los dos núcleos en el basidio y se dividen meióticamente. Los alelos de incompatibilidad se segregan y son llevados en los núcleos posmeióticos hacia la espora. Cada basidio forma cuatro esporas y cada una de ellas recibe un núcleo posmeiótico, las que desarrollan un micelio autoestéril con un solo núcleo posmeiótico y un tipo de

incompatibilidad.

En el sistema tetrapolar los factores de incompatibilidad A y B controlan distintas partes del ciclo sexual pero en forma coordinada. El factor A regula el apareamiento nuclear y la formación de la fibula, mientras que el factor B controla la migración nuclear y fusión de la hifa. Si un apareamiento presenta alelos diferentes en el factor A pero no en B ocasiona una hemincompatibilidad, en donde no ocurre migración nuclear y se forma un heterocarión infértil compuesto de hifas con puntas dicarióticas pero con células subterminales monocarióticas y pseudofibulas (no hay fusión de fibula con célula subterminal y se atrapa un núcleo hijo después de cada división). Por el contrario, en un apareamiento con idéntico factor A y diferente B se forma un heterocarión infértil con células multinucleadas, sin fibulas y crecimiento anormal. Finalmente si en ambos factores se presentan diferentes alelos se da la compatibilidad completa y resulta un dicarión no restringido, fértil con fibulas (Raper, 1978).

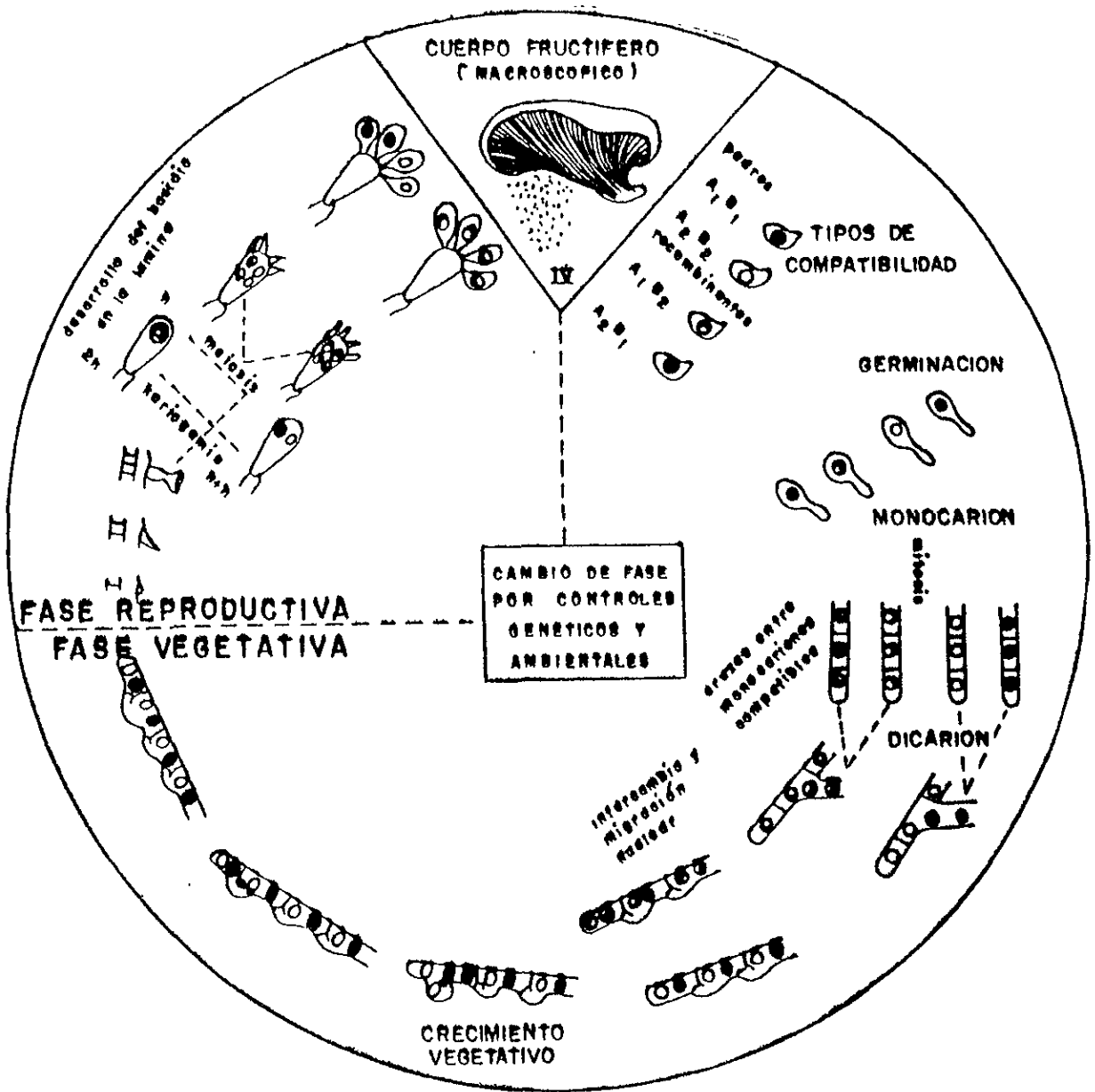


Figura 1. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus* (Ramírez-Carrillo, 1989)

1.4 OBTENCIÓN DE CEPAS MEJORADAS DE *Pleurotus* spp.

Se ha demostrado que *Pleurotus* tiene un gran potencial para ser cultivado en residuos agroindustriales (Zadrazil, 1978; Zadrazil y Dube, 1992) lo que ha permitido un incremento considerable en la producción nacional de este hongo (Sobal, 1997). Sin embargo, se hace necesario la obtención de nuevas cepas más eficientes y de mejor calidad. Sería posible reducir costos de producción al proveer cepas con fructificación temprana, altos rendimientos con cortos períodos de cultivo y esporóforos más grandes.

Cuando nuevas variedades son obtenidas por hibridación, dada su naturaleza dicariótica, éstas presentan 2 grupos de genes genéticamente diferentes, cada uno de ellos aportado por los progenitores. Mientras mayor sea la diferencia entre el material genético de los progenitores, mayor será la capacidad de adaptación del dicarion resultante, porque los diferentes genes se complementarán uno al otro permitiendo al híbrido adaptarse ampliamente a diferentes condiciones ambientales (Eger, 1978).

1.4.1 Apareamientos monocarion-monocarion

El método convencional para el mejoramiento genético de las cepas de *Pleurotus* consiste en fructificar las cepas que van a ser mejoradas para obtener la progenie monocarióticas, producto de la meiosis de los núcleos dicarióticos. Se realizan cruzamientos entre micelios monocarióticos en todas las combinaciones posibles para obtener los híbridos, los que se prueban en función de las características que se desean mejorar (Eger, 1978). Aún cuando este método resulta sumamente tardado ha sido utilizado y con éxito para la obtención de cepas mejoradas (Martínez-Carrera *et al.*, 1986) y en estudios genéticos sobre fructificación (Li, 1980) y la degradación de lignina (Ramírez-Carillo *et al.*, 1991).

1.4.2 Apareamientos dicarion-monocarion

Otra metodología para obtener cepas mejoradas es por medio de apareamientos dicarion-monocarion o también llamado "Fenómeno Buller" (Raper, 1966), que consiste en la dicarionización de un micelio monocariótico utilizando un dicarion, en lugar de un monocarion. Esto ocurre siempre y cuando alguno o ambos núcleos del dicarion sean

compatibles con el monocarión, el que presentará fíbulas, características del dicarión en *Pleurotus*.

1.4.3 Apareamientos entre neohaplontes

Un método alternativo es la separación de los dos componentes monocarióticos de una cepa dicariótica con características deseadas, por ejemplo altos rendimientos o ciertas morfologías. El micelio monocarión obtenido después del proceso de desdicarionización es llamado neohaplonte, término aplicado por Fries y Aschan (1952) para designar al micelio monocariótico derivado de un dicarión sin la intervención de la cariogamia y meiosis. Estos componentes monocarióticos en principio contienen la información genética de los fenotipos que presenta el dicarión seleccionado. Cuando se obtienen los diferentes neohaplontes de cada cepa dicariótica seleccionada y se cruzan entre sí, 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.

La separación artificial de los dicariones o desdicarionización se ha estudiado por métodos mecánicos y químicos (Fries y Aschan, 1952; Kerruish y Da Costa, 1963). Sin embargo, con la mayoría de estos métodos la separación no es simétrica, es decir, solo se obtiene un solo monocarión mientras que el otro se pierde por el manejo de las hifas o por la acción de los agentes químicos empleados.

Con el desarrollo de la técnica que hace uso de una solución de peptona como medio para propiciar la desdicarionización, se lograron obtener los dos componentes monocarióticos y no se observaron mutantes en el comportamiento y morfología de los neohaplontes (Leal-Lara, 1980). Este método se implementó para poder estudiar genéticamente a cepas que no presentan una producción de basidiosporas. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes que indiquen la obtención de cepas dicarióticas híbridas de *P. ostreatus* por medio de apareamientos entre neohaplontes.

1.4.4 Identificación de cepas mejoradas

Durante mucho tiempo se intentó seleccionar cepas altamente productivas identificando aquellas con una alta velocidad de crecimiento vegetativo en diferentes medios de cultivo, con agar o sustrato lignocelulósicos. Se ha observado que este parámetro no está correlacionado con una alta productividad en sustrato lignocelulósico (Chang y Miles, 1982). Una forma de incrementar el éxito en los programas de mejoramiento genético de *Pleurotus* podría ser por medio de la identificación de cepas desreguladas en su metabolismo, en particular con una represión por carbono deficiente y que esta desregulación le confiera alguna característica deseada. Estas cepas por lo general, se caracterizan por presentar un metabolismo más acelerado permitiendo la expresión de genes importantes para la asimilación de nutrientes y para la producción de biomasa, lo que podría redundar en una mayor agresividad y productividad. Un compuesto que ha sido empleado para seleccionar cepas desreguladas en hongos filamentosos es la 2 desoxiglucosa (2DG), un análogo tóxico de la glucosa el cual no puede ser metabolizado mas allá de 2-desoxiglucosa-6-fosfato, que al acumularse no permite que la glucosa y otros azúcares fácilmente asimilables sean metabolizados. Esta falta de energía ocasiona que ocurra lisis celular al ser degradada y modificada la estructura de la pared celular.

Las cepas resistentes a 2 desoxiglucosa presentan diferentes tipos de alteraciones en el sistema de transporte o en funciones de la hexocinasa o fosfatasa (Moore, 1981; Allen *et al.*, 1989). Se han producido mutantes resistentes a 2DG con diferentes hongos y se ha observado que cepas resistentes de *Neurospora crassa* presentan incrementos en sus niveles de amilasa y sacarasa (Allen *et al.*, 1989). En *Aspergillus niger* producen ácido cítrico más rápidamente que cepas parentales sensibles (Kirimura *et al.*, 1992) y en *Rhizopus* producen niveles más altos de glucoamilasa (Tani *et al.*, 1988). En levaduras se han obtenido cepas con mayor producción de amilasa, las que presentan una disminución en la actividad glucocinasa pero un incremento en la hexocinasa. (De Mot y Verachtert, 1987).

En 1996, Sánchez y Viniegra-Gonzalez detectaron cepas resistentes de *Pleurotus ostreatus*. Aquéllas que lograron crecer en un medio con 2DG presentaron

una fructificación temprana y el doble de productividad media en comparación con cepas que no desarrollaron micelio. Sin embargo, solo emplearon 6 cepas de *Pleurotus ostreatus*, por lo que se hace necesario implementar una metodología que pueda ser utilizada para otras especies de *Pleurotus* que pueden ser confundidas como *P. ostreatus* y que son empleadas en procesos comerciales. La carencia de estudios sobre el género *Pleurotus* ha ocasionado problemas en la identificación de las cepas comerciales, en donde solo se emplean sin importar la especie utilizada, ya que hasta la fecha no es posible una definición exacta del concepto de especie en este género (Vilgalys, 1993).

El cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* requiere la disponibilidad de una variedad de cepas que mejoren los procesos productivos y por ende una baja en los costos de producción, por lo que los objetivos de este trabajo fueron:

OBJETIVO GENERAL:

Obtener cepas mejoradas de *Pleurotus* spp. en su patrón de producción, con menor tiempo para el inicio de la fructificación y de cosecha, mayor rendimiento máximo y tasa de producción, color y peso promedio de los esporóforos, a través de apareamientos entre neohaplontes.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Identificar y elegir las cepas de *Pleurotus* spp. que presenten las mejores características de producción en paja de trigo.
2. Recuperar los componentes monocarióticos (neohaplontes) de las cepas de *Pleurotus* spp. elegidas.
3. Obtener híbridos por medio del apareamientos entre neohaplontes de las cepas de *Pleurotus* spp. elegidas.
4. Determinar la resistencia de las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp. a la 2DG.
5. Evaluar una eventual correlación entre las características de producción en paja de trigo y la resistencia a 2DG de las cepas de *Pleurotus* spp.
6. Seleccionar híbridos de *Pleurotus* spp. resistentes a 2DG y evaluar las características de producción.
7. Evaluar la naturaleza genética del carácter de resistencia a 2DG en cepas híbridas de *Pleurotus* spp.

HIPOTESIS

1. Mediante apareamientos entre neohaplontes se obtendrán híbridos de *Pleurotus* spp. con mejores características que los parentales.
2. Será posible correlacionar la resistencia a 2DG con ciertas características de producción en paja de trigo de *Pleurotus* spp.
3. El análisis de la progenie monocariótica permitirá determinar el tipo de segregación del carácter de resistencia a 2DG en *Pleurotus* spp.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas de *Pleurotus* spp.

Las cepas de *Pleurotus* spp. empleadas en este estudio se muestran en la Tabla 1, en donde se presenta la especie y su origen. Se conservan en refrigeración a temperatura de 4 °C sobre extracto de malta con agar y se encuentran depositadas en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

Tabla 1. Cepas de *Pleurotus* spp. empleadas.

CEPA	ESPECIE	CLAVE INTERNA	ORIGEN
P5	<i>P. ostreatus</i>	DPQ	Comercial de Quebec, Canadá
P8	<i>P. ostreatus</i>	Eger	Comercial de Somyce!
P10	<i>P. ostreatus</i>	Gyrko H-1	Comercial de Polonia
P11	<i>P. ostreatus</i>	INIREB-8	Silvestre de Veracruz
P13	<i>P. ostreatus</i>	MB	Comercial de México
P14	<i>P. ostreatus</i>	8x3 (Eger)	Comercial de Alemania
P15	<i>P. ostreatus</i>	Eger	Comercial de Italia (Pleos)
P17	<i>P. ostreatus</i>	PRL3009	Comercial de Canadá
P18	<i>P. sajor-caju</i>	PRL2725	India
P19	<i>P. sapideus</i>	PRL2705	Comercial E.U.A
PIA	<i>P. ostreatus</i>	Veracruz	Comercial
PCM	<i>P. ostreatus</i>	Veracruz	Comercial
PI8	<i>P. ostreatus</i>	Veracruz	Comercial
IBUG-3	<i>P. djamor</i>	Jalisco	Silvestre
IBUG-8	<i>P. djamor</i>	Jalisco	Silvestre
IBUG-28	<i>P. djamor</i>	Rep. Dominicana	Silvestre
IBUG-67	<i>P. djamor</i>	Veracruz	Silvestre

2.2 Medios de cultivo

2.2.1 Medio de extracto de malta con agar (EMA)

Para preparar 500 ml de extracto de malta agar, se agregaron 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar a un matraz erlenmeyer de un litro. Se adicionaron 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. Se tapó el matraz y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vació en caja petri de plástico con un diámetro de 9 cm. Una vez solidificado el medio se incubaron las cajas con medio de cultivo a 28°C durante 24 h para prueba de esterilidad. Las cajas estériles se guardaron en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

2.2.2 Medio de extracto de malta desproteínizado con agar (DPMA)

Se preparó primeramente una solución concentrada de extracto de malta desproteínizado. Para ello se pesaron 20 g de extracto de malta y se disolvieron en 250 ml de agua destilada. Se midió el pH de la solución anterior y se elevó 1.5 unidades con una solución de NaOH 1N. Después se adicionaron 1.4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se mezcló y esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Una vez frío se filtró para obtener la solución desproteínizada. Posteriormente se tomaron 75 ml del filtrado y se mezclaron con 425 ml de agua destilada y 10 g de agar. Se dejó reposar durante 20 minutos y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vació en cajas petri de plástico y se guardaron en bolsas de polietileno.

2.2.3 Medio de agar agua (AA)

Para preparar 500 ml de medio se pesaron 10 g de agar en una matraz erlenmeyer de 1 litro de capacidad y se adicionaron 500 ml de agua destilada. Se tapó el matraz y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vació en cajas petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio en las cajas de petri se guardaron en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

2.2.4 Medio de almidón con 2 desoxiglucosa (2DG)

Para preparar el medio de almidón con 2DG primero se preparó una solución de sales minerales. En 500 ml de agua destilada se disolvieron las siguientes sales en el orden indicado

SALES	CANTIDAD
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
KH_2HPO_4	0.8 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
Citrato férrico amoniacal	5.0 mg
CaCl_2	20.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.89 g

Las últimas dos sales se disolvieron por separado e integran al volumen total de un litro. Se ajustó el pH a 4.5, se adicionaron 20 g de agar y 10.5 de almidón soluble (Mallinkroft) por cada litro de solución de sales. Finalmente se adicionó la 2DG en diferentes concentraciones (0, 0.01, 0.05 y 0.1 g/l), se dejó reposar durante 20 minutos y esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vertió en cajas petri de plástico y se guardaron en bolsas de polietileno.

2.2.5 Solución desdicarizadora

En un litro de agua destilada se disolvieron 20 g de glucosa anhidra y se agregó 20, 30 g de peptona de carne P (Oxoid) ó 4g/l de glicina. De esta solución se tomaron 50 ml que se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml, se taparon y esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

2.3 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA CARACTERIZACION DE LAS CEPAS

2.3.1 Obtención de crecimiento vegetativo

Para obtener crecimiento vegetativo en medio de cultivo sólido, cajas de petri con medio EMA o AA fueron inoculadas con fragmentos de agar cubiertos de micelio, se

incubaron en oscuridad a 28 °C, hasta que invadió toda la superficie del medio. Para el medio de almidón la inoculación se realizó con puntas de pipeta automática con 7 mm de diámetro.

2.3.2 Inducción de la fructificación

Para obtener fructificaciones se inocularon en el centro 4 cajas petri con medio EMA de las cepas dicarióticas, se incubaron a 28 °C hasta que el micelio invadió el medio de cultivo. En este momento los micelios fueron inducidos a fructificar al ser expuestos a la luz natural. Se dejaron en estas condiciones hasta que inició la formación de primordios. Se retiró la tapa a la caja de petri y la base se colocó dentro de una bolsa de plástico que contó con 4 perforaciones, aproximadamente a 2 cm de la base, para permitir el intercambio gaseoso. La humedad relativa dentro de la bolsa se elevó colocando algodón a lo largo de la bolsa y se adicionó agua en el fondo de la bolsa. Las cajas fueron expuestas a la luz natural y a la temperatura ambiente, para permitir el desarrollo de las fructificaciones.

2.3.3 Sustrato lignocelulósico

2.3.3.1 Preparación de inóculo

La elaboración del inóculo se realizó con granos de trigo, los cuales se lavaron y cocieron durante 50 minutos. Después se drenó el exceso de agua caliente y se enfrió con el chorro del agua. Ya frío el grano se drenó el exceso de agua fría y se adicionó CaSO_4 al 1.3% y CaCO_3 al 0.3%. Posteriormente se colocaron 500 g de trigo por bolsas de polipapel y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 2 horas. Cuando el grano esterilizado estuvo frío se inoculó con un cultivo en agar de la cepa y se incubó a 28 °C hasta que el micelio los cubrió.

