

44 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESION DEL COLOR DE
LOS ESPOROFOROS EN *Pleurotus* spp. POR
APAREAMIENTOS DE NEOHAPLONTES
COMPATIBLES Y PROGENIES MONOSPORICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
M. en C. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO

DIRECTOR DE TESIS: DR. HERMILO LEAL LARA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A mis padres:

Ing. Guillermo Valencia Andrade.

Sra. María Elena Del Toro Frías

Por las enseñanzas que me dejaron de la vida gracias!
Siempre estarán en mi corazón. Descansen en paz.

A mis hermanos:

Memo, Jorge, Antonio, Arturo, María Elena,

María Eugenia, Carmela, Rafael y Raúl

Con sincero amor fraterno!

A la familia Garín Aguilar:

Como testimonio de agradecimiento
por permitirme ser parte de ellos.

A mi esposa MARA:

A quien amo profundamente.

Por que sigamos juntos en la lucha
incesante y continua de la vida.

A mis hijos Amilcar Ulises y Mara Itzel:

Gracias por brindarme su amor y confianza.

Reciban este fruto de mi vida con profundo amor.

Al Dr. Hermilo Leal Lara:

Gracias por ser mi amigo.

Por las enseñanzas e imputso brindado.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera:

Gracias por el apoyo y consejos brindados,

y sobre todo por demostrarme su amistad sincera.

A M: en B. Rebeca Ramírez Carrillo

Por su amistad, así como por sus valiosas
enseñanzas en el trabajo de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hermilo Leal Lara:

Por su valioso apoyo y asesoría
en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial:

Dr. Daniel Martínez Carrera
Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Por sus valiosos comentarios y observaciones
durante los exámenes tutoriales.
Así como por sus amistad incondicional.

A los miembros del jurado dictaminador:

Dr. TEOFILO HERRERA SUÁREZ
Dr. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Dr. HERMILO LEAL LARA
Dr. GUILLERMO AGUILAR OSORIO
Dr. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA
Dra. MARGARITA VILLEGAS RIOS
Dra. PATICIA ESTHER LAPPE OLIVERAS

Por la revisión del trabajo y sus atinadas
observaciones para mejorarlo.

CONTENIDO

	Páginas
Resumen	4
1 Introducción	6
2 Antecedentes	
2.1 Importancia biotecnológica de la producción de hongos.	7
2.2 Ciclo de vida de género <i>Pleurotus</i> .	8
2.3. Sistemas de compatibilidad sexual en los hongos.	13
2.4 Control genético del desarrollo de esporóforos.	15
2.5 Controversia taxonómica sobre el género <i>Pleurotus</i> .	18
2.6 Aspectos fisiológicos del color.	22
2.7 Aspectos genéticos del color.	25
2.8 Desdicariorización como método alternativo para estudios genéticos.	26
3 Justificación	29
4 Objetivos.	
4.1 Generales.	30
4.2 Particulares.	30
5 Hipótesis.	30
6 Materiales y métodos.	
6.1 Cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	32
6.2 Medios de cultivo.	
6.2.1 Medio de extracto de malta con agar (EMA).	32
6.2.2 Solución desdicariorizadora.	33
6.3 Condiciones para la producción de esporóforos.	
6.3.1 Preparación de inóculo.	33
6.3.2 Preparación de sustrato.	
6.3.2.1 Sustrato comercial.	33
6.3.3 Siembra en sustrato y producción de esporóforos.	34
6.4 Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes).	35
6.5 Recuperación de progenies monospóricas (meióticas).	36
6.6 Hibridación de neohaplontes y progenies meióticas.	37

6.7	Análisis estadístico de resultados.	38
7	Experimentos y resultados.	
7.1	Determinación de color de esporóforos y esporadas.	41
7.2	Recuperación de neohaplontes de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	46
7.3	Hibridación entre neohaplontes de cepas seleccionadas.	47
7.4	Características fenotípicas de cepas híbridas.	50
7.5	Características fenotípicas de cepas parentales.	54
7.6	Estudio de expresión del color en progenie de híbridos amarillos.	
7.6.1	Recuperación de progenie del híbrido IE201 ₂ xIE202 ₁ .	59
7.6.2	Recuperación de progenie del híbrido IE201 ₁ xIE202 ₂	62
7.6.3	Características fenotípicas de cepas híbridas progenie.	60
7.7	Estudio de expresión del color en progenie de cepa parental.	
7.7.1	Recuperación de la progenie de la cepa parental IE201	67
7.7.2	Recuperación de la progenie de la cepa parental IE202	68
7.7.3	Recuperación de la progenie de la cepa reconstituida IE202 _R	68
7.7.4	Características fenotípicas de cepas parentales progenie.	72
7.8	Distribución de los factores de incompatibilidad.	74
8	Discusión.	
8.1	Selección y caracterización de cepas.	76
8.2	Obtención de neohaplontes por desdicariorización química.	77
8.3	Hibridación de neohaplontes de cepas de colores de <i>Pleurotus</i> spp.	78
8.4	Características fenotípicas de cepas híbridas.	81
8.5	Fructificación de cepas híbridas y parentales.	91
8.6	Factores de compatibilidad.	92
8.7	Estudios del color en otros organismos	94
8.8	Discusión general	95
9	Conclusiones.	97
10	Prospecciones de investigación	100
11	Literatura citada.	101
12	Apéndice (artículos publicados)	107

RESUMEN.

Con motivo de iniciar los estudios sobre la expresión del color en Basidiomicetos del género *Pleurotus*, se adquirieron, fructificaron y caracterizaron 20 cepas parentales dicarióticas de varios colores de *Pleurotus* spp. Se seleccionaron 10 cepas (ECS127, ECS187, IB67, 1E202, IE200, IE201, INI8, PORO, RP y P15) que presentaron colores estables y contrastantes al ser cultivadas tanto a bajas temperaturas (12.5-15°C) como en condiciones sin control de la temperatura ambiental (18-35°C). Se efectuó la descariotización química de estas cepas, recuperándose simétricamente los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) para cada una de ellas. Al aparear los neohaplontes de estas cepas se observó la presencia de cinco grupos interestériles. En el primero se encuentran las cepas IB67 (gris), IE200 (blanca), PORO (rosa) y RP (rosa) agrupándose sus neohaplontes dentro de 2 tipos de compatibilidad con factores totalmente distintos, el A_mB_m , y el A_nB_n . En el segundo están contenidas las cepas IE201 (blanca) e IE202 (rosa), donde se agrupan los neohaplontes en los tipos de compatibilidad A_oB_o y A_pB_p . No obstante que las cepas rosas y blancas se distribuyeron en estos dos grupos interestériles, existe la posibilidad de que los factores del grupo 2 correspondan a los tipos complementarios A_mB_n y A_nB_m . Los 2 componentes de las cepas INI8 (gris) y ECS127_G (gris) se ubican dentro de un tercer grupo interestéril con los tipos de compatibilidad A_qB_q y A_rB_r . En el grupo 4 con factores de compatibilidad A_sB_s y A_tB_t se encuentra una cepa amarilla ECS187 mientras que también en el grupo 5 con factores de compatibilidad A_uB_u y A_vB_v se encuentra una cepa gris P15. Con los apareamientos monocarión-monocarión entre los neohaplontes se produjeron 13 cepas híbridas dicarióticas. Se determinó la coloración de los híbridos así como su productividad al primer corte; 11 cepas híbridas presentaron coloración grisácea y en las dos restantes la coloración fue amarilla (híbridos de las cepas IE201_{blanca} x IE202_{rosa}). La eficiencia biológica (EB) de los híbridos al primer brote se encontró entre 93 y 42%, rango similar al de las cepas parentales. Las esporadas de todos los híbridos fue color lila. Se obtuvieron las progenies monospóricas de los híbridos amarillos, y al aparear los monospóricos de tipo de compatibilidad parental con los neohaplontes compatibles de la cepa parental respectiva se obtuvieron híbridos productores de esporoforos amarillos. Se obtuvo la

progenie monospórica de la cepa parental rosa IE202 y al aparearse los cultivos monospóricos se generaron cepas dicarióticas que presentaron también color amarillo. En contra de lo esperado, se obtuvieron cuerpos fructíferos amarillos al reconstituirse la cepa parental rosa IE202 a partir de sus neohaplontes respectivos. La inesperada coloración amarilla de los esporóforos resulta probablemente de la presencia de uno o varios genes que no se expresan de forma natural en las cepas parentales. Es también posible que la presencia de factores extracromosomales participen en la expresión del color. La segregación de los cuatro tipos de compatibilidad presentó una distribución 1:1:1:1, tanto para las cepas parentales como las híbridas. Además se observó que los tipos de compatibilidad de las progenies de las cepas híbridas corresponden con los tipos de compatibilidad de sus respectivos padres. Se descarta la posibilidad de que la expresión del color en estas cepas híbridas esté asociada a los factores de incompatibilidad.

1 INTRODUCCIÓN

La gran diversidad fenotípica de las especies que forman el género *Pleurotus* se ha puesto de manifiesto a través de la variabilidad en la coloración que presentan las estructuras reproductivas o cuerpos fructíferos de estos Basidiomicetos (Petersen y Hughes, 1999). Cuando se cultivan artificialmente estos macromicetos, la coloración de los cuerpos fructíferos cambia dependiendo de las condiciones ambientales a las que se sometan los hongos (Eger-Hummel, 1980 y Li, 1980). Al estar creciendo en la naturaleza bajo diferentes condiciones ambientales se han recolectado cepas silvestres de un mismo grupo interestéril que presentan esporóforos con coloraciones distintas, así por ejemplo, en la especie *P. djamor* se encuentran cepas con esporóforos de colores blancos y rosas, en la especie *P. citrinopileatus* aparecen cepas con esporóforos que presentan colores amarillo y gris (Petersen, 1995; Petersen y Hughes, 1999). También se han detectado en cultivos de laboratorio cepas albinas en las especies de *Pleurotus*, (Byun, 1994; Murakami y Takemaru, 1990). Un problema común que se presenta en este género es que al utilizar la coloración de esporóforos y esporadas como caracteres de clasificación, hay confusión en la ubicación taxonómica de las cepas, considerándolas en la mayoría de los casos como especies diferentes. Sin embargo, a través de las pruebas de compatibilidad entre cepas se ha podido identificar que pertenecen al mismo grupo interestéril (Eger, 1978; Vilgalys et al, 1993; Petersen y Huges, 1999).

La variabilidad en la coloración de los esporóforos se ha explicado de dos formas distintas: por un lado se considera que es debido a una plasticidad fenotípica no genética, por lo que no se debe a la presencia específica de algún gen o grupo de genes (Petersen y Hughes, 1999) y por el otro se plantea la existencia de un gene recesivo *alb* que induce ausencia de coloración en los esporóforos (Komatsu y Kimura, 1968; Arita, 1974; Komatsu, 1977; Murakami y Takemaru, 1990; Murakami, 1999).

Los estudios sobre la expresión del color en el género *Pleurotus* permitirán elucidar los mecanismos genéticos que se encuentran involucrados en la transmisión de este carácter en los esporóforos y esporadas, así como esclarecer la participación del medio ambiente en su expresión.

Para iniciar los estudios de expresión del color en este género se planteó utilizar la desdicariorización química para obtener los componentes monocarióticos (neohaplontes) de cepas dicarióticas de colores de *Pleurotus* spp. con colores contrastantes. De esta forma en los neohaplontes recuperados estaría presente la información genética que determina la coloración de los esporóforos y al aparear estos componentes monocarióticos se obtendrían híbridos donde podrían estudiarse los factores que controlan la expresión del color.

2 ANTECEDENTES

2.1 Importancia biotecnológica de la producción de hongos.

El cultivo de los hongos representa una industria biotecnológica económicamente importante que se ha expandido marcadamente en todo el mundo durante las últimas décadas. La producción mundial de hongos comestibles cultivados en 1986 fue de 2.2×10^6 toneladas de hongos frescos y se incremento 125.6% en 1994 (4.9×10^6 toneladas) (Chang, 1996; Royse, 1997). En la actualidad se estima que se producen aproximadamente 5×10^6 toneladas de hongos frescos por año (Kues y Liu, 2000). Es importante indicar que en el año de 1986, *Pleurotus* spp. ocupaba el cuarto lugar de producción mundial con 1.7×10^5 toneladas después de *Agaricus*, *Lentinus* y *Volvariella*, y para el año de 1994 pasó al segundo lugar con 7.97×10^5 toneladas de hongos frescos es decir con un incremento del 371% para este periodo (Chang, 1996; Royse, 1997).

La producción comercial de hongos en México es una actividad importante para el desarrollo económico, social y ecológico del país. Desde el punto de vista económico, en 1990 el monto anual de operaciones superó los 22 millones de dólares, con un volumen de producción cercana a 9 mil toneladas de hongos por año lo que socialmente repercutió en la generación de aproximadamente 5 mil empleos, estimándose que se utilizaron 27 mil toneladas de desechos agroindustriales para esta producción de hongos. El cultivo de hongos comestibles ha resultado una buena alternativa para la agricultura, lográndose obtener resultados de producción en poco espacio y en un tiempo relativamente corto (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

En lo que respecta a la producción de setas (*Pleurotus* spp), en México la producción anual estimada para 1990, fue de 356 toneladas de hongos frescos, y en 1997 se estimó en 1825 toneladas, lo que representa un incremento del 413% durante este periodo (Martínez-Carrera, 1997; Sobal *et al.*, 1997).

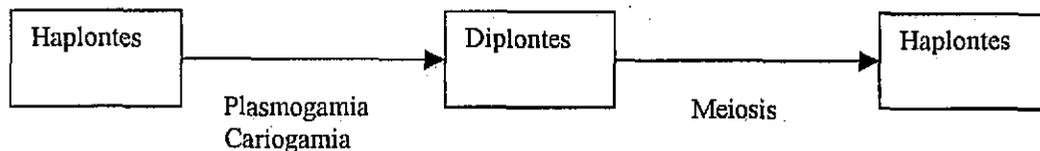
El incremento a nivel mundial y nacional del cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus*, plantea la necesidad de desarrollar tecnologías para su mejoramiento genético, con la finalidad de obtener cepas comerciales que permitan ofrecer al consumidor un alimento con atributos comerciales de calidad, y al productor contar con germoplasma de alta calidad que garantice elevados rendimientos en la producción en tiempos cortos. Se ha sugerido que la presencia de un color atractivo es una característica importante de una cepa para que sea aceptada en el mercado (Royse y Zaki, 1991). Es por ello que deben buscarse mediante la selección y mejoramiento genético cepas de *Pleurotus* que presenten colores atractivos y novedosos.

2.2 Ciclo de vida del género *Pleurotus*.

Uno de los principales problemas del cultivo de los hongos comestibles es el escaso entendimiento de los procesos celulares y genéticos así como de los controles fisiológicos y ambientales que regulan la iniciación del cuerpo fructífero de estos organismos (Kues y Liu, 2000). Es por eso de fundamental importancia conocer entre otros aspectos su ciclo de vida y sus patrones de sexualidad.

El ciclo de vida en los hongos consiste de tres etapas principales (Chang, 1982). La primera etapa esencial es la plasmogamia o anastomosis que es la fusión de dos células del micelio que se aparean; a través de la plasmogamia los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común. La segunda etapa importante es conocida como cariogamia o fusión nuclear. La tercera etapa esencial es la meiosis, la división nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide ($2n$) al estado haploide ($1n$). Por medio del proceso de sexualidad, ocurren la recombinación genética y la segregación. En el caso del género *Pleurotus*, esta segunda y tercera etapa ocurren de manera casi inmediata en células especializadas, los basidios, que se encuentran en las láminas de sus cuerpos fructíferos.

La fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denominan haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas, y las células o grupos de células en este estado se llaman diplontes. El fenómeno sexual completo podría resumirse de la siguiente forma (Chang, 1982; Herrera y Ulloa, 1990):



Para muchos hongos basidiomicetos, donde quedaría incluido el género *Pleurotus*, después de que se efectúa la plasmogamia, no se realiza la cariogamia en forma inmediata, de lo que resulta una célula binucleada llamada dicariocito o dicariote, cuyos dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad reciben el nombre de dicarion; a este estado en general se le da el nombre de fase dicariótica o dicariofase (ver **Figura 2.1**) y al proceso completo dicariorización. El dicariocito obtenido puede llegar a formar un micelio completo, para lo cual crece, se ramifica y se divide formando nuevas células.

Durante el ciclo biológico, los basidiomicetos incluyendo a *Pleurotus* generalmente pasan por tres fases de desarrollo del micelio que corresponden a los tipos: primario, secundario y terciario (Herrera y Ulloa, 1990). El micelio primario se origina de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas de células generalmente uninucleadas o monocarióticas y haploides.

El micelio secundario deriva del primario y está constituido por hifas de células binucleadas o dicarióticas. La dicariorización de las células del micelio primario se inicia mediante la plasmogamia de células monocarióticas y haploides (**Figura 2.1**), con genes compatibles. Es relevante considerar que la fase dicariótica del micelio se establece mediante los siguientes procesos:

- 1) La formación por plasmogamia de una rama de la célula binucleada inicial a la cual emigra el dicarion, siendo dicha rama la que da origen a micelios secundarios.
- 2) El fenómeno de Buller en donde un micelio monocariótico puede dicarionizarse si se desarrolla junto a un micelio dicariótico de la misma especie, siempre y cuando alguno de sus núcleos sea compatible sexualmente con el núcleo del monocariote. La dicarionización de dos micelios monocarióticos puede ocurrir a partir de una célula dicariótica inicial resultante de la somatogamia de dichos micelios: los núcleos compatibles de una célula dicariótica inicial se dividen simultáneamente y cada núcleo hijo emigra a una célula vecina a través del poro del tabique (llamado dolíporo) o a través de las fíbulas formadas por el micelio dicariótico.

Finalmente, el micelio terciario surge a partir del micelio secundario y es característico de la fase de reproducción sexual de los hongos, se organiza en tejidos especializados para formar cuerpos fructíferos.

En la **Figura 2.1** aparece la representación esquemática el ciclo de vida para hongos del género *Pleurotus*. Una sola basidiospora germina para dar una masa de hifas filamentosas monocarióticas (micelio), con células conteniendo un núcleo haploide cada una. El micelio puede o no pasar a través del ciclo asexual vía reproducción de oídios o clamidosporas. Si el complejo de hifas ramificadas, continúa creciendo como una unidad monocariótica y se encuentran con otro micelio monocariótico, en este momento las hifas de ambos micelios se unen (plasmogamia) y la determinación de si los micelios son sexualmente compatibles ocurre intracelularmente. Si los dos monocariotes son compatibles ocurre la migración nuclear después de la fusión celular. El núcleo de una de las células fusionadas migra hacia la otra célula monocariótica compatible.

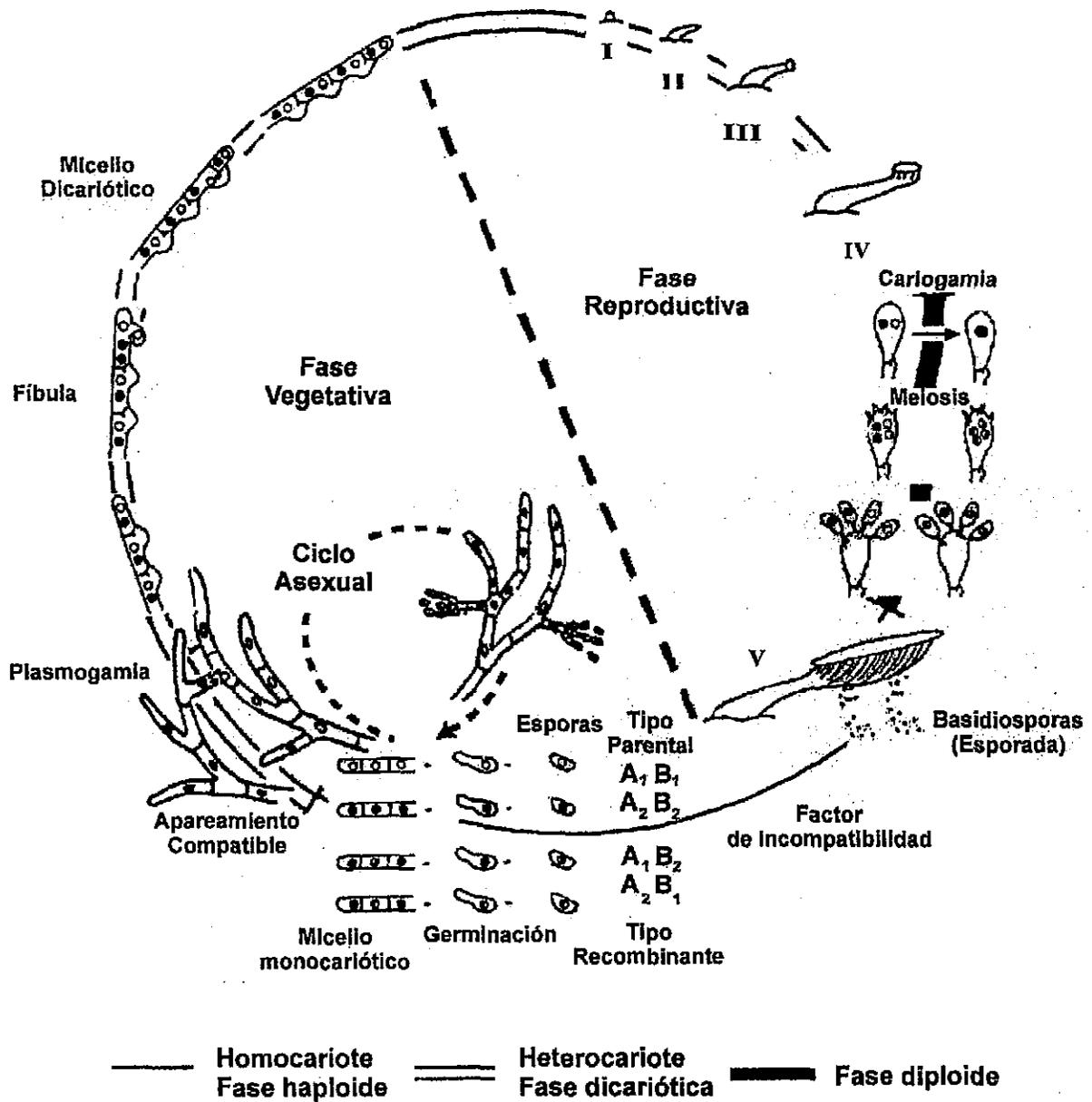


Figura 2.1 Ciclo de vida del género *Pleurotus*. Las fases I a V indican las etapas de desarrollo del esporóforo (I y III = fase fototrópica 1, IV = fase geotrópica y V = fase fototrópica 2). (Adaptado de Eger-Hummel, 1980; Li, 1980; Raper, 1978 y Burnett, 1975)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El septo que separa la célula dentro del filamento hifal contiene un poro complejo llamado doliporo, el cual normalmente previene los movimientos nucleares entre las células. La migración nuclear después de la fusión celular es facilitada por la degradación del doliporo, y después de la migración del núcleo, los septos son reconstruidos entre las células. Una vez que los dos núcleos compatibles están presentes dentro de la hifa se realiza el crecimiento para formar el micelio dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariotes en las células hijas. Durante este proceso la formación de fibulas es importante para el establecimiento del micelio dicariótico (fase vegetativa en **Figura 2.1**). Después de la dicarionización y si se cuenta con estímulos del medio ambiente apropiados, se induce la formación del cuerpo fructífero.

Este micelio terciario permanece dicariótico y la cariogamia y meiosis ocurren únicamente en los basidios, los cuales son producidos sobre las laminillas localizadas en la parte inferior del píleo. Los núcleos haploides, producto de la meiosis, emigran adentro de una tétrada de basidiosporas en la parte externa del basidio (fase reproductiva en **Figura 2.1**). Finalmente, las esporas son liberadas del cuerpo fructífero una vez que este ha madurado, empezando de nuevo el ciclo.

En los basidiomicetos los cuerpos fructíferos son las estructuras donde se lleva a cabo la reproducción sexual. Se forman sobre el micelio indiferenciado que se genera por crecimiento vegetativo. Para producir las fructificaciones, primero se forman sobre el micelio vegetativo protuberancias de hifas (nódulos primarios) consistentes de un intenso conjunto de micelio ramificado. Los nódulos de hifas se originan como conjuntos de ramas cortas de más de una hifa generativa. Las ramas en los nudos hifales generalmente tienen una morfología globosa y están embebidos en material mucilaginoso. Gradualmente, las ramificaciones de hifas se agregan una con otra para formar una asociación esférica de micelio de aproximadamente 1 o 2 mm de diámetro (nódulos secundarios). Dentro de esos pequeños cuerpos ocurre la diferenciación y se establecen primordios de cuerpos fructíferos que básicamente contienen todos los distintos tejidos que se presentan en el cuerpo fructífero (Kues, 2000; Kues y Liu, 2000).

Por medio de estudios fisiológicos se ha encontrado que *P. ostreatus* es un hongo cuyo proceso de fructificación es influenciado por la luz, de tal forma que los estados de desarrollo II y III (**Figura 2.1**) tienen una reacción positiva fototrópica, el estado IV presenta una reacción negativa geotrópica, y en la etapa V aparece una segunda etapa fototrópica positiva dando la forma excéntrica típica de este macromiceto (Eger-Hummel, 1980). Los eventos citológicos que ocurren durante el desarrollo del cuerpo fructífero en el género *Pleurotus* pueden resumirse en las 5 etapas que se muestran en la **Figura 2:1** (Eger-Hummel, 1980; Li, 1980) y son los siguientes:

- I. Agregación de hifas de células dicarióticas formando nódulos primarios.
- II. Agregación de ramificaciones de hifas generando primordios que tienen forma de cilindros con proyecciones alargadas y punta roma (fase fototrópica 1).
- III. La porción apical del estado II desarrolla el píleo por ensanchamiento de la cabeza del primordio (continúa fase fototrópica 1).
- IV. El píleo joven se expande por crecimiento de los márgenes y diferenciación de las laminillas. Los basidios crecen sobre el himenio (fase geotrópica negativa).
- V. Por la influencia de la luz, el píleo termina de expandirse (fase fototrópica 2) y se efectúa la liberación de basidiosporas.

2.3 Sistemas de compatibilidad sexual en los hongos.

Dentro de los hongos comestibles existen tanto especies autofértiles u homotálicas como autoestériles o heterotálicas. Si bien el homotalismo es un modo de reproducción sexual en los hongos en general, en los basidiomicetos las especies autofértiles representan tan solo un 10%. Por otro lado, dentro del 90% de las especies heterotálicas el 25% es bipolar y el 65% tetrapolar (Burnett, 1975; Burnett, 1986).

En el homotalismo, la estructura fructífera puede ser producida por un solo micelio monospórico. Se encuentran dos tipos de homotalismo entre especies autofértiles:

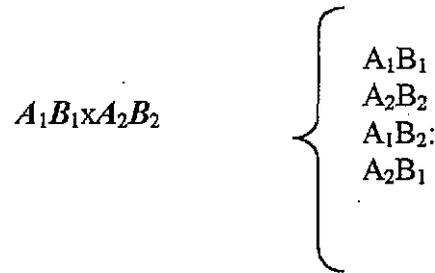
- a) Homotalismo primario en donde el micelio homocariótico, establecido de un sólo núcleo meiótico, tiene la posibilidad de progresar a través de heterocariosis a la culminación del ciclo sexual.

- b) Homotalismo secundario, en el cual se establece un micelio dicariótico o heterocariótico fértil a partir de una espora llevando dos núcleos meióticos de diferentes tipos de apareamiento (Raper, 1966).

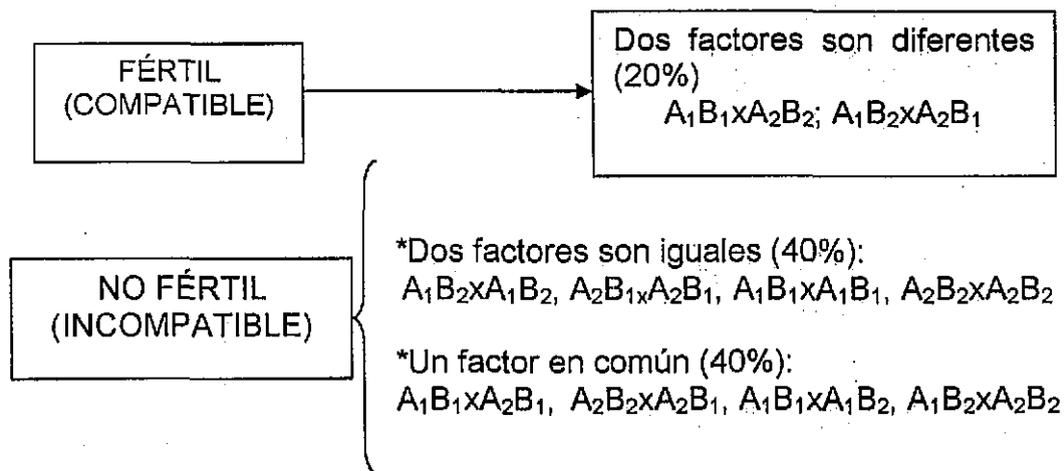
En el heterotalismo se requiere del apareamiento entre diferentes micelios homocarióticos para completar el ciclo sexual. Comúnmente se encuentran dos sistemas de heterotalismo en hongos comestibles.