2.3.3.2 Preparación del sustrato lignocelulósico

El sustrato empleado fue paja de trigo picada en trozos de 5 cm de longitud aproximadamente, la cual se humedeció a saturación y apiló en montones de 2 m de altura. Se dejó reposar durante 24 horas y se pasteurizó mediante la inyección de vapor hasta alcanzar una temperatura de 80 °C durante 1 hora.

2.3.3.3 Siembra del sustrato y cosecha de esporóforos

Cuando el sustrato esterilizado presentó una temperatura de 28 °C la paja pasteurizada fue empacada en 4 bolsas de plástico de 40 cm de ancho x 60 cm de largo, con 5 kg de paja húmeda cada una para cada cepa. La inoculación se realizó con una mezcla de forma homogénea de 5 g inóculo por 100 g de sustrato húmedo. Las bolsas ya inoculadas, fueron introducidas en el cuarto de incubación a una temperatura de 28 °C, sin iluminación, en donde tuvo lugar la propagación vegetativa del micelio en el sustrato, hasta que lo invadió completamente.

Después de aproximadamente 15 días, de haber inoculado las bolsas, aparecieron los primeros brotes o primordios en el micelio, trasladándose las bolsas al cuarto de fructificación en donde las condiciones ambientales fueron las adecuadas para el desarrollo de los cuerpos fructíferos. La temperatura de dicho cuarto se mantuvo entre 15 y 20 °C, la humedad relativa entre 90 y 95 % con una iluminación de 12 h/día y una ventilación continua para mantener la concentración de CO₂ por debajo de los niveles inhibitorios de la fructificación. Las bolsas con sustrato fueron colocadas de manera aleatoria para eliminar el efecto de las posibles variaciones en las condiciones ambientales en el cuarto sobre las diferentes cepas. Después de que el micelio colonizó al sustrato se quitó la bolsa de plástico y éste fue expuesto a las condiciones ambientales. La cosecha se realizó en el momento en que los esporóforos alcanzaron su máximo tamaño, mientras mantenían aún una apariencia fresca.

Para evaluar la productividad en cada una de las cepas se registró el número y el peso de los hongos obtenidos por bolsa y por día de corte. Se determinó el tamaño de los esporóforos al dividir el peso de las cosechas entre el número de esporóforos, y el color que presentaron. Se determinó el patrón de producción, es decir, el tiempo en días en que transcurrieron para la aparición de la primera cosecha y los días que transcurrieron en obtener las cosechas en el rendimiento máximo.

La eficiencia biológica fue calculada mediante la siguiente fórmula (Tschierpe y Hartmann, 1977).

$$\text{Eficiencia biológica (EB)} = \frac{\text{peso total de hongos frescos}}{\text{peso seco del sustrato}} \times 100$$

La tasa de producción se calculó como el valor que se obtuvo al dividir la EB entre el tiempo de incubación del hongo en el sustrato y el tiempo requerido para obtener las fructificaciones hasta el último corte ({hongos frescos/sustrato seco} por día) (Royse, 1989).

$$\text{Tasa de producción (TP)} = \frac{\text{EB}}{\text{Tiempo incubación} + \text{Tiempo fructificación}}$$

2.4 Condiciones para la producción de micelios monocarióticos

2.4.1 Producción de neohaplontes

Para la producción de neohaplontes se vigorizaron las cepas dicarióticas en medio de extracto de malta con agar. Se obtuvo una suspensión de fragmentos de hifas por homogeneización. Para ello el micelio resultante de tres cultivos en EMA con cerca de 4 cm de diámetro se colocó en un homogeneizador estéril previamente frío (4 °C) y se adicionaron 50 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente, el micelio se homogeneizó por 1.5 o 2.5 min a la velocidad más alta. Se inoculó la solución desdicarizadora con 20 o 50 µl de la suspensión de fragmentos de hifas y se incubó a 24 °C hasta ver la formación de colonias.

Cuando los micelios fueron visibles en la solución desdicarizadora algunos pellets fueron observados bajo el microscopio para buscar si presentaron o no fíbulas. Se homogeneizó nuevamente esta solución durante 1.5 o 2.5 a alta velocidad en condiciones estériles. Se procedió a distribuir 20 µl del homogeneizado sobre cajas de petri con 10 ml de medio EMA y se incubó a 24 °C hasta la aparición de colonias aisladas. Después de haber examinado al microscopio para observar la presencia o ausencia de fíbulas, se aislaron las colonias que no presentaban fíbulas y se incubaron a 28°C hasta obtener crecimiento en donde se verificó la ausencia de fíbulas.

2.4.2 Aislamiento de micelios monospóricos

De las fructificaciones obtenidas en paja de trigo se colectaron las esporas de cada una de las cepas. En una caja de petri con papel filtro estéril se colocó la fructificación de tal forma que las esporas se depositaron sobre el papel por medio de la gravedad. Después de 12 a 24 h se quitó el cuerpo fructífero y el papel se deshidrató en una estufa a 28 °C durante 12 h, posteriormente se colocaron en una bolsa de plástico con silica gel. Las esporadas se almacenan en refrigeración a 4 °C.

Para el aislamiento de micelios monospóricos se cortó un centímetro cuadrado de la esporada, aproximadamente. Por medio de diluciones con agua destilada estéril se obtuvieron 30 esporas por cada 20 µl de suspensión. Diez cajas de petri con medio DPMA fueron inoculadas con 20 µl de la suspensión de esporas y se incubaron a 28 °C durante 2 días para que germinaran las esporas. A partir de este momento se examinó todos los días y durante 10 días todas las cajas con la ayuda de un estereoscopio y se transfirieron todas las esporas que germinaron a cajas petri con medio DPMA. Posteriormente se comprobó al microscopio la ausencia de fíbulas en los cultivos recuperados y se sembraron en medio fresco de manera individual para aislar los micelios de cada una de las esporas por separado y fueron preservados en refrigeración a 4°C.

Con el objeto de clasificar la progenie en sus cuatro tipos de apareamiento, primeramente se tomaron 10 micelios monocarióticos y se aparearon en todas las combinaciones posibles. Si se encontraron los cuatro tipos, se tomó un monocarión de cada tipo y se designó como monospórico "prueba" y se apareó con el resto de la progenie. Si sólo se detectaron tres tipos, se tomó un monospórico de cada tipo y se aparearon con un segundo grupo de 10 micelios monospóricos. Los monospóricos del cuarto tipo siempre se encontraron después de evaluar el segundo grupo de 10 monospóricos.

2.5 Apareamientos y determinación de apareamientos positivos

Para hibridizar neohaplontes o monospóricos se cortó un cuadro de agar de 0.5 x

0.5 cm de lado de la periferia de una colonia en crecimiento. Para el caso del fenómeno Buller, se cortó un cuadro de agar del neohaplonte se incubó a 28 °C durante 2 días y posteriormente se cortó un cuadro de agar del dicarion. En ambos tipos de apareamientos, monocarion-monocarion y dicarion-monocarion, los fragmentos de agar se colocaron en una caja de petri con medio DPMA lo mas cercano posible. Por lo general se realizaron en una misma caja de petri de 5 a 6 cruza. A continuación se incubaron a 28°C durante 5-6 días y se observó al microscopio. Una cruza se determinó como positiva cuando al observar al microscopio se apreciaron fíbulas. Para evitar errores se consideró que la cruza es positiva cuando estas estructuras fueron observadas por lo menos en tres diferentes puntos situados de manera equidistantes en la periferia de la colonia. Las fíbulas son estructuras que se forman únicamente cuando se llevó a cabo la fusión celular (plásmogamia) y una reproducción mitótica coordinada de los núcleos monocarióticos de las cepas hibridizadas. Esto implica que los dos micelios monocarióticos apareados fueron compatibles y por lo tanto dieron origen a la formación de un dicarion.

2.6 Evaluación de la resistencia a la 2DG

2.6.1 Propagación en medio de almidón con 2DG

Para la caracterización de cepas en medio de almidón con diferentes concentraciones de 2DG, se obtuvieron cultivos de cada cepa en medio AA para que así el inóculo no enmascare el efecto de la 2DG sobre el crecimiento del micelio. Ya que se obtuvo micelio sobre AA, se cortaron círculos de 7 mm de diámetro con puntas de pipeta automática y se depositaron sobre medio de almidón con 2DG. Se realizaron tres replicas por cepa y concentración de 2DG. Una vez inoculadas las cajas de petri con los diferentes medios de cultivo se incubaron a 28°C, se midió el avance del crecimiento micelial cada día durante 7 días para determinar la velocidad de crecimiento en mm/día.

2.6.2 Determinación de biomasa producida

El crecimiento de las cepas en los diferentes medios de cultivo a los 7 días de incubación fue determinado por medio de la producción de biomasa. Para ello el micelio

desarrollado en el medio de cultivo se desprendió de la caja de petri con una espátula y se colocó en un vaso de precipitado, se le agregaron 100 ml de agua destilada y se fundió en horno de microondas. Posteriormente el micelio fue separado del agar por medio de papel filtro Whatman número 1, previamente secado durante 24 horas a 60 °C y pesado. La biomasa se determinó por peso seco. Las muestras permanecieron 24 horas a 60 °C, transcurrido este tiempo se pesaron las muestras y la producción de biomasa fue calculada por diferencia de peso.

2.6.3 Determinación de la resistencia a 2DG

Después de haber determinado la velocidad de crecimiento y producción de biomasa en los medios de cultivo de almidón se determinó la resistencia de las cepas a la 2DG al dividir la velocidad de crecimiento (mm/día) y la biomasa formada (mg/caja) en el medio de almidón con diferentes concentraciones de 2DG sobre el medio testigo sin 2DG. Para ambos casos se trató de encontrar una posible correlación entre los parámetros de producción y la resistencia a 2DG, por medio de un análisis de regresión y correlación.

2.7 Análisis de datos

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente, efectuando análisis de varianza y pruebas de rango múltiple en cada uno de los parámetros estudiados para establecer las diferencias significativas existentes. Se utilizó el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales para Computadoras Personales con sus siglas en inglés SPSS/PC+.

III. RESULTADOS

El inicio de un programa de mejoramiento genético para el desarrollo de cepas mejoradas de *Pleurotus* para el cultivo comercial requiere de una selección previa de dicariones altamente productivos. Por ello se obtuvieron cepas de diversas colecciones. Se partió de un conjunto de 17 cepas comerciales y silvestres de *Pleurotus* spp. que fueron cultivados en paja de trigo para determinar el tiempo del inicio de la fructificación, tiempo de cosecha, rendimiento máximo, tasa de producción, color y peso promedio de los esporóforos.

3.1 CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS DICARIOTICAS DE *Pleurotus* spp. EN PAJA DE TRIGO.

3.1.1 Inicio de la fructificación

En la Tabla 2 se reportan los días transcurridos para el inicio de la fructificación de las diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Se puede observar que éste fue entre 21 y 54 días. Con el análisis de varianza y la prueba de Duncan ($p < 0.05$) se separaron en cinco grupos con diferencias significativas entre ellos. Las cepas más precoces fueron IBUG-28, P18, IBUG-3 e I8P, que iniciaron la fructificación entre los 21 y 23 días. En el siguiente grupo se encontraron a P13, P5, IAP, e IBUG-8 con 26, 28, 28 y 32 días de incubación para obtener la primera cosecha. Las cepas P14, PCM, IBUG-67, P8 y P10 se caracterizaron por presentar una fructificación tardía con 46, 49, 50, 53 y 54 días, respectivamente.

3.1.2 Producción semanal y total

Los esporóforos se cosecharon y pesaron con la finalidad de determinar el rendimiento de las cepas. En las Tablas 3a y 3b se muestran las producciones semanales y totales de las diferentes cepas de *Pleurotus* spp. obtenidas durante 20 semanas que duró la producción. En general, el mayor porcentaje de producción se obtuvo durante las primeras semanas y fue disminuyendo conforme avanza el tiempo de producción. Como se aprecia, la producción total fue desde 481g para la cepa P19, hasta 1369 g para PCM. Al realizar el análisis estadístico con los datos de producción

total se determinaron 2 grupos (Duncan $p < 0.05$). Las cepas P19, P15, P11 presentaron las producciones mas bajas con 481, 691 y 964 g, respectivamente y el resto con valores mayores sin observarse diferencias significativas entre ellas.

TABLA 2. INICIO DE LA FRUCTIFICACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus spp.* SOBRE PAJA DE TRIGO.

CEPA	INICIO DE LA FRUCTIFICACION (días)
IBUG-28	21.2 ± 0.5 a *
P18	21.5 ± 1.7 a
IBUG-3	21.5 ± 0.5 a
I8P	22.7 ± 0.9 a
P13	25.7 ± 3.4 b
P5	27.7 ± 3.5 b
IAP	28.2 ± 3.3 b
IBUG-8	32.0 ± 6.2 b
P11	41.0 ± 8.2 c
P15	43.5 ± 6.3 d
P17	43.5 ± 1.9 d
P19	43.7 ± 7.5 d
P14	46.0 ± 13.4 e
PCM	49.0 ± 3.1 e
IBUG-67	50.0 ± 9.7 e
P8	53.7 ± 6.1 e
P10	54.0 ± 4.5 e

* Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las cepas (Duncan $p < 0.05$)

3.1.3 Producción semanal acumulada

En las Tablas 4a y 4b se reportan las producciones semanales acumuladas, en g de hongo fresco por 5 kg de sustrato húmedo, correspondientes a cada una de las diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Se realizó un análisis estadístico y con la prueba de LSD ($p < 0.05$) se determinó el periodo mínimo de producción es decir, el tiempo en que se alcanzó el rendimiento máximo significativo para cada cepa, después del cual ya no es conveniente continuar la producción pues la cosecha adicional no producía un aumento significativo. Se observaron diferencias significativas entre las primeras semanas de producción de una misma cepa, lo que significa que no es necesario prolongar el periodo de cosecha. Las cepas de *Pleurotus* spp. que tardaron menos tiempo en obtener su rendimiento máximo fueron P19, P10, P15 con 4, 5 y 6 semanas; P8, P11 y PCM con 7 semanas; IBUG-8 con 8; P13, P14 P18 y I8P necesitaron 9 semanas de producción. Por otro lado, IAP tardó 10 semanas; P5 y P17 con 11 semanas. Las que necesitaron periodos de producción más largos fueron IBUG-67, IBUG-28 e IBUG-3 con 12, 13 y 16 semanas, respectivamente.

3.1.4 Características de fructificación en el rendimiento máximo significativo

Para observar las diferencias en los máximos rendimientos significativos de las cepas de *Pleurotus* spp. y poder definir cuales fueron las más productivas en una cantidad de semanas menor, se realizó un análisis de varianza con pruebas de medias. Con el rendimiento máximo significativo se determinó la eficiencia biológica y el tiempo de fructificación. Otros parámetros evaluados, importantes en la fructificación, fueron el color y peso unitario de los esporóforos de las cepas de *Pleurotus* spp.

TABLA 3a. PRODUCCIÓN SEMANAL Y TOTAL* DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus* spp. SOBRE PAJA DE TRIGO

SEMANA	CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp.								
	P5	P8	P10	P11	P13	P14	P15	P17	P18
1	348±249	305±373	755±226	114±228	610±69	167±162	97±171	447±215	625±142
2	21±43	248±288	0±0	268±275	132±187	31±37	130±196	89±134	203±60
3	98±100	0±0	0±0	139±242	37±74	99±198	0±0	62±97	30±60
4	91±182	142±171	279±194	138±93	77±90	22±26	128±128	5±11	30±60
5	0±0	147±294	75±150	25±32	14±29	100±200	90±104	19±39	56±65
6	82±80	83±167	0±0	55±79	68±27	0±0	47±95	15±30	0±0
7	1±3	98±144	93±110	48±56	63±126	244±295	5±10	55±101	41±49
8	154±184	116±136	41±49	72±47	27±54	1±3	81±163	187±112	0±0
9	39±78	13±18	0±0	0±0	101±45	77±92	14±29	0±0	76±94
10	100±109	33±61	0±0	11±22	0±0	64±128	5±9	60±65	56±64
11	54±59	18±37	50±50	13±27	16±19	7±15	45±31	28±85	1±2
12	53±34	48±34	33±5	16±22	0±0	34±36	0±0	65±83	0±0
13	0±0	16±32	19±17	0±0	52±59	34±27	0±0	25±20	27±34
14	57±38	12±9	4±5	15±29	0±0	65±81	0±0	21±43	30±26
15	34±39	11±18	13±26	0±0	57±34	74±66	43±62	25±30	29±35
16	12±15	0±0	1±2	0±0	0±0	31±42	0±0	20±18	17±25
17	36	0±0	0±0	15±30	0±0	14±29	0±0	41±54	0±0
18	9±14	0±0	0±0	0±0	0±0	23±27	0±0	0±0	3±5
19	21±28	0±0	0±0	0±0	23±26	0±0	0±0	0±0	0±0
20	0±0	0±0	0±0	0±0	15±30	0±0	0±0	0±0	0±0
TOTAL	1218±159	1297±185	1365±203	964±152	1298±160	1094±247	691±102	1174±100	1229±205

* g de hongos frescos/ 5 kg de sustrato húmedo (humedad = 73.2 %) durante 20 semanas

TABLA 3b. PRODUCCIÓN SEMANAL Y TOTAL* DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus* spp. SOBRE PAJA DE TRIGO

SEMANA	CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp.							
	P19	I8P	IAP	PCM	IBUG-3	IBUG-8	IBUG-28	IBUG-67
1	144±95	641±44	502±293	479±373	344±69	173±347	259±69	227±281
2	34±43	26±52	167±335	5±10	21±36	332±363	7±4	61±122
3	0±0	165±70	202±181	58±116	144±140	259±275	156±125	133±156
4	130±90	0±0	0±0	302±111	33±49	101±122	34±69	45±91
5	0±0	12±25	147±29	0±0	33±54	45±90	6±13	27±54
6	0±0	95±109	27±55	0±0	78±100	125±74	9±19	120±92
7	23±29	0±0	16±32	224±212	61±96	12±25	114±127	0±0
8	59±71	56±65	78±33	49±98	82±67	54±76	30±35	40±80
9	36±72	94±88	0±0	55±45	68±75	54±39	69±25	67±99
10	0±0	0±0	28±57	0±0	28±41	0±0	3±6	99±124
11	0±0	0±0	76±39	67±51	4±8	21±36	127±84	67±77
12	0±0	0±0	0±0	6±13	14±10	0±0	6±13	51±103
13	0±0	4±9	44±33	69±59	67±30	33±41	82±62	98±69
14	2±5	0±0	28±23	13±26	0±0	0±0	0±0	0±0
15	28±48	53±53	3±6	16±21	32±39	61±63	15±19	52±66
16	22±45	21±43	25±22	22±31	118±44	1±2	28±22	0±0
17	0±0	9±18	8±17	0±0	0±0	3±7	47±55	87±107
18	0±0	20±40	10±21	0±0	0±0	1±3	32±37	0±0
19	0±0	18±36	0±0	0±0	0±0	15±31	16±33	0±0
20	0±0	0±0	0±0	0±0	49±43	0±0	9±11	0±0
TOTAL	481±152	1217±183	1359±139	1369±197	1183±157	1297±71	1059±137	1180±168

* g de hongos frescos/ 5 kg de sustrato húmedo (humedad = 73.2 %) durante 20 semanas

TABLA 4a. PRODUCCIÓN SEMANAL ACUMULADA* DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus spp.*

SEMANA	CEPAS DE <i>Pleurotus spp.</i>							
	P5	P8	P10	P11	P13	P14	P15	P17
1	348±249 a	305±373 a	755±226 a	114±228 a	610±69 a	167±162 a	97±171 a	447±215 a
2	370±209 a	553±163 b	755±226 a	382±255 b	743±140 b	198±138 a	227±185 b	537±89 b
3	469±295 b	553±163 b	755±226 a	522±35 c	780±144 c	297±225 b	252±223 c	600±138 b
4	561±168 c	696±296 c	1034±171 b	660±91 d	857±222 c	320±200 c	356±154 d	606±132 b
5	561±168 c	843±286 d	1109±162 c	686±112 e	872±242 c	420±227 d	446±225 e	625±119 b
6	643±177 d	927±211 e	1109±162 c	741±64 f	941±261 d	420±227 d	494±145 f	641±98 b
7	645±178 d	1025±141 f	1203±229 c	789±106 g	1004±191 e	664±344 e	499±138 f	696±114 c
8	799±164 e	1142±133 f	1244±201 c	862±147 g	1031±155 f	666±343 e	581±176 f	884±70 d
9	838±120 f	1156±148 f	1244±201 c	862±147 g	1133±159 g	743±282 f	595±152 f	884±78 d
10	938±149 g	1189±96 f	1295±236 c	874±146 g	1133±159 g	807±282 f	601±143 f	944±138 e
11	993±144 h	1208±91 f	1295±236 c	887±151 g	1150±156 g	815±275 f	647±92 f	973±120 f
12	1046±145 h	1257±93 f	1328±239 c	904±158 g	1150±156 g	849±304 f	647±92 f	1039±152 f
13	1046±145 h	1273±89 f	1347±225 c	904±158 g	1202±214 g	884±303 f	647±92 f	1065±171 f
14	1104±139 h	1286±88 f	1351±228 c	949±178 g	1202±214 g	950±314 f	647±92 f	1086±146 f
15	1138±144 h	1297±86 f	1364±202 c	949±178 g	1260±181 g	1024±259 f	691±102 f	1112±141 f
16	1151±137 h	1297±86 f	1365±203 c	949±178 g	1260±181 g	1056±234 f	691±102 f	1132±140 f
17	1187±149 h	1297±86 f	1365±203 c	964±152 g	1260±181 g	1070±221 f	691±102 f	1174±100 f
18	1197±139 h	1297±86 f	1365±203 c	964±152 g	1260±181 g	1094±247 f	691±102 f	1174±100 f
19	1218±159 h	1297±86 f	1365±203 c	964±152 g	1283±174 g	1094±247 f	691±102 f	1174±100 f
20	1218±159 h	1297±86 f	1365±203 c	964±152 g	1298±160 g	1094±247 f	691±102 f	1174±100 f

Letras idénticas muestran que no hay diferencias significativas entre las semanas para cada cepa (Duncan $p < 0.05$).
 * de hongos frescos por bolsa de 5 kg de sustrato (humedad = 73.2 %) durante 20 semanas de producción




= semana cuando cada cepa obtuvo su máximo rendimiento significativo

TABLA 4b. PRODUCCIÓN SEMANAL ACUMULADA* DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus* spp.