- a) La compatibilidad bifactorial está controlada por un solo factor, que suele ser denominado factor **A**, dispuesto en un par de cromosomas homólogos que necesitan unirse durante la reproducción sexual, para formar el par de genes alelos o alelomorfos compatibles, A_1A_2 . Los otros tipos de unión (A_1A_1 , A_2A_2) son incompatibles y por tanto estériles.
- b) La compatibilidad tetrapolar, depende de dos factores situados en los pares de cromosomas homólogos, y se denominan factores **A** y **B**. Debido a que están ubicados en cromosomas diferentes la segregación de estos factores durante la meiosis es independiente. Cada núcleo tiene su par de genes alelos o alelomorfos que controlan el mismo tipo de caracteres; se presenta un alelo en cada lugar o locus (en plural loci), en posición idéntica respecto a su cromosoma homólogo formándose así parejas de genes (A_mA_n y B_oB_p) en dichos cromosomas, situados en sus loci correspondientes. Sólo es fértil la unión sexual en la que se reúnen cuatro alelos diferentes para formar un micelio heterocigótico, por ejemplo con los alelos $A_1A_2B_1B_2$. Un talo con este juego de alelos puede producir basidiosporas de cuatro genotipos diferentes: A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 . También es posible que se produzcan esporas solamente de dos tipos si la combinación de caracteres se efectúa de la siguiente forma: A_1B_1 , A_1B_1, A_2B_2 y A_2B_2 . Esto depende del arreglo de los cromosomas homólogos durante la meiosis y del entrecruzamiento o falta de entrecruzamiento (crossing over) de un par o de ambos pares de cromosomas (Herrera y Ulloa, 1990).

En la fusión de los núcleos con genotipos A_1B_1 y A_2B_2 , después del proceso de meiosis, la segregación de los tipos de compatibilidad se distribuye en una relación 1:1:1:1 que podemos representar de la forma siguiente:



Al aparear estos genotipos en todas las combinaciones posibles, únicamente el 20% de los híbridos serán fértiles, es decir, producirán cuerpos fructíferos y basidiosporas. Se presentará el siguiente patrón de segregación de acuerdo a la segunda ley de Mendel:



2.4 Control genético del desarrollo del esporóforo.

Los cuerpos fructíferos se desarrollan sobre micelio dicariótico. Debido a que los loci del tipo de compatibilidad regulan la formación del dicarion, esos genes también controlan, en última instancia la iniciación de la fructificación. Los basidiomicetos frecuentemente tienen dos loci complejos de tipos de compatibilidad (halotipos). El locus de tipo de compatibilidad **A** codifica para dos tipos de factores de transcripción (llamados HD1 y HD2), subunidades proteicas de una proteína reguladora heterodimérica, y el locus de tipo de compatibilidad **B** codifica para feromonas y receptores de feromonas. En muchas especies

los genes para esas funciones están tan estrechamente ligados que ellos aparecen como atributos genéticos en apareamientos entre cepas compatibles. El inicio de la formación del dicarion y su posterior desarrollo sexual se establece cuando dos micelios compatibles con diferentes factores de incompatibilidad (halotipos) interactúan entre sí. La proteína HD1 y la proteína HD2 de diferente halotipo **A** se dimerizan para formar un factor complejo de transcripción activo. Similarmente una feromona reconoce y obviamente se une a un receptor de feromona de un halotipo **B** diferente (Casselton y Olesnick, 1998; Hiscock y Kues, 1999; Kothe, 1999; Kues y Liu, 2000; Kues, 2000).

Los genes de **A** y **B** regulan diferentes funciones celulares durante el apareamiento y la formación del dicarion. Los genes del locus del tipo de compatibilidad **A** controlan la duplicación de los dos núcleos parentales dentro del dicarion e inducen la formación de fíbulas en las células, sincronizando la división nuclear, y consecutivamente la formación del septo (**Figura 2.2**). Una vez efectuada la fusión de micelios monocarióticos, los genes **B** son responsables de la disolución del septo y la migración nuclear. En el dicarion ya establecido, los genes **B** controlan la fusión de la fíbula con la célula subapical después de la sincronización de la división nuclear, y así regulan la liberación del núcleo inicialmente atrapado dentro de la fíbula no fusionada (Kues y Liu, 2000; Raper, 1978). (**Figura 2.2**).

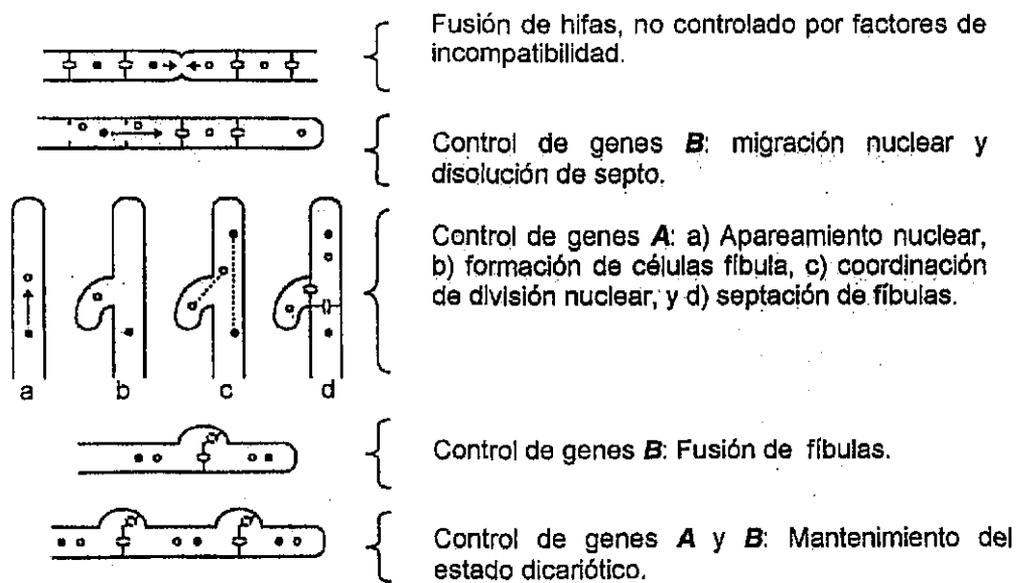


Figura 2.2 Papel de los genes de factores de incompatibilidad **A** y **B** en la regulación de la formación y mantenimiento de dicarion (Casselton y Olesnicky, 1998)

2.5 Controversia taxonómica sobre el género *Pleurotus*

La clasificación taxonómica del conjunto de especies de los basidiomicetos del género *Pleurotus*, ha sufrido varios cambios a lo largo de los últimos años. Esto se puede explicar debido a que inicialmente las especies del género se definían en función únicamente de las características morfológicas de los esporóforos, sin embargo, se ha descubierto que estos organismos muestran una gran plasticidad fenotípica, específicamente, presentan diferencias en el color de los esporóforos dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se desarrollan (Eger, 1978; Vilgays *et al.*, 1993; Petersen y Hughes, 1999). Actualmente, la definición de especie, para este género, es muy controvertida y es considerada tentativa por algunos autores (Eger, 1978).

Investigadores norteamericanos llaman *P. ostreatus* (Jacq.) Kummer (Arita, 1974) a la especie *P. sapidus* Kalchbr, basándose en el color de la esporada mientras que, otros taxónomos no prestan mucha atención a esta característica. Se ha propuesto la diferenciación de especies tales como *P. salignus*, *P. pulmonarius* Fr. y *P. columbinus* Quel. Ap. Bres., con respecto a la especie *P. ostreatus* con base en el color del píleo, así como en su afinidad por el sustrato (Eger, 1978). Sin embargo, el color es una característica extremadamente variable, que depende de las condiciones del cultivo. En *P. ostreatus*, bajo diferentes condiciones de crecimiento, los esporóforos pueden desarrollar un píleo blanco como el micelio, obteniéndose también esporóforos de color crema, café, o gris en diferentes tonalidades (Eger-Hummel, 1980; Li, 1980). Las láminas pueden ser más o menos decurrentes, coloreadas (más pálidas que el píleo) o blancas y la superficie del estípite puede ser tomentosa o glabra. Por lo anterior es muy difícil la identificación basada únicamente en características morfológicas sobre todo en especies de amplia distribución mundial, como es el caso del género *Pleurotus*. Eger (1978), propuso se confronten las cepas en estudio contra cepas de referencia en pruebas de apareamiento apropiadas, como una alternativa para evitar confusiones.

Vilgalys *et al.* (1993) estudiaron la compatibilidad de 170 cepas de *Pleurotus* spp., y clasificadas dentro del complejo *P. ostreatus*, pertenecientes a colecciones de Norteamérica, encontrando la presencia de únicamente 3 especies interestériles en

Estados Unidos y Canadá. Ellos utilizaron apareamientos monocariótico-dicariótico confrontando con cepas monocarióticas europeas de referencia, concluyendo que las especies *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* se encuentran también ampliamente distribuidas en Norteamérica, y que la otra especie detectada se describe como nueva especie, denominándola *P. populinus*. A partir de estos estudios se define el complejo *P. ostreatus*, el cual se encuentran constituido por varias especies que con anterioridad eran clasificadas como especies diferentes.

Otro grupo interestéril de importancia es el complejo *P. djamor*, el que está constituido por varias cepas que presentan esporóforos de colores blancos y rosas. De acuerdo a Corner (1981), no hay diferencias esenciales entre *P. salmoneostramenius* L. Vassilieva y *P. djamor* var *roseus* (Fr.) Boedijn, excepto que el primero produce basidiosporas rosas y en el último blancas. Neda et al. (1988), reportaron que las especies *P. salmoneostramineus* y *P. djamor* son compatibles una con otra, y sugieren que las dos especies están estrechamente relacionadas, indicando que no se puede justificar su separación en dos especies únicamente a partir de la diferencia del color entre el esporóforo y basidiosporas.

Estudios posteriores con *P. djamor* han mostrado que éste grupo interestéril está formado por 3 variantes morfológica que presentan los colores blanco, rosa y gris, correspondiendo a las denominaciones *djamor*, *salmoneostramineus* u *ostreatoroseus* y *opuntiae* (Dur. & Lev.) Sacc. Plegier, respectivamente (Petersen, 1995; Petersen y Ridley, 1996; Petersen y Hughes, 1999). McCleneghan y Hughes (1998) confirmaron la alta similitud genética de las variantes de color rosa a través del análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción amplificados (RFLP) de la región del ácido ribonucleico de ribosoma ITS ARNr, confirmando estudios previos de apareamiento.

Otro caso importante se presenta para las especies *P. citrinopileatus* Vassilyeva (amarilla) y *P. cornucopiae* (Pers.) Rolland (gris), que de acuerdo a los estudios de compatibilidad se ubican en el mismo grupo interestéril, a pesar de sus diferencias morfológicas (Petersen, 1995).

Esta situación ha llevado a considerar los conceptos de especies y especiación al interior del género *Pleurotus*. La especiación es el proceso por el cual un grupo genéticamente unido de individuos que se aparean se divide en dos o más grupos genéticamente distintos. Un requisito en este proceso es un "vacío" en el intercambio de genes entre los dos grupos de individuos emergentes. Este "vacío" permite a cada grupo acumular diferencias genéticas a través del proceso natural de la evolución incluyendo mutación, selección y deriva genética. Cuando dos grupos llegan a ser suficientemente diferentes ellos son reconocidos como especies (Petersen y Hughes, 1999). Para los hongos del género *Pleurotus*, en la mayoría de los casos las diferencias fenotípicas en el cuerpo fructífero son sutiles y hay desacuerdo de cuando dos grupos son especies diferentes o grupos adaptados localmente, pero con apareamiento dentro de la especie. (Petersen y Hughes, 1999)

Es importante considerar por lo anterior algunas definiciones de especie para tener un marco referencial a partir del cual se analicen las variaciones fenotípicas observadas en los hongos del género *Pleurotus*. Los tres conceptos de especie más ampliamente aplicables a los hongos de acuerdo a Petersen y Hughes (1999) son:

- Concepto de especie morfológica. Parte del supuesto que las diferencias en las características morfológicas reflejan las diferencias genéticas fundamentales, y por tanto implican una diferencia genética entre dos grupos.
- Concepto de especie filogenética. Establece que las poblaciones pueden ser agrupadas como especie si y sólo si ellas comparten un linaje evolutivo común, generalmente expresado como un nodo terminal en un árbol filogenético.
- Concepto de especie biológica. Definido como la habilidad de los individuos de dos grupos para interhibridizarse y obtener híbridos viables y fértiles.

Tradicionalmente, hasta fechas recientes, en la mayoría de los macromicetos el concepto de especie ha estado basado principalmente en un criterio morfológico. Sin embargo, el uso de la morfología para determinar especies en hongos superiores se ve limitada por las siguientes razones:

- Generalmente las características morfológicas consideran solo parte del ciclo de vida, es decir, el cuerpo fructífero. De esta manera la clasificación se ve limitada a las características de esta estructura.
- Los hongos de diferentes linajes evolutivos pueden compartir características morfológicas semejantes como consecuencia de una evolución convergente o paralela.
- Finalmente la amplitud de la plasticidad fenotípica dentro de un mismo taxón en los hongos superiores es altamente desconocida. Esto se debe en parte a que la mayoría de los cuerpos fructíferos son efímeros, ya que se forman sólo cuando las condiciones del entorno son apropiadas y sólo prevalecen por un tiempo muy corto.

Estas limitaciones han traído como consecuencia el desarrollo de múltiples clasificaciones intuitivas, ya que la mayoría de los taxónomos proponen clasificación de acuerdo a criterios propios. Como resultado, los patrones de variación morfológica han dado relativamente poca luz sobre los procesos de especiación en hongos (Vilgalys, 1991)

De suma utilidad en la taxonomía de basidiomicetos ha sido la información obtenida en los estudios de apareamiento en hongos. Actualmente como alternativa al concepto morfológico de especie, los estudios de sistemas de incompatibilidad, han ganado una amplia aceptación para la aplicación del concepto biológico de especie dentro de la problemática taxonómica de los basidiomicetos (Vilgalys, 1991; Vilgalys y Sun, 1994; Petersen, 1995). El conocimiento acerca de las barreras de interesterilidad, ha sido invaluable para identificar caracteres taxonómicos confiables entre especies similares, así como para confirmar la validez de los taxones morfológicos existentes. Sin embargo, el concepto biológico de especie como un criterio sistemático ha mostrado ser problemático para muchos grupos de hongos (Vilgalys, 1991; Petersen y Hughes, 1999). Las pruebas de compatibilidad son imposibles de aplicar a los hongos que no producen esporas sexuales (esporas meióticas). Este problema es serio porque aproximadamente el 20% de los hongos son morfológicamente asexuales (Donoghue, 1985; Bock, 1986; Templeton,

1989). También existen otros hongos que son homotálicos, es decir producen esporas meióticas pero sin estar bajo el control de un patrón de compatibilidad, por lo que en estos hongos la presencia de esporas meióticas no es suficiente para inferir su compatibilidad. Aunado a lo anterior, en algunos hongos heterotálicos no ha sido posible realizar las pruebas de apareamiento en condiciones de laboratorio, otros no pueden ser cultivados y bajo estas circunstancias es problemático aplicar el reconocimiento de especies biológicas a todas las especies de hongos.

Considerando los problemas anteriores, Mayden (1997), teniendo como base el concepto de especie filogenética lo transforma en el de reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica. La fuerza de este concepto surge de la comparación genealógica de más de un gen; un requisito de la genealogía de cada gen es que no ocurra recombinación entre ellos y en la práctica partes del gen son generalmente usadas para construir la genealogía. Este concepto ha sido aplicado tanto en hongos que producen esporas meióticas, como en aquellos que producen esporas mitóticas. En todos los casos ha permitido identificar especies que no fueron detectadas por el concepto morfológico, y en algunos casos por el concepto biológico. Sin embargo también hay casos en donde concuerdan los conceptos de reconocimiento de especies biológicas y filogenéticas (Taylor *et al.*, 2000).

2.6 Aspectos fisiológicos del color

Las especies del género *Pleurotus*, se encuentran altamente influenciadas por las condiciones del ambiente en el que crecen y desarrollan, dependiendo de éstas, se altera su ciclo de vida y/o cambia la morfología y coloración de los cuerpos fructíferos que se producen.

Li, en 1980 realizó trabajos sobre hibridaciones de cepas de *P. osteratus* y *P. ostreatus* var. florida, las cuales fructifican a diferentes temperaturas, indicando que a temperaturas bajas de 15 °C todos los esporóforos de los dicariotes obtenidos por apareamientos intracepa e intercepa fueron oscuros. Los dicariotes "florida" a una temperatura de 22.2 °C dieron esporóforos que presentaron tonalidades de café claro a

crema, y a temperaturas de 30 °C y 32.5 °C el color de los cuerpos fructíferos fue blanco cremoso y blanco, respectivamente.

El color gris persistió en los esporóforos formados a 22.2 °C, y todos los esporóforos fueron entre crema y blanco a 30 °C. Así mismo, se encontró gran variación en características macroscópicas morfológicas como la forma y el tamaño en los cuerpos fructíferos crecidos tanto a bajas como a altas temperaturas. Los esporóforos formados a altas temperaturas fueron más robustos y más compactos en textura.

Zadrazil (1978), estudió el efecto de diferentes condiciones climáticas sobre el desarrollo de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (ver **Figura 2.3**), observando que al disminuir la intensidad de luz, el estípite se alarga y adelgaza, con una reducción parcial del píleo, lo cual concuerda con los trabajos de Eger (1970) y Gyurko (1972). La luz es un factor iniciador del desarrollo de primordios, siendo necesaria por lo menos 15 minutos al día, de tal manera que en una cepa *P. ostreatus* var. florida, el número de primordios aumentó con un incremento en la duración e intensidad luminosa (Eger, 1970, Eger et al.1974).

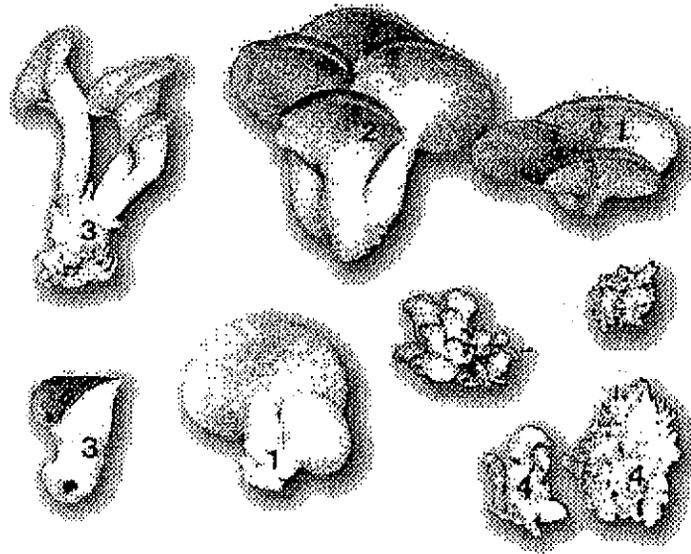


Figura 2.3. Influencia de la luz en la formación de esporóforos de *P. ostreatus*.
1 y 2: Esporóforos desarrollados con calidad y cantidad adecuada de luz; 3 y 4:
Esporóforos crecidos con baja intensidad de luz. (Zadrazil, 1978)

Leatham y Stahmann (1987) realizaron estudios del efecto que tiene la luz y la aireación sobre fructificaciones de *Lentinula edodes*, encontrando que los cuerpos fructíferos producidos en la oscuridad fueron menos pigmentados de lo normal y frecuentemente no presentaban un crecimiento adecuado. Otra conclusión importante es que únicamente los primordios pigmentados se expandieron y que la luz (especialmente la azul) promovía la pigmentación de primordios y cuerpos fructíferos. Acorde con los datos anteriores Tan (1977), indica que la respuesta fotomorfogenética en los hongos depende más comúnmente de las longitudes de onda de los colores azul, ultravioleta y ultravioleta lejano.

Eger-Hummel (1980) propuso el fototropismo como una buena herramienta para estudiar la existencia de más de un sistema fotorreceptor en la morfogénesis de hongos del género *Pleurotus*, dado que este tipo de macromicetos presentan dos fases fototrópicas y una geotrópica durante la etapa de fructificación (ver **Figura 2.1**). Por tratamiento de dicariotes con 1-metil-3-nitro-1-guanidina Eger-Hummel (op. cit.), obtuvo 3 mutantes **a**, **b** y **c** de *P. ostreatus*, que normalmente forman esporóforos con coloración de gris a marrón (Eger y Leal-Lara, 1979). La mutante **a** fue completamente atrópica, la mutante **b** no presentó las etapas de geotropismo ni la segunda fase fototrópica y en la mutante **c** se bloquearon las etapas de fructificación llegando a formar únicamente primordios. En presencia de luz se acumulan pigmentos que van del amarillo (flavonoides) al anaranjado (carotenos), desarrollándose esporóforos con colores llamativos. Con luz tenue o en oscuridad los pigmentos no se manifiestan quedando los esporóforos blancos como el micelio. Los tres tipos de mutantes que obtuvo Eger-Hummel requirieron de más luz para fructificar en comparación con las cepas silvestres, con la obtención de estas mutantes se demostró: 1. los hongos que normalmente producen esporóforos con colores de gris a marrón pueden ser capaces de producir pigmentos amarillo o naranja, normalmente estos pigmentos pueden estar presentes en mínimas cantidades (Eger-Hummel, 1980). 2. que las fases fototrópicas 1 y 2 no necesariamente dependen de los mismos genes o factores, ya que algunas mutantes son afectadas en la fase fototrópica 2 pero no en la fase fototrópica 1.

Es importante indicar que los experimentos realizados por Eger-Hummel (1980) ponen de manifiesto la presencia de pigmentos de colores diferentes a los de la cepa original, y que bajo determinadas condiciones se expresan en los esporóforos. La presencia de pigmentos de coloración diferente a la mostrada normalmente en los esporóforos de *Pleurotus* se ha puesto manifiesto por otra vía diferente, Takekuma *et al.* (1994), realizaron el aislamiento y purificación de un pigmento rosa en el hongo comestible *P. salmoneostramineus*, dicho pigmento se aisló a partir de un extracto acuoso de hongo molido. La solución acuosa obtenida por filtraciones repetidas en gel, contenía una cromoproteína con una estructura α -hélice, la extracción con acetona permitió la identificación de tres componentes: el pigmento identificado como 1 indolona, una glicoproteína con cadena galactósida y tres metales (Zn, Fe y Cu). La filtración en gel también suministró una glicoproteína de color amarillo pálido con β -estructura.

2.7 Aspectos genéticos del color

A partir de la fructificación de tres cepas rosas de *P. salmoneostramineus*, Murakami y Takemaru (1990), obtuvieron una mutante que presentó esporóforos blancos (albinos). Observaron que al aparear los cultivos monospóricos de la mutante blanca con los cultivos monospóricos de 3 cepas rosas silvestres se produjeron en todos los casos esporóforos rosas. El análisis genético de la progenie meiótica (basidiosporas) de los híbridos producidos mostró, que los esporóforos blancos y rosas se segregaban en una razón 1:1. En los apareamientos entre diferentes cepas albinas, todos los dicariones desarrollaron esporóforos blancos. Estos investigadores sugieren que la producción de esporóforos albinos en las tres cepas silvestres originales es un carácter heredable, el cual es controlado por un solo gene recesivo, al que denominaron *alb*. Así mismo, indican que este gene no se encuentra ligado a los factores de compatibilidad **A** o **B**. La esporada de estos esporóforos blancos también fue blanca, sugiriendo que el gene *alb* puede afectar la pigmentación tanto de esporas como de cuerpos fructíferos, ya que las cepas originales rosas tienen otro color de esporada. Finalmente especulan que el gene *alb* muta fácilmente y que se encuentra distribuido ampliamente en varias especies de basidiomicetos.

Así, se han reportado mutaciones espontáneas que producen esporóforos albinos en *Lentinula edodes* (Komatsu y Kimura, 1968), en *Pleurotus ostreatus* (Arita, 1974), y *Auricularia cornea* (Komatsu, 1977). Estos reportes indican que la mutación es controlada por un solo gene recesivo. Murakami (1999) obtiene espontáneamente esporóforos blancos de cuatro nuevas cepas rosas de *P. salmoneostramineus*. El análisis genético de la progenie de los cuerpos fructíferos de las respectivas cepas confirmó que la formación de esporóforos albinos es un carácter heredable y controlado por un solo gene recesivo. Los apareamientos entre cepas monocarióticas seleccionadas y los cultivos monospóricos albinos aislados previamente por Murakami y Takemaru en 1990, indicaron que los genes albinos detectados en las cuatro cepas fueron idénticos. La mayoría de los monospóricos aislados con el gene *alb+* secretaron pigmento rosa en el medio de cultivo utilizado. Los monospóricos aislados teniendo gen *alb* no produjeron la pigmentación rosa en el medio de agar. Estos resultados permiten especular que los pigmentos rosas de los cultivos monospóricos con el gene *alb+* así como los que se producen en los esporóforos rosas son el mismo metabolito.

2.8 Desdicariorización química como método alternativo para estudios genéticos.

Para el estudio de la expresión del color en basidiomicetos es factible utilizar diferentes métodos y técnicas. En el caso particular de esta investigación se planteó realizar el estudio siguiendo los métodos de la genética clásica, por lo que resultaba necesario obtener los genotipos característicos de las cepas estudiadas.

Para los estudios genéticos y el mejoramiento de cepas en varias especies de basidiomicetos y en particular en el género *Pleurotus* la expresión de los genotipos se estudia en la progenie monospórica. Para ello se fructifican las cepas que se van a estudiar y así obtener sus progenies monocarióticas, producto de la meiosis de los núcleos dicarióticos (ver ciclo de vida, en **Figura 2.1**). Por apareamiento de los monocariotes de la progenie, en todas las combinaciones posibles, se identifican los cuatro tipos de compatibilidad, siguiéndose el mismo procedimiento para estudiar la herencia de cualquier otro carácter genético, por lo que este método es laborioso y requiere de mucho tiempo.

Un método alternativo para realizar estos estudios con un menor esfuerzo es la separación de los dos componentes monocarióticos de un dicariote a través del proceso de desdicariorización. El estado dicariótico de los hongos es generalmente estable, sin embargo, es conocido que en muchas especies de basidiomicetos superiores, estos dicariotes pueden ser directamente separados (desdicariorizados) en sus componentes monocarióticos (neohaplontes) por medios artificiales (Fries y Aschan, 1952; Kerruish y Da Costa, 1963) ya sean físicos (microcirugía), químicos (crecimiento con sustancias químicas) o biológicos (regeneración de protoplastos). Así mismo, se ha reportado para algunas especies de hongos una habilidad para desdicariorizarse naturalmente (Arita, 1974). El término neohaplonte, fue definido por Fries y Aschan (1952) para designar al micelio monocariótico derivado de un dicarion sin la intervención de la cariogamia y meiosis.

La desdicariorización artificial tiene gran potencial ya que los neohaplontes obtenidos contienen en principio la información genética de los fenotipos que se expresan en el dicarion original. Por ello es posible utilizar este proceso como una herramienta para evaluar distintos eventos tales como el efecto del citoplasma dicariótico en el micelio monocariótico, la recombinación somática, la estabilidad del componente nucleico en dicariones y la identificación de grupos interestériles en pruebas de apareamiento. Este procedimiento presenta además la ventaja de reducir el tiempo requerido para aislar los genotipos de las cepas dicarióticas, debido a que no es necesario producir los cuerpos fructíferos para obtener las progenies, también es necesario considerar que dado que en el esporóforo se realiza la cariogamia y la meiosis, en estas progenies no es probable encontrar los genotipos originales (Leal-Lara, 1980).

La desdicariorización química inicialmente se realizó utilizando sustancias altamente tóxicas como desoxicolato de sodio o ácido cólico (Miles y Raper, 1956). Dado que estas sustancias inhibían el desarrollo micelial, se requerían de periodos de incubación muy largos (6 a 16 semanas) para lograr la desdicariorización, reportándose en la mayoría de los casos una recuperación no simétrica de los neohaplontes, es decir, se obtenía un solo núcleo del dicariote.