SEMANA	CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp.								
	P18	P19	I8P	PCM	IAP	IBUG-3	IBUG-8	IBUG-28	IBUG-67
1	625±142 a	144±95 a	641±44 a	479±373 a	502±293 a	344±69 a	173±347 a	259±69 a	227±281 a
2	829±119 b	178±72 b	667±54 b	484±372 a	670±183 a	366±102 b	505±347 b	267±82 b	288±239 b
3	859±82 c	178±72 b	832±46 c	542±283 a	872±108 b	510±104 c	764±113 c	423±79 c	422±281 c
4	889±143 d	309±127 c	832±46 c	844±349 b	872±108 b	543±92 c	865±157 d	458±68 d	467±190 d
5	946±119 e	309±127 c	845±52 c	844±349 b	1020±126 c	576±111 d	910±191 e	464±74 d	494±217 d
6	946±119 e	309±127 c	940±161 d	844±349 b	1047±107 c	655±95 e	1036±123 f	474±84 d	540±340 d
7	988±100 f	332±97 c	940±161 d	1068±287 c	1064±97 d	717±158 f	1049±140 f	589±60 e	540±340 d
8	988±100 f	392±146 c	996±183 e	1118±225 c	1142±113 e	799±94 g	1103±113 g	620±48 e	655±114 e
9	1064±173 g	428±165 c	1090±133 f	1173±243 c	1142±113 e	868±59 h	1158±139 g	690±64 f	723±164 f
10	1120±174 g	428±165 c	1090±133 f	1173±243 c	1171±101 f	896±89 h	1158±139 g	693±69 f	823±85 g
11	1121±171 g	428±165 c	1090±133 f	1241±205 c	1247±121 f	900±88 h	1180±139 g	820±141 g	890±112 g
12	1121±171 g	428±165 c	1090±133 f	1248±217 c	1247±121 f	915±95 h	1180±139 g	852±151 h	945±69 g
13	1148±200 g	428±165 c	1095±130 f	1317±189 c	1292±93 f	983±70 i	1213±100 g	910±149 i	1040±69 h
14	1179±174 g	431±168 c	1095±130 f	1330±215 c	1311±114 f	983±70 i	1213±100 g	910±149 i	1040±69 h
15	1208±184 g	459±127 c	1148±80 f	1347±216 c	1314±112 f	1016±95 i	1275±58 g	926±150 i	1092±76 h
16	1225±207 g	481±152 c	1170±163 f	1369±197 c	1339±122 f	1034±115 j	1277±57 g	954±168 i	1092±76 h
17	1225±207 g	481±152 c	1179±162 f	1369±197 c	1348±118 f	1134±115 j	1280±52 g	1001±132 i	1180±168 h
18	1229±205 g	481±152 c	1199±201 f	1369±197 c	1359±139 f	1134±115 j	1282±50 g	1033±159 i	1180±168 h
19	1229±205 g	481±152 c	1217±183 f	1369±197 c	1359±139 f	1134±115 j	1297±71 g	1050±128 i	1180±168 h
20	1229±205 g	481±152 c	1217±183 f	1369±197 c	1359±139 f	1183±157 j	1297±71 g	1059±137 i	1180±168 h

Letras idénticas muestran que no hay diferencias significativas entre las semanas para cada cepa (Duncan $p < 0.05$).
 * de hongos frescos por bolsa de 5 kg de sustrato húmedo (humedad = 73.2 %) durante 20 semanas de producción

 = semana cuando cada cepa obtuvo su máximo rendimiento significativo

3.1.4.1 Características de producción

En la Tabla 5 se observan las características de fructificación: rendimiento máximo, eficiencia biológica, tiempo de fructificación y tipo de esporóforos de diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Se realizó un análisis estadístico y pruebas de medias para cada parámetro con la finalidad de determinar las cepas con las mejores características de fructificación. De acuerdo con la prueba LSD ($P < 0.05$) las cepas más productivas fueron, IAP, P13, P10, IBUG-8, I8P, PCM, P18, P8, P5, IBUG-3 y P17 con una eficiencia biológica de 87, 83, 83, 82, 81, 79, 79, 76, 74, 73 y 72 %, respectivamente. En el siguiente grupo se encontraron IBUG-67, IBUG-28, P11 y P14 con eficiencias biológicas del 70, 68, 64 y 55 %. Las cepas menos productivas fueron P15 y P19 con productividades del 37 y 23%. En relación al periodo de rendimiento máximo, este se logró desde 4 semanas de producción para P19 hasta 13 semanas en IBUG-28 e IBUG-3. Las que obtuvieron su rendimiento máximo en menos semanas fueron P19, P10, P15, PCM y P8 con 4, 5, 6, 7 y 7 semanas respectivamente. Las cepas menos productivas fueron P19 con 23% hasta 70% para la IBUG-67 en 4 y 12 semanas de producción para obtener su rendimiento máximo significativo.

3.1.4.2 Características de los esporóforos

3.1.4.2.1 Color de fructificaciones

En general, el color de las fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* spp. se mantuvo constante para cada una de ellas durante todo el periodo de producción. Estos presentaron un color gris y blanco, y sólo los de las cepas P19 y P15 se observaron de un color gris muy oscuro tendiendo a azul en estadios jóvenes pero que se tornaron gris claro cuando el esporóforo alcanzó la madurez. En el caso de la IBUG-67 estos fueron de color rosa.

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS (RENDIMIENTO, EFICIENCIA BIOLÓGICA, TIEMPO DE FRUCTIFICACIÓN Y TIPO DE ESPOROFOROS) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus* spp.

CEPA	MAXIMO RENDIMIENTO (g de esporóforos 5 kg de sustrato)	EFICIENCIA BIOLÓGICA*	TIEMPO DE FRUCTIFICACIÓN (SEMANAS)	ESPOROFORO	
				COLOR	PESO UNITARIO (g)
IAP	1170±101 e	87.3±7.5 e	10	GRIS	6.1±4 b
P13	1119±140 e	83.5±10.4 e	9	GRIS	8.0±4 b
P10	1109±162 e	82.8±12.1 e	5	BLANCO	44.1±1 e
IBUG-8	1103±113 e	82.3± 8.4 e	8	GRIS	5.8±3 b
I8P	1090±133 e	81.3±9.9 e	9	GRIS	9.9±6 d
PCM	1066±283 e	79.5±21.1 e	7	GRIS	9.2±3 c
P18	1062±173 e	79.2±12.9 e	9	BLANCO	7.2±6 b
P8	1024±140 e	76.4±10.4 e	7	BLANCO	6.6±1 b
P5	991±144 e	73.9±10.7 e	11	GRIS	4.0±1 a
IBUG-3	982±70 e	73.3±5.2 e	13	BLANCO	6.1±2 b
P17	972±120 e	72.5±8.9 e	11	BLANCO	17.4±6 d
IBUG-67	941±64 d	70.2±4.8 d	12	ROSA	10.8±5 d
IBUG-28	910±149 d	67.9±11.1 d	13	BLANCO	5.5±2 b
P11	860±147 c	64.2±11.0 c	8	GRIS	4.0±1 a
P14	742±282 b	55.4±21.0 b	9	BLANCO	11.2±5 d
P15	493±146 a	36.8±10.9 a	6	GRIS-AZUL	12.9±4 d
P19	308±127 a	22.9±9.5 a	4	GRIS-AZUL	15.9±7 d

Letras diferentes muestran diferencias significativas entre ellas para cada variable (LSD $p < 0.05$)

* Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco)

3.1.4.2.2 Peso unitario promedio

En relación al tamaño (g/hongo) los esporóforos presentaron un peso unitario de 4 hasta 44.1 g para las cepas P5 y P10, respectivamente. Con el análisis estadístico y la prueba de medias (LSD $p < 0.05$) se determinó que los esporóforos más grandes fueron para P10, P17, P19, P15, P14, IBUG-67 e I8P con un tamaño unitario promedio de 44.1, 17.4, 15.9, 12.9, 11.2, 10.8 y 9.9 g, respectivamente. Le siguieron las cepas PCM, con 9.2 g. En cambio las cepas con el tamaño de esporóforos más pequeños fueron P13, P18, P8, IAP, IBUG-3, IBUG-8, IBUG-28, P5 y P11, con pesos unitarios de sus fructificaciones de 8.0, 7.2, 6.6, 6.1, 6.1, 5.8, 5.5, 4.0 y 4.0, respectivamente.

3.1.5 Tasa de producción

Debido a que no todas las cepas con altas producciones las obtienen en poco tiempo o por el contrario otras presentaban bajas cantidades de fructificaciones pero en menor tiempo de incubación y cosecha, se decidió determinar la tasa de producción que corresponde a la relación de la eficiencia biológica entre los días necesarios para obtener dichas cosechas incluyendo el periodo de incubación. En la Tabla 6 se reporta la tasa de producción, la cual fue desde 0.18 para la P19 hasta 0.62 para la IAP. Con el análisis estadístico y de acuerdo a la prueba LSD ($p < 0.05$) se determinó que dentro de las cepas de *Pleurotus* spp. con la mayor tasa de producción se encontraron a IAP, P18, I8P, IBUG-8. Con tasas de producción intermedia se encuentran las cepas P13, PCM, P10 y P8, mientras que las cepas P19, P14, P15 IBUG-28, P17, IBUG-67, P5, IBUG-3 y P11 mostraron las menores tasas de producción.

3.1.6 Características de cepas seleccionadas de *Pleurotus* spp.

Con base en los resultados obtenidos de la caracterización de cepas sobre paja de trigo como sustrato se procedió a seleccionar las mejores cepas de *Pleurotus* spp. En la Tabla 7 se observa el registro de cada cepa seleccionada y las características que presentaron. Así tenemos que la P18 presentó una fructificación temprana con 21 días para iniciar a fructificar, un rendimiento máximo de 79.7% y esporóforos blancos; la IAP produjo un rendimiento de 87.3 % con esporóforos de color gris. La cepa P15 mostró un tiempo de cosecha de sólo 6 semanas y las fructificaciones de color gris-azul. La cepa

IBUG-67 presentó un rendimiento de 70.2% y cuerpos fructíferos de color rosa. La P10 mostró un rendimiento de 82.8% en tan sólo 5 semanas de producción y esporóforos de color blanco y grandes con un peso unitario de 44.1 g/hongo.

TABLA 6. TASA DE PRODUCCIÓN EN EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus spp.*

CEPA	TASA DE PRODUCCIÓN (E. B. */día)
IAP	0.62 ± 0.03 a
P18	0.61 ± 0.10 b
I8P	0.60 ± 0.03 b
IBUG-8	0.59 ± 0.08 c
P13	0.57 ± 0.12 d
PCM	0.57 ± 0.20 e
P10	0.55 ± 0.09 e
P8	0.51 ± 0.07 e
P11	0.50 ± 0.11 f
IBUG-3	0.49 ± 0.03 f
P5	0.48 ± 0.06 f
IBUG-67	0.48 ± 0.04 f
P17	0.47 ± 0.07 f
IBUG-28	0.45 ± 0.07 f
P15	0.31 ± 0.09 f
P14	0.30 ± 0.11 f
P19	0.18 ± 0.07 f

* Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco)
 Letras diferentes muestran diferencias significativas entre ellas (LSD p<0.05)

TABLA 7. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CEPAS SELECCIONADAS DE *Pleurotus* spp. SOBRE PAJA DE TRIGO.

PARAMETRO DE SELECCIÓN	CEPAS				
	P18	IAP	P15	IBUG-67	P10
FRUCTIFICACIÓN TEMPRANA					
-Categoría	BUENA	BUENA	MALA	MALA	MALA
-Valor (días)	21	28	43	50	54
RENDIMIENTO MAXIMO					
-Categoría	BUENA	BUENA	MALA	REGULAR	BUENA
-Valor (EB*)	79.7	87.3	36.8	70.2	82.8
DURACION DE FRUCTIFICACION					
-Categoría	MALA	MALA	BUENA	MALA	BUENA
-Valor (semanas)	9	10	6	12	5
COLOR DE ESPOROFOROS	BLANCO	GRIS	GRIS-AZUL	ROSA	BLANCO
PESO UNITARIO DE ESPOROFOROS					
-Categoría	MALA	MALA	REGULAR	REGULAR	BUENA
-Valor (g/hongo)	7.2	6.1	12.9	10.8	44.1

* Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco)

3.2 DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Pleurotus* spp. CON ALTOS RENDIMIENTOS.

Uno de los factores que influye en el éxito de un programa de mejoramiento genético es el de contar con un método eficiente para la selección de cepas con las características deseadas. Para ello se pueden emplear análogos tóxicos, los cuales van a apoyar en la discriminación de cepas reguladas metabólicamente si este fenotipo se encuentra asociado con algún carácter que se desea seleccionar. Un ejemplo de ello es la 2DG que se ha propuesto como agente selectivo de cepas precoces y con altas productividades en el hongo comestible *Pleurotus* spp. (Sánchez y Viniegra, 1996). Por tal motivo se realizó un estudio sobre el efecto de la 2DG en el crecimiento de diversas cepas de *Pleurotus* spp. y así preseleccionar en el laboratorio sin necesidad de realizar la fructificación en algún sustrato.

Esto sería posible si se encontrara una correlación entre la resistencia a la 2DG y algún criterio de selección como una alta productividad en poco tiempo, precocidad en la formación de cuerpos fructíferos y color y tamaños grandes de esporóforos.

3.2.1 Efecto de la 2DG sobre el crecimiento de *Pleurotus*.

Como ya se contaba con las características de producción de las cepas seleccionada para el mejoramiento genético, se procedió a evaluar el efecto de la 2DG sobre el crecimiento de estas cepas. Se determinó en una primera instancia la velocidad de crecimiento de las 5 cepas seleccionadas en medio con 0.1 g/l de 2DG en comparación del testigo sin 2DG para determinar la resistencia a 2DG (Tabla 8). Se puede observar que la cepa P18 presentó la mayor velocidad de crecimiento con 5.2 mm/día, le siguen P10 con 3.3 mm/día e IAP con 2.4 mm/día. Las cepas P15 e IBUG-67 no lograron crecer sobre el medio con 2DG. La resistencia fue de 57.9 % para la P10, 45.6 % para la P18 y 21.1 % en IAP, mientras que a las cepas P15 y la IBUG-67 se le consideró una resistencia del 0%, debido a que no lograron crecer en el medio con 2DG.

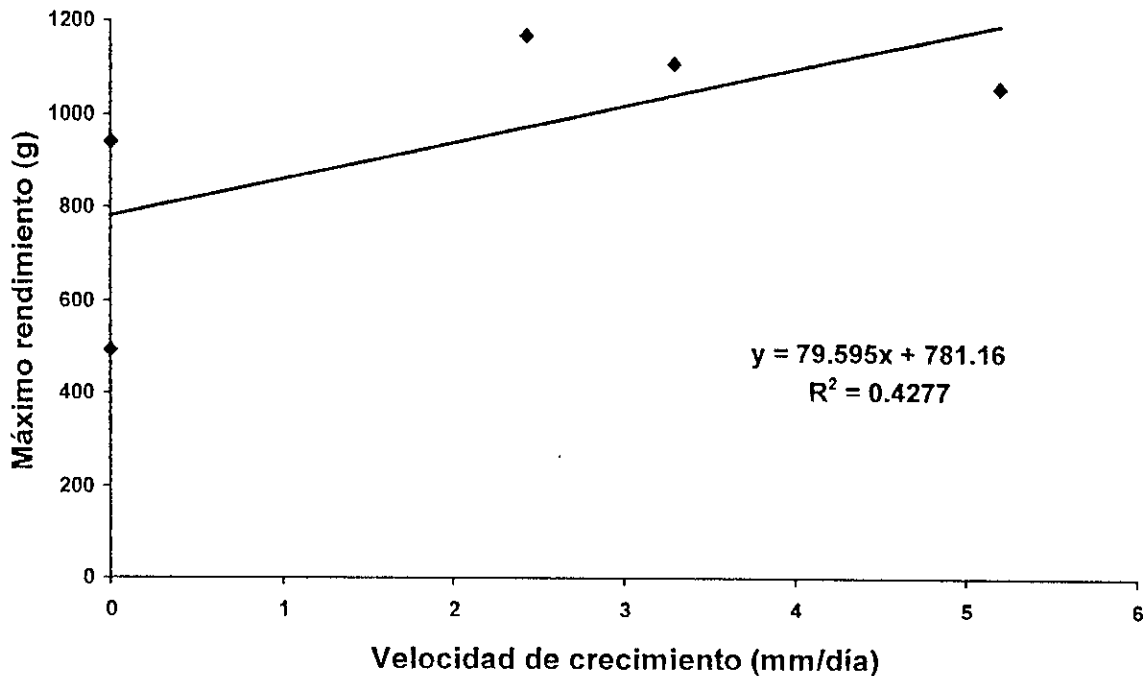
TABLA 8. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA (0.1 g/l) SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus* spp.

CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (mm/día)		RESISTENCIA R*(%)
	ALMIDON	ALMIDON + 2DG	
P18	11.4±0.88	5.2±0.18	45.6
IAP	11.4±1.2	2.4±0.13	21.1
P15	6.5±0.61	0.0±0.00	0
IBUG-67	5.0±0.11	0.0±0.00	0
P10	5.7±0.70	3.3±0.05	57.9

R*(%)= Resistencia a 2DG (=porcentaje de biomasa producida respecto al control)

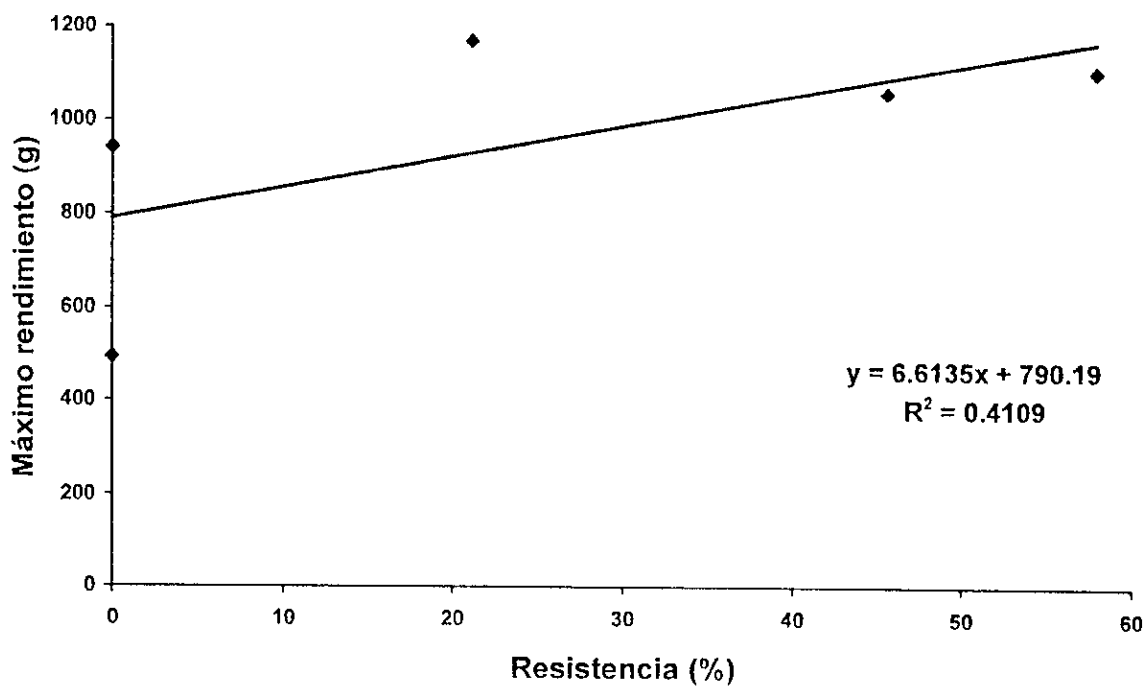
Con el análisis estadístico se determinó que no existe una correlación entre la velocidad de crecimiento en el medio con 2DG y el rendimiento máximo sobre paja de trigo pues el coeficiente de correlación determinado fue de 65.4 ($R^2=0.4277$) con una probabilidad menor del 90%. Esto nos indica que esta relación fue debido al azar y que no existe una correlación entre ambos parámetros (Figura 2). Con el resto de parámetros evaluados que fueron inicio y duración de la fructificación y peso promedio de los esporóforos, tampoco se encontró una posible correlación significativa.

FIGURA 2. CORRELACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE 2DG (0.1 g/l) CON EL RENDIMIENTO MÁXIMO DE *Pleurotus spp.* SOBRE PAJA DE TRIGO.



Al tomar en cuenta la resistencia de las cepas a la 2DG y no sólo la velocidad de crecimiento en medio con 2DG tampoco fue posible encontrar una correlación significativa entre este parámetro y las características de producción de las cepas. En la figura 3 se muestra la relación entre la resistencia a 2DG y el rendimiento máximo, con una $R^2=0.4109$, equivalente a un coeficiente de correlación de 0.641 y una probabilidad menor del 90%. Por lo anterior, no fue posible afirmar que las cepas más resistentes presenten los mayores rendimientos en paja como sustratos y que éstos se presenten en menor tiempo, o que presenten esporóforos más grandes.

FIGURA 3. CORRELACIÓN DE LA RESISTENCIA A 2DG (0.1 g/l) CON EL RENDIMIENTO MÁXIMO DE *Pleurotus* spp. SOBRE PAJA DE TRIGO.



Debido a que no se encontró una relación significativa entre los parámetros de producción de las cepas seleccionadas ya sea con la velocidad de crecimiento (Figura 2) o con la resistencia a 2DG (Figura 3), se decidió determinar la resistencia de las 17 fructificadas con anterioridad. Para esta evaluación se consideró necesario cuantificar la producción de biomasa en peso seco, con el objeto de evaluar el crecimiento micelial de una forma más precisa. Se empleó un medio de cultivo con almidón como fuente de carbono y diferentes concentraciones de 2DG (0.0, 0.01, 0.5 y 0.1 g/l). La resistencia se determinó al tomar en cuenta la producción de biomasa en los medios con 2DG con respecto al testigo (sin 2DG) en porcentaje.

En la Tabla 9 se presenta el efecto de la concentración de 2DG sobre la producción de biomasa de *Pleurotus* spp. En el medio testigo (sin 2DG) las cepas con producciones mayores de 10 mg/caja fueron P11, P8, P18, I8P, PCM y P5 con 17.6, 16.1, 15.4, 12.1, 10.7 y 10.5 mg/caja, respectivamente. Las cepas P13, P14, P10, P17,

P15, IBUG-8 e IAP, presentaron una producción de 9.1, 8, 7.4, 7, 6.3, 5.6 y 5.5, mg/caja. En cambio la producción de biomasa fue de 4, 3.5 y 2 mg/caja para la P19, IBUG-67 e IBUG-28.

TABLA 9. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2DG SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA (mg/caja) DE *Pleurotus spp.*

CEPA	CONCENTRACION DE 2DG (g/l)						
	0.0	0.01		0.05		0.1	
	Biomasa	Biomasa	R*(%)	Biomasa	R*(%)	Biomasa	R*(%)
P5	10.5	4.9	46.7	8.4	80.0	0.0	0.0
P8	16.1	3.6	22.4	3.6	22.4	2.8	17.4
P10	7.4	4.7	63.5	5.2	70.3	3.7	50.0
P11	17.6	5.3	30.1	7.0	39.8	4.3	24.4
P13	9.1	8.9	97.8	8.4	92.3	4.2	46.2
P14	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P15	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P17	7.0	5.5	78.6	4.8	68.6	2.9	41.4
P18	15.4	6.2	40.3	5.3	34.4	3.7	24.0
P19	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IAP	5.5	4.3	78.2	3.6	65.5	3.1	56.4
PCM	10.7	6.0	56.1	0.0	0.0	0.0	0.0
I8P	12.1	7.7	63.6	9.2	76.0	3.7	30.6
IBUG-8	5.6	4.4	78.6	3.2	57.1	2.9	51.8
IBUG-28	2.0	1.3	65.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IBUG-67	3.5	1.6	45.7	2.2	62.9	0.0	0.0

R*(%)= Resistencia a 2DG (=porcentaje de biomasa producida respecto al control)

Con el medio que contiene 0.01 g/l de 2DG, las cepas con mayor producción de biomasa fueron P13, I8P, P18, PCM, P17 y P11 con 8.9, 7.7, 6.2, 6, 5.5 y 5.3 mg/caja. Le siguieron P5, P10, IBUG-8, IAP, P8, IBUG-67 e IBUG-28 con una producción de 4.9, 4.7, 4.4, 4.3, 3.6, 1.6 y 1.3 mg/caja. Por otro lado, el crecimiento de tres cepas fue inhibido a esta concentración de 2DG (P14, P15 y P19). La resistencia a 2DG (0.01 g/l) fue de 97.8, 78.6, 78.6, 78.2, 65.0, 63.6, 63.5, 56.1, 46.7, 45.7, 40.3, 30.1 y 22.4 % para la P13, P17, IBUG-8, IAP, IBUG-28, I8P, P10, PCM, P5, IBUG-67, P18, P11 y P8; mientras que la P14, P15 y P19 presentaron 0% de resistencia.

En el medio con 0.05 g/l de 2DG, la I8P, P5, P13, P11, P18 y P10 presentaron 9.2, 8.4, 8.4, 7, 5.3 y 5.2 mg/caja de biomasa. En cambio la P17, P8, IAP, IBUG-8 e IBUG-67 presentaron una producción de 4.8, 3.6, 3.6, 3.2 y 2.2 mg/caja, respectivamente, mientras que P14, P15, P19, PCM e IBUG-28 fueron inhibidas totalmente. Las cepas P13, P5, I8P, P10 presentaron 92.3, 80, 76 y 70.3% de resistencia, y resultaron las menos afectadas por el análogo tóxico de la glucosa. Le siguieron P17, IAP, IBUG-67, e IBUG-8 con 68.6, 65.5, 62.9, y 57.1 % de resistencia a la 2DG. En cambio la resistencia para la P11, P18 y P8 fue de 39.8, 34.4 y 22.4 %, respectivamente. A diferencia de la P14, P15, P19, PCM e IBUG-28 que se inhibió su crecimiento.

Las cepas que lograron crecer con 0.1 g/l de 2DG, fueron P11, P13, P10, P18, I8P, IAP, P17, IBUG-8 y P8 con 4.3, 4.2, 3.7, 3.7, 3.7, 3.1, 2.9, 2.9 y 2.8 mg/caja de biomasa, respectivamente. Por otro lado, el crecimiento fue inhibido para la P5, P14, P15, P19, PCM, IBUG-28 e IBUG-67. Con 0.1 g/l de 2DG, la IAP, IBUG-8 y la P10 presentaron una resistencia de 56.4, 51.8 y 50%. Le siguieron P13, P17, I8P, P11, P18, P8 con resistencias menores del 50%, es decir, 46.2, 41.4, 30.6, 24.4, 24 y 17.4, respectivamente. En esta concentración de 2DG el crecimiento se inhibió para las cepas P5, P14, P15, P19, PCM, IBUG-28 e IBUG-67.

Se puede observar que cuando se incrementó la concentración de 2DG el número de cepas resistentes a 2DG disminuye. De 13 cepas resistentes con 0.01 g/l, a 11 cepas con 0.05 g/l y 9 con 0.1 g/l.

En general, se observó que al aumentar la concentración de 2DG, de 0.01 a 0.05 g/l, disminuyó la producción de biomasa, excepto para las cepas P5, P10, P11, I8P e IBUG-67, en donde se determinó un incremento en la producción de biomasa con 0.05 g/l de 2DG. Pero con 0.1 g/l de 2DG todas las cepas presentaron disminuidos sus niveles de biomasa en relación con las menores concentraciones.

Después de determinar la resistencia a 2DG de las cepas de *Pleurotus* spp. se procedió a analizar estadísticamente estos resultados con los obtenidos en la fase de producción en paja de trigo. Estos parámetros fueron inicio de la fructificación, duración de la fructificación, rendimiento máximo significativo y tamaño de los esporóforos. Se trató de encontrar alguna correlación entre los parámetros de producción con la resistencia a la 2DG, en las diferentes concentraciones evaluadas. En caso de encontrar una correlación de este tipo, la selección de cepas de *Pleurotus* spp. con alguna característica interesante podría llevarse, sin llevar a cabo el tedioso y largo proceso de caracterización de cepas sobre sustratos lignocelulósicos.

A una concentración de 0.01 g/l de 2DG, el rendimiento máximo y la resistencia a 2DG presentaron coeficientes de correlación de 0.792 ($R^2=0.6281$). Los coeficientes de correlación fueron 0.435, 0.430 y 0.026 ($R^2=0.1894$, 0.1851 y 0.0007) para el resto de parámetros (inicio, duración de la fructificación y el peso promedio de los esporóforos). En el medio con 0.05 g/l de 2DG, se encontró un coeficiente de correlación de 0.634 ($R^2=0.4021$) para el rendimiento máximo y de 0.300, 0.297 y 0.098 ($R^2=0.0901$, 0.0881 y 0.096) para inicio y duración de la fructificación y el peso de los esporóforos. Con 0.1 g/l de 2DG se obtuvo un efecto similar. El coeficiente de regresión para el rendimiento máximo fue de 0.612 ($R^2=0.3745$), con el inicio y duración de la fructificación fue de 0.208 y 0.053 ($R^2=0.0434$ y 0.0028). Para el peso promedio de los cuerpos fructíferos el coeficiente fue de 0.254 ($R^2=0.643$) (Tabla 10).

Al aumentar la concentración de 2DG disminuyó el número de cepas resistentes y permitió identificar realmente cepas resistentes. Se determinó una correlación alta con una probabilidad mayor del 95% entre el rendimiento máximo y la resistencia a 2DG a las 3 concentraciones, es decir, una cepa resistente presentará una mayor producción de hongos en sustratos de paja de trigo. Sin embargo, con una concentración de 0.1 g/l de 2DG, es posible identificar a las cepas altamente productivas con mayor precisión, ya que a concentraciones menores cepas poco productivas son capaces de desarrollarse y confundirse como cepas resistentes.

TABLA 10 . COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A 2DG Y LOS PARAMETROS DE SELECCIÓN DE CEPAS DE *PLEUROTUS* SPP.

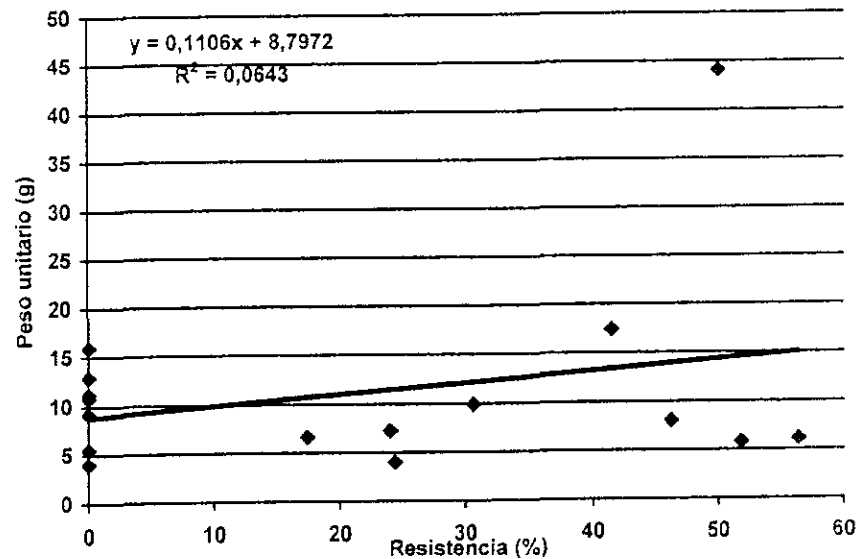
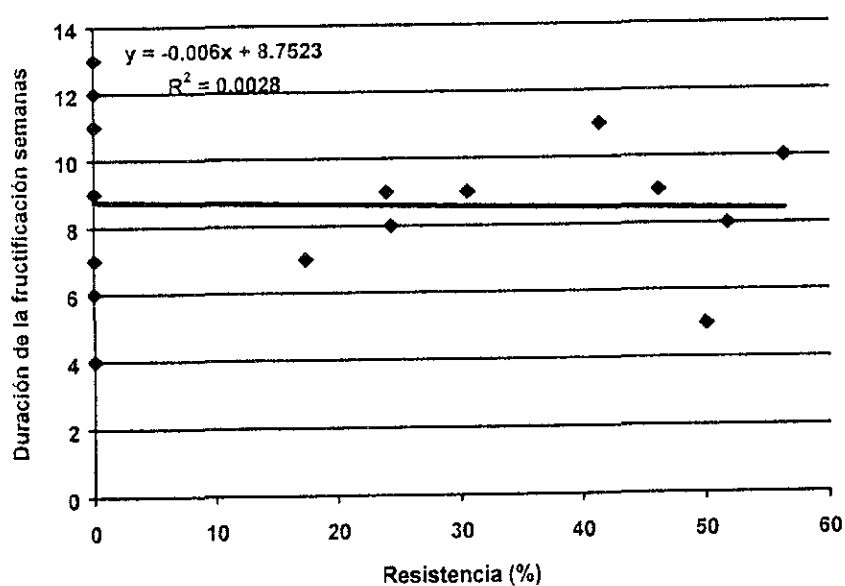
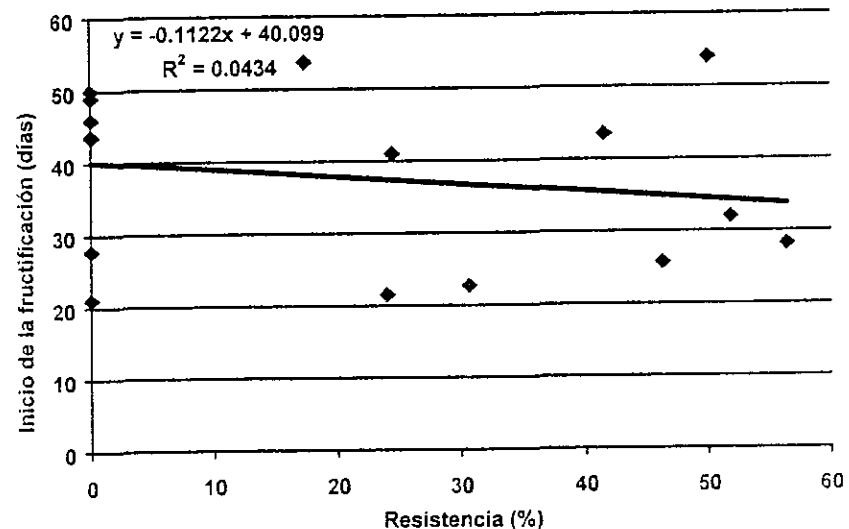
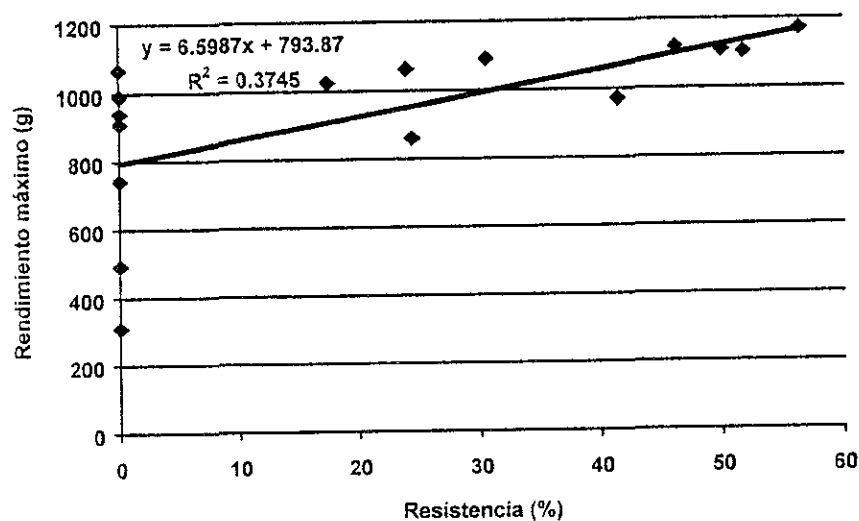
PARAMETRO DE SELECCIÓN	RESISTENCIA A 2DG (%)		
	CONCENTRACION DE 2DG (g/l)		
	0.01	0.05	0.10
RENDIMIENTO MÁXIMO	0.792	0.634	0.612
INICIO DE LA FRUCTIFICACIÓN	0.435	0.300	0.208
DURACIÓN DE LA FRUCTIFICACIÓN	0.430	0.297	0.053
PESO UNITARIO DE ESPORÓFOROS	0.026	0.098	0.254

La figura 4, muestra la correlación entre las características de producción y la resistencia a 2DG (0.1g/l) de las cepas de *Pleurotus* spp. en donde se encontró una correlación positiva y significativa para el rendimiento máximo, con un coeficiente de correlación de 0.612 ($R^2=0.3745$), lo que nos indica que esta correlación es debido a la relación que existe entre los dos parámetros, es decir, que una cepa más resistente a

2DG presentará una mayor producción de esporóforos sobre paja de trigo y que existe una probabilidad mayor del 95%. Con el inicio de la fructificación, el periodo de fructificación y el peso promedio de los esporóforos no se encontró una correlación significativa, pues se determinó que la probabilidad de las correlaciones es menor del 90%, valor mínimo para ser significativo.