Leal-Lara (1980) y Leal-Lara y Eger-Hummel (1982), implementaron el método de desdicarización química utilizando soluciones no tóxicas de glucosa-glicina y glucosa-peptona. Con 14 cepas (entre ellas dos mutantes) de 5 especies de basidiomicetos lograron la recuperación simétrica de los dos componentes monocarióticos. Así mismo, observaron por el comportamiento y morfología que no se presentaron mutantes en los neohaplontes obtenidos. Los tiempos de obtención de los componentes monocarióticos variaron entre 6 y 80 días dependiendo de la sustancia utilizada.

3 JUSTIFICACIÓN

Los estudios genéticos de la expresión del color son necesarios porque pueden dar respuesta a varias interrogantes que se presentan en la actualidad para el género *Pleurotus*. Algunas de las más importantes son: la identificación de especies o complejos de especies del género, ya que se ha visto a lo largo del tiempo que es difícil la ubicación taxonómica correcta de las especies únicamente a través de sus características morfológicas. La variabilidad de la coloración de esporóforos de las especies del género *Pleurotus* depende de las condiciones ambientales bajo las cuales crecen, por lo que es importante las bases genéticas que controlan la expresión del color y que le permiten a estos organismos modificar la coloración de los esporóforos, bajo diferentes situaciones ambientales. Así mismo, este género presenta diferentes patrones de especiación que demandan de estudios genéticos para esclarecerlos.

El estudio genético del color en los esporóforos de *Pleurotus* spp. requiere la obtención de cepas que presenten colores estables bajo condiciones de producción controladas, de tal forma que permita eliminar la influencia del ambiente sobre la coloración de los esporóforos de estos hongos. Así mismo, es necesario contar con un mecanismo para la obtención de monocariones, a partir de las cepas dicarióticas parentales, que permita la conservación de las características genéticas para la expresión del color. Dada esta situación, se planteó en el presente trabajo la selección de cepas con colores estables, la implementación del método de desdicarización química para la obtención de los componentes monocarióticos de estas cepas y la hibridación de dichos componentes, con el objeto de aportar elementos que permitan explicar la variabilidad fenotípica de los cuerpos fructíferos de este hongo comestible y coadyuven al entendimiento de la expresión de color en el género *Pleurotus*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales.

- 4.1.1 Aportar elementos que permitan explicar la expresión del color en cepas de *Pleurotus* spp.
- 4.1.2 Optimizar el método de desdicarización química para cepas de *Pleurotus* spp.
- 4.1.3 Obtener cepas híbridas de *Pleurotus* spp. que presenten colores contrastantes y estables.

4.2 Objetivos particulares

- 4.2.1 Obtener neohaplontes de cepas de diferentes colores de *Pleurotus* spp.
- 4.2.2 Obtener híbridos de cepas de diferentes colores de *Pleurotus* spp.
- 4.2.3 Caracterizar el sistema que controla la compatibilidad sexual en los híbridos y en las cepas parentales.
- 4.2.4 Realizar apareamientos entre la progenie de híbridos con colores novedosos y neohaplontes de cepas parentales.

5 HIPÓTESIS

- 5.1 Si la información genética sobre el color de los esporóforos en las especies del género *Pleurotus* se encuentra contenida en los neohaplontes, el apareamiento de estos componentes monocarióticos entre cepas de *Pleurotus* con colores distintos permitirá determinar el o los patrones de expresión del color en este género.
- 5.2 Dado que el proceso de desdicarización implica la separación de los núcleos que forman el dicarion original, los componentes monocarióticos obtenidos conservan los genotipos originales, por lo que el apareamiento entre

neohaplontes compatibles permitirá la obtención de híbridos de *Pleurotus* que presenten colores diferentes a las cepas parentales.

5.3 Debido a que las cepas de *Pleurotus* parentales presentan un sistema de compatibilidad tetrapolar heterotálico, los híbridos formados a partir de apareamientos entre cepas tendrán el mismo tipo de compatibilidad.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas de *Pleurotus* spp.

En el cuadro 6.1 se indica el origen de las cepas de *Pleurotus* spp. empleadas en este estudio y se señala el nombre de la persona que la donó. Estas cepas se encuentran depositadas en el cepario del departamento de Alimentos y Biotecnología de La Facultad de Química, UNAM.

CUADRO 6.1 CEPAS DE *PLEUROTUS* SPP. CON ESPORÓFOROS DE DIFERENTES COLORES.

Cepas de <i>Pleurotus</i> spp.		
CLAVE	ORIGEN	DONANTE
ECS127 _G (*)	Chiapas	G. Huerta
ECS127 _R	Chiapas	G. Huerta
ECS130	Chiapas	G. Huerta
ECS187 (*)	Chiapas	G. Huerta
IAP	Veracruz	H. Leal
IB67(*)	Jalisco	A. Arias
IE136	Jalapa	D. Salmones
IE200 (*)	Jalapa	D. Salmones
IE201 (*)	Jalapa	D. Salmones
IE202(*)	Jalapa	D. Salmones
INI8 (*)	Jalapa	G. Valencia
P5	Canadá	H. Leal
P15 (*)	Italia	H. Leal
PLEUS	Puebla	G. Valencia
PORO(*)	USA (Stamets)	G. Huerta
RP(*)	México	G. Pulido
Uap7	Puebla	M.A. Castro
Uap9	Puebla	M.A. Castro

El (*) indica cepas que se utilizaron para desdicarlotización

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Medio de extracto de malta con agar (EMA)

Para preparar 500 ml de extracto de malta agar, se depositaron 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar en un matraz Erlenmeyer de un litro. Se adicionaron 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los componentes. Se tapó el matraz y se dejó reposar durante 20 minutos agitando ocasionalmente. Posteriormente se esterilizó en

autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. El medio estéril se vació, con ayuda de un dispensador, en cajas Petri de plástico con un diámetro de 9 cm. Una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron a 28 °C durante 24 h para prueba de esterilidad. Posteriormente se efectuó la revisión visual de las cajas estériles y las que no presentaron problemas de contaminación se guardaron en bolsas de polietileno y se refrigeraron hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

6.2.2 Solución desdicarizadora

En un litro de agua destilada se disolvieron 20 g de glucosa anhidra y se agregaron 20 g de peptona de carne P (Oxoid). 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 30 minutos. Los matraces se incubaron a 28 °C durante 24 h para prueba de esterilidad. Posteriormente se efectuó la revisión visual de los matraces y los que no presentaron problemas de contaminación se refrigeraron hasta su uso.

6.3 Condiciones para la producción de esporóforos.

6.3.1 Preparación de inóculo

La elaboración del inóculo se realizó en granos de trigo, los cuales se lavaron y cocieron durante 50 minutos. Después se drenó el exceso de agua caliente y se enfrió con flujo continuo de 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 en 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 correspondiente y se incubó en condiciones de oscuridad a 28 °C hasta que el micelio invadió totalmente el grano.

6.3.2 Preparación del sustrato

6.3.2.1 Sustrato comercial.

Este sustrato se obtuvo de fábrica productora de hongos comestibles (hongos Leben), en donde la paja picada es sometida a una fermentación a cielo abierto de 5 días en

condiciones aerobias, con volteo y mezclado diario. Posteriormente la paja fermentada se pasteurizó con inyección de vapor y aire por doce horas a 60 °C, para después mantener la temperatura a 50 °C por 2 días, y finalmente enfriarla a 28 °C para sembrarla.

6.3.2 Siembra del sustrato y producción de esporóforos

El sustrato pasteurizado se inoculó colocando capas alternas de paja e inóculo en una bolsa de plástico de 30 cm de ancho x 50 cm de largo hasta completar un peso total por bolsa de 1 kg. Se utilizaron aproximadamente 5 g inóculo por 100 g de sustrato húmedo pasteurizado, y se realizaron 10 repeticiones por cada cepa. Las bolsas ya inoculadas, fueron colocadas en el cuarto de incubación a una temperatura de 28 °C, sin iluminación, en donde se llevó a cabo la propagación vegetativa del micelio en el sustrato, hasta su invasión completa.

Aproximadamente 15 días después de haber inoculado las bolsas, el micelio colonizó al sustrato apareciendo los primeros brotes o primordios. Se quitaron entonces las bolsas de plástico, trasladándose los bloques de sustrato 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 30 °C, la humedad relativa entre 90 y 95 % con un foto periodo de iluminación de 12 h/día, y una ventilación continua para mantener la concentración de CO₂ por debajo de los niveles inhibitorios de la fructificación. Los bloques con sustrato fueron colocados de manera aleatoria sobre la estantería del cuarto de fructificación con la finalidad de eliminar el efecto de las posibles variaciones en las condiciones ambientales en el cuarto sobre las diferentes cepas. 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 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. La determinación del color se realizó utilizando los atlas de colores de Koppers (1996) y de Maerz y Paul (1950). Se determinó la eficiencia biológica de acuerdo

la recomendación de Tschierpe y Hartmann (1977), reportándose de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia biológica} = \text{Rendimiento (EB)} = \frac{\text{g hongos frescos}}{100 \text{g sustrato seco}}$$

6.4 Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes)

Las modificaciones del procedimiento de Leal-Lara (1980) y Arteaga-Santillán *et al.* (1996) fueron las siguientes: para la inoculación de la solución glucosa peptona se utilizaron cajas Petri con colonias con crecimiento que ocupaba 2/3 partes de la superficie de la caja de Petri. La totalidad del agar cubierto con micelio de una caja se depositó en un homogeneizador estéril, se añadieron 50 ml de agua estéril y se homogeneizó por 1 minuto. Se tomaron 100 μ l del homogeneizado para inocular cada matraz conteniendo 50 ml de solución peptona-glucosa, y posteriormente se incubaron a una temperatura de 25-28 °C. A las 24 y/o 48 h (presencia de desarrollo micelial) se homogeneizó el contenido del matraz más 50 ml de agua estéril por 30 segundos; 20, 25 y 30 μ l de este homogeneizado fueron inoculados en cajas Petri. Éstas se incubaron a 28 °C; al desarrollarse las colonias se determinó microscópicamente la presencia de fíbulas. Aquellas que presentaron hifas sin fíbula (neohaplontes) fueron sembradas en cajas de Petri conteniendo EMA, para verificar la ausencia de fíbulas al desarrollarse nuevamente.

Los neohaplontes recuperados se propagaron individualmente en cajas Petri con EMA hasta que el diámetro de las colonias alcanzó 2 a 4 cm. Los neohaplontes obtenidos fueron apareados para identificar los dos componentes del dicarion. Para determinar la compatibilidad entre colonias monocarióticas, del margen en crecimiento de una colonia se cortó un trozo cúbico de agar con micelio de aproximadamente 4mm de lado, y se colocó en una caja con medio EMA, al lado de este fragmento se colocó otro trozo de agar con micelio, de igual tamaño, proveniente de un monocariote distinto. En cada caja se realizaron 6 apareamientos hasta completar la combinación de todos los neohaplontes. Después de 2 a 5 días de incubación se detectó, con la ayuda del microscopio, la presencia de fíbulas en varios puntos de las colonias formadas por cada apareamiento,

identificándose de esta forma los dos tipos característicos de neohaplontes para cada cepa independientemente.

6.5 Recuperación de progenies monospóricas (meióticas)

Las esporas de los cuerpos fructíferos se colectaron colocando el esporóforo sobre papel filtro o aluminio estéril dejándolo esporular entre 12 y 24 horas. Posteriormente, se retiró el cuerpo fructífero y el papel con las esporas se guardó en una bolsa de polipapel, la cual se almacenó a temperatura ambiente.

Para la germinación de esporas se cortó un cuadro del papel filtro de 1 x 1 cm con las esporas, bajo condiciones de esterilidad, y este se depositó en vial con 5 ml de agua destilada estéril; se agitó vigorosamente y con la suspensión de esporas resultante se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . De cada dilución se inocularon 50 μ l en 2 placas de EMA que se incubaron a 28°C durante 3 días. Diariamente se examinaron todas las cajas con el microscopio, y las colonias monocarióticas encontradas, se transfirieron a cajas Petri con EMA (4 colonias por placa). Cuando se observó desarrollo micelial en las colonias, se llevó a cabo una segunda revisión microscópica, resemebrándose individualmente sólo las colonias monocarióticas en placas de EMA. En los casos en donde no fue posible aislar monocariotes (por la elevada cantidad de colonias) se preparó nuevamente la suspensión de esporas y se realizó una dilución mayor antes de inocular en las placas de EMA. Una vez que se obtuvieron las colonias monocarióticas crecidas, se les asignó una clave de identificación y se procedió a su clasificación en los 4 tipos de compatibilidad.

Para clasificar la progenie monocariótica de cada dicarionte, los cultivos miceliales monospóricos (msp) obtenidos de las esporas aisladas del dicarionte, fueron apareados con los dos neohaplontes parentales. En un período de 3 a 7 días de incubación se revisaron al microscopio para observar la formación de fíbulas, resultado de la compatibilidad entre dos cepas, lo que permitió identificar a los monocariotes con los tipos de compatibilidad I y II.

Los monocariotes que no fueron compatibles con los neohaplontes parentales, significa que pertenecen a alguno de los dos tipos recombinates (III y IV). Para su clasificación en estos dos tipos, se tomaron al azar dos monocariotes del grupo que dio reacciones negativas con los dos neohaplontes parentales (es decir con probable tipo III o IV), y se cruzaron con el resto de los monocariotes no clasificados. Como resultado de dichas cruza se presentaron las siguientes opciones:

- 1) Dos monocariotes seleccionados pertenecieran al mismo tipo de compatibilidad por ejemplo al tipo (IV) con lo cual los apareamientos positivos identificaban a los monocariotes del tipo opuesto (III), y los monocariotes restantes, con apareamientos negativos pertenecían al mismo tipo (IV). Para confirmar que realmente pertenecen al tipo (IV) fue necesario cruzar estos monocariotes que no se cruzaron con alguno del tipo contrario (III) ya conocido.
- 2) Un monocariote perteneciera al tipo III y otro al tipo IV, con lo cual se lograba la clasificación en una forma inequívoca de todos los monocariotes en la primera serie de apareamientos.

6.6 Hibridación de neohaplontes y progenie meiótica.

Para hibridizar neohaplontes de las diferentes cepas entre ellos mismos y con los monospóricos de las diferentes cepas, los monocariotes se propagaron individualmente en placas de EMA; se corroboró de nuevo al microscopio la ausencia de fíbulas y se procedió a realizar el apareamiento siguiendo la técnica ya descrita en el inciso 6.4. Los cubos de micelio de las colonias monocarióticas se colocaron lo más cercano posible, realizando de 5 a 6 apareamientos en una misma caja de Petri, las que se incubaron a 28 °C durante 5–6 días. Una crusa se determinó como positiva cuando microscópicamente se apreciaron fíbulas en por lo menos tres diferentes puntos situados de manera equidistantes en la periferia de la colonia. Las fíbulas son estructuras que se forman únicamente cuando se lleva a cabo la fusión celular (plasmogamia), 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.

6.7 Análisis estadístico de resultados

Para determinar la proporción en la que se recuperaron los dos tipos de neohaplontes, así como la forma de segregación de los factores de compatibilidad se aplicó la prueba de χ^2 . Para detectar diferencias estadísticas significativas en la producción de esporóforos de las cepas tanto, parentales como híbridas, se utilizó el análisis de varianza y en caso de encontrar diferencias significativas, se aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan para clasificar a las cepas de acuerdo a su capacidad de producción.

7 EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

Dada la gran variabilidad fenotípica del color de esporóforos de los basidiomicetos del género *Pleurotus*, existen controversias en la forma de clasificar las diferentes cepas de éste género.

Con la intención de aportar elementos para entender la forma en la que se expresa el color en los cuerpos fructíferos de estos hongos, se realizaron varios experimentos. En la **Figura 7.1** se aparece el diagrama general de trabajo que se siguió en la presente investigación, cepas de *Pleurotus* spp. de diferentes lugares del país se fructificaron determinándose la coloración de los esporóforos y esporadas.

Se seleccionaron las cepas que presentaron colores contrastantes y estables, recuperándose, por el proceso de descariotización química, los componentes monocarióticos (neohaplontes) de 10 cepas. Se realizó la hibridación de los neohaplontes (nhs) de las diferentes cepas, determinando la coloración de esporóforos y esporadas de los híbridos obtenidos. Se seleccionaron los híbridos amarillos y se efectuó la recuperación de la progenie meiótica (msp). Así mismo, se realizó la obtención de la este tipo de progenie para las cepas reconstituidas a partir de sus neohaplontes y para una de las cepas parentales de los híbridos amarillos.

Se determinaron los factores de incompatibilidad realizándose apareamientos entre los neohaplontes compatibles y los monocariotes con tipo de compatibilidad I y II para las cepas híbridas, así como entre los monospóricos con factores de incompatibilidad I y II de las cepas parentales.

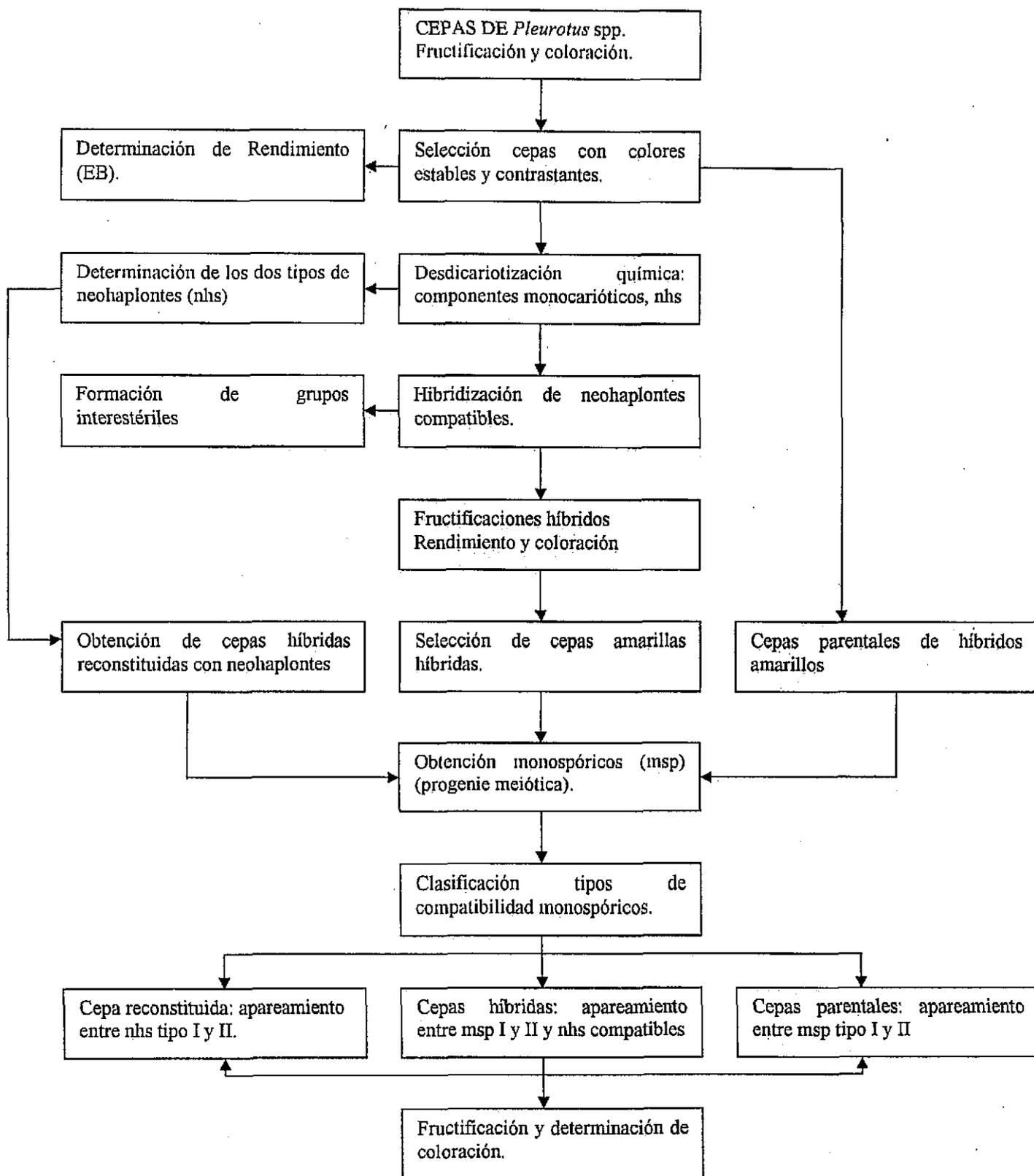


Figura 7.1 Diagrama general de trabajo

7.1 Determinación de color de esporóforos y esporadas

Para realizar los estudios genéticos sobre la expresión del color de los esporóforos en el género *Pleurotus* se requiere en una primera instancia seleccionar cepas que produzcan de manera estable esporóforos de colores definidos. Por ello en la presente investigación fue necesario obtener cepas de colección tanto de origen local como del extranjero (**Cuadro 7.1**). Se partió de un conjunto 20 cepas *Pleurotus* spp., tanto comerciales como silvestres. Estas fueron cultivadas en paja de trigo para determinar el color de esporóforos y esporadas, ya que al inicio de la presente investigación se contaba únicamente con la información muy general y subjetiva proporcionada por los responsables de las diferentes colecciones, respecto a la coloración de los esporóforos. A esto debe añadirse la variabilidad en la coloración de estas estructuras dentro del género *Pleurotus* debido a las condiciones del medio ambiente. Por lo anterior resultaba indispensable obtener las fructificaciones de las cepas bajo condiciones controladas del laboratorio, para poder determinar, en forma confiable, la coloración de los esporóforos y esporadas de cada cepa. En el **Cuadro 7.1** se presentan los resultados obtenidos, la coloración de esporóforos y esporada se expresa de acuerdo al diccionario de colores de Maerz y Paul (1950). Es importante indicar que actualmente en México la mayoría de los trabajos que informan sobre el color de los esporóforos de cepas de *Pleurotus* spp., únicamente indican el color apreciativo que tienen estas estructuras, el cual resulta muy subjetivo dada la diversidad de formas de percepción del color que cada investigador tiene. Sin embargo, la utilización de los atlas de colores permite una mejor caracterización de este atributo estableciendo una identificación objetiva de la coloración de los cuerpos fructíferos y esporadas de las diferentes cepas de *Pleurotus* spp. (Zervakis y Balis, 1991; Vilgalys, y Sun, 1994). Se logró establecer así una colección importante de cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. que producen cuerpos fructíferos de colores diversos (ver **Figura 7.2**).

CUADRO 7.1 CEPAS DICARIÓTICAS DE *Pleurotus* spp. SELECCIONADAS PARA ESTUDIAR LA EXPRESIÓN DEL COLOR.

Cepa	Procedencia (Especie reportada)	Crecimiento micelial ² (Tipo/Abundancia)		Color ¹	
				Esporóforo	Esporada
ECS130	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	R	Rosa claro (1/7D)	Durazno (10/5B)
ECS127 _G	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	R	Marrón pardusco (12/2B)	Púrpura pálido (3/7B)
ECS127 _R	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	R	Rosa: claro (1/7D)	Durazno (10/5B)
ECS187	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>P. citrinopilatus</i>)	F	R	Amarillo fuerte (9/1K)	Rosa pálido (3/1B)
IAP	Edo. Veracruz Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	EX	Marfil (10/2B)	Liliáceo (42/3B)
IB67	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	EX	Gris rosáceo (3/1B)	Pardusco-amarillo (10/2A)
IB67-2	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	R	Marfil (10/2B)	Pardusco-amarillo (10/2A)
IB67-3	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	R	Marfil (10/2B)	Pardusco-amarillo (10/2A)
IE136	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. columbinus</i>)	F	R	Gris azulado (41/7A)	Lila claro (41/2B)
IE200	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>)	A	R	Blanco (2/1A)	Blanco (2/1A)
IE201	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>)	A	R	Blanco (2/1A)	Blanco (2/1A)
IE202	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>salmoneostramineus</i>)	A	EX	Rosa coral (2/9F)	Durazno (10/5B)
INI8	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. ostreatus</i>)	F	EX	Marrón pardusco (12/2B)	Rosa pálido (3/1B)
P5	Quebec, Canadá (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	EX	Marfil (10/2B)	Pardusco-amarillo (10/2A)
P15	Pleos, Italia (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	R	Gris (35/4A o 36/6A)	Pardusco-amarillo (10/2A)
PLEUS	XICO, PUEBLA, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	F	EX	Canela (12/7E)	Rosa pálido (3/1B)
PORO	Stamets, USA (<i>P. ostreatoroseus</i>)	F	R	Rosa perla (1/8F)	Durazno (10/5B)
RP	Productor en D.F., Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	R	Rosa ópera (1/8B)	Durazno (10/5B)
UAP7	U. de Puebla, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	EX	Arena (13/6C)	Púrpura pálido (3/7B)
UAP9	U. de Puebla, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	A	EX	Marfil (10/2B)	Púrpura pálido (3/7B)

1. El color de cuerpos fructíferos y esporadas de acuerdo a Maerz y Paul (1950)

2. Crecimiento micelial; Tipo: A = algodonoso, F = filamentosos; Abundancia: Ex = exuberante, R = regular.

Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, humedad (H.R). 85-95%, ciclo 12 h luz-obscuridad, ventilación continua.

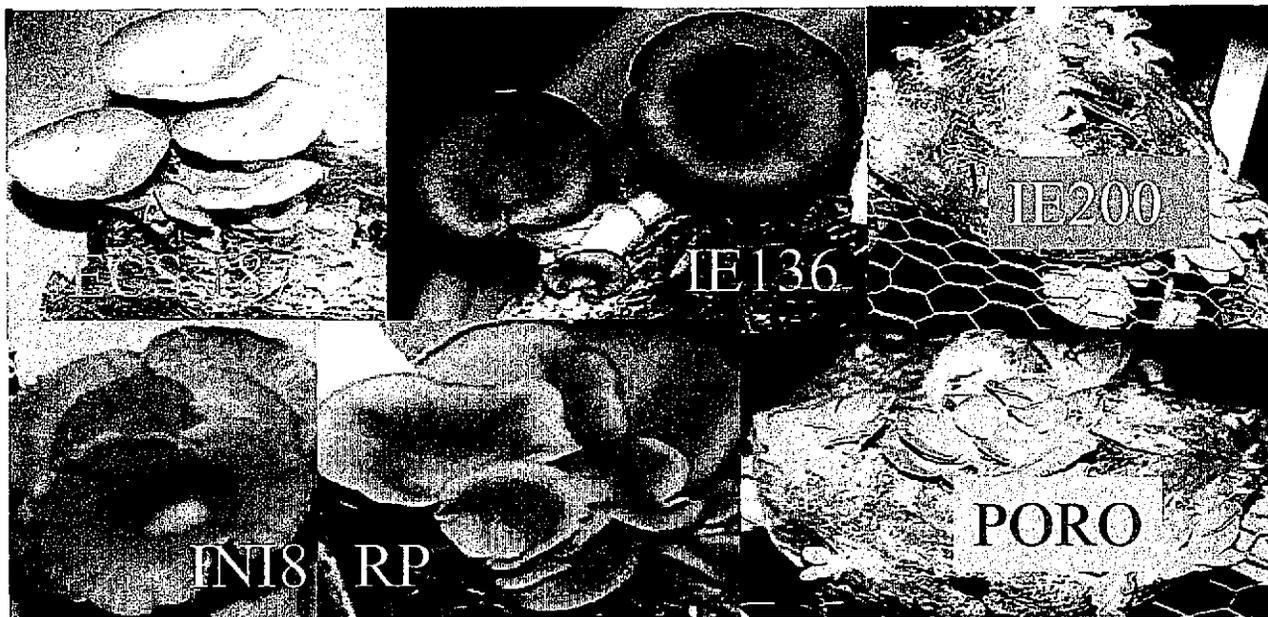


Figura 7.2 Cepas de colores de *Pleurotus* spp

Es importante señalar que en el Cuadro 7.1 sólo se presenta el color que se consideró predominante, por lo que a continuación se hace una descripción más detallada de los colores obtenidos. Para la evaluación del color se utilizó primeramente el atlas de colores de Koppers (1979). Una vez determinados los colores característicos de las cepas, se realizó la identificación con el diccionario de colores de Maerz y Paul (1950) para asignar las claves y nombres de cada color (Zevakis y Balis, 1991).

Los esporóforos de la cepa ECS130 presentaron coloración de rosa claro a rosa hortensia (1/7D a 2/7E) mientras que en el conjunto de esporas la coloración fue durazno (10/5B). Con respecto a la cepa ECS127 se puede observar que presenta los subíndices (G) y (R) esto se debe a que a pesar de que se solicitó la cepa rosa (R), el ECOSUR (Chiapas) proporcionó en una primera instancia una cepa gris con esa denominación, situación de la que nos percatamos hasta el momento de fructificarla. Posteriormente se obtuvo del ECOSUR la cepa rosa ECS127_R cuyos esporóforos fueron de color rosa claro a rosa hortensia (1/7D a 2/7E) y el color de las esporas fue el mismo que para la cepa ECS130.

La cepa ECS127_e exhibió una coloración de esporóforos entre ámbar blanco y marrón pardusco (11/1C a 12/2B), con color de esporada púrpura pálido (3/7B). Para la cepa ECS187 los esporóforos presentaron coloración de verde amarillo claro, amarillo claro y amarillo fuerte (9/1F, 9/1I y 9/1K), las esporas fueron de color rosa pálido (3/1B). La cepa IAP generó esporóforos de color arenisca, marfil a pardusco amarillo (10/3B, 10/2/B a 10/2A), y la esporada presentó un color liliáceo (42/3B).

En la cepa IB67 color gris rosáceo, que inicialmente se proporcionó por la U. de Guadalajara con indicación de coloración rosa, después de obtener los esporóforos y comprobar que no era así, se decidió solicitarla de nuevo en dos ocasiones, por lo que se trabajaron tres tipos IB67, IB67-2, IB67-3 de esta cepa. La coloración de los esporóforos de la cepa IB67 fueron entre naranja grisáceo, gris rosáceo y ámbar blanco, beige miel (4/2C, 3/1B y 11/1C, 11/6C), con color de esporadas pardusco amarillo (10/2A). La cepas IB67-2 y IB67-3 mostraron colores de esporóforos marfil y arenisca (10/2B y 10/3B), con el mismo color de esporada de la cepa IB67. Para la cepa IE136 los cuerpos fructíferos dieron coloraciones con diferentes tonos que van desde, gris claro, marfil oscuro hasta gris azulado, gris acorazado, platino (4/7A, 12/3C a 41/7A, 45/4A, 45/3A), el color de esporada fue lila claro (41/2B o 42/3C). Las cepas IE200 e IE201 exhibieron color blanco tanto en los esporóforos como en la esporada (2/1A). En la cepa IE202 los esporóforos mostraron coloración de rosa coral a flor de durazno (2/9F a 2/9B), y esporas de color durazno (10/5B).

INI8 presentó fructificaciones con coloración entre marrón pardusco y color almendra, y nuez (12/2B y 13/6B y 13/5B), con esporadas rosa pálido (3/1B). En el caso de la cepa P15 los esporóforos tuvieron color gris (35/5A y 36/6A), con esporada pardusco amarillo (10/2A). La cepa P5 dio coloraciones entre marfil y arenisca (10/2B y 10/3B) y en el conjunto de esporas la coloración fue pardusco amarilla (10/2A). PLEUS originó esporóforos color canela o salvado (12/7E o 12/7D) y las esporas rosa pálido (3/1B).

La cepa PORO mostró esporóforos con coloraciones rosa perla (1/8F) y esporada color durazno (10/5B). En RP los esporóforos fueron color rosa opera a durazno (1/8B o 1/8C a 2/9A o 2/9B) y esporada color durazno (10/5B). En la cepa UAP7 la coloración de

los esporóforos fue arena o corcho (13/6C o 12/7B) con color de esporada púrpura pálido (3/7B). Finalmente UAP9 exhibió fructificaciones con color entre pardo amarillento y marfil (12/6B a 10/2B) con esporada del mismo color que la cepa UAP7.

En algunos casos la coloración de los esporóforos que se determinó no coincidió con la reportada por los donantes, lo cual probablemente fue resultado de las diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas así como a la naturaleza subjetiva de la caracterización que hicieron del color observado. Se encontró por ejemplo, que las cepas IB67, IB67-2 y IB-67-3, que fueron donadas como cepas productoras de esporóforos rosas, exhibieron colores marfil, arena y gris. Se observa en el **Cuadro 7.1** que los esporóforos de las cepas ECS127_R, ECS130, IE202, PORO y RP presentaron una coloración rosa, la cual permaneció a lo largo de la primera cosecha, las cepas IE200 e IE201, presentaron color blanco, la ECS187 color amarillo, mientras que el resto de las cepas mostraron colores desde gris (IB67, IE136 y P15), marfil y arena (IB67-2, IB67-3, IAP, P5 UAP9 y UAP7), hasta amarillo pálido y canela (INI8, ECS127_G, y PLEUS).

En cuanto a las esporadas, se observó una variación del color de las diferentes cepas. Por lo regular fueron color durazno en las cepas con esporóforos rosa, blanco en las cepas con esporóforos blancos, pardusco amarillo en las cepas de esporóforos de color marfil, rosa pálido en las cepas con fructificaciones de color amarillo pálido, y púrpura y lila claro en las cepas con esporóforos marfil y gris.

Es importante considerar que para los estudios genéticos sobre el color de los esporóforos es esencial disponer de cepas de *Pleurotus* que muestren estabilidad de este parámetro, por lo que debido a que en trabajos anteriores se ha establecido un efecto de la temperatura en el cambio de coloración de los esporóforos (Li, 1980), se consideró conveniente evaluar la coloración de los esporóforos de las cepas que presentaron colores contrastantes (ECS127_R, ECS130, IE200, IE201, IE202, PORO y RP), a una temperatura de 15 °C. Se observó que no hubo cambio en el color de los esporóforos, conservándose los colores blancos y rosas respectivos. De esta forma se disponía ya de los elementos necesarios para realizar la selección de las cepas para este estudio. Se contaba ya con cepas que producían esporóforos de colores estables y contrastantes. De ellas se

seleccionaron diez cepas, ECS127_G, ECS187, IB671, IE200, IE201, IE202, INI8, P15, PORO y RP (Figura 7.1), para iniciar los estudios genéticos de expresión del color. En esta etapa del trabajo fue necesario efectuar la obtención de los componentes monocarióticos de cada una de las cepas, por lo que se realizó el proceso de desdicariorización química.

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

Se efectuó la desdicariorización de las 10 cepas de colores de *Pleurotus* (ECS127_G, ECS187, IB671, IE200, IE201, IE202, INI8, P15, PORO y RP). En el **Cuadro 7.2** se presenta el número total de neohaplontes recuperados para cada cepa. La cantidad de neohaplontes obtenidos para las cepas IB67, IE202, INI8 y P15 varió de 5 a 7. Con el resto de las cepas el número varió entre 8 y 12. El número de componentes monocarióticos obtenido en general fue pequeño comparado con los reportes de trabajos previos, en los que el número de neohaplontes obtenidos varió entre 27 y 45 (Leal-Lara, 1980). Se observa que a pesar del número pequeño de componentes monocarióticos obtenido, la recuperación fue simétrica con el método de desdicariorización química empleado, de acuerdo a los valores de χ^2 obtenidos para una proporción 1:1

Estos resultados coinciden con los de Leal-Lara (1980), encontrándose los dos tipos de neohaplontes en iguales proporciones. También se comprueba que el medio de cultivo utilizado, peptona-glucosa al 20%, sirvió para desdicariorizar las cepas de *Pleurotus*, por lo que se atribuye que la peptona resultó eficaz para producir la desdicariorización. (Leal-Lara, 1980; Arteaga-Santillán et al., 1996).

Sin embargo, es necesario mencionar que fue necesario realizar modificaciones al método de obtención de neohaplontes empleado por estos autores (ver Materiales y métodos), ya que se tenían problemas para obtener los componentes monocarióticos y al modificar los tiempos de homogenización se permitió que los neohaplontes pudieran crecer en las placas de EMA.

CUADRO 7.2. RECUPERACIÓN DE COMPONENTES MONOCARIÓTICOS (NEOHAPLONTES) DE CEPAS DE *Pleurotus* spp.

Cepas Dicarióticas de <i>Pleurotus</i> spp.	Color de Esporóforos*	Neohaplontes Recuperados			Prueba χ^2 * para recuperación simétrica* (nh1:nh2 = 1:1)
		Total	Tipo nh1	Tipo nh2	
ECS127	Gris	12	6	6	0.00
ECS187	Amarillo	8	5	3	0.50
IB67	Gris	5	2	3	0.20
IE200	Blanco	15	8	7	0.06
IE201	Blanco	12	7	5	0.33
IE202	Rosa	5	3	2	0.20
INI8	Gris	7	2	5	1.28
P15	Gris	7	4	3	0.14
PORO	Rosa	11	8	3	2.27
RP	Rosa	9	3	6	1.00

* χ^2 de tablas (P = 0.01)=11.34. Valores de χ^2 menores al valor de tablas indican que no hay diferencias estadísticas significativas.

* El color de los esporóforos corresponde a la escala de colores básicos.

7.3 Hibridización entre neohaplontes de cepas seleccionadas

Los componentes monocarióticos de las cepas de colores de *Pleurotus* spp., se aparearon en todas las combinaciones posibles, para estudiar la expresión y estabilidad de los colores en los nuevos híbridos. Al aparear los neohaplontes se observó la presencia de cinco grupos interestériles (**Cuadro 7.3**). Dentro del primero se encuentran las cepas IB67, IE200, PORO y RP con colores gris, blanco y rosa, respectivamente, agrupándose sus neohaplontes dentro de 2 tipos de compatibilidad con factores totalmente distintos, el $A_m B_m$ y el $A_n B_n$. En el segundo grupo están contenidas las cepas IE201 e IE202, cuyos esporóforos presentaron color blanco y rosa respectivamente; de igual forma se agrupan los neohaplontes en los tipos de compatibilidad $A_o B_o$ y $A_p B_p$. Como se puede observar, las cepas rosas y blancas se encuentran en estos dos grupos interestériles. No obstante, cabe también la posibilidad de que los tipos de incompatibilidad de estos dos grupos resultaran tipos complementarios entre sí, es decir que los factores del grupo 2 fuesen $A_m B_n$ y $A_n B_m$. Para elucidar esta situación sería necesario obtener los cuatro tipos de

compatibilidad de las progenies meióticas de cada cepa dicariótica lo que permitiría verificar sus patrones de interhibridización.

Los 2 componentes de las cepas IN18 y ECS127_c se ubican dentro de un tercer grupo interestéril con los tipos de compatibilidad A_qB_q y A_rB_r ; ambas cepas presentan color gris en sus esporóforos.

Tanto el grupo 4 y el 5 están representados por una sola cepa, observándose que la cepa amarilla ECS187 (grupo 4) contiene los factores de compatibilidad A_sB_s y A_tB_t ; una situación similar se presenta en el grupo 5 en el cual se ubica la cepa gris P15 con los factores de compatibilidad A_uB_u y A_vB_v .

Como requisito de este estudio se buscaba contar con varias cepas de colores contrastantes y que fueran interhibridizables entre si, situación que llevo a descartar las cepas de los grupos interestériles 3, 4 y 5. En el caso del grupo 3 ambas cepas presentaron color gris por lo que no se consideró conveniente seleccionarlas, y los grupos 4 y 5 estaban representados por una cepa, es decir, que no son interhibridizables con los otros grupos, por lo que también se eliminaron. Debido a que las cepas rosas y blancas quedaron ubicadas en los grupos interestériles 1 y 2, y considerando que en estos grupos se encuentran las cepas que mostraron colores estables y contrastantes, así como la total compatibilidad entre ellas, se decidió obtener los esporóforos de las cepas híbridas dicarióticas formadas dentro de estos dos grupos, con la finalidad de evaluar la coloración esporóforos y esporadas, y la productividad de las cepas híbridas.

CUADRO 7.3. TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE COMPONENTES MONOCARIÓTICOS DE CEPAS DE *Pleurotus* spp.

Tipos De Compatibilidad		Grupo 1								Grupo 2				Grupo 3				Grupo 4		Grupo 5	
		A _m B _m				A _n B _n				A _o B _o		A _p B _p		A _q B _q		A _r B _r		A _s B _s	A _t B _t	A _v B _v	A _w B _w
CEPAS		IB67 ₁	IE200 ₂	PORO ₁	RP ₁	IB67 ₂	IE200 ₁	PORO ₂	RP ₂	IE201 ₁	IE202 ₁	IE201 ₂	IE202 ₂	ECS127 ₁	INI8 ₂	ECS127 ₂	INI8 ₁	ECS187 ₁	ECS187 ₂	P15 ₁	P15 ₂
A _m B _m	IB67 ₁	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IE200 ₂	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PORO ₁	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RP ₁	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _n B _n	IB67 ₂	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IE200 ₁	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PORO ₂	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RP ₂	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _o B _o	IE201 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IE202 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A _p B _p	IE201 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IE202 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A _q B _q	ECS127 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	INI8 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A _r B _r	ECS127 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	INI8 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A _s B _s	ECS187 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A _t B _t	ECS187 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A _v B _v	P15 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A _w B _w	P15 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Color en el Dicariote original		Gris rosáceo	Blanco	Rosa	Rosa	Gris rosáceo	Blanco	Rosa	Rosa	Blanco	Rosa	Blanco	Rosa	Gris	Gris	Gris	Gris	Amarillo	Amarillo	Gris	Gris

El signo (+) indica formación de fibulas, apareamiento compatible. El signo (-) indica apareamiento incompatible o ausencia de fibulas.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Es importante indicar que otra cepa que presentó un color contrastante y estable fue la cepa amarilla ECS187, sin embargo, se descartó debido a que presentó incompatibilidad con las cepas restantes

7.4 Características fenotípicas de las cepas híbridas

Con la finalidad de determinar la fertilidad de los híbridos formados, la coloración de los esporóforos y la productividad (EB), se logró fructificar 13 de los catorce híbridos obtenidos (uno de ellos no formó esporóforos) de los apareamientos entre cepas de los grupos interestériles 1 y 2.

La coloración de los primordios y esporóforos de los híbridos producidos entre cepas del grupo interestéril 1: IB67₁xIE200₁, IB67₂xIE200₂, IB67₁xPORO₂, IB67₂xPORO₁, IE200₁xPORO₁, IE200₂xPORO₂, IB67₁xRP₂, IB67₂xRP₁, IE200₁xRP₁, PORO₁xRP₂, y PORO₂xRP₁, fue muy parecida entre si. Todos los primordios de estos híbridos presentaron una coloración crema rosáceo, mientras que los esporóforos maduros tuvieron una coloración beige, marfil, crema o pardusco. Al aparear los neohaplontes de las dos cepas del grupo interestéril 2 se obtuvieron dos híbridos, IE201₂xIE202₁ y IE201₁xIE202₂, los que sin embargo, presentaron un color **amarillo (Cuadro 7.4, Figura 7.3)**, color diferente a los característicos de las cepas parentales, la cepa IE201 (blanca) y la cepa IE202 (rosa) o de los híbridos obtenidos del primer grupo interestéril.

El color de las esporadas de todos los híbridos fue lila claro (41/2B) (Maerz y Paul, 1950). Es importante mencionar que el desarrollo del cuerpo fructífero en las cepas híbridas amarillas, mostró una ontogenia distinta en comparación con las otras cepas híbridas. En las cepas amarillas, al iniciarse la fructificación, se desarrolló una protuberancia o cluster que sobresalió de la superficie del sustrato invadido con micelio, sobre la cual después se desarrollaron los primordios de los cuerpos fructíferos. Mientras que en los demás híbridos, el desarrollo del esporóforo se obtuvo a partir de los nódulos de micelio o primordios que se formaron sobre la superficie del sustrato directamente.

CUADRO 7.4 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS FRUCTIFICACION DE CEPAS HÍBRIDAS DE *Pleurotus* spp.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS DE ESPORÓFOROS		
	TAMAÑO (cm)	PESO (g)	COLOR
GRUPO INTERESTÉRIL 1			
IB67 ₁ xIE200 ₁	5x7-6x8	9-22	Beige miel (11/6C)
IB67 ₂ xIE200 ₂	6x8-7x10	9-14	Marfil (10/2B)
IB67 ₁ xPORO ₂	5x6-7x8	9-13	Naranja amarillo(11/5C)
IB67 ₂ xPORO ₁	7x9-12x14	22-55	Pardo amarillo (11/2B)
IB67 ₁ xRP ₂	5x7-6x8	9-22	Beige miel (11/6C)
IB67 ₂ xRP ₁	7x8-7x10	9-14	Beige (11/2C)
IE200 ₁ xPORO ₁	8x8-8x10	20-35	Marfil (10/2B)
IE200 ₂ xPORO ₂	9x10-10x12	24-27	Crema (10/3D)
IE200 ₁ xRP ₁	5x6-8x8	9-14	Pardo amarillo (11/2B)
PORO ₁ xRP ₂	8x10-13x14	23-56	Pardo amarillo (11/2B)
PORO ₂ xRP ₁	8x8-6x16	21-38	Marfil (10/2B)
GRUPO INTERESTÉRIL 2			
IE201 ₁ xIE202 ₂	6x7	10	Amarillo brillante (9/1K)
IE201 ₂ xIE202 ₁	5x6-6x7	11-12	Amarillo brillante (9/1K)

Nota: Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, H.R. 85-95%, ciclo 12 h luz-obs., ventilación continua.

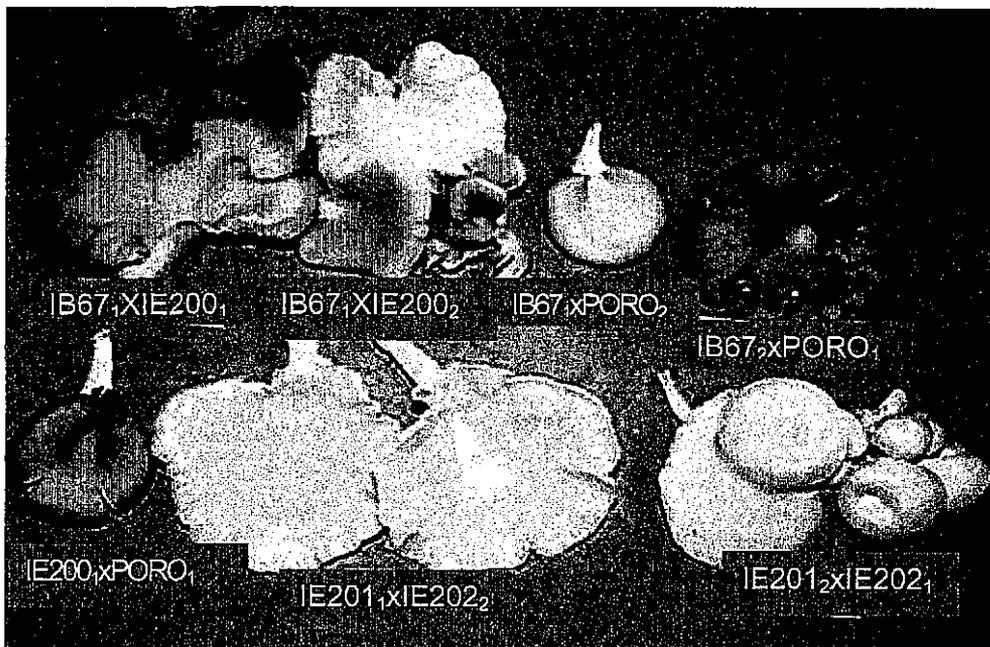


Figura 7.3 Esporóforos de Híbridos obtenidos por el apareamiento de cepas parentales de *Pleurotus* spp..

La presencia de híbridos amarillos planteó la interrogante de si se trataba de la expresión de un gene recesivo o de una contaminación genética. Este planteamiento tenía como base dos aspectos, primero que las cepas parentales no presentaron indicios de color amarillo en sus esporóforos y segundo, que al haber trabajado con una cepa parental amarilla cabría la posibilidad de una contaminación genética. La estrategia que se siguió para resolver esto contempló el apareamiento de los neohaplontes de las cepas ECS127_G, IE201 y IE202 con la finalidad de reconstituirlas, a partir de sus componentes monocarióticos. Se consideró que la cepa ECS127_G presentaba coloración gris típica o común de este género y dado que en la literatura existen reportes de reconstitución a partir de sus componentes monocarióticos en cepas con este color (Leal-Lara, 1980), por lo que su reconstitución serviría de patrón de comparación. La fructificación de las cepas parentales y reconstituidas ECS127_G, IE201 y IE202 conjuntamente con las cepas híbridas, y la posterior determinación de la coloración de los esporóforos permitió confirmar que la presencia de esporóforos amarillos esta relacionada con la forma de expresión del color en este género.

Se observó que tanto la cepa ECS127_G parental como la reconstituida presentaron esporóforos con la misma coloración gris. Esto indica que en esta cepa de color gris, el proceso de descariotización química no provocó cambios en la coloración del dicariote original, lo que concuerda con reportes previos (Leal-Lara, 1980; Leal-Lara y Eger-Hummel, 1982). Sin embargo, las 2 cepas reconstituidas IE201 y IE202 produjeron esporóforo amarillos, a pesar de que la cepa parental IE201 produjo nuevamente esporóforos blancos y en la cepa parental IE202 nuevamente fueron rosas (**Figura 7.4**).

En el **Cuadro 7.4** se presentan los datos de peso y tamaño, color de primordios y esporóforos para los trece híbridos obtenidos a partir del apareamiento de los grupos interestériles 1 y 2. Las cepas híbridas IB67₂xPORO₁, IE200₁xPORO₁, PORO₁xRP₂ y PORO₂xRP₁ presentaron los tamaños y pesos de esporóforos mayores obteniéndose tamaños de píleo entre 7x9-12x14, 8x8-8x10, 8x10-13x14, 8x8-6x16 cm respectivamente, con pesos que van de 20 hasta 56 g, estas características de los esporóforos son atributos importantes para la comercialización de los hongos comestibles (Arias-García, 1998; Paredes, 1996; Paredes et al., 1996). A pesar de que los pesos unitarios menores se

encontraron entre 9 y 10 g para el resto de las cepas híbridas, estos valores fueron superiores a los valores de peso unitario de fructificaciones pequeñas reportados por Arias-García (1998) y considerándose que representan esporóforos con calidad regular y de tamaño mediano (Paredes, 1996; Paredes et al., 1996).

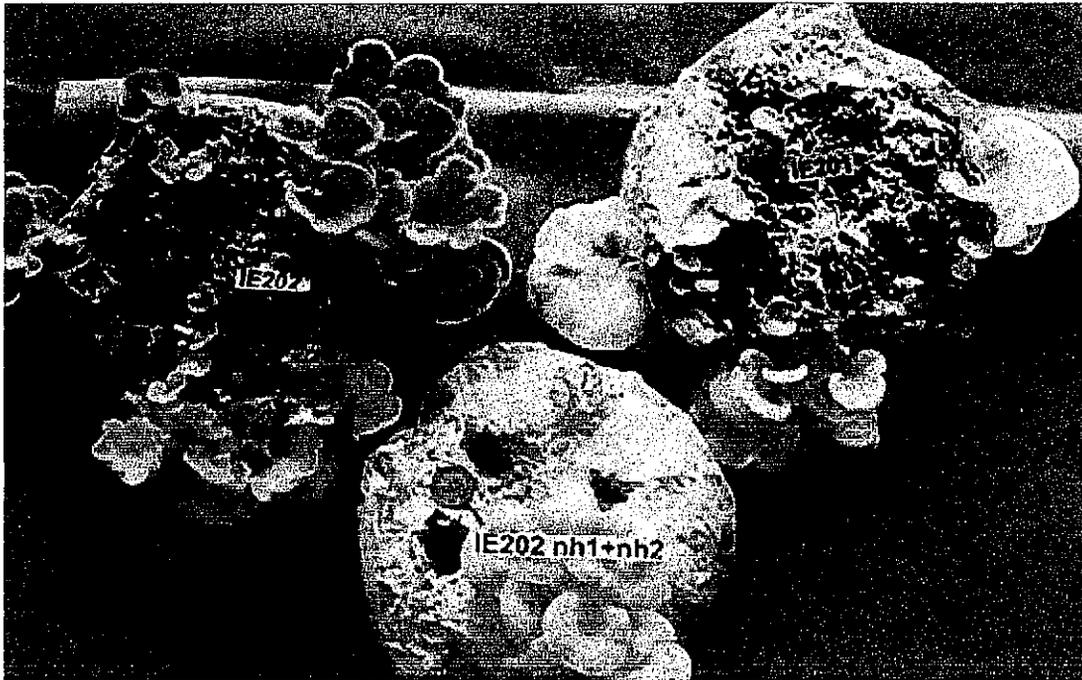


Figura 7.4 Cepas parentales blanca (IE201), rosa (IE202) y cepa reconstituida (IE202_R).

Como se puede observar en el **Cuadro 7.5**, al primer brote todas las cepas híbridas rebasaron el 40% de eficiencia biológica (EB). Es importante destacar que el híbrido IE201₁xIE202₂ del grupo de interestéril 2, presentó la mayor eficiencia biológica (93.5%), no encontrándose diferencias significativas en la producción del segundo híbrido de este grupo (IE201₂xIE202₁ respecto a los híbridos del grupo interestéril I, con la excepción del híbrido IB67₂xIE200₂ que presentó la menor EB (40.9%).

CUADRO 7.5. RENDIMIENTO (g DE HONGOS FRESCOS/ 100 g DE SUSTRATO SECO) DE LAS CEPAS HÍBRIDAS.

CEPAS	RENDIMIENTO (EB*) g HONGOS FRESCOS/100g SUSTRATO SECO
GRUPO INTERESTÉRIL 1	
IB67 ₁ xRP ₂	76.3 ± 11 ^b
IE200 ₁ xPORO ₁	73.3 ± 6 ^b
IE200 ₁ xRP ₁	69.6 ± 1 ^b
PORO ₁ xRP ₂	66.8 ± 23 ^b
IE200 ₂ xPORO ₂	64.0 ± 4 ^b
IB67 ₂ xPORO ₁	62.6 ± 3 ^b
IB67 ₁ xIE200 ₁	61.8 ± 11 ^b
IB67 ₂ xRP ₁	52.0 ± 2 ^b
IB67 ₁ xPORO ₂	49.6 ± 4 ^b
PORO ₂ xRP ₁	42.3 ± 8 ^b
IB67 ₂ xIE200 ₂	40.9 ± 14 ^a
GRUPO INTERESTÉRIL 2	
IE201 ₁ xIE202 ₂	93.5 ± 20 ^c
IE201 ₂ xIE202 ₁	75.4 ± 4 ^b

*Letras diferentes indican diferencias significativas en la eficiencia biológica de las cepas (x₂)

7.5 Características fenotípicas de cepas parentales.

Para evaluar la capacidad real de producción de cuerpos fructíferos de los híbridos, se deben comparar con las cepas parentales y otras cepas silvestres de *Pleurotus* spp. Se incluyeron 12 cepas, ocho de las cuales fueron utilizadas para la obtención de los híbridos antes indicados. Las otras 4 cepas se tomaron como cepas de referencia. En su conjunto los dos tipos de cepas producían esporóforos con coloraciones blanco, gris, rosa y amarillo.

En el **Cuadro 7.6** se presentan las características morfológicas de peso, tamaño, color de los esporóforos y esporadas obtenidas para las 12 cepas. Las cepas de referencia presentaron un intervalo de tamaño de píleo entre 3x8-6x8 y 8x10-6x11 cm, con peso de esporóforos de 13 a 28 g, mientras que el intervalo de tamaño de píleo para las cepas parentales fue de 5x9-6x9 a 8x10-7x14 cm, con pesos que van de 5 a 30 g.

CUADRO 7.6. FRUCTIFICACIÓN DE CEPAS PARENTALES Y DE REFERENCIA DE *Pleurotus* spp.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS DEL ESPORÓFORO			COLOR ESPORADA
	TAMANO (cm)	PESO (g)	COLOR	
CEPAS DE REFERENCIA				
ECS127 _R	5x9-6x9	13-16	Rosa claro (1/7D)	Durazno (10/5B)
ECS130	8x10-6x11	14-18	Rosa claro (1/7D)	Durazno (10/5B)
IAP	7x9-9x11	26-28	Marfil (10/2B)	Lila (42/3B) ₀
PLEUS	3x8-6x8	21-25	Canela (1/8F)	Durazno (10/5B)
GRUPO INTERESTÉRIL 1				
IB67	8x8-7x9	5-8	Gris rosáceo (3/1B)	Pardusco (10/2A)
IE200	8x10-7x14	16-30	Blanco (2/1A)	Blanco (2/1A)
POROS	5x9-6x9	13-16	Rosa perla (1/8F)	Rosa pálido (3/1B)
RP	6x10-9x11	26-30	Rosa opera (1/8B)	Durazno (10/5B)
GRUPO INTERESTÉRIL 2				
IE201	8x10-7x11	15-25	Blanco (2/1A)	Blanco (2/1A)
IE202	7x9-9x11	25-50	Rosa coral (2/9F)	Durazno (10/5B)
GRUPO INTERESTÉRIL 3				
INI8	7x8-6x12	20-25	Marrón pardusco (12/2B)	Rosa pálido (3/1B)
GRUPO INTERESTÉRIL 4				
ECS187	8x10-6x11	12-16	Amarillo fuerte (9/1K)	Rosa pálido (3/1B)

Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, H.R. 85-95%, ciclo 12 h luz-obs., ventilación continua.