De acuerdo con estos resultados se determinó que es factible identificar y seleccionar a nivel laboratorio las cepas de *Pleurotus* spp. con rendimientos en paja de trigo en función de su resistencia a la 2DG. Para esta identificación y selección de cepas se debe determinar la producción de biomasa sobre un medio de cultivo que contenga almidón (fuente de carbono) y 0.1 g/l de 2DG, como agente selectivo. Con esta concentración de 2DG fue posible identificar a las cepas altamente productivas con mayor precisión, ya que a concentraciones menores, por ejemplo 0.01 g/l, no todas las cepas que muestran crecimiento son altamente productoras. Con una concentración de 0.01 g/l se encontraron 13 cepas resistentes, para una concentración de 0.05 g/l disminuyó hasta 11 cepas pero con 0.1 g/l se identificaron 9 de 10 cepas determinadas con rendimientos altos

FIGURA 4. CORRELACIÓN DE LA RESISTENCIA A 2 DG (0.1 g/l) CON LAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUCCIÓN DE DIFERENTES CEPAS DICARIÓTICAS DE *Pleurotus spp.* EN PAJA DE TRIGO



3.3 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE DICARIONES HÍBRIDOS DE *P. ostreatus*

En general el mejoramiento genético de *Pleurotus* se ha realizado principalmente por medio de apareamientos monocarión-monocarión, a partir de las progenies obtenidas de cepas dicarióticas, que presentan alguna característica deseada, tales como altos rendimientos en algún sustrato, esporulación bajo condiciones extremas o bien en función de características de los esporóforos tales como color y peso.

Los micelios monocarióticos necesarios para realizar este tipo de apareamientos pueden obtenerse de una manera sencilla, por medio de la producción de neohaplontes, a partir de los cuales se puede generar nuevas cepas y posteriormente caracterizarlas para seleccionar las más adecuadas.

Con base en la correlación encontrada entre la resistencia a 2DG y la productividad en paja de trigo, los híbridos más productivos podrían ser identificados cuantificando la producción de biomasa en medio de almidón con 2DG.

3.3.1 Recuperación de neohaplontes de cepas de *Pleurotus* spp.

Para iniciar el mejoramiento genético de las cepas seleccionadas, sus componentes monocarióticos o neohaplontes fueron recuperados por desdicarización por medio de la técnica que hace uso de una solución de peptona. Después de haber inducido la desdicarización de los micelios dicarióticos, se procedió al aislamiento de neohaplontes y con el microscopio se ratificó la ausencia de fibulas, estructuras presentes solo en un micelio dicariótico, para determinar el éxito de la producción de neohaplontes. Ya que se verificó que los micelios fueron monocarióticos se procedió a determinar la presencia de los dos componentes del dicarión por apareamientos entre los micelios monocarióticos recuperados de una misma cepa dicariótica.

La Tabla 11 muestra los tipos parentales (neohaplontes) recuperados de las cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. Se puede observar que para P10 y P14 se lograron

obtener los dos componentes monocarióticos, pero para las cepas P15, P17, P18, e IAP solo se recuperó un componente. En cambio para la IBUG-67, con fructificaciones rosas, no fue posible la producción de neohaplontes ya que no se logró obtener algún crecimiento en la solución desdicarizadora.

TABLA 11. RECUPERACIÓN DE COMPONENTES MONOCARIÓTICOS (NEOHAPLONTES) DE CEPAS DICARIÓTICAS DE *Pleurotus spp.*

CEPAS	TIPOS PARENTALES RECUPERADOS (Neohaplontes)
P10	2
P14	2
P15	1
P17	1
P18	1
IAP	1
IBUG-67	0

Ya que para la cepa IBUG-67 no fue posible obtener los componentes monocarióticos se modificó la metodología, como lo sugiere Leal-Lara (1980) cuando no se obtienen los neohaplontes. Se aumentó la cantidad de peptona de 20 a 30 g/l o se sustituyó por 4g/l de glicina, se disminuyó el tiempo de homogeneizado del micelio de 2.5 a 1,5 minutos y se aumentó la cantidad de inóculo de 20 a 50 μ l. Después de haber experimentado con estos variantes no se lograron obtener los neohaplontes de la IBUG-67, ya que se obtuvieron micelios dicarióticos o cuando las condiciones eran muy agresivas no se lograba obtener micelio.

3.3.2 Aislamiento de progenie monocariótica de IBUG-67.

Desafortunadamente no se logró deducir la IBUG-67, cepa interesante por el color rosa de sus carpóforos, para poder obtener híbridos con colores llamativos. A partir de una esporada de esta cepa se aislaron un total de 40 micelios monospóricos para contar con material genético de esta cepa y utilizarlo en la formación de híbridos con los neohaplontes ya recuperados. Se les determinó el tipo de compatibilidad y los apareamientos positivos (dicariones) fueron inducidos a fructificación. Se seleccionaron 2 que fueran compatibles y que sus fructificaciones fueran del color deseado con la finalidad de asegurarse de que contengan la información genética para el color rosa de los cuerpos fructíferos.

3.3.3 Apareamientos monocarión-monocarión.

El método tradicional para la obtención de híbridos en *Pleurotus* consiste en realizar apareamientos monocarión-monocarión y después de 4-6 días de incubación se observa la presencia de fíbulas. Por ello se procedió a aparear los micelios monocarióticos obtenidos (neohaplontes y monospóricos) en todas las combinaciones posibles.

En la Tabla 12 se muestran los apareamientos realizados entre neohaplontes de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* spp. en donde se aprecia que se contó con 10 monocariones provenientes de la deducirización de 6 de ellas y 2 de la progenie de la IBUG-67. Se realizaron 44 apareamientos monocarión-monocarión al hibridar todas las cepas en todas sus posibles combinaciones. Los apareamientos positivos (que presentaron fíbulas) resultaron en dicariones y se denotan con un signo de más (+). Cuando el apareamiento no resultó en un dicarión se le asignó un signo de menos (-). En total se lograron obtener 13 micelios dicarióticos híbridos. Las cepas que participaron con sus neohaplontes para la formación de estos híbridos fueron: P10, P14, P15, P17 y P18. Por medio de estas hibridaciones se lograron obtener los siguientes micelios dicarióticos: P10₁xP14₁, P10₁xP15₁, P10₁xP17₁, P10₂xP14₁, P10₂xP15₁, P10₂xP17₁, P14₁xP15₁, P14₁xP17₁, P14₁xP18₁, P14₂xP17₁, P14₂xP18₁, P15₁xP17₁ y P15₁xP18₁. Se logró obtener apareamientos positivos entre neohaplontes con

combinaciones de micelios de las diferentes características deseadas, es decir, fructificación precoz, altos rendimiento y tamaños grandes. Sólo el neohaplonte de la IAP y los monospóricos de la IBUG-67 no se hibridaron con el resto de los neohaplontes, cepas con alta fructificación y cuerpos fructíferos de color rosa, respectivamente.

TABLA 12. APAREAMIENTOS ENTRE NEOHAPLONTES DE LAS CEPAS SELECCIONADAS DE *Pleurotus spp.*

NEOHAPLONTES DE CEPAS DE <i>Pleurotus spp.</i>								
	P10 ₁	P10 ₂	P14 ₁	P14 ₂	P15 ₁	P17 ₁	P18 ₁	IAP ₁
P14 ₁	+	+						
P14 ₂	-	-						
P15 ₁	+	+	+	-				
P17 ₁	+	+	+	+	+			
P18 ₁	-	-	+	+	+	-		
IAP ₁	-	-	-	-	-	-	-	
IBUG-67 ₁ *	-	-	-	-	-	-	-	-
IBUG-67 ₂ *	-	-	-	-	-	-	-	-
IBUG-67 **	-	-	-	-	-	-	-	-

* micelios monospóricos de cepa IBUG-67

** Fenómeno Buller entre neohaplontes y la cepa dicariótica IBUG-67

3.3.4 Apareamientos dicarión-monocarión.

Un método alternativo para la obtención de micelios dicarióticos híbridos es el denominado "Fenómeno Buller" (Raper, 1966), que emplea un micelio dicariótico para dicariorizar un micelio monocariótico mediante la migración de un solo núcleo del dicarión a través del micelio monocarión. Eger *et al.* (1976), reportaron que el "Fenómeno Buller" permite transmitir algunas características deseadas. Por lo que se

decidió emplear esta técnica con los neohaplontes obtenidos y la cepa dicariótica IBUG-67. Se realizaron 8 apareamientos dicarición-monocarición y se observó la presencia de fíbulas en el monocarición después de 5 días de incubación para permitir el contacto entre los micelios para que se diera la migración de núcleos compatibles.

En la Tabla 12 se muestran los 8 los apareamientos dicarición-monocarición que se realizaron entre los neohaplontes de las cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. con la cepa dicariótica IBUG-67. No se logró en ningún caso la hibridización entre los micelios, ya que no se observó la presencia de fíbulas en los neohaplontes, lo cual se denota con un signo de menos (-).

3.3.5 Selección de dicariones híbridos de *P. ostreatus*.

3.3.5.1 Color de esporóforos de cepas parentales seleccionadas

Con la finalidad de evaluar si es posible determinar el color de esporóforos de las cepas en forma rápida y sin fructificar en paja de trigo, se verificó que las cepas padres presentaran los mismos colores en medio de cultivo extracto de malta con agar (EMA) y en paja de trigo. Para ello las cepas seleccionadas se cultivaron en medio de cultivo EMA y cuando lo cubrieron se colocaron en una cámara húmeda con luz natural indirecta para inducir la fructificación.

En la Tabla 13 se muestra el color de las fructificaciones en paja de trigo y el medio EMA para cada una de las cepas dicarióticas parentales de *Pleurotus* spp. Se observa que la P10 y la P18 presentaron fructificaciones blancas. La IBUG-67 formó fructificaciones de color rosa y la IAP desarrolló esporóforos de color gris. La única cepa que resultó con ciertos cambios fue la P15, ya que en paja de trigo presentó fructificaciones de color gris-azul mientras que en medio EMA estas fueron de color gris-oscuro.

En general todas las cepas de *Pleurotus* spp. estudiadas mostraron el mismo color en ambos sustratos y resultó factible la determinación rápida del color de las

fructificaciones en medio EMA ya que no se observaron modificaciones en el color de esporóforos. Sin embargo, esta determinación debe realizarse al inicio de la fructificación en EMA ya que después los cuerpos fructíferos se tornaban amarillos por la deshidratación. En el caso de P15 se presentaron fructificaciones de color gris-azul en paja de trigo, mientras que en medio EMA este se perdía y tornó gris oscuro.

TABLA 13. COLOR DE ESPOROFOROS EN PAJA DE TRIGO Y AGAR EMA DE LAS CEPAS DICARIOTICAS PARENTALES DE *Pleurotus spp.*

CEPA	COLOR DE ESPOROFOROS	
	PAJA DE TRIGO	EMA
P10	BLANCO	BLANCO
P15	GRIS-AZUL	GRIS-OSCURO
P18	BLANCO	BLANCO
IAP	GRIS	GRIS
IBUG-67	ROSA	ROSA

3.3.5.2 Color de esporóforos de cepas híbridas obtenidas.

Con base en lo anterior se seleccionaron los dicariones híbridos según el color de las fructificaciones al inducir la formación de fructificaciones en EMA. En la Tabla 14 se muestra el color de esporóforos formados en EMA por los apareamientos dicarióticos entre neohaplontes, así como el neohaplonte que ejerció una mayor influencia sobre el color de las fructificaciones. En general los esporóforos presentaron un color blanco o gris. Para los híbridos que fue posible se identificó el neohaplonte dominante del color de esporóforo, pero no para todos ya que algunos provienen de cepas con el mismo color. Los neohaplontes que predominaron en el color de los híbridos fueron los siguientes: P15₁ sobre P10₁ y P18₁; P10₂ sobre P14₁ y P15₁; P17₁ sobre P10₂ y P15₁ y P14₁ sobre P15₁.

3.3.5.3 Resistencia a 2DG de dicariones híbridos

Con el objeto de identificar entre los dicariones híbridos obtenidos en este estudio cepas altamente productivas por el método previamente desarrollado con base en la resistencia a 2DG, se determinó la producción de biomasa de todos los dicariones híbridos en un medio de almidón como fuente de carbono y diferentes concentraciones de 2DG (0.01, 0.05, 0.1 g/l). Después de incubar durante 7 días a 28 °C, se determinó la resistencia en las 3 concentraciones de 2DG (Tabla 15).

TABLA 14. COLOR DE ESPORÓFOROS DE APAREAMIENTOS DICARIOTICOS ENTRE NEOHAPLONTES .

DICARIONES HÍBRIDOS	COLOR DE ESPOROFOROS EN EMA	NEOHAPLONTE PREDOMINANTE
P10 ₁ xP14 ₁	Blanco	*
P10 ₁ xP15 ₁	Gris	15 ₁
P10 ₁ xP17 ₁	Gris	*
P10 ₂ xP14 ₁	Gris	10 ₂
P10 ₂ xP15 ₁	Blanco	10 ₂
P10 ₂ xP17 ₁	Gris	17 ₁
P14 ₁ xP15 ₁	Blanco	14 ₁
P14 ₁ xP17 ₁	Blanco	*
P14 ₁ xP18 ₁	Gris	*
P15 ₁ xP17 ₁	Blanco	17 ₁
P15 ₁ xP18 ₁	Gris	15 ₁
P14 ₂ xP17 ₁	Blanco	*
P14 ₂ xP18 ₁	Blanco	*

* Ambos neohaplontes provienen de cepas con fructificaciones del mismo color

La resistencia a 0.01 g/l de 2DG fue desde 88.9 a 37.5% para los dicariones híbridos. Cuando se aumentó la concentración a 0.05 g/l de 2DG, se observó una inhibición total del crecimiento para los dicariones híbridos P10₁xP17₁, P14₁xP15₁, P14₂xP18₁ y P15₁xP18₁, mientras que la resistencia a 2DG del resto de los dicariones híbridos fue de 71.9 hasta 21.8%. Con 0.1 g/l de 2DG, solo los dicariones P14₂xP17₁, P14₁xP18₁, P10₂xP15₁, P10₁xP14₁, P14₁xP17₁, P10₂xP17₁, lograron crecer y mostraron una resistencia mayor del 50%, de 57.2, 55.2 y 50.4% para los tres primeros híbridos, mientras que los tres últimos presentaron una 17.2, 12.8 y 10.1%, respectivamente.

Se puede concluir que al igual que en las cepas parentales de *Pleurotus* spp. los dicariones híbridos obtenidos presentaron una disminución en la producción de biomasa al incrementar la concentración de 2DG. Con la concentración más pequeña de 0.01 g/l de 2DG, todos los híbridos lograron crecer. Mientras que al incrementar la concentración a 0.05 g/l de 2DG, el crecimiento de 4 híbridos se ve inhibido totalmente y con 0.1 g/l de 2DG, el número de cepas híbridas en el que el crecimiento se ve inhibido se incrementó hasta 7, y sólo 6 cepas dicarióticas resultaron ser resistentes a esta concentración de 2DG.

3.3.5.4 Cepas híbridas dicarióticas seleccionadas

De los híbridos producidos se seleccionaron ciertas cepas con base en una expectativa de altos rendimientos y esporóforos de diferentes colores (Tabla 16). Estos dicariones híbridos son: P10₂xP15₁, P14₂xP17₁, P14₁xP17₁, P10₁xP14₁, P14₁xP18₁ y P10₂xP17₁. Cabe hacer notar que son 4 cepas híbridas dicarióticas con fructificaciones de color blanco (las primeras cuatro) y 2 de color gris (las dos últimas). La resistencia de los dicariones híbridos obtenida en una concentración de 0.1 g/l 2DG fue desde 10.1% para P10₂xP17₁ hasta 57.2 % para P10₂xP15₁.

3.4 Caracterización de híbridos seleccionados de *Pleurotus* spp.

La caracterización de cepas con base en la resistencia a la 2DG nos permite esperar altas producciones de cuerpos fructíferos sobre paja de trigo sin necesidad de llevar a cabo la fructificación en algún sustrato lignocelulósico, como la paja de trigo. Sin

embargo, resultaba necesario determinar el resto de las características de producción en paja de trigo de las cepas híbridas obtenidas por apareamiento entre neohaplontes, tales como el patrón de producción: inicio y duración de la fructificación y peso promedio de los esporóforos. Para ello se sembraron 4 bolsas con 5 kg de paja pasteurizada y después de ser inoculadas se incubaron a 28°C hasta la aparición de fructificaciones, las que se cortaron, contaron y pesaron para determinar las características de producción.

TABLA 15. RESISTENCIA A 2DG DE LOS DICARIONES OBTENIDOS POR APAREAMIENTO ENTRE NEOHAPLONTES.

DICARIONES HÍBRIDOS	RESISTENCIA (%) *		
	CONCENTRACION DE 2DG (g/l)		
	0.01	0.05	0.1
P10 ₁ xP14 ₁	79.2	66.5	12.8
P10 ₁ xP15 ₁	65.3	61.1	0.0
P10 ₁ xP17 ₁	50.6	0.0	0.0
P10 ₂ xP14 ₁	53.1	28.8	0.0
P10 ₂ xP15 ₁	88.9	71.9	57.2
P10 ₂ xP17 ₁	78.2	57.6	10.1
P14 ₁ xP15 ₁	64.5	0.0	0.0
P14 ₁ xP17 ₁	37.5	21.8	17.2
P14 ₁ xP18 ₁	77.9	67.2	55.2
P15 ₁ xP17 ₁	75.7	66.6	0.0
P15 ₁ xP18 ₁	54.4	0.0	0.0
P14 ₂ xP17 ₁	84.2	67.7	50.4
P14 ₂ xP18 ₁	73.3	0.0	0.0

Resistencia = Biomasa en medio con 2DG sobre biomasa en medio sin 2DG multiplicado por cien

3.4.1 Inicio de la fructificación sobre paja de trigo de los híbridos de *Pleurotus* spp.

Para identificar los híbridos con fructificación temprana o tardía se tomó en cuenta el número de días para obtener la primera cosecha, es decir, el inicio de la fructificación. En la Tabla 17 se puede observar que este fue entre 39 y 95 días. Con el análisis estadístico se determinó que los más precoces fueron P10₂xP15₁, P14₁xP18₁, P14₂xP17₁ y P14₁xP17₁, los que necesitaron 39, 44, 45 y 46 días para la fructificación. En cambio, P10₁xP14₁ y P10₂xP17₁ se determinaron como cepas de fructificación tardía con 82 y 95 días, respectivamente.

TABLA 16. CEPAS DICARIÓTICAS HÍBRIDAS SELECCIONADAS CON BASE EN EL COLOR DE FRUCTIFICACIONES EN EMA Y RESISTENCIA A 2DG.

DICARIÓNES HÍBRIDOS	CARACTERÍSTICAS	
	COLOR DE ESPORÓFOROS	RESISTENCIA (%)
P10 ₂ xP15 ₁	BLANCO	57.2
P14 ₁ xP18 ₁	GRIS	55.2
P14 ₂ xP17 ₁	BLANCO	50.4
P14 ₁ xP17 ₁	BLANCO	17.2
P10 ₁ xP14 ₁	BLANCO	12.8
P10 ₂ xP17 ₁	GRIS	10.1

3.4.2 Producción semanal y total

Los esporóforos se cosecharon y pesaron con la finalidad de determinar el rendimiento de las cepas. En la Tabla 18 se muestran la producción semanal y total de los diferentes cepas dicarióticas híbridas de *Pleurotus* spp. en g de hongo fresco por 5

kg de sustrato húmedo durante las 14 semanas en que se extendió la producción. Se muestra que la producción total fue desde 798g para P10₂xP17₁, hasta 1230g para P14₁xP17₁.

La producción acumulada de los híbridos seleccionados durante 14 semanas se presenta en la Tabla 19. Con el análisis estadístico se determinó que solo son necesarias de 3 a 8 semanas de producción para obtener su rendimiento máximo significativo. Con este parámetro se determinó que las producciones fueron desde 571 a 1124 g de hongos frescos por 5 kg de sustrato.