A excepción de la cepa IB67, las 11 cepas utilizadas en esta etapa del trabajo producen esporóforo grandes o medianos (Paredes, 1995) de calidad buena a regular (Arias-García, 1998).

El Cuadro 7.7 contiene los valores de la eficiencia biológica (EB) para el primer brote de las cepas parentales y de referencia. Como se puede observar, se obtuvo un intervalo de eficiencia entre 127 y 48%. Se realizó un análisis de varianza con los resultados de eficiencia biológica obtenidos, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los rendimientos de las 12 cepas evaluadas $F(11,24)=32.71$ ($p<0.0001$). A continuación se utilizó la prueba de Duncan para determinar las cepas más productivas, que como puede observarse en Cuadro 7.7 se formaron 3 grupos, en el primer grupo ubicamos a las cepas IAP, IE201 y RP, las que presentaron los máximos valores de productividad: 112, 120 y 127% respectivamente, por lo que se les puede considerar cepas altamente productivas.

En el segundo grupo el intervalo de EB varió entre 73% y 108% y lo integraron las cepas ECS127_R, ECS130, ECS187, IE200, INI8, PORO y PLEUS, se puede considera que este grupo tiene una productividad aceptable. El tercer grupo lo formaron las cepas IB67 e

IE202 con valores de EB de 48% y 51% respectivamente, siendo estas las menos productivas.

CUADRO 7.7. RENDIMIENTO (g DE HONGOS FRESCOS/ 100 g DE SUSTRATO SECO) DE LAS CEPAS PARENTALES Y DE REFERENCIA.

CEPAS	RENDIMIENTO (EB*) g HONGOS FRESCOS/100g SUSTRATO SECO
CEPAS DE REFERENCIA	
IAP	112.8 ± 2 ^c
ECS130	108.0 ± 7 ^b
ECS127 _R	95.1 ± 33 ^b
PLEUS	84.0 ± 15 ^b
GRUPO INTERESTÉRIL 1	
RP	127.1 ± 29 ^c
IE200	102.1 ± 20 ^b
POROS	78.6 ± 2 ^b
IB67	52.1 ± 2 ^a
GRUPO INTERESTÉRIL 2	
IE201	120.0 ± 19 ^c
IE202	48.1 ± 9 ^a
GRUPO INTERESTÉRIL 3	
INI8	73.5 ± 1 ^b
GRUPO INTERESTÉRIL 4	
ECS187	96.5 ± 11 ^b

*Letras diferentes indican diferencias significativas en la eficiencia biológica de las cepas (χ^2)

Se realizó el análisis de varianza de una vía considerando la eficiencia biológica de las cepas híbridas, de las cepas parentales y de las de referencia (**Cuadro 7.8**) detectándose diferencias estadísticas significativas $F(24,74) = 4.26$, $p < 0.0001$. En el **Cuadro 7.8** se presentan los grupos obtenidos con las cepas parentales e híbridas al aplicar la prueba de Duncan, observándose la formación de 5 grupos. En el grupo con más bajos rendimientos (40.9 a 76.3%), se ubicaron la mayoría de las cepas híbridas, exceptuando la cepa IE201₁xIE202₂, junto con las cepas parentales IE202, ECS127_G, IB67 e INI8. En un segundo grupo (b) se encuentran la cepa comercial PLEUS con una eficiencia del 84% y la cepa PORO con 78.6%.

CUADRO 7.8. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS HÍBRIDAS Y PARENTALES DE ACUERDO AL RENDIMIENTO (g DE HONGOS FRESCOS/ 100 g DE SUSTRATO SECO).

CEPAS	RENDIMIENTO (EB*) g HONGOS FRESCOS/100g SUSTRATO SECO
CEPAS PARENTALES	
CEPAS DE REFERENCIA	
IAP	112.8 ± 2 ^d
ECS130	108.0 ± 7 ^d
ECS187	96.5 ± 11 ^c
ECS127 _R	95.1 ± 33 ^c
PLEUS	84.0 ± 15 ^b
INI8	73.5 ± 1 ^a
GRUPO INTERESTERIL 1	
RP	127.1 ± 29 ^e
IE200	102.1 ± 20 ^c
PORO	78.6 ± 2 ^b
IB67	52.1 ± 2 ^a
GRUPO INTERESTERIL 2	
IE201	120.0 ± 19 ^e
IE202	48.1 ± 9 ^a
CEPAS HÍBRIDAS	
GRUPO INTERESTERIL 1	
IB67 ₁ xRP ₂	76.3 ± 11 ^a
IE200 ₁ xPORO ₁	73.3 ± 6 ^a
IE200 ₁ xRP ₁	69.6 ± 1 ^a
PORO ₁ xRP ₂	66.8 ± 23 ^a
IE200 ₂ xPORO ₂	64.0 ± 4 ^a
IB67 ₂ xPORO ₁	62.6 ± 3 ^a
IB67 ₁ xIE200 ₁	61.8 ± 11 ^a
IB67 ₂ xRP ₁	52.0 ± 2 ^a
IB67 ₁ xPORO ₂	49.6 ± 4 ^a
PORO ₂ xRP ₁	42.3 ± 8 ^a
IB67 ₂ xIE200 ₂	40.9 ± 14 ^a
GRUPO INTERESTERIL 2	
IE201 ₁ xIE202 ₂	93.4 ± 20 ^c
IE201 ₂ xIE202 ₁	75.4 ± 4 ^a

*Letras diferentes indican diferencias significativas en la eficiencia biológica de las cepas (x±σ)

La cepa híbrida IE201₁xIE202₂, y las cepas silvestres ECS127_R, ECS187, IE200, formaron el grupo c, con rendimientos entre 93 y 102%. El grupo d fue formado por las cepas IAP y la cepa ECS130 con 112 y 108% de EB respectivamente. Por último, las cepas IE201 (120%) y RP (127%) conformaron el grupo e, con los más altos rendimientos.

Al comparar los rendimientos producidos por las cepas híbridas y las parentales del grupo interestéril 1 se observó que todos los híbridos se encuentran junto con la cepa parental IB67 dentro del grupo con más baja producción aún en los apareamientos con algunos de los componentes monocarióticos de las cepas más productoras (IE200 y RP). En el caso del grupo interestéril 2 se observó que junto con la cepa parental IE202 (48.1%) el híbrido IE201₂xIE202₁ también se encuentra dentro del grupo con más bajos rendimientos, mientras que el segundo híbrido IE201₁xIE202₂ presenta un mayor rendimiento, si bien todavía por debajo del rendimiento obtenido por la cepa parental IE201.

7.6 Estudio de expresión del color en progenie de híbridos amarillos.

Los resultados antes mencionados (ver **Cuadros 7.4 y 7.6**) dejan abiertas diversas preguntas. Si bien las cepas con cuerpos fructíferos blancos y rosas quedaron integradas dentro de 2 grupos interestériles, todos los híbridos formados por el primer grupo interestéril generaron esporóforos de color gris, mientras que de manera inesperada los híbridos obtenidos a partir de las cepas parentales ubicadas en el grupo interestéril 2 presentaron un color amarillo, es decir, que a partir de las cepas blanca y rosa se obtuvieron cepas con esporóforos de color amarillo.

Estos resultados generaron varias interrogantes tales como: ¿los neohaplontes obtenidos realmente corresponden a las cepas parentales blanca y rosa?, ¿es probable que haya ocurrido una contaminación genética con la cepa parental amarilla ECS187?, ¿el proceso de descariotización provocó algún cambio genético?, o bien ¿el color amarillo de los esporóforos formados se debe a una forma de expresión de la información genética contenida en las cepas originales? Con el objeto de resolver estas preguntas, se establecieron varias estrategias experimentales.

Primeramente se decidió realizar un análisis de la progenie de los híbridos con esporóforos amarillos que se obtuvieron al aparear los neohaplontes de las cepas IE201 e IE202. Estas progenies meióticas se aparearían con los neohaplontes parentales compatibles IE201₁, IE201₂, IE202₁ e IE202₂ para evaluar el color de los esporóforos producidos.

Con ello, a partir de las pruebas de compatibilidad entre material genético de cepas híbridas y parentales, se descartaría la posibilidad de una contaminación con material genético de los neohaplontes o basidiosporas de la cepa amarilla ECS187. Esto resultaba necesario ya que dicha cepa fue manipulada simultáneamente a las cepas híbridas y parentales. De esta forma se buscaba adicionalmente determinar si se regeneraban los colores originales de las cepas parentales blanco o rosa.

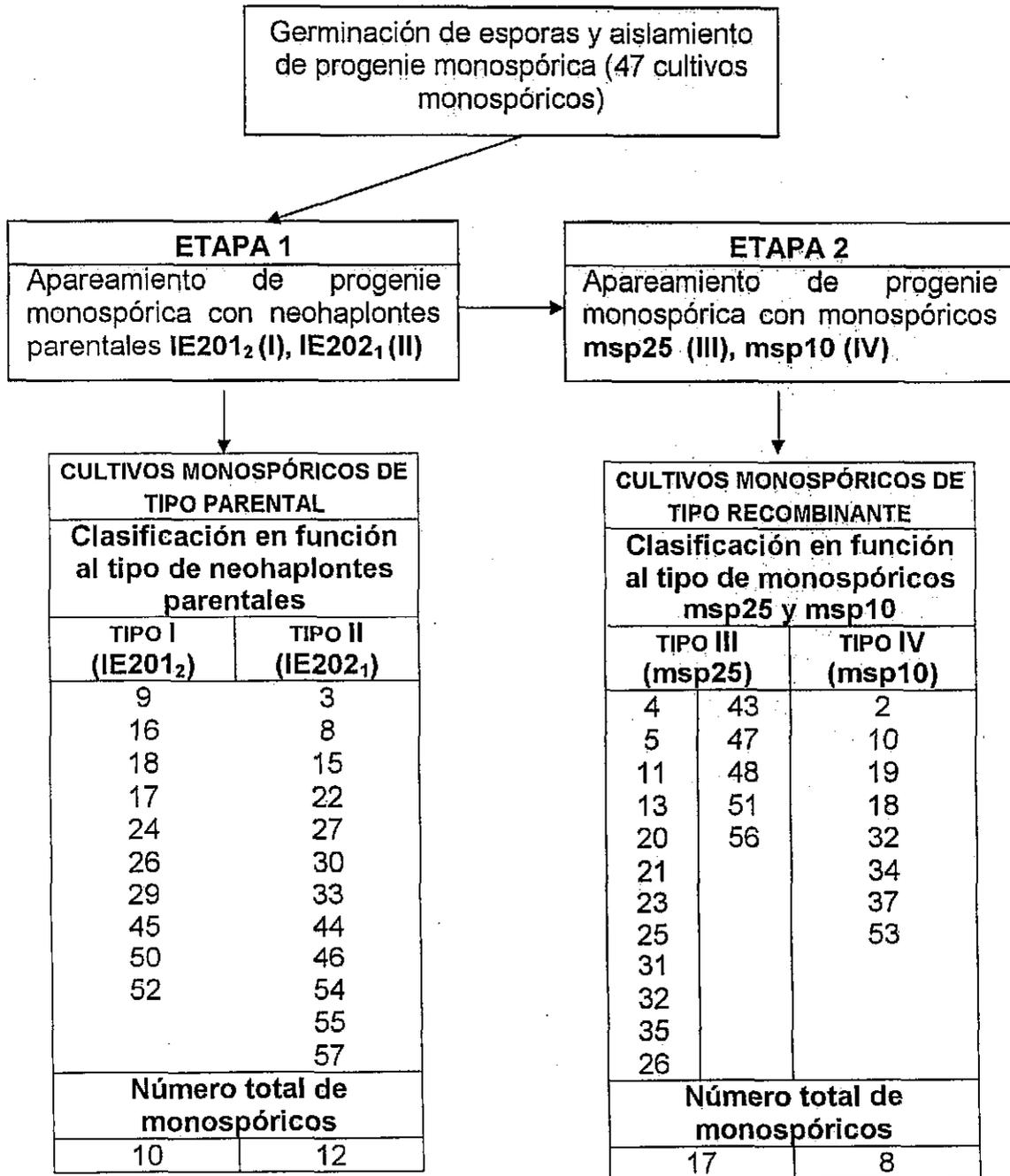
7.6.1 Recuperación de la progenie del híbrido IE201₂xIE202₁.

Para clasificar la progenie, una vez aislados los monocariotes y confirmada la ausencia de fíbulas en cada colonia se procedió, en una primera etapa, a identificar las colonias monocarióticas con los tipos de compatibilidad parental.

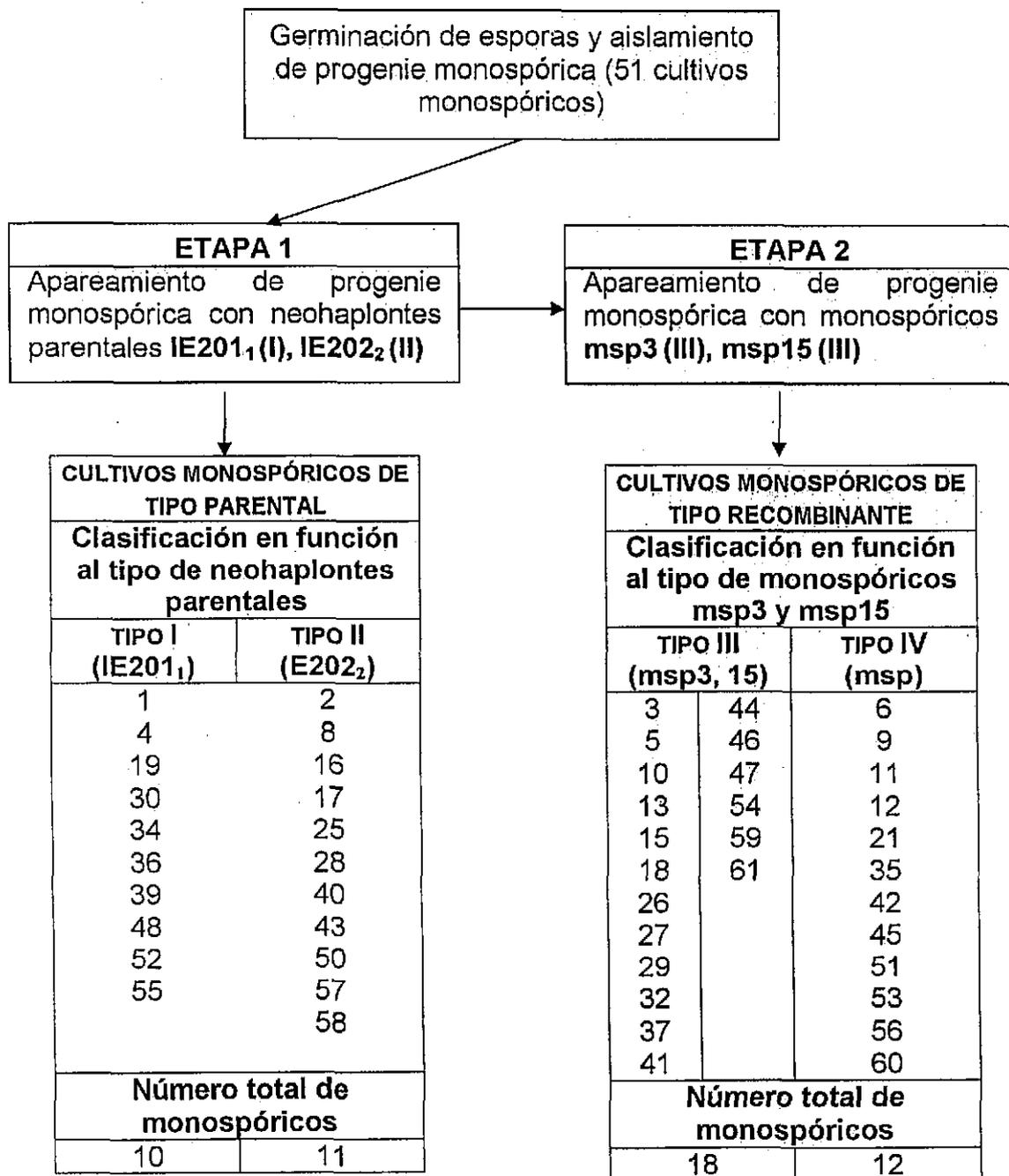
Los 47 monocariotes (msp) recuperados de esta progenie fueron apareados con los 2 tipos de neohaplontes correspondientes a las cepas parentales, IE201₂ e IE202₁, respectivamente. Al revisar las cruzas al microscopio fue posible identificar 10 monocariotes del tipo IE201₂ y 12 del tipo IE202₁ (**Cuadro 7.9**, etapa 1).

Para la identificación de los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante, en la segunda etapa, se tomaron los monocariotes msp25 y msp10. (con probables tipo de compatibilidad III o IV) y se aparearon con los 25 monocariotes que no habían dado reacción positiva con las dos cepas parentales. En este caso, con el monocariote msp10 fue posible identificar 17 monocariotes con el tipo III y con el msp25 se identificaron 8 monocariotes pertenecientes al tipo IV (**Cuadro 7.9**, etapa 2).

CUADRO 7.9. CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO IE201₂XIE202₁ EN LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD.



CUADRO 7.10. CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO IE201₁XIE202₂ EN LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD



7.6.2 Recuperación de la progenie del híbrido IE201₁xIE202₂.

De la progenie de este híbrido se aislaron 51 monocariotes y al aparearlos con los dos neohaplontes parentales, se identificaron 10 monocariotes del tipo IE201₁ y 11 del tipo IE202₂ (**Cuadro 7.10**, etapa 1). En la segunda etapa, para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (tipos III y IV) se tomaron los monocariotes msp3 y msp15 (con probable tipo III o IV) y se cruzaron con los 30 monocariotes que no habían sido clasificados. En este caso, tanto el monocariote 3 como el 15 resultaron ser del mismo tipo, ambos dieron apareamientos positivos con 18 monocariotes los que fueron catalogados como del tipo III, y los 12 monocariotes restantes (msp) se clasificaron como tipo IV (**Cuadro 7.10**, etapa 2).

7.6.3 Características fenotípicas de cepas híbridas progenie.

Una vez caracterizados los factores de compatibilidad de las progenies meióticas de los híbridos amarillos IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂, se aparearon los monospóricos con tipo de compatibilidad I ó II de ambos híbridos con los neohaplontes parentales compatibles correspondientes. Las cepas dicarióticas obtenidas se hicieron fructificar para determinar sus características fenotípicas.

En el **Cuadro 7.11** se muestran los resultados de los apareamientos compatibles entre las dos clases de monocariotes utilizados. En todos los casos se detectó la presencia de fíbulas que indican una reacción positiva es decir la formación de un dicariote. El neohaplonte IE201₂, formó cepas dicarióticas con 12 monospóricos del híbrido IE201₂xIE202₁. Con el neohaplonte parental IE202₁ se cruzaron 10 monospóricos de este híbrido.

El color de los cuerpos fructíferos de las cepas dicarióticas formadas al aparear la progenie monospórica de la cepa híbrida IE201₂xIE202₁ con los neohaplontes compatibles correspondientes aparece en el **Cuadro 7.11**. Es importante explicar que en todas las cepas dicarióticas, la fase de incubación del micelio en paja se completo en un tiempo corto de 15-20 días, periodo en el que el micelio invadió totalmente la paja, sin embargo, no todas las cepas fructificaron.

Para el caso de los apareamientos de los cultivos monospóricos de tipo parental con el neohaplonte IE202₁, únicamente 4 de las 10 cepas dicarióticas presentaron formación de cuerpos fructíferos; estos fueron amarillos (ver **Figura 7.5**) y se desarrollaron a partir de un "cluster" o protuberancia de micelio a manera de cabeza de brócoli que sobresalía de la paja invadida (ver **Figura 7.6**). Es importante indicar que esta morfología fue característica de todas las cepas híbridas amarillas que se obtuvieron en este estudio, independientemente del origen de los componentes monocarióticos utilizados.

Una situación similar se observó en los apareamientos correspondientes con el neohaplonte IE201₂, donde el 50% de las cepas dicarióticas formaron cuerpos fructíferos, que en todos los casos fueron amarillos y se formaron a partir de "clusters".

Como se puede observar en el **Cuadro 7.12**, el neohaplonte IE201₁ se apareó con 11 monospóricos de la cepa híbrida IE201₁ x IE202₂. En el caso del neohaplonte IE202₂ se apareó con 10 monospóricos progenie.

En el **Cuadro 7.12** se indican el color de los esporóforos obtenidos por los apareamientos entre la progenie monospórica de tipo parental de la cepa híbrida IE201₁ x IE202₂ con los neohaplotentes correspondientes. En este caso, el tiempo de invasión del sustrato por estas cepas fue también de 10-15 días. Sin embargo, el porcentaje de cepas híbridas capaces de fructificar fue mayor.

El 80% de las cepas dicarióticas obtenidas de los apareamientos con el neohaplonte IE201₁ fructificaron formando en todos los casos cuerpos fructíferos de color amarillo. Con el neohaplonte IE202₂ de las 8 cepas dicarióticas que fructificaron, 6 produjeron esporóforos totalmente amarillos y en dos casos presentaron tonalidades rosáceas. En todos los casos hubo presencia de "clusters".

CUADRO 7.11. COLOR DE LOS ESPORÓFOROS PRODUCIDOS AL APAREAR LA PROGENIE DE TIPO PARENTAL DEL HÍBRIDO IE201₂XIE202₁ CON LOS NEOHAPLONTES PARENTALES COMPATIBLES.

APAREAMIENTOS			COLOR DEL ESPORÓFORO
CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE TIPO PARENTAL		NEOHAPLONTE PARENTAL COMPATIBLE	
TIPO	MONOSPORICO		
TIPO I IE201 ₂	9	IE202 ₁	Amarillo
	16		Amarillo
	18		Amarillo
	17		NF
	24		NF
	26		NF
	29		NF
	45		NF
	50		NF
	52		Amarillo
TIPO II IE202 ₁	3	IE201 ₂	Amarillo
	8		NF
	15		Amarillo
	22		Amarillo
	27		Amarillo
	30		Amarillo
	33		NF
	44		Amarillo
	46		NF
	54		NF
	55		NF
	57		NF

NF indica que no fructificó. En todos los casos de formación de esporóforos hubo presencia de "clusters" al inicio de la fructificación.
 Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, H.R. 85-95%, ciclo 12 h luz-obs., ventilación continua.

CUADRO 7.12. COLOR DE LOS ESPORÓFOROS PRODUCIDOS AL APAREAR LA PROGENIE DE TIPO PARENTAL DEL HÍBRIDO IE201₁XIE202₂ CON LOS NEOHAPLONTES PARENTALES COMPATIBLES.

APAREAMIENTOS			COLOR DE ESPORÓFORO
CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE TIPO PARENTAL		NEOHAPLONTE PARENTAL COMPATIBLE	
TIPO	MONOSPÓRICO		
TIPO I IE201 ₁	1	IE202 ₂	Amarillo
	4		NF
	19		Amarillo rosa
	30		Amarillo
	34		NF
	36		Amarillo
	39		Amarillo rosa
	48		Amarillo
	52		Amarillo.
	55		Amarillo
TIPO II IE202 ₂	2	IE201 ₁	Amarillo
	8		NF
	16		Amarillo
	17		Amarillo
	25		NF
	28		Amarillo
	40		Amarillo
	43		Amarillo
	50		Amarillo
	57		Amarillo
	58		Amarillo

NF indica que no fructificó. En todos los casos de formación de esporóforos hubo presencia de "clusters" al inicio de la fructificación.
 Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, H.R. 85-95%, ciclo 12 h luz-obs., ventilación continua.

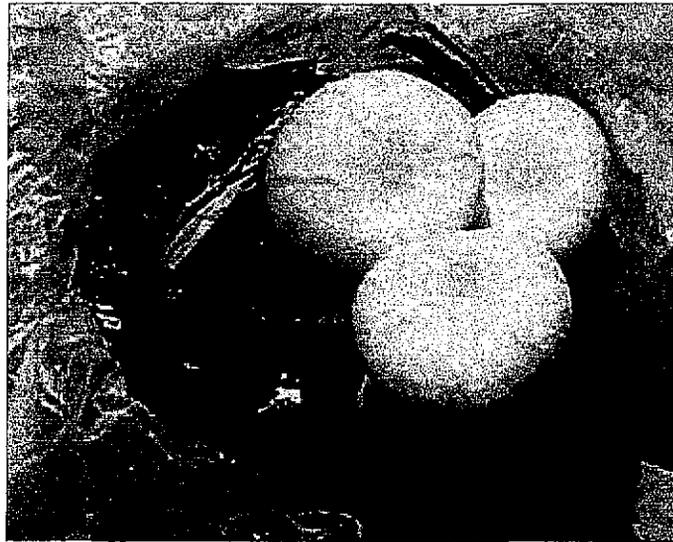


Figura 7.5 Esporóforos obtenidos del apareamiento entre neohaplontes compatibles de cepas parentales IE201 e IE202 y monospóricos de cepas híbridas IE201₁xIE202₂ e IE201₂xIE202₁

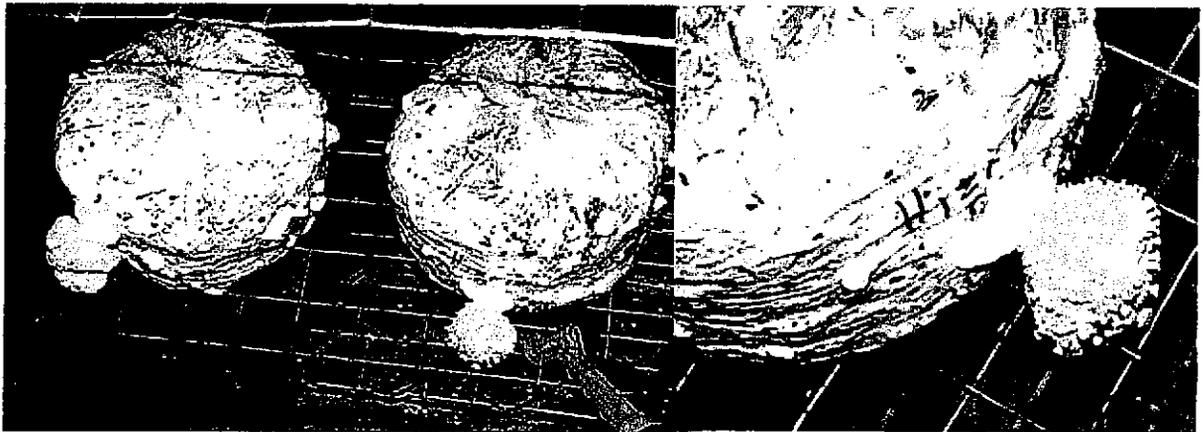


Figura 7.6 Formación de protuberancia o "clusters" en cepas híbridas IE201₁xIE202₂ e IE201₂xIE202₁

7.7 Estudio de expresión del color en progenie de cepa parental.

Otras de las estrategias que se siguieron para el estudio de la expresión del color consistieron en el análisis de progenies monospóricas de cepas parentales IE201 e IE202 y de la cepa reconstituida IE202_R (a partir de sus neohaplontes respectivos). El apareamiento de la progenie monospórica de estas tres cepas con los neohaplontes parentales compatibles respectivos, permitiría descartar la posibilidad de contaminación genética con la cepa amarilla ECS187. Así mismo, las pruebas de apareamiento entre la progenie monospórica de la cepa IE202_R y los neohaplontes compatibles de las cepas parentales llevarían a suprimir la posibilidad de que el proceso de desdicarionización provocara alguna mutación en los componentes monocarióticos recuperados y que el color amarillo de los esporóforos de la cepa IE202_R fuera producto de dicha mutación.

La determinación del color en los esporóforos de la progenie obtenida a partir de los apareamientos entre los monospóricos de tipo I y II de la cepa IE202 permitiría, por un lado, confirmar que la expresión del color amarillo en los esporóforos para este tipo de cepas de *Pleurotus* es independiente del proceso de desdicarionización, por lo que se confirmaría la ausencia de mutación debida a este fenómeno. Por otro lado, advertir la presencia de un gene o conjunto de genes, que de forma natural se encuentran en las cepas originales parentales, y se expresan bajo las condiciones trabajadas en este estudio.

7.7.1 Recuperación de la progenie de la cepa parental IE201

En este caso de los 25 monocariotes que se aislaron de esta progenie, se identificaron 5 monocariotes del tipo IE201₁ y 8 del tipo IE201₂ después de ser apareados con los dos neohaplontes parentales (**Cuadro 7.13**, etapa 1). Posteriormente, para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (tipos III y IV) se tomaron los monocariotes msp8 y msp25 (con probable tipo III o IV) y se cruzaron con los 12 monocariotes que no habían sido clasificados. En este caso con el monocariote msp25 se identificaron 8 monocariotes de tipo III y con el msp8 se identificaron 4 monocariotes de tipo IV (ver **Cuadro 7.13**, etapa 2).

7.7.2 Recuperación de la progenie de la cepa parental IE202

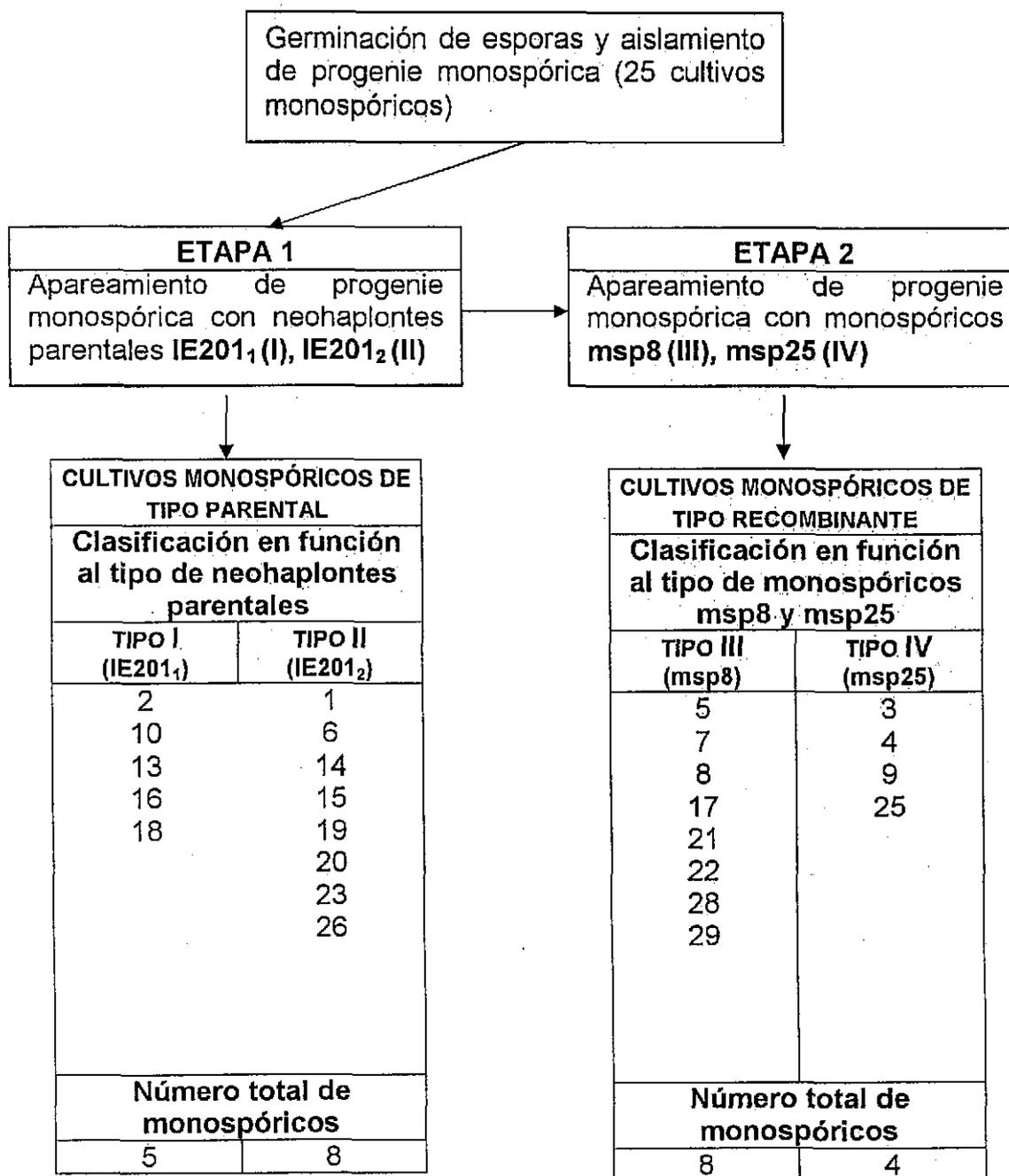
De esta progenie se aislaron 37 monocariotes que al aparearlos con los dos neohaplontes parentales se identificaron 6 monocariotes del tipo IE202₁ y 13 del tipo IE202₂ (**Cuadro 7.14**, etapa 1). Para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (tipos III y IV) se tomaron los monocariotes msp4 y msp20 (con probable tipo III o IV) y se cruzaron con los 18 monocariotes que no habían sido clasificados. En este caso con el monocariote msp20 se identificaron 9 monocariotes de tipo III y con el msp4 se identificaron 9 monocariotes de tipo IV (**Cuadro 7.14**, etapa 2).

7.7.3 Recuperación de la progenie de la cepa parental reconstituida IE202_R.

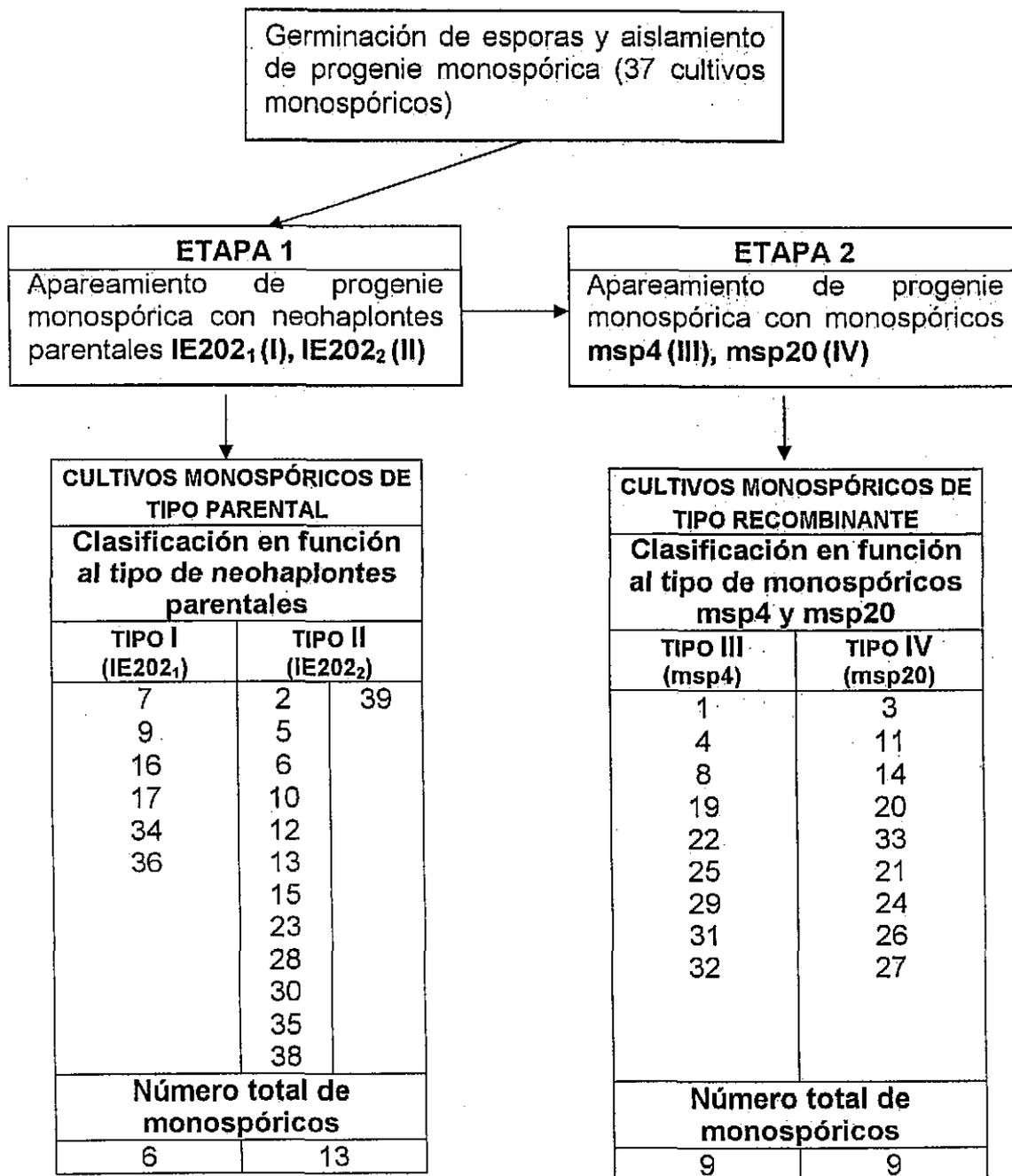
La cepa IE202_R presentó esporóforos de color amarillo (ver sección 7.4). Esta cepa se obtuvo a partir del apareamiento de los dos componentes monospóricos IE202₁ e IE202₂. Se consideró necesario realizar la recuperación de la progenie parental de esta cepa con el motivo de analizar la compatibilidad de la progenie con los neohaplontes obtenidos de la cepa original. Con esta estrategia podría corroborarse por otra vía que los componentes genéticos que permitieron la reconstitución de esta cepa efectivamente pertenecían a la cepa rosa IE202, descartando la posibilidad de una contaminación debida a los componentes genéticos de la cepa amarilla ECS187.

Se aislaron 39 monocariotes de esta progenie y al cruzarlos con los dos neohaplontes parentales se identificaron 8 monocariotes del tipo IE202₁ y 10 del tipo IE202₂ (**Cuadro 7.15**, etapa 1). En la segunda etapa para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (tipos III y IV) se tomaron los monocariotes msp10 y msp28 (con probable tipo III o IV) y se aparearon con los 21 monocariotes que no habían sido clasificados. En este caso con el monocariote msp28 se identificaron 12 monocariotes de tipo III y con el msp10 se identificaron 9 monocariotes de tipo IV (**Cuadro 7.15**, etapa 2).

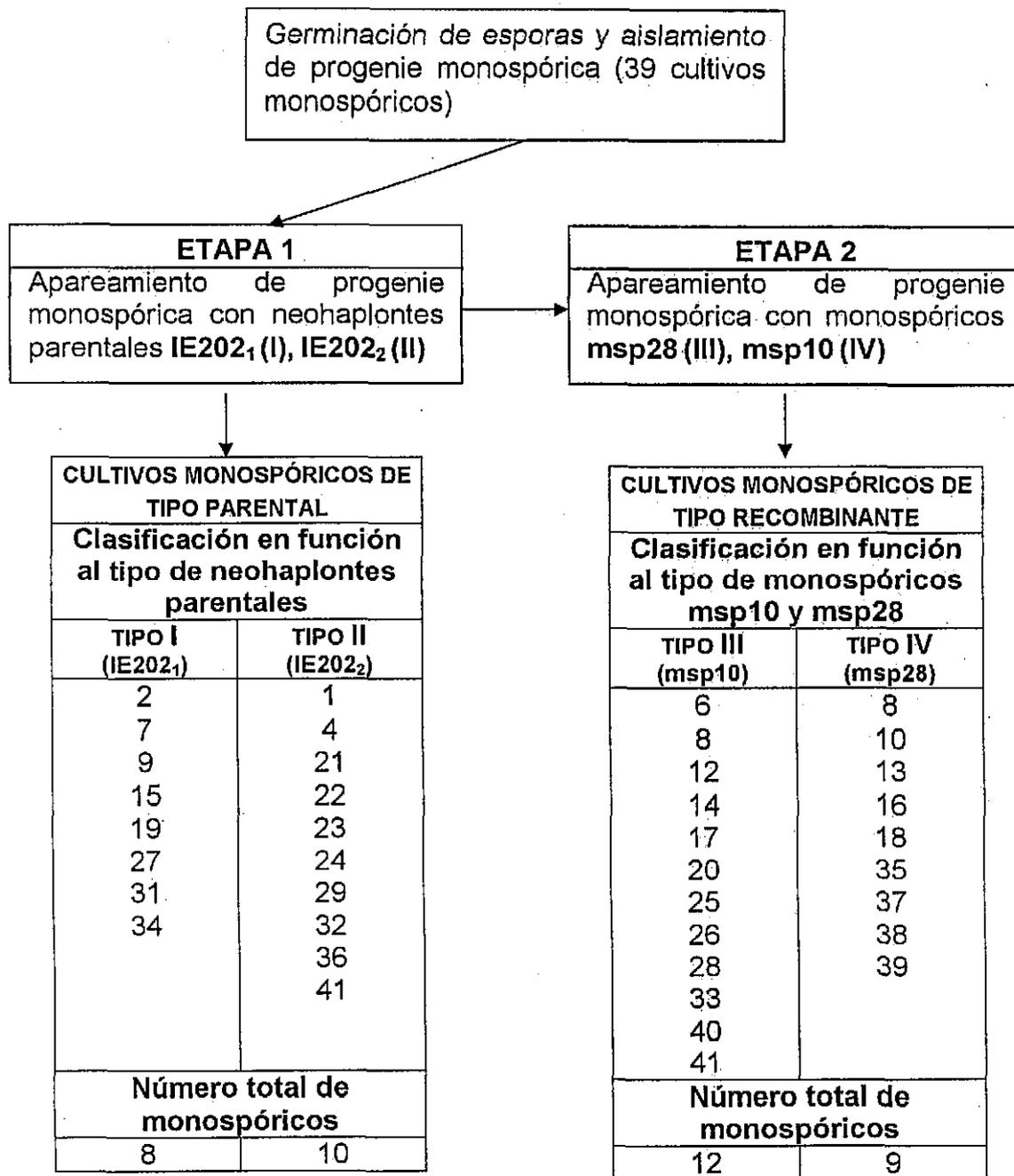
CUADRO 7.13. CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DE LA CEPA PARENTAL IE201 EN LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD



CUADRO 7.14. CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DE LA CEPA PARENTAL IE202 EN LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD



CUADRO 7.15. CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DE LA CEPA PARENTAL IE202_R RECONSTITUIDA EN LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD



7.7.4 Características fenotípicas de la cepa parental progenie IE202.

En esta etapa del trabajo se consideró necesario efectuar el apareamiento de la progenie monospórica de la cepa IE202 (rosa), y determinar las características de los cuerpos fructíferos formados por la progenie de las cepas dicarióticas. Dado que se contaba con los cepas monocarióticas de referencia para los cuatro tipos de compatibilidad (ver **Cuadro 7.14**), se decidió utilizar los tipos de compatibilidad parentales I y II para aparearlos entre sí y tratar de regenerar la cepa original con color rosa.

Los apareamientos de 8 monospóricos de tipo I con los monospóricos de tipo II de la cepa parental IE202 se presentan en el **Cuadro 7.16**, se observó que se formaron 28 cepas dicarióticas, de las cuales únicamente 4 no produjeron esporóforos. En la mayoría de las cepas dicarióticas el color de los cuerpos fructíferos fue amarillo, con presencia de "clusters" (**Figura 7.6**). Sin embargo, el apareamiento entre los monospóricos 7 y 23 presentó una coloración amarillo naranja, la cual fue más notoria cuando los esporóforos estaban pequeños. Sorprendentemente el apareamiento de los monocariotes 36 y 13 generó esporóforos blancos con presencia de "clusters", y píleo en forma de campana.

En esta parte del estudio, al evaluar la expresión del color en la progenie meiótica de la cepa IE202 se observó nuevamente que la coloración de los esporóforos fue amarilla. Estos resultados apoyan los obtenidos con los apareamientos entre los neohaplontes de la cepa IE202 (rosa) que también producían esporóforos amarillos. Por tanto, la posibilidad de una variación genética debida al proceso de desdicarionización química resulta muy remota.

CUADRO 7.16. COLOR DE LOS ESPORÓFOROS DE LOS APAREAMIENTOS DE LA PROGENIE DE LA CEPA PARENTAL ROSA IE202.

PROGENIE MONOCARIÓTICA DE TIPO PARENTAL		COLOR DEL ESPORÓFORO PRODUCIDO AL APAREAR MONOSPÓRICOS TIPO I Y II
TIPO I	TIPO II	
7	2	Amarillo
	10	Amarillo
	13	Amarillo
	18	Amarillo claro
	23	Amarillo naranja
	28	Amarillo
16	2	Amarillo
	13	Amarillo
	23	Amarillo
	28	Amarillo
	30	Amarillo
17	2	Amarillo
	13	Amarillo
	22	Amarillo
18	20	Amarillo
26	2	NF
	32	Amarillo
27	10	Amarillo
34	2	Amarillo
	10	NF.
	13	Amarillo
	23	Amarillo
	28	Amarillo
36	2	NF
	10	NF
	13	Blanco (campana)
	28	Amarillo
	32	Amarillo

NF indica que no fructificó. En todos los casos de esporóforos amarillos hubo presencia de "clusters" al inicio de la fructificación.

Parámetros de fructificación: T = 15-30 °C, H.R. 85-95%, ciclo 12 h luz-obs., ventilación continua.



Figura 7.7 Esporóforos obtenidos de apareamiento entre monospóricos aislados de cepa rosa IE202.

7.8 Distribución de los factores de incompatibilidad

Una vez clasificada la progenie monocariótica de cada cepa en los cuatro tipos de compatibilidad se utilizó la prueba de χ^2 para determinar si la distribución de los factores de incompatibilidad era aleatoria. Los valores de χ^2 obtenidos para la progenie de las 5 cepas (**Cuadro 7.17**) fueron aún menor a 11.34 (valor de significancia menor a 0.01) con lo cual se confirma con una probabilidad del 95% que la distribución en los 4 tipos de compatibilidad es de 1:1:1:1. Estos resultados también permiten confirmar que el sistema de compatibilidad de las cepas híbridas y parentales es de tipo tetrapolar heterotálico (**Cuadro 7.17**). Sin embargo, las cepas parentales del grupo interestéril presentaron color de esporóforos blanco y rosa, mientras que los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas y reconstituidas fueron de color amarillo (ver **Cuadros 7.4 y 7.6**).

CUADRO 7.17. APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE χ^2 PARA DETERMINAR LA DISTRIBUCIÓN DE LA PROGENIE MONOCARIÓTICA DE CADA HÍBRIDO EN LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD

CEPAS DICARIÓTICAS	NÚMERO DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS OBTENIDOS PARA CADA FACTOR DE INCOMPATIBILIDAD					VALORES DE χ^2 PARA UNA DISTRIBUCIÓN 1:1:1:1 DE LOS 4 TIPOS DE COMPATIBILIDAD *
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Total	
IE201 ₂ X IE202 ₁	10	12	17	8	47	3.80
IE201 ₁ X IE202 ₂	10	11	18	12	51	3.03
IE 201	5	8	8	4	25	2.04
IE 202	6	13	9	9	37	2.67
IE 202 _R	8	10	12	9	39	0.89

* χ^2 de tablas (P = 0.01)=11.34. Valores de χ^2 menores al valor de tablas indican que no hay diferencias estadísticas significativas.

En este caso, la utilización de los neohaplontes parentales de la cepas IE201 (blanca) e IE202 (rosa) como marcadores genéticos para recuperar las progenies monocarióticas con tipos de compatibilidad I y II, es una comprobación inequívoca de la ausencia de contaminación genética, debido a la compatibilidad entre estos marcadores y la progenie monospórica de los tres tipos de cepas : parentales, híbridas y reconstituidas. Así mismo, la determinación de los factores de incompatibilidad para la cepa amarilla reconstituida (IE202_R), partiendo de los neohaplontes de la cepa parental IE202 también corrobora que se trata de material genético correspondiente a dicha cepa.

Los neohaplontes obtenidos a partir del método de desdicarización siempre se aparearon en todas las pruebas de compatibilidad realizadas, por lo que se confirma la estabilidad en la capacidad de apareamiento de los neohaplontes obtenidos por este método químico, lo cual coincide con los resultados obtenidos en otros estudios (Arias-García, 1998; Arteaga-Santillán *et al.*, 1996; Leal-Lara y Eger-Hummel, 1982).

8 DISCUSIÓN

8.1 Selección y caracterización de cepas.

En el presente trabajo se propuso aportar elementos para evaluar la expresión del color en cepas del género *Pleurotus* mediante el apareamiento entre neohaplontes compatibles y progenies monospóricas de cepas parentales con colores contrastantes y estables. Para ello debió realizarse la caracterización y selección de cepas dicarióticas silvestres de *Pleurotus* spp. determinando el color de esporóforos y esporadas en condiciones controladas de laboratorio.

Una seria limitación en la mayoría de los estudios realizados en México con cepas del género *Pleurotus*, en que se informa el color de los esporóforos es la falta de un patrón de referencia confiable. Esto adquiere mayor importancia cuando se pretende realizar estudios sobre expresión del color, en particular debido a la gran plasticidad fenotípica del género *Pleurotus* (Vilgalys y Sun, 1994; Petersen, 1995; Petersen y Hughes, 1999).

Con la finalidad de que el color de los esporóforos permaneciera estable, se controlaron las condiciones ambientales durante la realización de todos los experimentos efectuados en la presente investigación. Al utilizar el atlas de colores (Maerz y Paul, 1950) se contó asimismo con un parámetro confiable para evaluar el color de los cuerpos fructíferos y esporada, comprobando la estabilidad de este parámetro durante el experimento. El uso de las claves del atlas de colores (**Cuadro 7.1**) resultó ser un método confiable y objetivo para registrar la coloración de esporóforos y esporadas. De esta forma fue posible confirmar en ciertos casos las coloraciones reportadas por los donantes, y detectar las cepas que mostraron coloraciones distintas a las indicadas. La utilización de dichas claves permitió primeramente caracterizar, y posteriormente seleccionar las cepas que exhibieron colores estables y contrastantes, y por lo tanto adecuadas para estudios genéticos del color.

8.2 Obtención de neohaplontes parentales por desdicariorización química.

Se confirmó el efecto desdicariorizador de la peptona P (Oxoid) de acuerdo a la metodología propuesta por Leal-Lara (1980), que demostró ser muy efectiva con las diez cepas de *Pleurotus* sometidas a este proceso químico, ya que fue posible recuperar simétricamente los 2 componentes monocarióticos de todas ellas, aún a partir de un pequeño número de aislamientos (**Cuadro 7.2**). El tiempo de recuperación de los neohaplontes fue de 24-48 horas, que comparado con el mínimo de 6 días que informa Leal-Lara (1980), es un buen indicativo de la optimización del proceso. Arias-García (1998) reportó problemas para recuperar los dos componentes de la cepa P15, para la cepa IB67 no logró obtener ninguno de los neohaplontes mientras que con la cepa IN18 se habían hecho varios intentos para desdicariorizarla sin conseguirlo. En el presente trabajo fue posible obtener los dos tipos de neohaplontes de todas las cepas, debiéndose también mencionar que la recuperación de los componentes monocarióticos de todas las cepas tratadas fue simétrica (relación 1:1).

Por lo general, los micelios monocarióticos obtenidos presentaron dos formas de crecimiento, en uno de los neohaplontes el crecimiento fue rápido y en el otro lento. Sin embargo, no se observaron defectos en el crecimiento micelial de los neohaplontes, ni pérdida en la capacidad de apareamiento, lo que coincide con trabajos reportados por otros investigadores (Arias-García, 1998; Leal-Lara, 1980; Valencia-Del Toro y Leal-Lara, 1999). En todos los casos reportados, fue posible cruzar los neohaplontes obtenidos, ya sea entre aquellos provenientes de la misma cepa o bien entre neohaplontes de cepas diferentes, así como, entre monocariotes meióticos y neohaplontes.

Petersen (1995), menciona que en los estudios de compatibilidad con especies del género *Pleurotus*, los neohaplontes recuperados a partir de sales biliares no reaccionan igual que los cultivos monospóricos, sin embargo, en las pruebas de apareamiento realizadas en esta etapa del trabajo no se observó diferencia entre aislados monospóricos y neohaplontes. Tal vez la diferencia obtenida con los resultados de Petersen (op. cit.) se deba a la toxicidad de la solución desdicariorizadora utilizada.

El mecanismo de desdicariorización por agentes químicos en hongos superiores aún se desconoce. Sin embargo, Miles y Raper (1956) y Tokimoto et al. (1978) han propuesto la siguiente hipótesis: la destrucción del dicarion por agentes químicos resulta en un defecto en la fusión entre las fíbulas y la penúltima célula durante el proceso, lo que ocasiona que la fíbula y la penúltima célula contengan un solo núcleo y se forme el micelio desdicariorizado. Arita (1979) reportó que la alta frecuencia de selección nuclear observada durante la desdicariorización por microcirugía de hifas dicarioróticas, se presentó también al tratar químicamente el micelio dicariorótico. Sería importante identificar si este fenómeno se presenta como una alteración del proceso de reproducción del material nuclear del protoplasma o de la pared celular dicariorótica, o bien, como resultado de la influencia de sustancias tóxicas, a las cuales los componentes monocarioróticos de una cepa presentan diferente susceptibilidad.

De estas dos alternativas la posibilidad de que la desdicariorización con peptona se deba a la presencia de alguna sustancia tóxica es la más factible. Esta podría ser producida durante el tratamiento térmico dado a la solución desdicariorizadora peptona-glucosa (Leal-Lara, 1980; Arias-García, 1998; Valencia-Del Toro y Leal-Lara, 1999).

La utilización de los componentes monocarioróticos obtenidos por desdicariorización es una alternativa importante en experimentos de hibridación de cepas parentales e identificación de factores de apareamiento (Kay y Vilgalys, 1992; Leal-Lara, 1980; Arias-García, 1998; Valencia-Del Toro y Leal-Lara, 1999). Así fue posible obtener en menor tiempo, los componentes monocarioróticos de las 10 cepas estudiadas por lo que se puede considerar que la desdicariorización química es una herramienta valiosa en los estudios genéticos de los hongos del género *Pleurotus*, y potencialmente de otros macromicetos.

8.3 Hibridación de neohaplontes de cepas de colores parentales.

Los apareamientos entre los neohaplontes de las distintas cepas permitieron identificar 5 grupos de intersterilidad (**Cuadro 7.3**), con la presencia de un total de 10 factores **A** y 10 Factores **B** (Kay y Vilgalys, 1992).

De acuerdo a los estudios de compatibilidad entre neohaplontés, el grupo interestéril 1 está conformado por la cepa blanca IE200, las cepas rosas PORO, RP y la cepa gris IB67. La información proporcionada por los donantes indicó que la cepa IE200 pertenece a la especie *P. djamor*, var. *djamor*, y la cepa PORO a la especie *P. ostreatoroseus*. Previamente otros autores han reportado que estas 2 especies son interhibridizables y forman esporóforos blancos y rosas (Corner, 1981; Neda, et al., 1988; Petersen, 1995; Petersen, y Hughes, 1999). Para las otras dos cepas no se proporcionó clasificación taxonómica, sin embargo, la cepa IB67 presentó coloración de esporóforos gris, color similar al obtenido en las fructificaciones de las cepas híbridas de este grupo interestéril.

El segundo grupo interestéril esta formado por las cepa blanca IE201 y la cepa rosa IE202, que de acuerdo a los donantes pertenecen a *P. djamor*, var. *djamor* y *P. djamor*, var. *salmonostramineus*, respectivamente.

La separación de las 6 cepas productoras de esporóforos blancos y rosas en 2 grupos interestériles distintos resultó sorprendente. No obstante, puede explicarse de acuerdo a las siguientes alternativas:

- Los tipos de compatibilidad de las cepas IE201, IE202, corresponden a tipos complementarios de grupo 1, y por lo tanto sus factores serían $A_m B_n$ y $A_n B_m$
- Que las cepas pertenezcan a diferentes especies biológicas y por ello no presenten compatibilidad con las cepas del grupo 1.
- Existe alguna clase de incompatibilidad vegetativa (Larraya et al., 1999) entre los neohaplontes derivados de las cepas IE201, IE202, que no se pone de manifiesto cuando al aparear los componentes monocarióticos de cada cepa por separado. Sería por lo tanto conveniente realizar pruebas de compatibilidad entre las progenies meióticas de estas dos cepas, y así definir si pertenecen al mismo grupo interestéril.