TABLA 17. INICIO DE LA FRUCTIFICACIÓN SOBRE PAJA DE TRIGO DE HÍBRIDOS DE *Pleurotus spp.*

DICARIONES HÍBRIDO	INICIO DE LA FRUCTIFICACIÓN (días)
P10 ₂ xP15 ₁	39±5 a *
P14 ₁ xP18 ₁	44±3 a
P14 ₂ xP17 ₁	45±8 a
P14 ₁ xP17 ₁	46±4 a
P10 ₁ xP14 ₁	82±28 b
P10 ₂ xP17 ₁	95±25 b

* Letras idénticas muestran que no hay diferencias significativas entre ellas (Duncan p<0.05).

TABLA 18. PRODUCCIÓN SEMANAL Y TOTAL* EN PAJA DE TRIGO DE DICARIONES HÍBRIDOS OBTENIDOS POR APAREAMIENTO ENTRE NEOHAPLONTES.

SEMANA	CEPAS DICARIOTICAS HIBRIDAS DE <i>Pleurotus spp.</i>					
	P10 ₁ xP14 ₁	P10 ₂ xP15 ₁	P10 ₂ xP17 ₁	P14 ₁ xP17 ₁	P14 ₁ xP18 ₁	P14 ₂ xP17 ₁
1	434.0±298.8	696.5±270.6	469.4±266.1	871.5±94.1	257.0±147.8	344.8±438.7
2	0±0	0±0	560.0±396.0	0±0	0±0	570.0±28.3
3	0±0	0±0	54.0±38.2	297.0±0	419.3±106.5	917.0±0
4	0±0	0±0	33.0±23.3	245.1±19.3	0±0	134.0±135.8
5	297.1±0	286.9±0	0±0	0±0	266.7±339.8	335.0±21.2
6	0±0	302.5±194.5	177.0±125.2	55.5±17.7	0±0	177.7±132.0
7	0±0	0±0	341.0±209.3	46.0±0	0±0	0±0
8	161.0±80.6	0±0	0±0	0±0	135.0±0	0±0
9	0±0	0±0	326.5±194.2	0±0	0±0	0±0
10	445.0±431.3	0±0	60.5±61.4	0±0	0±0	0±0
11	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
12	47.7±35.0	0±0	25.0±17.7	0±0	0±0	45.0±0
13	0±0	134.0±93.0	0±0	0±0	0±0	0±0
14	0±0	222.0±0.0	0±0	0±0	0±0	10.0±0
TOTAL	847± 73	1075.5±153	798.7±216	1230.2±242	805.2±187	1196±123


* de hongos frescos por bolsa de 5 kg de sustrato (humedad = 83 %) durante 14 semanas de producción

TABLA 19. PRODUCCIÓN SEMANAL ACUMULADA* SOBRE PAJA DE TRIGO DE DICARIONES HÍBRIDOS OBTENIDOS POR APAREAMIENTO ENTRE NEOHAPLONTES

SEMANA	CEPAS DICARIOTICAS HIBRIDAS DE <i>Pleurotus spp.</i>					
	P10 ₁ xP14 ₁	P10 ₂ xP15 ₁	P10 ₂ xP17 ₁	P14 ₁ xP17 ₁	P14 ₁ xP18 ₁	P14 ₂ xP17 ₁
1	434.0±298.8 a	696.5±270.6 a	469.4±224.7 a	871.5±94.1 a	257.0±147.8 a	344.8±438.7 a
2	434.0±298.8 a	696.5±270.6 a	549.4±169.6 b	871.5±94.1 a	257.0±147.8 a	629.8±430.5 b
3	434.0±298.8 a	696.5±270.6 a	557.1±160.8 b	945.8±209.5 a	571.5±247.0 b	859.0±187.1 c
4	434.0±298.8 a	696.5±270.6 a	561.9±164.6 b	1124.3±119.1 b	571.5±247.0 b	926.0±237.3 d
5	508.3±401.6 b	768.2±261.3 b	561.9±164.6 b	1191.0±227.0 b	771.5±141.3 b	1093.5±153.9 e
6	508.3±401.6 b	919.5±112.9 c	587.1±215.2 b	1208.0±230.4 b	771.5±141.3 b	1182.3±145.1 e
7	508.3±401.6 b	919.5±112.9 c	684.6±272.4 c	1230.3±242.2 b	771.5±141.3 b	1182.3±145.1 e
8	588.8±309.2 c	919.5±112.9 c	684.6±272.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1182.3±145.1 e
9	588.8±309.2 c	919.5±112.9 c	777.9±198.2 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1182.3±145.1 e
10	811.3±283.0 c	919.5±112.9 c	795.1±217.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1182.3±145.1 e
11	811.3±283.0 c	919.5±112.9 c	795.1±217.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1182.3±145.1 e
12	847.0±273.7 c	919.5±112.9 c	798.7±216.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1193.6±122.9 e
13	847.0±273.7 c	1020.0±190.4 c	798.7±216.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1193.6±122.9 e
14	847.0±273.7 c	1075.5±153.0 c	798.7±216.4 c	1230.3±242.2 b	805.3±187.3 b	1196.1±123.9 e
TOTAL	847.0±273.7	1075.5±153.0	798.7±216.4	1230.3±242.2	805.3±187.3	1196.1±123.9

Letras idénticas muestran que no hay diferencias significativas entre las semanas para cada cepa (Duncan p<0.05).

* de hongos frescos por bolsa de 5 kg de sustrato (humedad = 83 %) durante 14 semanas de producción

 = semana cuando cada cepa obtuvo su rendimiento máximo significativo

3.4.4 Características de fructificación

Para observar las diferencias en los máximos rendimientos significativos de las cepas dicarióticas híbridas de *Pleurotus* spp. y poder definir cuales fueron las más productivas en una cantidad de semanas menor se realizó un análisis estadístico con pruebas de medias. Ya con el rendimiento máximo significativo se determinó la eficiencia biológica y el tiempo de fructificación. Otros parámetros importantes en la fructificación que fueron evaluados son el color y peso unitario de los esporóforos de las cepas de *Pleurotus* spp (Tabla 20). Las cepas más productivas fueron P10₂xP15₁, P14₂xP17₁ y P14₁xP17₁ que presentaron una eficiencia biológica de 108, 128 y 132 %, mientras que las menos productivas resultaron ser los híbridos P14₁xP18₁, P10₁xP14₁ y P10₂xP17₁, con eficiencias biológicas de 67, 69 y 80%, respectivamente.

El color y peso unitario de los esporóforos para cada híbrido seleccionado fue determinado en paja de trigo y se presentan en la Tabla 20. En general fueron de color blanco y solo los P10₂xP17₁ y P14₁xP18₁ presentaron esporóforos de color gris. En relación al peso unitario, éste fue de 9 g para P14₁xP17₁ y P14₁xP17₂. Le siguió P10₂xP15₁ con 14 g y los que presentaron los mayores pesos, de 20 a 25 g, fueron los híbridos P10₁xP14₁, P10₂xP17₁ y P14₁xP18₁.

TABLA 20. CARACTERÍSTICAS DE FRUCTIFICACIÓN (RENDIMIENTO MÁXIMO, EFICIENCIA BIOLÓGICA, TIEMPO DE FRUCTIFICACIÓN Y TIPO DE ESPOROFOROS) SOBRE PAJA DE TRIGO DE LOS HIBRIDOS DICARIOTICOS SELECCIONADOS

DICARIONES HIBRIDOS	MAXIMO RENDIMIENTO SIGNIFICATIVO * (g de esporóforos /5 kg sustrato)	EFICIENCIA BIOLÓGICA (%)•	TIEMPO DE FRUCTIFICACION (semanas)	ESPOROFOROS	
				Color	Peso unitario (g)
P14 ₁ xP18 ₁	571.5±247.0 a	67.2±29.1 a	3	Gris	25.8±34
P10 ₁ xP14 ₁	588.8±309.2 a	69.3±36.4 a	8	Blanco	20.8±13
P10 ₂ xP17 ₁	684.6±272.4 b	80.5±32.0 b	7	Gris	25.5±22
P10 ₂ xP15 ₁	919.5±112.9 c	108.2±13.3 c	6	Blanco	14.3±7
P14 ₂ xP17 ₁	1093.5±153.9 c	128.6±18.1 c	5	Blanco	9.3±5
P14 ₁ xP17 ₁	1124.3±119.1 c	132.3±14.0 c	4	Blanco	9.7±3

Letras idénticas muestran que no hay diferencias significativas entre ellas para cada variable (Duncan p<0.05).

* Humedad del sustrato = 83 %

• Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco)

La tasa de producción (TP), es decir, la cantidad de hongos frescos por 100 g de sustrato fresco en cada día de cultivo se muestra en la Tabla 21. Se puede observar que las cepas P14₂xP17₁ y P14₁xP17₁ mostraron la mejor TP con 1.75 y 2.06. Por el contrario las cepas con menores TP fueron P10₂xP17₁ y P10₁xP14₁, con 0.66 y 0.68, respectivamente.

Al comparar los valores de EB (Tabla 20) y de TP para cada híbrido (Tabla 21) se observó una concordancia entre ellos. Esto es, cepas con alta EB presentarán mayores TP siempre y cuando el tiempo de fructificación sea muy semejante entre ellas, como en los híbridos P10₂xP15₁, P14₂xP17₁ y P14₁xP17₁, que obtuvieron su rendimiento máximo entre 4 y 6 semanas. Entre estos híbridos no se encontró diferencias significativas para la EB, pero al tomar en cuenta la TP el híbrido P10₂xP15₁ presentó una tasa de producción menor al obtener su rendimiento máximo hasta 6 semanas. Para los híbridos con menores rendimientos ocurrió algo semejante, pues presentaron EB semejantes pero en diferente tiempo de fructificación, lo que permitió encontrar que el híbrido P14₁xP18₁ con la menor EB resultara con mejor TP.

TABLA 21. TASA DE PRODUCCIÓN EN EL RENDIMIENTO MÁXIMO SOBRE PAJA DE TRIGO DE DICARIONES HÍBRIDOS SELECCIONADOS

DICARIONES HÍBRIDOS	TASA DE PRODUCCIÓN (E. B. */día)
P10 ₂ xP17 ₁	0.66±0.20 a **
P10 ₁ xP14 ₁	0.68±0.46 a
P14 ₁ xP18 ₁	1.03±0.31 b
P10 ₂ xP15 ₁	1.44±0.34 c
P14 ₂ xP17 ₁	1.75±0.18 d
P14 ₁ xP17 ₁	2.06±0.38 d

* Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco) (humedad = 83%)

** Letras diferentes muestran diferencias significativas entre ellas (LSD p<0.05)

3.5 Análisis comparativo de cepas padres e híbridas

Para determinar si los híbridos obtenidos por apareamiento entre neohaplontes presentaron mejores características de producción que sus parentales, los parámetros de selección fueron comparados con una prueba de t de student para determinar si existen o no diferencias significativas entre los grupos evaluados y estos se muestran en la Tabla 22.

El inicio de la fructificación de las cepas progenitoras fue de 36 días mientras que en los híbridos se incrementó significativamente hasta 62 días. Las cepas progenitoras requirieron 107 días en obtener su rendimiento máximo, pero los híbridos lo obtuvieron en menor tiempo en tan solo 28 días de producción. El tiempo requerido para completar el ciclo de cultivo se dedujo entonces de 144 días con las parentales a 91 días para los híbridos.

No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento máximo significativo de las cepas parentales, 938 g respecto al de los híbridos con 814 g de hongos frescos por 5 kg de sustrato húmedo. Estos valores no son comparables, porque se partió de una diferente cantidad de materia seca, debido al distinto contenido de agua del sustrato empleado para los dos grupos de cepas. Con las cepas progenitoras una bolsa de 5 kg de sustrato contenía 1340 g de materia seca (Humedad 73.2%), mientras que los dicariones híbridos los 5 kg de sustrato representaron solo 850 g de materia seca (Humedad=83%). Para evitar este problema se comparó la eficiencia biológica, que mide la producción de hongo frescos por 100 g de sustrato seco, en donde sí se encontraron diferencias significativas. Las cepas parentales presentaron una eficiencia biológica de 70% y en las híbridas ésta fue de 96%, resultando más productivas los híbridos.

Al comparar el peso unitario de los basidiocarpos también se encontraron diferencias significativas ya que las cepas progenitoras presentaron cuerpos fructíferos de 11 g mientras que las híbridas produjeron esporóforos más pesados de 18 g.

TABLA 22. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA A 2DG DE LAS CEPAS PARENTALES DE *PLEUROTUS* SPP. Y DE HÍBRIDOS OBTENIDOS POR APAREAMIENTO ENTRE NEOHAPLONTES.

CARACTERÍSTICA	CEPAS DE <i>PLEUROTUS</i> spp.		t student ($\alpha=0.05$) •
	PARENTALES	HÍBRIDOS	
Inicio de la fructificación (días)	36.8±12.9	62.3±28.3	4.8 •
Duración de la fructificación (días)	107.7±21.7	28.5±14.5	2.2 •
Rendimiento máximo significativo (g de hongos frescos/5kg sustrato)	938.31±264.11	814.14±301.56	1.3 NS
Eficiencia biológica *	70.0±19.7	95.8±35.5	17.9 •
Peso unitario de esporóforos (g)	10.9±10.3	18.5±17.9	3.04 •
Tasa de producción (E.B*/.día)	0.4888±0.144	1.203±0.610	17.92 •
Resistencia a 2DG	22.068±21.46	26.43±23.74	0.672 NS

•=Existen diferencias significativas entre ambos grupos

NS= No hay diferencias significativas

* Eficiencia biológica = g de esporóforos frescos / 100g sustrato (peso seco)

En relación a la tasa de producción, parámetro que relaciona la eficiencia biológica con el tiempo requerido para alcanzarla, se observaron diferencias significativas. Se encontró que los híbridos presentaron tasas de producción de más del doble que las cepas parentales, 1.2 y 0.49 respectivamente.

La resistencia de las cepas progenitoras a 2DG fue de 22%, mientras que los híbridos presentaron una resistencia de 26%, ligeramente mayor, pero no significativa.

3.6 ESTUDIO GENÉTICO DEL CARÁCTER DE RESISTENCIA A 2DG EN *Pleurotus* spp.

Debido a la posibilidad de seleccionar híbridos de *Pleurotus* spp. altamente productivos con base en la resistencia a 2DG resultaba indispensable estudiar la naturaleza genética de este carácter. De esta manera podría eventualmente determinarse el número probable de genes que participan en su expresión así como su segregación en los cuatro tipos de compatibilidad sexual, y así definir su uso potencial para hibridar cepas manteniendo altas producciones.

3.6.1 Determinación de la resistencia a 2DG de neohaplontes de cepas de *Pleurotus* spp.

Con la finalidad de determinar la constitución genética de los híbridos seleccionados respecto a la resistencia a 2DG, se determinó la producción de biomasa por los neohaplontes en el medio de almidón con 2DG. La Tabla 23 muestra que en el medio sin 2DG, la producción de biomasa fue desde 0.43 mg/caja para la cepa P14₁ hasta 4.13 mg/caja con el neohaplonte P10₁. Asimismo se muestran las cepas que lograron crecer en el medio con 0.1 g/l de 2DG y que se determinaron como resistentes, estas fueron P10₁, P10₂, P15₁, P18₁ y IAP₁, que produjeron una biomasa desde 0.53 mg/caja para el neohaplonte P18₁ hasta 1.60 mg/caja por IAP₁. Las cepas sensibles fueron P14₁, P14₂, P17₁ e IBUG-67₁, que no mostraron crecimiento en el medio con 2DG.

3.6.2 Segregación del carácter de resistencia a 2DG

El conocimiento de la naturaleza genética del carácter de resistencia a 2DG en el hongo *Pleurotus* es indispensable para emplearlo como parámetro de selección para realizar un mejoramiento genético y mantener los altos rendimientos de las cepas. Por ello se seleccionaron los híbridos de acuerdo a la constitución genética de los neohaplontes que lo conforman, con el objeto de estudiar la segregación de este carácter. La Tabla 24 muestra los híbridos y su constitución genética. De los 6 híbridos caracterizados en paja de trigo,

P10₂xP17₁, P10₁xP14₁, y P14₁xP18₁ fueron del tipo R⁺xR⁻; P14₂xP17₁ y P14₁xP17₁ del tipo R⁻xR⁻ y P10₂xP15₁ R⁺xR⁺.

TABLA 23. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y SENSIBILIDAD A 2DG (0.1 g/l) DE COMPONENTES MONOCARIÓTICOS DE DICARIONES DE *Pleurotus spp.*

COMPONENTE MONOCARIÓTICO	PRODUCCIÓN DE BIOMASA (mg/caja)		CONSTITUCIÓN GENOTÍPICA
	ALMIDÓN	ALMIDÓN + 2DG	
P10 ₁	4.13±2.476	1.43±1.973	R ⁺
P10 ₂	1.80±0.400	1.13±0.929	R ⁺
P15 ₁	1.07±0.208	1.20±0.400	R ⁺
P18 ₁	1.30±0.346	0.53±0.153	R ⁺
IAP ₁	3.70±0.400	1.60±0.812	R ⁺
P14 ₁	0.43±0.153	0.00±0.000	R ⁻
P14 ₂	2.03±1.230	0.00±0.000	R ⁻
P17 ₁	0.90±0.624	0.00±0.000	R ⁻
IBUG-67 ₁ *	1.97±0.551	0.00±0.000	R ⁻

R = resistente a 2DG

S = sensible a 2DG

*= cepa monocariótica de la progenie de IBUG-67

Para determinar el patrón de segregación de este carácter, se debía recuperar la progenie monocariótica de este híbrido seleccionado. Se aislaron cerca de 50 micelios monospóricos y por medio de apareamientos se les determinó su tipo de compatibilidad sexual. Se determinó además su resistencia a 2DG.

TABLA 24. SELECCIÓN DE HÍBRIDOS DE *Pleurotus spp.* CON BASE EN LA CONSTITUCIÓN GENOTÍPICA DE SUS COMPONENTES MONOCARIÓTICOS

DICARIOTE HÍBRIDO	CONSTITUCIÓN GENÉTICA			HÍBRIDO SELECCIONADO
	R^+xR^-	R^+xR^+	R^-xR^-	
P10 ₂ xP17 ₁	*			
P10 ₁ xP14 ₁	*			
P14 ₁ xP18 ₁	*			*
P10 ₂ xP15 ₁		*		*
P14 ₂ xP17 ₁			*	
P14 ₁ xP17 ₁			*	*

Inicialmente se evaluó la progenie del híbrido R^+xR^- (P14₁xP18₁) para determinar el número probable de genes que participaran en la resistencia a 2DG en *Pleurotus*. Para ello se aislaron 47 micelios monospóricos y si el carácter estuviera determinado por un gen, el 50% de la población lo tendría, esto es 23 monospóricos. En este caso se identificaron 38 micelios resistentes, es decir aproximadamente 81%, valor muy por arriba de lo esperado. La prueba de X^2 no permite aceptar la participación de 1 gen, sino más bien la presencia de una cierta dominancia, sin ser esto tampoco concluyente. Por ello se considero adecuado estudiar otros dos híbridos con diferente constitución genética (Tabla 24).

Al evaluar la progenie del dicarion R^+xR^+ (P10₂xP15₁), se presentó una situación algo semejante. De los 48 micelios aislados para este híbrido se detectaron 33 monospóricos R^+ , es decir, el 69% lo que en este caso si permite concluir la participación de un gen de acuerdo a la prueba de X^2 . Sin embargo, con el híbrido R^-xR^- (P14₁xP17₁), en donde no se esperaba encontrar micelios

R+, el 22% de los 46 micelios monospóricos obtenidos fueron R+, aceptándose en este caso la participación de número de genes mayor, 2 ó 3.

Se observó que cuando el híbrido de *P. ostreatus* contiene un neohaplonte R+ se acepta la hipótesis de que en el carácter de resistencia a 2DG participa un solo gen o bien que este pudiera ser dominante. Sin embargo, en el híbrido formado con 2 neohaplonte R⁻ el carácter R⁺ se encuentra en la progenie como si estuviera controlado por 2 o más genes. Por lo anterior la naturaleza este carácter indica su presencia como un factor extracromosomal, quizás en mitocondria, un plásmido o un virus.