El grupo interestéril 3 lo forman las cepas IN18 y ECS127_G ambas presentan color de esporóforos marrón pardusco. Los neohaplontes de estas dos cepas fueron compatibles con cepas monospóricas de referencia (tester) de la especie *P. pulmonarius* (datos no

presentados), por lo que ambas corresponden a la especie *P. pulmonarius*. Esto contradice la información proporcionada por los donantes (Instituto de Ecología) que indican que la cepa INI8, pertenece a *P. ostreatus*.

La cepa ECS187 forma el cuarto grupo interestéril, la clasificación taxonómica dada por los donantes para esta cepa es *P. citrinopileatus*, y no fue compatible con las demás cepas, por lo que se da por hecho la confirmación de su ubicación taxonómica.

La cepa P15, aparece en el quinto grupo interestéril, y será necesario hacer pruebas con cepas referenciales europeas y americanas para determinar su clasificación taxonómica. Con las pruebas de apareamiento realizadas en este estudio se concluye que no forma parte de las especies trabajadas ya que presenta incompatibilidad con todas las cepas.

El empleo de las pruebas de apareamiento para identificar la formación de 5 grupos interestériles en esta investigación, tiene como base la definición del concepto biológico de especie, el cual ha sido utilizado ampliamente para ubicar las cepas de *Pleurotus* spp. (Vilgalys, et al. 1994; Kay y Vilgalys, 1992; Petersen, 1995; Petersen y Ridley, 1996; Petersen, y Hughes, 1999). Las investigaciones realizadas con técnicas bioquímicas como el uso de isoenzimas (Vilgalys, 1991); y con técnicas moleculares, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de DNA (Vilgalys, 1991; Vilgalys y Sun, 1994), longitud de fragmentos polimórficos de restricción del DNA (RFLP) (Castel, et al., 1987, Vilgalys, 1991), etc. han corroborado los resultados obtenidos con las pruebas de apareamiento, y en la mayoría de las veces las especies corresponden a los mismos taxos.

La discrepancia entre pruebas de compatibilidad y coloración de los esporóforos (carácter taxonómico) presentada en las cepas de los grupos interestériles 1 y 2, sugiere que los procesos de evolución morfológica pueden no estar acoplados o relacionados necesariamente al desarrollo de las barreras de interesterilidad durante la especiación.

Numerosos estudios han notado una estrecha correspondencia entre intercompatibilidad y similitud genética. Sin embargo, la evolución de barreras de

interesterilidad puede ser vista como un mecanismo el cual refuerza muy pequeñas barreras entre grupos en proceso de especiación, pero no necesariamente son el factor primario que causa especiación. La especiación es un proceso gradual y continuo que involucra varios aspectos, que no están necesariamente, ligados o dependientes del desarrollo previo de las barreras de interesterilidad (Coyne, 1985). Este punto de vista neo-Darwiniano de la especiación contrasta con muchos estudios previos de especiación en basidiomicetos, a partir de los cuales se asume que el aislamiento reproductivo es requerido antes de que ocurra la divergencia morfológica y ecológica (Vilgalys, 1991; Schilthuizen, 2000).

La rigurosa interesterilidad frecuentemente observada entre grupos completos de miembros altamente intercompatibles ha permitido a los micólogos aceptar el concepto biológico de especie (CBE) como un criterio taxonómico primario para el reconocimiento de especies de hongos. Muchos micólogos frecuentemente utilizan el CBE para establecer conceptos taxonómicos en hongos. Dada la poca familiaridad con la distinción de especie (concepto) y especiación (proceso) algunas veces se crea confusión tanto para estudios de taxonomía y de evolución. Como alternativa, conceptos de especies que no necesariamente tomen en cuenta un solo aspecto, como interesterilidad o morfología, son deseables para la consistencia taxonómica. Uno de tales conceptos es el concepto filogenético de especie, el cual define especie como el grupo más pequeño o linaje reconocible. Un concepto de especie basado estrictamente en la compatibilidad de apareamientos puede también ser simplista a causa de que ignora la posibilidad de la evolución independiente de poblaciones aisladas genéticamente (Vilgalys, 1991; Petersen, 1995; Petersen y Ridley, 1996; Petersen, y Hughes, 1999).

8.4 Características fenotípicas de cepas híbridas.

Las cepas parentales IE201 blanca e IE202 rosa, se desdicarizotizaron y a partir de sus componentes monocarióticos, se realizó el apareamiento, obteniéndose los híbridos IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂ los cuales presentaron un color amarillo y una morfología del desarrollo de primordios distinta a las demás cepas híbridas y parentales. Ante la

presencia de dos cepas híbridas que presentaron un color amarillo inesperado, se decidió implementar varias estrategias para explicar este fenómeno.

1. Debido a la gran plasticidad fenotípica que se presenta en las especies del género *Pleurotus*, se consideró necesario repetir bajo condiciones ambientales diferentes a las utilizadas, la fructificación de los híbridos, por lo que se realizó un cultivo en el laboratorio, con temperatura controlada de 28-30 °C, humedad relativa de 90% y ventilación continua. Bajo estas condiciones, las cepas híbridas presentaron estabilidad en la producción de cuerpos fructíferos amarillos, que se formaron a partir de primordios agrupados en "clusters".
2. Para descartar la posibilidad de una contaminación genética, se decidió obtener las progenies meióticas de las dos cepas parentales IE201 e IE202, para aparearlas posteriormente con los neohaplontes de estas cepas. Se encontró que los tipos parentales de la progenie meiótica fueron compatibles con los neohaplontes, por lo que se excluyó la presencia de contaminación genética con neohaplontes o basidiosporas de la cepa amarilla *P. citrinopileatus*.
3. Con la finalidad de analizar si el fenómeno de desdicariorización había afectado las características genéticas de los componentes monocarióticos obtenidos, a través de una mutación, que de alguna forma alteró la información genética original del dicarionte, se reconstituyeron las cepas parentales IE201 e IE202 a partir de sus neohaplontes, y se fructificaron, determinando la coloración y morfología de los esporóforos. Se obtuvieron esporóforos amarillos con presencia de "clusters". Puesto que no se obtuvieron esporóforos con el color es típicos de las cepas parentales, se pensó en la presencia de una mutación.
4. Si el proceso de desdicariorización provocaba alguna alteración en el material genético, entonces, la intrahibridización de la progenie meiótica de las cepas parentales, deberían producir dicariorios con esporóforos blancos y rosas. Sin embargo los apareamientos de la progenie de la cepa IE202 (rosa) produjeron en todos los casos esporóforos amarillos con formación de "clusters". Con esta evidencia contundente, se descartó definitivamente que el proceso de

desdicarización provocara alguna mutación en los componentes monocarióticos.

5. En la progenie F1 de las dos cepas híbridas amarillas, se esperaría que segregaran los colores amarillo, rosa y blanco. Se realizaron los apareamientos entre la progenie meiótica de los híbridos IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂ con sus neohaplontes parentales correspondientes. En todos los casos los esporóforos presentaron color amarillo y formación de "clusters" en el desarrollo del primordio, resultados similares a las intrahibridaciones de la progenie meiótica de las cepas híbridas y de las parentales.

En el análisis de los resultados experimentales, es importante distinguir los procesos que se realizaron.

En la producción de esporóforos amarillos por los híbridos IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂ debe de considerarse que cada uno de los neohaplontes parentales contiene la información genética necesaria para expresar el fenotipo de estas cepas. La producción de esporóforos amarillos por estos híbridos debe estar codificada por un gene o grupo de genes, los cuales se expresan en la nueva cepa dicariótica formada.

Eger-Hummel (1980), indicó que en los hongos de la especie *P. ostreatus*, se presentan normalmente pigmentos con colores que van de amarillo a naranja, los cuales ocurren en cantidades muy pequeñas. A través de mutaciones químicas obtuvo tres cepas que presentaron deficiencias en las etapas normales de desarrollo del cuerpo fructífero. Detectó que en estas mutantes se presentaron coloraciones que van de amarillo a naranja, por lo que concluyó primeramente que los esporóforos de colores gris a café pueden ser capaces de producir pigmentos de color amarillo a naranja, y en segundo lugar, que las dos fases fototrópicas I y II de formación de esporóforos, no necesariamente dependen de los mismos factores, puesto que algunas mutantes son afectadas en la fase fototrópica I pero no en la fase fototrópica II. Esto hace suponer que la información genética para este tipo de pigmentación en las especies del género esta presente de forma natural, y que a través de una mutación es posible lograr la expresión fenotípica de la misma.

Takekuma et al. (1994) hacen la purificación de la cromoproteína del pigmento rosa (ver introducción) encontrando también la presencia de una glicoproteína amarillo pálido con β -estructura. Para la cepa *P. salmoneostramineus*, se logra identificar el pigmento que produce el color amarillo, el cual sólo es visible a través de la extracción química. Estos estudios confirman que deben existir genes que codifiquen la coloración amarilla, al mismo tiempo que los que codifican para gris o rosa.

Conocer la forma en la que los organismos regulan la expresión de sus genes es importante para poder explicar los resultados obtenidos en la presente investigación. Como respuesta de adaptación o supervivencia de los organismos al medio ambiente, los mecanismos genéticos de activación o desactivación de genes tienen un papel importante. Para el caso específico de los basidiomicetos, la morfogénesis en los hongos esta inducida y controlada por factores medioambientales (Eger-Hummel, 1980; Kues y Liu, 2000; Kues, 2000).

Es posible que la presencia de coloración amarilla en los esporóforos de las cepas híbridas y reconstituidas, se debe a la intervención de elementos extracromosomales que influyan en la expresión del color rosa o blanco original de la cepa parental. Si el proceso de desdicarización implica la separación de los dos componentes monocarióticos del micelio dicariótico, podría darse el caso de que se pierda comunicación del núcleo con un elemento o conjunto de elementos citoplásmicos, lo que quizás impida la expresión normal del gene que codifica el color rosa o blanco.

El mecanismo de expresión de los factores de compatibilidad en basidiomicetos, apoya la presencia de factores extracromosomales. Durante la expresión de los factores de compatibilidad **A** y **B**, en los hongos *Schizophillum commune*, *Coprinus cinereus* y *Ustilago maydis*, para el factor **A**, se ha detectado que la subunidad proteica HD2 (ver introducción), se encuentra en el citoplasma, y requiere del acoplamiento con la subunidad proteica HD1, que se encuentra en el núcleo, para formar un factor activo de transcripción, que debe ser transportado dentro del núcleo para poder unirse con el DNA (Casselton y Olesnick, 1998, Kues y Liu, 2000; Kues, 2000).

Es importante mencionar que los factores **A** y **B**, están involucrados en la iniciación de la fructificación de los esporóforos (Kues, 2000). Es por ello factible que la formación de protuberancias o "clusters", que aparecen en los esporóforos amarillos al inicio de la fructificación, esté también relacionado con algún factor extracromosomal, dado que en las cepas parentales no se presenta este fenómeno.

El desarrollo de los hongos es dirigido por factores genéticos y epigenéticos en continua interacción con el medio ambiente. Se asume que cada estado sucesivo de morfogénesis depende de conjuntos específicos de señales llevadas a un tiempo apropiado y colocadas durante los procesos de crecimiento. El dinamismo morfogénico procede en una dimensión de tiempo a través de una cascada de asociaciones de señal efecto (Umar y Van Griensven, 1999).

El micelio en "clusters" característicamente produce tejido masivo, indiferenciado y pseudoesclerótico en lugar de cordeles de micelio. De esta masa basal numerosos cuerpos fructíferos se desarrollan en todas direcciones (Umar y Van Griensven, 1999). La formación de "clusters" en *A. bisporus* es un fenómeno nuevo en el cultivo de estos hongos y no se han identificado agentes causales para este fenómeno por lo cual generalmente se asume que la inestabilidad genética forma esta etiopatogénesis. De acuerdo con Umar y Van Griensven (1999), las características del crecimiento de los "clusters" indican:

1. Múltiples señales morfogenéticas que inducen la formación de primordios aparecen en diferentes lugares en direcciones polarizadas anormales dentro del tejido de hongo indiferenciado
2. Señales de iniciación similares pueden aparecer en el estípite del primordio, el cual entra rápidamente en un estado avanzado de crecimiento.

Si se afecta de alguna forma la interacción entre la componentes nucleares y factores citoplásmicos, es probable que se pierda la relación señal-efecto durante el desarrollo morfogenético del cuerpo fructífero, provocándose así la presencia de "clusters", y a pesar

de que se tengan las condiciones ambientales adecuadas, no se presenta un desarrollo normal de los esporóforos.

Los hongos al igual que los demás organismos, establecen estrategias de sobrevivencia que les permiten adaptarse al medio en el que se desarrollan, las preguntas son; ¿Por que si el hongo tiene la posibilidad de expresar el color amarillo no lo hace? si el color rosa o blanco es dominante en la naturaleza ¿bajo qué condiciones se expresa?

Dentro de las posibles respuestas es necesario considerar que una de las estrategias de los hongos es la desactivación de la expresión de genes a partir del fenómeno de silenciamiento, proceso que ha sido estudiado ampliamente en plantas y en los hongos de los géneros *Neurospora* y *Ascobolus*. Diferentes organismos pueden reaccionar a la introducción de ácidos nucleicos extraños por la inducción de mecanismos de silenciamiento de genes, que están basados sobre el reconocimiento de secuencias homólogas de ácidos nucleicos (Cogoni, 2001; Ben-Ari, 1999; Fagard et al., 2000; Selker, 1997). El silenciamiento de genes es alcanzado vía diversas estrategias. Las secuencias homólogas pueden ser inactivadas a un nivel transcripcional, o a nivel post-transcripcional involucrando degradación de secuencias específicas de RNA mensajero (RNAm). Existe un gran número de evidencias indicando que el silenciamiento de genes es una respuesta de defensa a la intromisión de ácidos nucleicos parásitos, tales como DNA y RNA virales; sin embargo, el silenciamiento de genes puede actuar como un mecanismo de vigilancia sobre duplicaciones de secuencias de DNA endógeno, teniendo un papel de mantenimiento del genoma. (Cogoni, 2001; Ben-Ari, 1999)

En ambas estrategias de silenciamiento, se ha propuesto la presencia de una molécula trans-activa difusible citoplásmicamente y/o dentro del núcleo que puede mediar el silenciamiento de genes a distancia, interviniendo en la degradación del RNAm (Cogoni, 2001).

Es factible que la expresión del color amarillo en los esporóforos rosas y blancos de las cepas parentales este suprimida por un mecanismo de silenciamiento de genes, y que al efectuarse la separación de los componentes monocarióticos por el proceso de desdicarionización, se eliminen factores citoplásmicos asociados al silenciamiento del gen

o genes que expresan el color amarillo, esta situación hace posible que se presente el color amarillo en los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas.

En la naturaleza, tanto la cepa rosa como la blanca, no desarrollan el color amarillo en sus esporóforos, y estos no presentan formación de "clusters". La función principal del cuerpo fructífero desde el punto de vista biológico, es la dispersión de las basidiosporas como medio de conservación de la especie (Chang y Miles, 1989; Schilthuizen, 2000). Al igual que en las flores de las plantas, la coloración es importante para la atracción de otros organismos que dispersaran de alguna forma las basidiosporas, así mismo, el color de los cuerpos fructíferos está en función de las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrollan las especies.

Se ha observado que las plantas que habitan en diferentes altitudes requieren desiguales condiciones de temperatura y luz para iniciar la floración, y que existe un acoplamiento entre señales del ambiente y endógenas que disparan el inicio de este fenómeno (Smach y Coupland, 2000)

Es probable que la coloración de las cepas parentales haya aparecido en la especie a través de un proceso evolutivo, que estuvo influenciado por las condiciones climáticas. De esta forma, el gene o genes que codifican estos colores tienen un carácter dominante sobre las otras posibilidades de coloración.

La existencia de la especie *P. citrinopileatus* cuyos cuerpos fructíferos son de color amarillo, apoya esta idea, ya que de alguna forma a lo largo de proceso evolutivo se generó esta especie, y en la actualidad se presenta en forma silvestre en las regiones del continente Europeo. Hasta el momento, no se ha reportado en el continente Americano la presencia de forma silvestre de la *P. citrinopileatus*, aunque comienza a producirse a nivel comercial. Es válido el cuestionamiento sobre si la exhibición del color amarillo de las cepas híbridas represente una posibilidad de cambio fenotípico de las cepas parentales, que permita la separación de subespecies o razas, que se diferencien con el tiempo y las condiciones medioambientales, y/o de si la plasticidad fenotípica característica de las especies de este género está influenciada únicamente por las condiciones del medio

ambiente, y no por la presencia de unidades discretas genéticas (Petersen y Hughes, 1999).

A nivel laboratorio, se observó que las cepas híbridas amarillas presentaron un mayor tiempo de fructificación comparado con las cepas parentales, debido tal vez a la formación de los "clusters". Estas observaciones preliminares quizás nos estén indicando que la aparición de esporóforos amarillos no es una estrategia tan viable del hongo, como la que siguen las cepas blanca y rosa en la naturaleza.

La producción de esporóforos amarillos a partir de los apareamientos de la progenie meiótica (msp) de las cepas híbridas $IE201_2 \times IE202_1$ e $IE201_1 \times IE202_2$, con los neohaplontes compatibles, ocurre después de meiosis. El color amarillo de los esporóforos persiste entonces aún inclusive después de la segregación meiótica.

Si consideramos que la segregación de los genes responsables del color siguen un comportamiento Mendeliano, un genotipo heterocigoto de un par de alelos (**Aa**) heredará, por segregación meiótica, estos dos alelos al micelio, de tal forma que se tendrán los genotipos distintos, **A** o **a** en la progenie.

En la unión de estos micelios durante el apareamiento, se producen tres clases de segregantes de estos heterocigotos y sus genotipos serán: **AA**, **Aa**, o **aa** en una relación **1AA:2Aa:1aa**. La relación es conocida como segregación fenotípica, y se efectúa de acuerdo a la segunda ley de Mendel. En esta relación si el alelo **A** es dominante sobre el alelo **a**, la razón de segregación fenotípica, o sea la proporción de caracteres controlados por el par de alelos en cuestión presente en la progenie del heterocigoto, será **3A: 1a** (homocigotos y heterocigotos dominantes genotipos **AA** y **Aa**): (el homocigoto recesivo genotipo **a**). En los casos en los que no haya dominancia entre alelos, se producen 3 fenotipos; **a1** y **a2**, dando los genotipos **a1a1**, **a1a2** y **a2a2**, en una razón aproximada 1:2:1 y todos los genotipos son distintos.

Puesto que tanto los neohaplontes, que al reconstituir la cepa original produjeron esporóforos amarillos, como la progenie meiótica, que se obtuvo a partir de esporóforos amarillos contenían genotipo amarillo (**a**), el dicariote formado al aparear estos

monocariotes resulta con genotipo aa, por ende, la producción cuerpos fructíferos amarillos se explica considerando que el gen amarillo es dominante con respecto a los genes probables que codifican otros colores. Por lo que se descarta la posibilidad de que se haya efectuado una segregación conforme lo establece la segunda ley de Mendel.

La producción de esporóforos amarillos a partir de la interhibridización de la progenie meiótica de la cepa rosa (IE202), ocurrió después de meiosis, y de nuevo el color amarillo persistió después de la segregación meiótica.

Excepciones a la teoría cromosomal de la herencia han surgido a lo largo del tiempo. Con la presencia de elementos extracromosomales, los fenotipos de la progenie pueden diferir de los parentales originales (Fincham et al., 1979).

Si el sistema de apareamiento de los hongos es tal que uno de los parentales contribuye con la mayoría o con todo el citoplasma en la formación del cigoto, se podría esperar más o menos una transmisión uniparental de algunos atributos gobernados por determinantes citoplásmicas. Así cuando un par de micelios homocarióticos compatibles crecen juntos, la hifa dicariótica que se forma después del apareamiento, contiene predominantemente el citoplasma de uno de los parentales, aunque los núcleos pertenezcan a cada uno de los micelios parentales.

Matsumoto y Fukumasa-Nakai (1996) investigaron la herencia del DNA mitocondrial (DNAm_t) en cruza sexuales de *P. ostreatus*. Encontraron que la mayoría de los dicariones producidos por los apareamientos presentaron genotipos mitocondriales predominante de uno de los dos componentes monocarióticos parentales, comprobándose con esto la transmisión uniparental del material genético citoplásmico. Sin embargo, para los dicariones aislados de las zonas de unión de los dos micelios monocarióticos apareados se encontraron genomas mitocondriales de ambos monocariones parentales, lo que indica que el DNA mitocondrial de *P. ostreatus* también puede ser heredado biparentalmente, vía recombinación del DNAm_t. La mezcla citoplasmática en áreas de la fusión hifal entre micelios parentales, presenta la posibilidad de fusión mitocondrial y mezcla de los DNAm_ts, con la subsecuente recombinación (Anderson y Kohn, 1998). Se

sugiere que este tipo de recombinación puede ser una fuente importante de variación en el genoma entre poblaciones naturales en esta especie.

La segregación de los elementos extracromosomales o extranucleares (alelos citoplásmicos), ocurre algunas veces sobre el crecimiento vegetativo así como en la formación de esporas (Fincham et al., 1979). Es importante considerar que la supresión de genes que se expresan algún carácter determinado, es la clase más simple de interacción entre elementos extracromosomales (Burnett, 1975). Por ello es probable obtener fenotipos diferentes a los esperados, ya que los fenotipos normales o tipo silvestre dependen de todas las determinantes genéticas, tanto nucleares como citoplásmicas, así, mismos fenotipos anormales pueden ser controlados por factores citoplásmicos o nucleares (Fincham et al., 1979).

La obtención de cuerpos fructíferos de color amarillo a partir de los componentes monocarióticos progenie de la cepa parental rosa IE202, podría ser explicada por la presencia de una segregación extracromosomal, en la cual se suprime el color rosa de la cepa parental, y de nuevo, se pone de manifiesto la existencia de un gen o genes que codifican el color amarillo y que se encuentran presentes en la cepa original, pero que no se expresan:

Esto mismo podría haber ocurrido con las 11 cepas híbridas que presentaron coloración grisácea, producto del apareamiento entre las cepas rosas (PORO, RP), cepa blanca (IE200) y la cepa gris (IB67) (**Cuadro 7.4**). En los apareamientos obtenidos entre los neohaplontes correspondientes de las cepas PORO y RP con la cepa IE200, la progenie no generó esporóforos de color rosa o blanco como en las cepas parentales, por lo que podría asumirse que se presentó un fenómeno parecido al observado en los híbridos amarillos, sin embargo, no se detectó la formación de "clusters" al momento de la fructificación. Tal vez, el color gris este determinado por un conjunto de genes, los cuales al expresarse manifiestan esa coloración, como ya se indicó antes.

Murakami y Takemaru (1990) y Murakami (1999) establecen que la presencia del albinismo en cepas rosas de *P. salmoneostramineus* se debe a un solo gene recesivo, denominado *alb*, que es un gen transformativo. Sin embargo, Murakami (1999) indica la

presencia de otro factor que influye sobre el gen *alb*, para que se exprese, aunque no especifica si este factor es algún elemento extracromosomal. Si consideramos la cepa blanca IE201, se podría suponer que la separación de los núcleos por desdicarización hizo que se manifestará algún factor, tal vez extracromosomal, para que la coloración de los esporóforos fuera gris. Con respecto a los esporóforos de los apareamientos entre los neohaplontes de las cepas rosas PORO y RP, se podría también suponer que la expresión del color gris este en este caso determinada por un gen o conjunto de genes que se ven desactivados por alguno de los mecanismos analizados con anterioridad.

En los apareamientos de los neohaplontes de la cepa IB67 con las cepas IE200, PORO y RP independientemente, los esporóforos obtenidos, presentan en todos los casos, el color gris de la cepa IB67. Se podría también pensar que la información genética contenida en la cepa IB67 presenta dominancia al expresarse en los esporóforos formados.

Los híbridos que se obtuvieron al aparear los neohaplontes de las diferentes cepas coloridas de *Pleurotus* son de gran valor. Con sus progenies podrá estudiarse la segregación del carácter que determina el color de los esporóforos en *Pleurotus*. Representan el punto de partida para el desarrollo de cepas con colores estables y novedosos ya que en estos híbridos se encuentra el material genético original de las cepas dicarióticas seleccionadas.

8.5 Fructificación de cepas híbridas y parentales.

Los rendimientos de las cepas híbridas y parentales junto con las cepas comerciales IAP, INI8 y PLEUS permitieron ordenarlas en 5 grupos. A pesar de que el primer grupo obtuvo los valores más bajos, en este se encuentra la cepa INI8 que en estudios previos ha alcanzado valores de productividad mayores del 100%, a lo largo de tres brotes o cosechas (Valencia del Toro et al., 1997). Considerando que en este estudio se determinó la productividad al primer brote, se puede establecer que las cepa híbridas y parentales contenidas en este grupo tienen una productividad aceptable. Aún con la cepa IE202 que presentó el valor de EB más bajo (48.1%) de las cepas parentales, en el estudio realizado por Gaitán-Hernández y Salmones (1999), obtuvieron una productividad de 123.29%

después de 7 cosechas, clasificándola como cepa de alta producción, por lo en este trabajo la cepa IE202 presentó una productividad aceptable, ya que en el primer brote su EB representa el 39% del valor reportado para 7 cosechas.

En casi la totalidad de las cepas híbridas, la EB fue menor que sus respectivas cepas parentales, incluso las cepas IB67 e IE202 quedaron ubicadas en el mismo grupo. Los tiempos de fructificación fueron más largos en las cepas híbridas con respecto a las cepas parentales (datos no presentados).

8.6 Factores de compatibilidad.

La segregación de los factores de incompatibilidad se determinó con las progenies meióticas de las siguientes cepas:

- a) Cepas parentales IE101 e IE202.
- b) Cepa reconstituida IE202, a partir de sus neohaplontes.
- c) Cepas híbridas que produjeron esporóforos amarillos (IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂)

Se observó que los tipos de compatibilidad de las progenies de las cepas híbridas y reconstituidas corresponden con los tipos de compatibilidad de sus respectivas cepas parentales y presentan una distribución de 1:1:1:1

A pesar de un número pequeño de apareamientos entre monospóricos, los resultados obtenidos corresponden con lo esperado teóricamente (Isikhuemhen et al., 2000). Los apareamientos intracepa confirmaron el modo heterotálico bifactorial de reproducción sexual de las cepas parentales blanca y rosa, así como de las cepas dicarióticas obtenidas a partir de ellas, y consecuentemente los monacariones obtenidos se segregaron dentro de uno de los cuatro tipos de apareamiento. El sistema de apareamiento tetrapolar con alelos múltiples ha sido claramente demostrado que regula la reproducción sexual en varias especies del género *Pleurotus*, revelando la existencia de dos estructuras genéticas en los factores de incompatibilidad (Terakawa, 1960; Eugenio y Anderson, 1968; Eger 1978; Hilber, 1982; Petersen y Ridley, 1996; Zervakis y Bali, 1995; Larraya et al., 1999).

La función biológica de los dos loci se ha investigado para basidiomicetes tales como *C. cinereus* y *S. commune*, encontrándose que están involucrados en el control de mecanismos responsables para asegurar la transmisión de los dos núcleos de la célula dicariótica durante la división celular. Para el género *Pleurotus*, sin embargo, únicamente hay datos sobre la variabilidad de genes **A** y **B** (Larraya et al., 1999). Es probable que los factores de incompatibilidad en *Pleurotus* controlen también los diferentes procesos morfogenéticos que se presentan durante los procesos de apareamiento y formación del dicarion, por lo que la formación de "clusters" en las cepas híbridas debe de alguna forma estar relacionada o controlada por estos genes (Kues, 2000, Casselton y Olesnicky, 1998).

Se produjeron esporóforos amarillos en todos los apareamientos de la progenie meiótica de los híbridos IE201₂xIE202₁ e IE201₁xIE202₂, ya sea por intrahibridización de los dos tipos parentales o bien al hibridizar con los neohaplontes parentales compatibles. Es nula la probabilidad de que la producción de esporóforos amarillos por los híbridos y las cepas parentales (originales o reconstituidas) se encuentre ligado a los factores de incompatibilidad.

En este estudio se identificaron los factores de incompatibilidad de la progenie monocariótica de las diferentes cepas dicarióticas utilizando los productos haploides obtenidos por desdicarionización química. Es importante considerar que el tipo de incompatibilidad de cada dicarion, usando neohaplontes puede proveer información adicional acerca de la estructura genética en poblaciones de hongos.