3.6.3 Distribución del carácter en los cuatro tipos de apareamiento

Pleurotus ostreatus es un basidiomicete heterotálico tetrapolar, y en cada basidio se forman 4 tipos de esporas, diferentes genéticamente por los factores de incompatibilidad. Por ello se determinó si la resistencia a 2DG está ligada o no a alguno de los tipos de compatibilidad sexual.

La Tabla 26 muestra la distribución de los monospóricos resistentes a 2DG en la progenie del híbrido P14₁xP18₁ (R⁺xR⁻) en los cuatro tipos de apareamiento. Los 33 micelios resistentes se distribuyeron 10 en el tipo de apareamiento I y II, 5 en el III y 8 en el IV. Para el híbrido P10₂xP15₁ (R⁺xR⁺), los 31 micelios resistentes se distribuyeron 7 en el tipo I y II, 11 en el III y 6 en el IV (Tabla 27). Los 10 micelios resistentes en P14₁xP17₁ (R⁻xR⁻) se distribuyeron cuatro en el tipo I y II, dos en el IV y cero en el II (Tabla 28).

TABLA 25. NÚMERO DE GENES RESPONSABLES DE LA RESISTENCIA A 2DG EN CEPAS PRODUCTIVAS DE *Pleurotus* spp.

GENES (NÚMERO PROBABLE)	MONOCARIONES RESISTENTES A 2DG				GENES DETERMINADOS	
	VALOR ESPERADO		VALOR OBSERVADO		Valor de χ^2 (Calculado)	Aceptación de hipótesis (P=95 % $\chi^2= 3.84$)
	RELATIVO (%)	ABSOLUTO (Nr)	RELATIVO (%)	ABSOLUTO (Nr)		
OBLACIÓN DE HIBRIDO $R^+ \times R^-$ (P14₁ x P18₁):						
47 MONOCARIONES						
1	50	23			9.8	NA
2	25	12	80.9	38	58.3	NA
3	12.5	6			170.7	NA
OBLACIÓN DE HIBRIDO $R^+ \times R^+$ (P10₂ x P15₁):						
48 MONOCARIONES						
1	50	24			3.4	Aceptado
2	25	12	68.75	33	36.7	NA
3	12.5	6			121.5	NA
OBLACIÓN DE HIBRIDO: $S^- \times S^-$ (P14₁ x P17₁):						
46 MONOCARIONES						
1	50	23			7.3	NA
2	25	11	21.7	10	0.09	Aceptado
3	12.5	6			2.7	Aceptado

NA = Existen diferencias significativas entre ambos grupos
Aceptado = No hay diferencias significativas

TABLA 26. DISTRIBUCIÓN DE MONOCARIONES RESISTENTES A 2DG EN LOS 4 TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO P14₁xP18₁ (R⁺xR⁻).

	TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
	I	II	III	IV
MONOCARIONES (CLAVE)	4	1	9	3
	5	8	10	7
	11	15	14	21
	19	20	32	27
	22	25	51	28
	23	26		33
	24	40		34
	36	42		44
	37	48		
	45	52		
NUMERO TOTAL DE MONOCARIONES	10	10	5	8

Con la distribución de los monospóricos resistentes de los 3 híbridos seleccionados, se evaluó su posible segregación en los cuatro tipos de compatibilidad sexual (Tabla 29). Para los híbridos que contienen un neohaplonte R⁺ (R⁺xR⁺ y R⁺xR⁻) la segregación más probable fue de 1:1:1:1. Para el híbrido R⁻xR⁻ se encontró que cualquiera de los tipos de segregación evaluados pudiera ser posible pero la más probable fue 3:1:3:1. Sin embargo, se decidió tomar la que se obtuvo en los otros dos híbridos, lo que permitió deducir que no se encuentra ligado a un tipo de compatibilidad, lo que nos permitiría emplear los cuatro tipos de apareamiento.

TABLA 27. DISTRIBUCIÓN DE MONOCARIONES RESISTENTES A 2DG EN LOS 4 TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE LA PROGENIE DEL HIBRIDO P10₂xP15₁ (R⁺xR⁺).

	TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
	I	II	III	IV
MONOCARIONES (CLAVE)	1	3	5	4
	7	16	10	20
	11	18	13	23
	12	22	14	27
	28	32	17	42
	37	34	21	a
	38	e	29	
			35	
			39	
			43	
			44	
NUMERO TOTAL DE MONOCARIONES	7	7	11	6

TABLA 28. DISTRIBUCIÓN DE MONOCARIONES RESISTENTES A 2DG EN LOS 4 TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE LA PROGENIE DEL HIBRIDO P14₁xP17₁ (R⁻xR⁻).

	TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
	I	II	III	IV
MONOCARIONES (CLAVE)	19		10	21
	25		22	30
	32		29	
	37		40	
NUMERO TOTAL DE MONOCARIONES	4	0	4	2

TABLA 29. SEGREGACIÓN DEL CARACTER DE RESISTENCIA A 2DG EN LOS 4 TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE LAS PROGENIES DE 3 HÍBRIDOS DE *Pleurotus spp.*

TIPO DE SEGREGACION PROBABLE	SEGREGACIÓN ENCONTRADA (VALOR DE χ^2 Calculado)		
	TIPO DE HÍBRIDO		
	R ⁺ xR ⁻	R ⁺ xR ⁺	R ⁻ xR ⁻
1:1:1:1	2.03	1.90	4.4
2:1:2:1	4.59	1.93	2
3:1:3:1	8.95	5.56	1.7
4:1:4:1	13.34	10.12	2

Aceptación de hipótesis (P=95 %, $\chi^2= 7.81$)

1. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso obtener cepas mejoradas de *Pleurotus* spp. en el patrón de producción, a través de apareamientos entre neohaplontes.

Se realizó una caracterización y selección de las cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. de la colección del grupo de trabajo. Con estos datos y la determinación de la resistencia a 2DG, se desarrolló una metodología que permitiera la identificación y selección de cepas con altos rendimientos en paja de trigo con base en la resistencia. De las cepas seleccionadas se efectuó la producción de neohaplontes, lo que permitió la obtención de híbridos. Posteriormente se seleccionaron las cepas dicarióticas híbridas con base a la resistencia a 2DG y en seguida fueron caracterizadas en paja de trigo. Finalmente se estudió la constitución genética del carácter de resistencia a 2DG. Este comprendió la determinación del número de genes involucrados y la distribución del carácter de resistencia a 2DG en híbridos seleccionados.

Los patrones de producción de las diferentes cepas en paja de trigo fueron caracterizados de acuerdo a los siguientes parámetros con menor tiempo para el inicio de la fructificación y de cosecha, mayor rendimiento máximo y tasa de producción, color y peso promedio de los esporóforos. Cabe resaltar que algunos de ellos ya han sido empleados al caracterizar cepas silvestres y comestibles de hongos comestibles, entre ellos *Pleurotus*, con diferentes condiciones geográficas y ambientales en donde se ha utilizando diversos sustratos, tales como bagazo de caña de azúcar en Brasil (Bononi *et al.*, 1991), paja de trigo en la India (Upadhyay y Vijay, 1991), mazorcas de maíz en Grecia (Zervakis y Balis, 1991), paja de trigo en Estados Unidos (Royse y Zaki, 1991), y en Francia (Houdeau *et al.*, 1991); Pulpa de café (Martinez-Carrera *et al.*, 1996), paja de trigo (Navarro *et al.*, 1996) y bagazo de maguey tequilero en México (Soto-Velazco *et al.*, 1991a). Sin embargo, el rendimiento máximo significativo así como la tasa de producción no han sido evaluados y tomadas en cuenta como criterios de selección en un programa de

mejoramiento genético de cepas de *Pleurotus*, como se propone en este trabajo

Se ha reportado que *Pleurotus* inicia la fructificación después de 31 días hasta 55-60 días de incubación en paja de trigo (Cedano *et al.*, 1993; Upadhyay y Vijay, 1991). Las cepas evaluadas en este estudio mostraron un periodo de incubación de 21 a 32 días, en cambio otras iniciaron la fructificación entre 41 y 54 días. Al primer grupo de cepas se consideró de fructificación temprana y al segundo de fructificación tardía.

En general las cepas evaluadas en el trabajo presentaron mayores producciones en las primeras semanas y fueron disminuyendo hasta que fueron nulas, como lo mencionan otros trabajos para otras cepas y empleando otros sustratos (Jain *et al.*, 1988; Cedano *et al.*, 1993; Hernandez-Ibarra *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 1996; Soto-Velazco *et al.*, 1991a) y a diferencia de Acosta-Urdapilleta *et al.*, (1994) que reportaron mayor producción en la segunda cosecha.

En el caso del rendimiento máximo significativo, éste se estudió para determinar la máxima producción en el mínimo tiempo de cultivo, ya que solo existen reportes de estudios en donde se determina el rendimiento máximo sin importar en el número de cosechas, es decir, sin tener en cuenta el potencial de fructificación.

Existen pocos estudios en donde se emplee la tasa de producción para evaluar la producción de cepas de *Pleurotus*. Este parámetro ha sido utilizado para *Lentinus* (Royse, 1985, Royse, 1989) y *Auricularia* (Calvo-Bado *et al.*, 1996). Recientemente, Hernández-Ibarra *et al.* (1995) evaluaron cepas de *Pleurotus* aisladas del estado de Chiapas y obtuvieron una TP de 2.21, muy por encima de las obtenidas en este estudio; sin embargo, emplearon pulpa de café como sustrato y las condiciones ambientales de producción no fueron las mismas. Otro factor importante fue el uso de diferentes cepas, lo que ocasiona una marcada diferencia entre las cepas de los dos trabajos.

Como se puede apreciar en el capítulo de experimentos y resultados se emplearon cepas con diferente color de esporóforos, principalmente fueron blancos y grises, que son los más aceptados por el consumidor del mercado mexicano. Se utilizaron además cepas con fructificaciones de color gris-azul y rosa, pues esporóforos de otros colores como el rosa son atractivos para el mercado estadounidense (Royse y Zaki, 1991). Desde el punto de vista comercial resulta sumamente interesante llevar al mercado mexicano cepas con cuerpos fructíferos atractivos para el consumidor, eventualmente de colores novedosos, pero con altos rendimientos que permitan aumentar la demanda de este tipo de hongo.

El tamaño de esporóforos se ha determinado clasificándolos de acuerdo al diámetro del pileo (Mata y Gaitan-Hernández, 1995), lo cual es sumamente laborioso y está expuesto a errores experimentales. Por lo anterior el tamaño del esporóforo se determinó al tomar en cuenta el peso unitario (Royse, 1989) y no por longitud. Así se caracterizaron las cepas en una forma más rápida, ya que en ciertas etapas del cultivo con algunas cepas se obtuvieron grandes cantidades de esporóforos pero de tamaño pequeño, y una forma rápida de evaluar su tamaño resulta el peso unitario promedio.

Vilgalys *et al.* (1993), propuso al menos 15 grupos diferentes de *Pleurotus* spp. dados por la interesterilidad entre ellos y por estudios de filogenia molecular utilizando DNAr en cepas de diferente origen geográfico, aisladas de Norteamérica, Europa, Asia, Sudamérica, África y Australia. Los resultados obtenidos con la caracterización de las cepas empleadas en este estudio mostró que *Pleurotus* spp. presenta una gran variabilidad morfológica por su plasticidad fenotípica y variación genética, y concuerda con el reporte de Vilgalys *et al.* (1993), observándose un rango muy amplio de variación en cada uno de los parámetros evaluados. Esto se explica por el origen de las cepas que es muy diverso y están adaptadas a climas desde tropicales hasta templados.

Eugenio y Anderson (1968) mencionaron que con el apareamiento entre cepas de diferente origen resultan dicariones con mayor producción de cuerpos

fructíferos. La variabilidad fisiológica, genética y fenotípica encontrada en las cepas del presente estudio resultó importante ya que cepas de diferente origen geográfico son una fuente importante de material genético para realizar el programa de mejoramiento genético propuesto, en donde sea posible combinar características interesantes de una cepa con las de otras.

El mejoramiento genético de hongos macroscópicos, y entre ellos *Pleurotus*, se basa principalmente en la obtención de cepas por medio de apareamientos entre micelios monospóricos y su evaluación en el sustrato para determinar las características de producción de las cepas y finalmente una selección, el que resulta en un enorme gasto de tiempo, dinero y mano de obra. Por lo anterior, se hacia necesaria una metodología que ayude a identificar de manera rápida cepas con características interesantes, pero sin realizar esta caracterización en planta piloto; es decir, una identificación en el laboratorio que nos permita seleccionar las mejores cepas con potencial para el cultivo comercial.

Una forma de selección rápida es por medio de agentes selectivos de tipo tóxico tales como la 2DG, cuya resistencia confiera a las mutantes alguna propiedad desreguladora del metabolismo. Para ello se han obtenido cepas con mayor producción de amilasa y sacarasa, ácido cítrico, glucoamilasa, entre otros (Allen *et al.*, 1989; Kirimura *et al.*, 1992 y Tani *et al.*, 1988) en donde el parámetro de selección ha sido la resistencia a 2DG.

Sánchez y Viniestra (1996) evaluaron la resistencia de 6 cepas de *Pleurotus* y reportaron que cepas resistentes a 2DG presentan una mayor producción de hongos frescos la cual es alcanzada en menor tiempo. Sin embargo, con los resultados obtenidos de las 6 cepas seleccionadas y posteriormente de las 16 cepas empleadas sólo se logró encontrar una correlación altamente significativa entre la resistencia a 2DG y la producción, pero no para identificar cepas con fructificación precoz, tiempo de cosecha y tamaño de esporóforos. Se hace necesario ampliar mas el universo de cepas de *Pleurotus* para poder lograr una conclusión mas precisas al respecto ya que de acuerdo al reporte de Vilgarys *et al.* (1993), este género presenta una gran

variabilidad fisiológica y genética, y quizás con un bajo número de cepas no se logre concluir o generalizar para todas las especies del hongo *Pleurotus*, en donde algunas están mal identificadas taxonómicamente.

Con base en los resultados obtenidos, se determinó que es factible identificar y seleccionar a nivel laboratorio las cepas con rendimientos altos, en función de su resistencia a la 2DG. Sin embargo, para esta selección se debe determinar la biomasa formada y no solo observar si hay o no crecimiento, como lo propuso Sánchez y Viniegra (1996). Por otro lado, se concuerda con Sánchez y Viniegra (1996) que es necesario una concentración de 0.1 g/l de 2DG para identificar con mayor precisión a las cepas altamente productivas, ya que a concentraciones menores, por ejemplo 0.01 g/l no todas las cepas resistentes pueden ser identificadas con plena seguridad.

Sánchez y Viniegra (1996) lograron identificar cepas de *Pleurotus* con fructificación temprana de manera simultánea a las cepas con altos rendimientos. Sin embargo, con el presente estudio y con las cepas evaluadas no se encontró una correlación significativa para el inicio de la fructificación, es decir, una cepa resistente a 2DG no fructificará en menor tiempo.

En el mejoramiento genético de cepas de *Pleurotus* se han empleado micelios monospóricos, es decir, micelios monocarióticos obtenidos después de la germinación de una espora meiótica (basidiospora) para obtener cepas con tolerancia a altas temperaturas (Li, 1980), degradación selectiva del sustrato (Ramírez-Carrillo *et al.*, 1991) o mediante el Fenómeno Buller (Arias-García *et al.*, 1993). Sin embargo, no existen reportes para el mejoramiento genético en donde participen neohaplontes con el fin de obtener nuevas cepas con altos rendimientos.

Como resultado de la identificación de cepas de la primera etapa del estudio se seleccionaron 5 cepas dicarióticas del banco de germoplasma del que se partió inicialmente y 2 más dentro de un segundo grupo las que presentaron un menor peso unitario pero también de estipite.

La producción de neohaplontes de las cepas dicarióticas seleccionadas no fue posible para todas ellas. Se logró obtener los dos componentes de P10 y P14, mientras que de las cepas P15, P17, P18, e IAP sólo se recuperó un componente. La IBUG-67 no fue desdicariotizada, aún al modificar la concentración de peptona, inóculo o el tiempo de homogeneizado del micelio (Leal-Lara, 1980).

Aún se desconoce el mecanismo de desdicariotización en hongos superiores por agentes químicos. Se propone sin embargo la siguientes hipótesis: la interrupción del dicarion por agentes químicos resulta en un defecto en la fusión entre la célula gancho (fíbula) 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 desdicariotizado (Miles y Raper, 1956).

La recuperación de neohaplontes resultó asimétrica con varias cepas o en algunos casos los micelios de una cepa silvestre no fueron haploidizados. Se ha propuesto que éste puede resultar por una pérdida en la viabilidad para lograr un buen crecimiento ocasionado por una mutación recesiva letal o factor haploletal causada durante el proceso de desdicariotización, como lo reportaron Fox *et al.*, (1994) y Fukumasa-Nakal *et al.* (1994) para algunas cepas silvestres de *Lentinula edodes*. En el caso extremo se encontró la cepa IBUG-67 de la cual no se logró la recuperación de neohaplontes. Por lo que se decidió aislar micelios monospóricos obtenidos de la germinación de basidiosporas. De las 7 cepas de *Pleurotus* seleccionadas para ser desdicariotizadas se obtuvieron 10 micelios monocarióticos (neohaplontes y monospóricos). Estas cepas monocarióticas fueron hibridadas por apareamientos entre micelios monospóricos y por apareamientos dicarion-monocarion lográndose la obtención de 13 micelios dicarióticos híbridos.

En el ciclo sexual de *Pleurotus* están involucrados los factores de incompatibilidad que fomentan el entrecruzamiento entre cepas diferentes y evitar el intracruzamiento, promoviendo así la variación genética. Por los apareamientos monocarion-monocarion y del "Fenómeno Buller" no se obtuvo

un número mayor de híbridos debido a que estos factores de incompatibilidad eran idénticos en algunos casos o bien debido a incompatibilidades somáticas que no permitieron la correcta formación de fibulas y/o la migración del núcleo a través de la fíbula (Eugenio y Anderson, 1968). Para los micelios de la IBUG-67 e IAP no se logró la obtención de híbridos, esto debido a que probablemente sean especies diferentes.

Estos híbridos fueron caracterizados por su resistencia a 2DG y el color de las fructificaciones en EMA para identificar las mas adecuadas con potencial para el cultivo comercial. Al igual que las cepas parentales de *Pleurotus* spp. los dicariones híbridos obtenidos presentaron una disminución en la producción de biomasa al incrementar la concentración de 2DG. Con 0.1 g/l de 2DG, el número de cepas híbridas que se inhiben se incrementa hasta 7, y solo 6 cepas dicarióticas resultaron ser resistentes a esta concentración de 2DG, por lo que se seleccionaron para su caracterización en paja de trigo. El inicio de la fructificación de estas cepas vario entre 39 y 95 días, el rendimiento máximo significativo se registró entre la 3 hasta las 8 semanas de producción, la eficiencia biológica fue mayor del 80 % y algunos de ellas superaron el 100% con una tasa de producción de 2.06%. Los esporóforos fueron de color blanco y solo los híbridos P10₂xP17₁ y P14₁xP18₁ presentaron esporóforos de color gris. El peso unitario fue hasta de 20-25 g/hongo.

En general los híbridos obtenidos mostraron ciertas características atractivas que en las cepas parentales no se observaron tales como: un periodo de fructificación más corto para obtener el rendimiento máximo significativo, de solo 28.5 días, la eficiencia biológica fue en promedio de 96 % superando el 70 % de los parentales, se incrementó el peso unitario a 18.5 g/hongo, así como la tasa de producción se elevó hasta 1.2. Por otro lado, no obstante que el inicio de la fructificación se incrementó de 37 hasta 62 días, la tasa de producción se incrementó notoriamente ya que en esta la eficiencia biológica se relaciona con el periodo de incubación y el de producción. Por ello el mayor tiempo de incubación no representa una desventaja para la producción, ya que al acortarse el periodo de fructificación permite por el contrario eficientar espacios en la sala de fructificación.

El conocimiento de la naturaleza genética del carácter de resistencia a 2DG en el hongo *Pleurotus* es indispensable para emplearlo como parámetro de selección en la realización de un programa de mejoramiento genético y mantener los altos rendimientos de las cepas. Goffrini *et al.*, (1995) reportaron que el carácter de resistencia 2DG en *Kluyveromyces lactis* es dominante y que muestra una segregación 1:1. Por lo anterior se decidió determinar la naturaleza genética y segregación de este carácter en el híbrido R^+xR^- .

Al evaluar la progenie del híbrido R^+xR^- con la prueba de X^2 se encontró que este carácter está determinado por menos de un gen, es decir que presenta cierta dominancia. Para comprobar lo anterior y como no fue posible determinar el número de genes que participen en su expresión se decidió tomar dos híbridos más con diferente constitución genética (R^+xR^+ y R^+xR^-). En el híbrido R^+xR^+ se encontró que probablemente un gen este involucrado, pero con el híbrido R^-xR^- se determinó la participación de 2 o más genes. No se logró determinar la presencia de un gen dominante ya que no toda la progenie del híbrido R^+xR^+ fue R^+ , y para el R^-xR^- que no se esperarían encontrar R^+ se encontró que un 21% de los micelios monospóricos aislados presentaron el carácter.

De acuerdo la constitución genética del híbrido varió el número de genes que participan en la expresión del carácter de resistencia a 2DG en *Pleurotus ostreatus*. En el híbrido con uno o dos neohaplonte R^+ se aceptó la hipótesis de un gen, que es dominante. En el híbrido sin componentes R^+ se aceptó la participación de 2 o más genes en la expresión del carácter de resistencia a 2DG. Sin embargo, es probable que sean varios factores extracromosomales, localizándose en mitocondria, plásmido por virus que se complementan para formar un dicarion R^+ y que al segregarse se pierda esta característica. Esta es posible ya que se han encontraron 4 haplotipos de mitocondria en 36 poblaciones silvestres de *Agrocybe aegerita* por medio del análisis de RFLPs (González *et al.*, 1997). Otra posibilidad sería en la caracterización de los neohaplontes utilizados en particular el R^- , que fuese identificado como R^+ .

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Para comprobar si el carácter de resistencia a 2DG es extracromosomal resulta necesario la evaluación de progenies con un número mayor de micelios monospóricos e incluso más híbridos dicarióticos que permitan llegar a tales conclusiones o incrementar la población de micelios monospóricos de los híbridos estudiados. Asimismo es necesario evaluar la estabilidad del carácter después de la resiembra sucesiva y evaluación de la resistencia a 2DG.

La participación de un gen concuerda con los resultados obtenidos en la levadura *K. lactis*, en donde por un análisis de tétradas de híbridos entre cepas mutantes y silvestres se sugiere que la mutación es monogenética, es decir que solo participa un gen (Goffrini, *et al.*, 1995). En cambio Allen *et al.*, (1989) aislaron mutantes resistentes a 2DG de *Neurospora crassa* y mediante un mapeo genético encontraron que la mutación comprende 4 loci. Por lo que es necesario hacer una caracterización mas exhaustiva para el caso de las cepas resistentes de *Pleurotus* spp.

Para probar el carácter de resistencia a 2DG en cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp. es necesario desarrollar una técnica que permita identificar satisfactoriamente las cepas resistentes de las sensibles, quizás mediante una disminución de la concentración de 2DG en el medio de cultivo, incrementando el periodo de incubación o algún otro método de evaluación del crecimiento que permita una optimización en la evaluación de la resistencia a 2DG.

Después de la determinación de los tipos de apareamiento de las progenies, se analizó la distribución del carácter de resistencia a 2DG para cada uno de los híbridos. Para ello se realizaron apareamientos entre las progenies y posteriormente se determinó la resistencia a 2DG. La prueba de X^2 indicó que el tipo de segregación mas probable es 1:1:1:1. Lo anterior concuerda con Goffrini, *et al.* (1995) quienes reportaron una segregación 1:1 para la levadura *K. lactis*, lo que indica que éste carácter no está ligado a algún tipo de apareamiento, por otro lado reportaron que la mutación de resistencia a 2DG es dominante (Goffrini, *et al.*, 1995).

En este estudio se encontró que el carácter de resistencia a 2DG en *Pleurotus* es extracromosomal, ya que mediante el análisis de las progenies del híbrido $R^- \times R^-$ se encontraron monocariones resistentes y con el $R^+ \times R^+$ no fue posible identificar a todos como R^+ esto probablemente debido a una errónea clasificación en los micelios. Por lo que se hace necesario seguir investigando la metodología de identificación de cepas monocarióticas resistentes a 2DG de *Pleurotus* spp. pues estas contienen un solo grupo de cromosomas a diferencia del dicarion, que contiene dos juegos cromosómicos y le permiten tener una mayor resistencia a 2DG.

5. CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta tesis fue la obtención de cepas de *Pleurotus ostreatus* con potencial comercial por medio del apareamiento entre neohaplontes de cepas dicarióticas seleccionadas con base en los siguientes parámetros de producción:

tiempo para el inicio de la fructificación y de cosecha, rendimiento máximo, tasa de producción, color y peso promedio de los esporóforos.

Mediante los parámetros de selección se pudo identificar a las cepas parentales, las que mostraron comprobar la gran diversidad fisiológica y genotípica del género, muy importante para llevar a cabo un programa de mejoramiento genético donde cada cepa participa con su material genético, el cual esta adaptado a diferentes condiciones ambientales y con amplia diversidad fisiológica.

Al incrementar la concentración de 2DG el crecimiento, evaluado por medio de la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa, se vio disminuido. De esta manera se observó una completa inhibición en un número mayor de cepas mientras se incrementó la concentración de 2DG.

Se encontró una correlación altamente significativa, con una probabilidad mayor del 95%, entre la resistencia a 2DG y el rendimiento máximo significativo.

Se estableció que una cepa resistente a 2DG presentará una mayor producción de cuerpos fructíferos en paja de trigo como sustrato. Para ello es necesario determinar la resistencia con base en la producción de biomasa en el medio de cultivo con 2DG (0.1 g/l).

Se encontró que no todas las cepas se desdicarionizan con las condiciones establecidas en la literatura, ya que para algunas cepas no fue posible la producción de neohaplontes.

Durante la formación de híbridos se pudo constatar que los neohaplontes obtenidos presentan factores de incompatibilidad idénticos que no permitieron la formación de dicariones en todos los casos.

Por medio de la correlación significativa encontrada entre la resistencia a 2DG y la producción de cuerpos fructíferos, así como la producción de neohaplontes de cepas de *Pleurotus* fue factible obtener y seleccionar cepas dicarióticas híbridas de *Pleurotus* de características con potencial comercial. Estas presentaron periodo de cosechas cortos para obtener los rendimientos máximos, eficiencias biológicas de 95% y esporóforos más grandes que las cepas parentales.

Mediante apareamientos entre neohaplontes se obtuvieron 13 micelios híbridos dicarióticos, y se seleccionaron los 6 más productivos por medio de la resistencia a 2DG. Éstos resultaron con características potencialmente favorables para la producción de *Pleurotus* spp. en paja de trigo. Entre ellas están: eficiencia biológica alta, tiempo de cosecha mas corto y esporóforos mas grandes

No fue posible concluir de manera definitiva sobre la naturaleza del carácter de la resistencia a 2DG pero se sugiere la presencia de varios factores extracromosomicos y que no se encuentra asociado a ninguno de los factores de incompatibilidad.

SUGERENCIAS

Quedó establecido que el procedimiento para la obtención y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* empleado en esta investigación fue adecuado para la producción de cepas con características atractivas y el potencial para el mercado. Este consistió en la producción de neohaplontes de cepas dicarióticas seleccionadas con base en los parámetros de producción en el rendimiento máximo y no en su potencial de cultivo. Los híbridos obtenidos por medio del apareamiento entre los neohaplontes fueron seleccionados con base en la resistencia a 2DG y mostraron mejores características que las cepas parentales tales como: eficiencia biológica alta, tiempo de cosecha más corto y esporóforos mas grandes. Cabe aclarar que es necesario determinar los parámetros de selección en el rendimiento máximo significativo para determinar la producción comercial y no el potencial que pudieran tener las cepas, como se reporta en la literatura. Esto permitiría realizar una mejor selección de cepas.

No obstante, es aconsejable que en estudios de mejoramiento genético de *Pleurotus ostreatus* posteriores al presente se enfatice en la producción de los dos componentes de la cepa dicariótica que permitan la participación de ambos en la producción de híbridos con nuevos fenotipos. Asimismo es necesario continuar con el estudio genético del carácter de resistencia 2DG por medio de la evaluación de mas híbridos $R^+ \times R^-$ que nos permitan tener una conclusión definitiva al respecto. Por último es importante desarrollar una metodología que nos ayude en la determinación de cepas resistentes o sensibles a 2DG en micelios monocarióticos, por medio de un tiempo mayor de incubación y quizás una disminución de la concentración de 2DG. Esto se debe hacer ya que los micelios dicarióticos son más vigorosos pues presentan dos núcleos y toleran mayores concentraciones de 2DG mientras que los monocarióticos contienen uno sólo. Lo anterior permitiría entender mejor la genética del carácter de resistencia a 2DG en *Pleurotus*.

6. LITERATURA CITADA

- Acosta-Urdapilleta L., N. Bautista, V. M. Mora, L. López, D. Portugal y V. M. Bustos, 1994. Primer cultivo de una cepa silvestre de *Pleurotus ostreatus* de México. *Memorias V Congreso Nacional de Micología*: 64
- Allen K., M. T. McNally, H. S., Lowendorf, C. W. Salyman y S J. Free, 1989. Deoxiglucose-resistan mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, mapping and biochemical characterization. *J. Bact.* 171:53-58.
- Arias-García A., C. Soto-Velazco y L. Guzmán-Dávalos, 1993. Obtención y caracterización de cepas de *P. djamor* cultivadas en bagazo de maguey tequilero. *Memorias I Simposium Latinoamericano de Micología, La Habana, Cuba* p 65.
- Bano, Z., 1967. Studies on mushrooms with particular reference to cultivation and sumerged propagation on *Pleurotus flabellatus*. Ph. D. Thesis, University of Mysore, India.
- Bano, Z. y S. Rajarathnam, 1979. Some important studies on *Pleurotus* mushroom technology. Central Food Techonological Institute, Mysore, India.
- Bononi V. L. R., R. Maziero y M Capelari, 1991. *Pleurotus ostreatoroseus* cultivation in Brazil. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher (ed.). Balkema, Rotterdam:531-532
- Calvo-Bado L. A., J. E. Sánchez-Vazquez y G. Huerta-Palacios, 1996. Cultivo de *Auricularia fuscusuccinea* (Mont.) Farlow sobre sustratos agrícolas en el Sonocusco, Chiapas, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 9:95-106.
- Cedano M., M Martínez, C Soto-Velazco y L Guzmán-Dávalos, 1993. *Pleurotus ostreatoroseus* (Basidiomycotina, Agaricales) in México and its growth in agroindustrial wastes. *Cryp. Bot.* 3:297-302.
- Chang S. T. y W. A. Hayes, 1978. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, Nueva York.
- Chang S. T. y P. G. Miles, 1982. Introduction to Mushroom science. *In: Tropical Mushrooms Biological nature and cultivation methods* (eds. Chang y Miles). The Chinese University Press.
- Chang S. T. y P. G. Miles, 1984. A new look at cultivated mushrooms. *Bioscience* 34:358

- Chang S. T. y P. G. Miles, 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press Boca Raton.
- Chang S. T. y T. H. Quimio, 1982. Tropical mushrooms. Biological Nature and cultivation Methods. The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N. T. Hong Kong.
- De León Choocoj, R., C. Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos y G. Guzmán, 1993. Cultivation of *Pleurotus* on water hyacinth and determination of the heavy metals in Mexico. *Mushroom Res.* 2:37-30.
- De Mot R. y H. Verachtert, 1987. Regulation of the amylase secretion by the yeast *Filobasidium capsuligenum* and a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:258-262.
- Eger, G., 1978. Biology and Breeding of *Pleurotus*. In S. T. Chang y W. A. Hayes (Eds). The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press. Nueva York.
- Eugenio C. P. y N. A. Anderson, 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60:627-634.
- Flegg P. B., 1992. Future strategies for mushroom production. *Mush. Res.* 1:13-18.
- Flegg P. B., 1995. Speciality mushrooms-recent publications. *Mush. J.* 543:20.
- Fox H. M., J. Burden, S. T. Chang y J. F. Peberdy, 1994. Mating-type incompatibility between commercial strains of *Lentinula edodes*. *Exp. Mycol.* 18:95-102.
- Fries N y K. Aschan, 1952. The physiological heterogeneity of the dikariotic mycelium of *Poliporus abietinus* investigated with the aid of microsurgical technique. *Sven. Bot. Tidskr.* 46:429-445.
- Fukumasa-Nakai Y., T. Matsumoto y M. Komatsu, 1994. Dedikaryotization of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40:551-562.
- Goffrini P., A. Ficarelli y I. Ferrero 1995. Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology* 141:441-447.
- González P., G. Barroso y J. Labarere, 1997. Organization and inheritance of the mitochondrial genome of molecular the cultivated basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Memorias VI Congreso Nacional de*

- Micología/Jornadas Científicas, Tapachula Chiapas, C4:7-8.
- Guzmán G., 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes, Limusa, México, D. F.
- Guzmán G., 1983. Los hongos de la Península de Yucatán II. Nuevas exploraciones y adiciones micológicas. *Biotica* 8:71-100.
- Guzmán G., 1985. Hongos. Ed. Limusa. México, D. F.
- Guzmán G. y D. Martínez-Carrera, 1987. El cultivo de los hongos comestibles sobre la pulpa de café en México. *Memorias del Tercer Simposio internacional sobre la utilización integral de los subproductos del café*:68-75.
- Gutiérrez I., Y. Pérez, M. Klibansky, B. Altuna y L. González, 1996. Aplicación de fitohormonas al cultivo de *Pleurotus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 9:107-115.
- Hernandez-Ibarra H., J. E. Sánchez-Vázquez y L. Calvo-Bado, 1995. Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp. de la región de Tapachula, Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 11:29-38.
- Houdeau G., J. M. Oliver, S. Libmond y H. Bawadikji, 1991. Improvement of *Pleurotus* cultivation. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher (ed.). Balkema, Rotterdam:549-554.
- Iracabal, B., G. Zervakis y J. Labarere, 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141:1479-1490.
- Jain S. K., G. S. Gujral., R. Bisaria y P. Vasudevan, 1988. Cultivation of *Pleurotus sajor caju* on aquatic weed. *Aquatic Botany* 30:245-251.
- Kerruish, R. y E. W. Da Costa, 1963. Monokaryotization of cultures of *Lenzites trabea* (Pers) Fr. and other wood destroying basidiomycetes by chemical agents. *Ann. Bot.* 27:653-69.
- Kirimura K., S. Sarangbin, S. Rugsaseel y S. Usami, 1992. Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*. *App. Microbiol Biotechnol.* 36:573-577.
- Leal-Lara H., 1980. Sporelessness in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dikaryotization method. Tesis Doctoral Universidad Philipps, Marburg/Lahn, Alemania.
- Li S. F., 1980. Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus*

- ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm. Bibliotheca Mycologica, Cramer, Vaduz.
- Maher M. J.,1991. Spent mushroom compost (SMC) as a nutrient source in peat based potting substrates. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (ed.) Balkema, Rotterdam:645-650.
- Martínez-Carrera D., P. Morales, W. Martínez, M. Sobal y A. Aguilar,1996. Large-scale drying of coffee pulp and its potential for mushroom cultivation in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 9:43-52.
- Martínez-Carrera D., P. Morales, M. Sobal y A. Larqué-Saavedra, 1993. ¿Reconversión de la industria de los hongos? *Technoindustria*, Diciembre:52-59.
- Martínez-Carrera D., M. Sobal y M. Quirarte,1986. Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Mex. Mic.* 2:227-238.
- Mata G. y R. Gaitan-Hernández,1995.Cultivo de *Pleurotus* en hojas de caña de azúcar. *Rev. Mex. Mic.* 11:17-22.
- Matsumoto T., K. Mimura y Y. Fukumasa-Nakai,1995. Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:487-97.
- Miles P. G. y J.R. Raper, 1956. Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia. *Mycologia* 48:484-94.
- Moore D.,1981. Effects of hexose analogues on fungi: mechanism of inhibition and resistance. *New Phytol* 87:487-515.
- Navarro M., M. Sobal, y L. Acosta-Urdapilleta, 1996 Estudio comparativo de algunos híbridos de *Pleurotus ostreatus* en Morelos, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 9:117-124.
- Oei P.,1991.Some aspects of mushroom cultivation in developing countries. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (ed). Balkema, Rotterdam:777-780.
- Petersen R. H. y K. W. Hughes,1993. Intercontinental interbreeding collection of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and other species. *Sydowia* 45:139-152.
- Ramírez-Carrillo R., 1989. Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Tesis de maestría en biotecnología. Instituto de

- Ramirez-Carrillo R., H. Leal-Lara y G. Eger-Hummel, 1991. Genetic control of cellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher (ed). Balkema, Rotterdam:11-15.
- Raper J. R., 1966. Genetic of sexuality in higher fungi. Ronald Press. Nueva York.
- Raper C. A., 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In S. T. Chang y W. A. Hayes (eds), The Biology and cultivation of edible mushroom. Academic Press. NY.
- Royse, D. J., 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia* 77:756-762.
- Royse D. J., 1989. Factors influencing the production rate of shiitake. *Mush. J. Tropics*. 9:27-138
- Royse D. J. y S. A. Zaki, 1991. Yield stimulation of *Pleurotus flabellatus* by dual nutrient supplementation of pasteurized wheat straw. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher (ed). Balkema, Rotterdam, 545-547.
- Sánchez C. y G. Viniestra-Gonzalez, 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Micol. Res.* 100:455-461.
- Singer, R., 1975. The Agaricales in modern taxonomy, Cramer, Vaduz.
- Sobal, M., P. Morales, W. Martínez, D. N. Pegler y D. Martínez-Carrera, 1997. Cultivation of *Lentinus levis* in Mexico. *Micol Neotrop. Apl.* 10:63-71.
- Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos y L. Villaseñor, 1991a. Substrates for cultivation of *Pleurotus* in Mexico, 1. Tequila maguey baggase (*Agave tequilana*). *Mush. J. Tropics*. 11:29-33.
- Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos y C. Tellez, 1991b. Substrates for cultivation of *Pleurotus* in Mexico, II sugarcane baggase and corn stover. *Mush. J. Tropics*, 11:34-37.
- Stamets P., 1993. Growing gourmet and medical mushrooms. Ten Speed Press, Hong Kong.
- Tani Y., A. Fuji y H. Nishise, 1988. Production of raw cassava starch-digestive glucoamilasa by a 2-deoxiglucose-resistant mutant of *Rhizopus* sp. *J. Ferment. Technol.* 66:545-551.
- Tschierpe H. J. y K. Hartmann, 1977. A comparison of different growing

- methods. *Mushroom J.* 60:404-416.
- Upadhyay R. C., y B. Vijay, 1991. Cultivation of *Pleurotus* species during winter in India. *Mush. Sci.* 13:533-536.
- Vilgalys R., J-M. Moncalvo S-R. Liou y M. Volovsek, 1996. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus*. In: *Mushroom Biology and Mushroom products* (Ed. Daniel Royse). Penn State University
- Vilgalys R., A. Smith y B. L. Sun, 1993. Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Can. J. Bot.* 71:113-128.
- Vilgalys R. y B. L. Sun, 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4599-4603.
- Zadrazil F., 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In: S. T. Chang y W. A. Hayes (eds.). *The Biology and Cultivation of Edible Mushroom*. Academic Press. Nueva York.
- Zadrazil F. y H. C. Dube, 1992. The oyster mushroom - importance and prospects. *Mush. Res.* 1:25-32.
- Zervakis G. y C. Balis., 1991. *Pleurotus* species of Greece: An evaluation of their morphological and physiological characteristics. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (ed) Balkema, Rotterdam:537-544.
- Zervakis G. y J. Labarere, 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138:635-45.