Sin embargo el análisis de progenie del apareamiento de los neohaplontes usando marcadores genéticos adicionales como isoenzimas y polimorfismo del DNA serán necesarios para explicar las variaciones de color y morfología en las cepas dicarióticas obtenidas en este estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo son contundentes en cuanto a descartar la contaminación genética debida a al cepa de *P. citrinopileatus* en los híbridos amarillos obtenidos. Sin embargo, sería conveniente el trabajo molecular a partir del cual se podrían corroborar estos resultados. Para ello se debería efectuar la amplificación de DNA del material genético de cepas parentales blanca, rosa y amarilla, de los neohaplontes de

estas cepas, y de los híbridos amarillos obtenidos, con la finalidad de comparar los patrones genéticos de híbridos con respecto a neohaplontes y cepas parentales, esto nos permitiría comprobar las similitudes y/o diferencias entre las cepas obtenidas.

8.7 Estudios del color en otros organismos.

La expresión del color es un fenómeno que se ha estudiado ampliamente en otros organismos. En mariposas, un genotipo puede producir fenotipos alternos a través de la sensibilidad ambiental regulada por hormonas, presentándose un polifenismo estacional en el que ocurre la plasticidad fenotípica como respuesta a la variación de factores del ambiente. Así mismo, la selección artificial y mutaciones de un solo gen demostraron la presencia de una variación genética que afectó el número, tamaño, posición y composición de color de los anillos de las alas de la mariposa (Brakefield y French, 1999).

En las plantas la floración es controlada por las señales medioambientales que reflejan cambios de clima, particularmente la temperatura y la longitud del día. Para *Arabidopsis* se han analizado dos tipos de receptores. El primero, los criptocromos, son flavoproteínas que funcionan como receptores a la luz azul; el criptocromo 1 codifica una proteína que es expresada a niveles similares en la obscuridad y en la luz durante la germinación, el criptocromo 2 codifica una proteína soluble lábil a la luz azul. El segundo grupo de receptores de luz, los fitocromos, son codificados por una pequeña familia de 5 genes, cada fitocromo existe en dos formas; una en presencia de la luz roja y la otra en rojo lejano. Los trabajos genéticos realizados en *Arabidopsis* han dado acceso a genes cuyos productos controlan la floración en respuesta a los cambios climáticos. (Samach y Copulan, 2000).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la mutación de los genes *ade2* y/o *ade1* en la ruta biosintética de la adenina permite la acumulación de un pigmento rojo, mientras que la mutación epistática en la misma ruta evita el fenómeno (Ugolini y Bruschi, 1996). El cambio en la coloración de rojo a blanco (o al revés) con la combinación adecuada de alelos mutantes y de tipo silvestre de genes de la ruta de la adenina se ha utilizado ampliamente como un fenotipo no selectivo para visualizar y cuantificar la ocurrencia de varios eventos genéticos tales como la recombinación, conversión y aneuploidía. Ugolini y

Bruschi (1996), indican que la presencia de mutaciones *ade8-18* y *ade2* en la ruta biosintética de la adenina confiere selectividad ventajosa a la célula blanca que contiene estos genotipos, comparada con células que únicamente tienen el gen mutado *ade2*.

En el caso del género *Pleurotus*, se ha detectado gran variabilidad fenotípica a través del cultivo de este basidiomiceto con diferentes condiciones ambientales. La identificación del gene o conjunto de genes que determina la expresión del color en el género *Pleurotus* permitirá entender los mecanismos fisiológicos y genéticos que determinan el color en los esporóforos de este macromiceto.

8.8 Discusión general

Para el estudio sobre expresión del color se requirieron de cepas de *Pleurotus* spp. que presentaron esporóforos con colores estables. La estabilidad del color se caracterizó como la presencia del mismo color (con mínimas variaciones tonalidad) en el cuerpo fructífero, que se mantenían a lo largo del primer brote del cultivo, la cual se logró mediante el establecimiento de condiciones ambientales controladas. El uso de atlas de color por primera vez de manera sistemática, fue un apoyo considerable para determinar la estabilidad del color de los esporóforos.

Durante el proceso de descariotización química, se hicieron modificaciones al método de Leal-Lara (1980), sobre todo en lo referente a los tiempos de homogenización del micelio, esta etapa es crucial dado que implica un rompimiento del micelio dicariótico, para la formación de trozos de micelio que lleven únicamente un núcleo. Durante el trabajo se detectó que la disminución del tiempo permitía la obtención de los dos tipos de componentes monocarióticos, a pesar de que el número de colonias monocarióticas recuperadas fuera pequeño, comparado con el reportado en otras investigaciones (Leal-Lara, 1980; Arias-García, 1998). Es necesario indicar que la sensibilidad de las cepas al rompimiento mecánico es un factor importante, por lo que dependiendo de la especie con la que se trabaje será necesario ajustar los tiempos de homogenización.

A partir del apareamiento de los neohaplontes de las diferentes cepas se obtuvieron híbridos con esporóforos de colores diferentes a los de las cepas parentales, lo que se

observó también al aparear la progenie meiótica. Esto implica que el o los genes responsables de la expresión del color amarillo, están contenidos en ambos tipos de componentes monocarióticos (nhs y msp). Los resultados corroboran la hipótesis de que la información genética sobre el color de los esporóforos se encuentra contenida en los neohaplontes. Así mismo, el hecho de que los esporóforos de los híbridos formados a partir de las cepas del primer grupo interestéril presentaron color gris, y esporóforos amarillos en las cepas híbridas del segundo grupo interestéril, indica la presencia de patrones específicos de expresión del color para estos grupos. Lo que comprueba la hipótesis planteada.

A pesar de la inexplicable variación de la herencia del color (rosa a amarillo), el sistema de compatibilidad en las cepas parentales al igual que en los híbridos formados fue tetrapolar heterotálico, confirmándose la hipótesis planteada.

Una de las características importante de este trabajo, en relación a otros que se han realizado, fue la utilización de neohaplontes para estudiar la expresión del color, esto permitió la obtención de cepas híbridas que presentaron coloraciones distintas en sus esporóforos comparadas con las cepas parentales.

Si únicamente se hubiese trabajado con la progenie meiótica de las cepas la información sería muy parcial. Es decir, que de otra forma no hubiera sido posible penetrar tan profundamente en este fenómeno.

9 CONCLUSIONES.

El principal objetivo que se planteó este trabajo fue evaluar la expresión del color en cepas de *Pleurotus* spp. a partir de un método no tradicional de mejoramiento genético, el cual consistió en el apareamiento de los componentes monocarióticos compatibles (neohaplontes), obtenidos por desdicariorización química, de cepas que presentaron colores estables y contrastantes.

El uso de condiciones controladas de laboratorio, permitió la caracterización y selección de cepas parentales de *Pleurotus* spp. con colores atractivos y estables, con alta productividad, con posibilidades de mejoramiento genético y por lo tanto buenas candidatas para su comercialización.

Las cepas híbridas obtenidas fueron productivas, con rendimientos en la mayoría de los casos, comparables con los obtenidos en las cepas parentales. Estos híbridos representan una fuente importante para la realización de estudios de mejoramiento genético, ya que en ellos se conjunta dos atributos valiosos como son la coloración atractiva y la productividad aceptable.

Los resultados obtenidos en este estudio con cepas de colores indican que son organismos adecuados para el análisis genético del color en el género, ya que fue posible detectar variaciones morfogénicas como presencia de color amarillo y formación de "clusters" a lo largo de los experimentos. La ventaja de un ciclo relativamente corto de vida de las especies del género *Pleurotus* (aproximadamente 6 semanas) es también una característica importante para la utilización de estos organismos en estudios genéticos.

Las modificaciones implementadas al proceso de desdicariorización química permitieron la recuperación simétrica de los dos tipos de neohaplontes para 10 cepas de *Pleurotus* spp., logrando desdicariorizar cepas que en estudios previos no fue posible o solamente se obtuvo uno de los componentes monocarióticos. Es importante resaltar también que se comprueba la eficacia de la solución desdicariorizadora glucosa-peptona.

El apareamiento entre neohaplontes ya sea de la misma cepa o de cepas diferentes, así como con la progenie meiótica de la misma cepa, señala que la capacidad de apareamiento de los componentes monocarióticos obtenidos por el método de desdicarionización no se vio afectada.

Se establece que la desdicarionización es un método confiable como herramienta para la realización de estudios genéticos, que facilita en cuanto a tiempo y procedimiento, la obtención de componentes monocarióticos, puesto que no requiere de la obtención de la progenie meiótica, y por ende la fructificación de las cepas.

La hibridación de neohaplontes de las 10 cepas seleccionadas permitió determinar 5 grupos interestériles, identificándose las especies *P. pulmonarius*, *P. djamor* y *P. citrinopileatus*.

Se obtuvieron 13 cepas dicarióticas híbridas que formaron esporóforos. La evaluación del color de estas estructuras permitió la selección de dos cepas híbridas que presentaron color amarillo en sus esporóforos y dieron la pauta para evaluar la expresión del color de la progenie dicariótica obtenida al aparear los neohaplontes de las cepas parentales con la progenie meiótica de estos híbridos.

La obtención en los híbridos amarillos de un color totalmente distinto al de las cepas parentales planteó la posibilidad de la existencia de genes en las cepas parentales rosa y blanca, que se encuentren reprimidos, de tal forma que no se expresan en la cepa dicariótica silvestre, y únicamente lo hacen después de que se ha llevado un proceso de separación de los componentes monocarióticos, ya sea a través de la germinación de basidiosporas o por desdicarionización química.

Los esporóforos de color amarillo se obtuvieron por apareamiento tanto de neohaplontes como de progenie meiótica para las cepas IE201 e IE202, por lo que se pone de manifiesto la presencia de genes que codifican la pigmentación amarilla en las fructificaciones, estos resultados se ven apoyados por estudios fitoquímicos en los cuales se ha detectado que los extractos acuosos de cepas rosas presentan cromoproteínas

amarillo claro. De alguna forma, estos genes se expresan en las cepas reconstituidas a partir de los neohaplontes o de la progenie meiótica.

A través de la determinación de los factores de incompatibilidad fue posible establecer que tanto cepas parentales, híbridos y cepas reconstituidas, presentaron una segregación de los tipos de compatibilidad 1:1:1:1, confirmando la naturaleza tetrapolar heterotálica del género *Pleurotus*, que no se vio modificada a pesar de los cambios de color.

10. PROSPECCIONES DE INVESTIGACIÓN.

Estudiar las condiciones que permitan obtener cepas que produzcan esporóforos con color de las cepas parentales (blanca o rosa) a partir de la progenie meiótica es necesaria para poder entender el proceso de expresión del color en las cepas parentales. Esto requiere del apareamiento de un número mayor de monocariotes de las progenies meióticas, debiéndose además incluir los tipos de compatibilidad recombinantes. Probablemente sea necesario obtener las progenies F2 o F3 de los apareamientos compatibles.

De igual forma, para determinar los patrones de segregación del color en las cepas híbridas es necesario realizar apareamientos de los tipos de compatibilidad recombinantes con los neohaplontes compatibles se la otra cepa, y en ambos casos, con tipos recombinante y parentales, obtener dos o más generaciones.

El trabajo con las cepas híbridas cuyos cuerpos fructíferos presentaron color gris es importante para determinar los procesos de expresión y segregación del color en las especies del género *Pleurotus*, por lo que será necesaria la obtención de cepas progenie dicarióticas y la generación de esporóforos, siguiendo los lineamientos planteados en los párrafos anteriores. Quedan las interrogantes de si el color de los esporóforos será también amarillo? al regenerarse a partir de sus progenies meióticas?

Las cepas híbridas obtenidas deberán evaluarse en función a distintos parámetros de productividad (tasa de producción, rendimiento, EB), con la finalidad de determinar sus características morfológicas, seleccionándose las más adecuadas para la producción comercial.

La implementación de técnicas de biología molecular para la elucidación de él o los genes que determinan el color amarillo de las cepas híbridas es necesaria. De esta forma se podría determinar si alguno de los fenómenos de silenciamiento de genes está presente en las cepas silvestres, así mismo, se pondría de manifiesto la presencia de elementos citoplásmicos o extracromosomales.

11 LITERATURA CITADA.

- Anderson, N. A., C. R. Furnier, A. S. Wang, J. W. Schuandt, 1991. The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* *sapidus*. *Can. J. Bot.* **69**: 2187-2191.
- Anderson, B. J., L. M. Kohn, 1998. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *TREE* **13**: 444-449.
- Arias-García, A., C. R. Ramírez, H. Leal-Lara, 2000. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* hybrids resistant to 2DG obtained by pairings of neohaplonts from selected dikaryons. In: Van Griensven (Ed.), *Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*. Netherlands. Vol. I: 305 -309.
- Arias-García, A., 1998. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para el cultivo comercial por apareamiento entre neohaplontes. Tesis Maestría en Biotecnología. UNAM. México D.F.
- Arita, I., 1974. Genetic study of white fruit-bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **11**:58-68.
- Arita, I., 1979. The mechanism of spontaneous dedikarionization in hyphae of *Pholiota nameko*. *Mycologia.* **71**: 603-611.
- Arteaga-Santillán, S. E., R. Ramírez-Carrillo, H. Leal-Lara, 1996. Desdikarionización excéntrica de *Lentinus* sp. *Rev. Mex. Micol.* **12**: 15-21.
- Ben-Ari, E., 1999. The silence of the genes. *Bioscience.* **49**: 432-436.
- Bock, W.J., 1986. Species concepts, speciation, and macroevolution. In: K. Iwatsuki, P.H. Raven, W.J. Bock (Eds.), *Modern aspects of species*. Tokyo: University of Tokyo Press., 31-57.
- Brakefield, M. P., V. French, 1999. Butterfly wings: the evolution of development of colour patterns. *BioEssay* **21**: 391-401
- Bresinsky, A., M. Fisher, B. Meixner, W. Paulus, 1987. Speciation in *Pleurotus* *Mycologia*, **79** (2): 234-245.
- Burnett, H. J., 1975. *Mycogenetics*. Jhon Wiley & Sons. London. pp. 100.
- Burnett, H. J., 1986. *Fundamental of mycology*. Edawars Arnold (Publidhers) Ltd. London. pp. 314
- Byun, M. O. B., K. Kyung-Soo, Y. Chang-Hyun, C. Dong-Yeul, 1994. Variations in mitochondrial DNA of *Peurotus sajor-caju*. *Kor. J. of Mycol.* **22**(2): 117-121.
- Casseltan, A. L., N. S. Olesnicky, 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomicete fungus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 55-70.
- Castel, A. J., P. A. Horgen, B. J. Anderson, 1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Appl. Env. Microbiol.* **53**: 816-822.
- Chang, S.T., 1982. Sexuality and strain improvement in edible mushrooms. *Mush. New. for Tropics.* **3**: 2-6.

- Chang, S. T., 1996. Mushrooms research and development equality and mutual benefit. *Mush. Biol. Mush. Prod.* **2**: 1-10.
- Chang, S.T., P.G. Miles, 1989. *Edible Mushrooms and their Cultivation*, CRG Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 317-336.
- Chang, S.T., P.G. Miles, 1991. Recent trends in world production of cultivated edible mushrooms. *Mush. J.* **504**: 14-18.
- Cogoni, C., 2001. Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**: 381-406.
- Corner, E. J. H., 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus*. *Men. Shiga. Univ.* **23**:37-43.
- Coyne, J. A., 1985. Genetic studies sibling species of *Drosophila* with relationship to theories of speciation. *Genet. Res. (Camb.)* **46**: 169-192.
- Danai, O., I. Olenik, Y. Hadar, I. Chet, D. Levanon, 1998. The rol of the light in the morphogenesis of *Pleurotus ostreatus*. *Int. J. Mush. Sci.* **2** (2): 33-39
- Donoghue, M. J., 1985. A critique of the biological species concept and recommendation for a phylogenetic alternative. *Bryologist* **88**: 172-181.
- Eger, H. G., 1970. Die wirkung eniger n-verbindungen auf mycelwachstum und primordienbildung des basidiomiceten *Pleurotus spec. aus. florida*. *Arch. Mikrobiol.* **74**: 160-173.
- Eger, G., H. D. Gottwald, U. Nezer, 1974. The action of the light and other factors on sporophore initiation in *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* **IX**. 575-583.
- Eger, G., G. Eden, E. Wissing, 1976. *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theor. Appl. Genet.* **47**: 155-163.
- Eger, H. G., 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In: S. T. Chang, W. A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press N.Y. pp. 497-519.
- Eger, H. G., H. Leal-Lara, 1979. Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia.* **71**:577-588.
- Eger-Hummel, G., 1980. Blue-light photomorphogenesis In: C. G. Elliot (Ed.), *Mushrooms (Basidiomycetes) in reproducction in fungy*. Chapman & Hall, London.
- Esser, K., 1966. Incompatibility. In: C. G. Anisworth, S. A. Sussman, *The fungus*, Vol. II Academic press. N Y.
- Eugenio, C. P., N. A. Anderson, 1968. The genetic and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia.* **60**: 627-634.
- Fagard, M., S. Boutet, J. B. Morel, C. Bellini, H. Vaucheret, 2000. AGO1, QDE-2 and RDE-1 are related proteins requerid for post-transcriptional gene silencing in plants. Quelling in fungi, and RNA interference in animals. *PNAS.* **97**(21): 1650-1654.
- Fincham, S. R. J., R. P. Day, A. Radford, 1979. *Fungal genetics*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London .
- Fries, N., K. Aschan, 1952. The physiological heterogeneity of the dicaryotic mycelium of *poliporus abietinus* investigated whit the aid of microsurgical technique. *Sven. Bot. Tidskr.* **46**: 429-445.

- Fukumasa-Nakaki, Y., T. Matsumoto, M. Komatsu, 1994. Dedicarionization of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. *J. Gen Appl. Microbiol.* **40**: 551-562.
- Gaitán-Hernández, R., D. Salmones, 1999. Análisis de producción de cepas de *Pleurotus djamor*. *Rev. Mex. Micol.* **15**: 115-118.
- Gyurko, P., 1972. Die rolle der belichtung bei dem anbau de austernseitling (*Pleurotus ostreatus*). *Mush. Sci.* **8**: 461-469.
- Herrera, T., M. Ulloa, 1990. El Reino de los hongos. UNAM, Fondo Cultura Económica. México.
- Hilber, O., 1982. Die gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer, unter besonderer Berücksichtigung *Pleurotus eryngii*-formenkomplexes. *Bibliotheca Mycologica* **87**.
- Hiscocock, S. J., U. Kues, 1999. Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *Int. Rev. Ctol.* **193**: 165-295.
- Isikhuemhen, O. S., J. M. Moncalvo, R. Vilgalys, 2000. Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberrigium*. *Mycol. Res.* **104**: 732-737.
- Kay, E., R., Vilgalys, 1992. Spatial distribution and genetic relationships among individual in natural population of the oyster mushrooms *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia.* **84** (2):173-182.
- Kerruish, R., W. E. Da Costa, 1963 Monokarionization of cultures of *Lenzites trabea* (pers) Fr. and other wood destroying basidiomycetes by chemical agents. *Ann. Bot.* **27**: 653-669.
- Komatsu, M., 1977. Fruit-bodies with white pilie of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **15**: 55-64.
- Komatsu, M., K. Kimura, 1968. Studies on abnormal fruit-bodies of himenomicetous fungus. V. Fruit-bodies with white pilie of *Lentinus edodes* (Berk.). *Sing. Rep. Tottori Mycol. Inst.* **6**:9-17.
- Khote, E., 1999. Mating types and pheromone recognition in Homobasidiomicete *Schizophyllum commune*. *Fungal Gen. Biol.* **27**: 146-152.
- Kues, U., 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 316-353.
- Kues, U., Y. Liu, 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 141-152.
- Kuppers, H., 1979. Atlas de los colores. Ed. Blume, Barcelona.
- Larraya, L., M. M. Peñas, S. P. G. Cruz, E. Ritter, G. A. Pisabarro, L. Ramírez, 1999. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to A incompatibility locus in white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Gen.* **34**: 486-493.
- Leal-Lara, H., 1980. Sporelessness in basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dedikarionization method. **Ph. D. Dissertation.** Marburg University, Marburg/Lahn.

- Leal-Lara, H., G. Eger-Hummel, 1982. A monokaryotization method its use for genetic studies in wood-rotting basidiomycetes. *Theor. Appl. Genet.* **61**: 65-68.
- Leatham, G. F., M. A. Stahmann, 1987. Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **88**(1): 9-20.
- Li, S. T., 1980. Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus* (Jack. Ex. Fr.) Kummer. *Bibl. Mycol.* **76**: 1-86.
- Maerz, A., M. R. Paul, 1950. A dictionary of color. Mc. Graw Hill.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, A. Larqué-Saavedra, 1993. ¿Reconversión de la industria de los hongos? *Technoindustria*, Diciembre, pp. :52-59.
- Martínez-Carrera, D. 1997. Producción de *Pleurotus* en México. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología. IX Jornadas Científicas. Tapachula, Chiapas, México.
- Matsumoto, T., Y. Fukumasa-Nakai, 1996. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics.* **30**:549-552.
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: M. F. Claridge, H. A. Dawah, M. R. Wilson (Eds.), *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall. London. pp. 381-424
- McClenagan, S. C., K. W. Hughes, 1988. Genetic study on *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin. *Inoculum.* **49**(2):35.
- Miles, P. G., J. R. Raper, 1956. Recovery of the component strain from dikaryotic mycelia. *Mycologia.* **48**: 484-494.
- Moore, D., 1998. Fungal morphogenesis. Cambridge University Press. New York.
- Murakami, S., T. Takemaru, 1990. Genetic studies of *Pleurotus salmoneostramineus* forming albino basidiocarps. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* **28**: 199-204.
- Murakami, S., 1999. A supplemental genetic study on *Pleurotus salmoneostramineus* forming albino basidiocarps. *Rep. Tottori. Mycol. Inst.* **37**: 64-70.
- Neda, H., H. Furakawa, T. Miyagy, 1988. Two *Pleurotus* species from Okinawa. *Proc. Ann. Meet. Mycol. Soc. Jap.* pp 51.
- Papazin, H. P., 1955. Sectorin variants in *Schizophyllum*. *Am. J. Bot.* **42**: 394-400.
- Paredes, Q. P., 1996. Evaluación de la productividad de diferentes cepas comerciales dl hongo comestible *Pleurotus* spp. (setas). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Paredes, P., H. Leal, R. Ramírez, A. Arias-García, 1996. Criterios de selección de cepas de *Pleurotus* spp. Para mejorar la competitividad de la producción comercial. *Micol. Neotrop. Apl.* **9**: 67-79.
- Peberdy, J. F., A. M. Hanifah, J. H. Jia, 1993. New perspectives on the genetics of *Pleurotus*. In: S. T., Chang, J. A. Buswell, S. W. Chiv (Eds.), *Mushroom biology and mushroom products*. The Chinese Univ. Press. pp 55-66.
- Petersen, H. R., 1995. Contributions of mating studies to mushrooms systematics. *Canadian Journal of Botany.* **73** (suppl.) S831-S842.
- Peterson, H. R., S. G. Ridley, 1996. A new Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. **88**: 198-207.

- Petersen, R., K. Hughes, 1999. Species and speciation in mushrooms. *Bioscience*. **49**(6): 440-452.
- Raper R. J., 1966. Life cycles, basic patterns of sexuality, and sexual mechanisms. In: C. G. Anisworth, S. A. Sussman, *The fungus*, Vol. II Academic press. N Y.
- Raper C. A., 1978. Sexuality and breeding. In: S. T. Chang, W. A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press N.Y. pp. 83-117.
- Royse, D. J., 1997. Speciality mushrooms: consumption, production and cultivation. *Rev. Mex. Micol.* **13**: 1-11.
- Royse, D. J., A. S. Zaki, 1991. Yield stimulation of *Pleurotus flabellatus* by dual nutrient supplementation of pasteurized wheat straw. In: Maher (Ed.), *Science and Cultivaton of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, Dublin. pp. 545-547.
- Schilthuizen, M., 2000. Dualism and conflict in understanding speciation. *BioEssays*. **22**: 1134-1141.
- Selker. U. E., 1997. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induces confudión? *TIGAUGUST 1997*. **13**(8): 296-301.
- Shibata, N., N. Gohow, T. Inove, C. Nagano, K. Inaba, H. Takekuma, S. Takekuma, Z. Yoshida, Y. Kai, 1997. Crystallization and preliminary crystallographic studies of pink color chomoprotein from *Pleurotus salmoneostramineus* L. Vass. *Ac. Crystal.* **D33**: 335-336.
- Smach, A., G. Coupland 2000. Time measurement and the control of flowering in plants. *Bioessays*. **22**:38-47.
- Sobal, M., P. Morales, W. Martínez, D. N. Pegler, D. Martínez-Carrera, 1997. Cultivation of *Lentinus levis* in México. *Micol. Neotrop. Apl.* **10**:63-71.
- Takekuma, S., H. Takekuma, Y. Matsubara, K. Inaba, Z. Yoshida, 1994. A novel mushroom pigment: Islation and charactrization. *J. Am. Chem.* **116**: 8849-8850.
- Takemaru, T. 1964. Monokariotization studies in the basidiomicetes. II. Neohaplonts induced by oxgall tratament. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **4**:41-43.
- Tan, K. K., 1977. Light-induced fungal development. In: J. E. Smith, R. D. Berry (Eds.) *The filamentous Fungi III*. John Wiley, New York. pp. 334-357.
- Templeton, A.R., 1989. The meaning of species and speciation. In: D. Otte, J.A. Endler, Sunderland (Eds.), *Speciation and Its Consequences*. Sinauer Associates. pp. 3-27.
- Terakawa, H., 1960. The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. *Scientific papers (Coll. Gen. Educ. Univ. Tokio)*. **10**: 65-71.
- Taylor, J.W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett, M. C. Fisher, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Gen. Biol.* **31**: 21-32.
- Tokimoto, K., K. Hsebe, M. Komatsu, 1978. Studies on dedikaryotization of *Lentinus edodes* (berk.) sing. I. Induction of dedicaryotization by fall powder. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **16**:66-72.
- Tschierpe, H. J., K. Hartmann, 1977. A comparison of different growing methods. *Mush. J.* **60**: 404-416.

- Ugolini, S., C. V. Bruschi, 1996. The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage if white *ade8-18*, *ade2* cell over red *ade2* cells. *Curr. Gen.* 30: 485-492.
- Umar, M. H., D. L. J. Van Griensven, 1999. Studies on the morphogenesis of *Agaricus bisporus*: the dilemma of normal versus abnormal fruit body development. *Mycol. Res.* 103: 1235-1244.
- Valencia-Del Toro, G., M. E. Garín-Aguilar, S. L. Vázquez, 1997. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa, cascarilla y pajillas del café. *Productos Naturales Vol. 3*. UAM-IZTAPALAPA. pp 159-168.
- Valencia-Del Toro, G., H. Leal-Lara, 1999. Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus* spp. con cuerpos fructíferos de diversos colores. *Rev. Mex. Micol.* 15:65-71.
- Vilgalys, R., 1991. Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. *Mycologia.* 83(6): 758-773.
- Vilgalys, R., A. Smith, B. L. Sun, O.K. Miller, 1993. Intersterility groups in *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Can. J. Bot.* 71: 113-128.
- Vilgalys, R., L. B. Sun, 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushrooms *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4599-4603.
- Whitehouse, H. L. K., 1949. Multiple-allelomorph heterothallism in fungi. *New. Phytol.* 48: 212-244.
- Worrall, J. J., 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia.* 89: 24-36.
- Zadrazil, F., 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eringii*. *Mush. Sci.* 9: 621-652.
- Zadrazil, F., 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In: S. T. Chang, W. A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press N.Y. 597-619.
- Zervakis, G., J. Laberere, 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138: 635-645.
- Zervakis, G., C. Balis, 1991. *Pleurotus* species of Greece: an evaluation of their morphological and physiological characteristics. *Mush. Sci.* 13: 537-534.
- Zervakis, G., C. Balis, 1994. *Pleurotus* species of Greece: An evaluation of their morphological and physiological characteristics. In: Maher (Ed.), *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam. Dublin. pp. 537-543.
- Zervakis, G., C. Balis, 1995. Incompatibility alleles and mating behaviour between and within *Pleurotus* species. In: Maher (Ed.), *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam. Dublin. pp. 53-62.

12 APÉNDICE (Artículos publicados):

Valencia-Del Toro, G., H. Leal-Lara, 1999. Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus* spp. con cuerpos fructíferos de diversos colores. Rev. Mex. Micol. **15**:65-71.

Valencia del Toro, G. H. Leal-Lara. 2002. Fruit body color in *Pleurotus* spp hybrid strains obtained by matings of compatible neohaplonts. Mushroom Biology and Mushroom Products. Sánchez et al. (eds). 2002 UAEM. ISBN 968-878-105-3. 151-159 pp.

ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD ENTRE CEPAS DE *PLEUROTUS* SPP CON CUERPOS FRUCTÍFEROS DE DIVERSOS COLORES

GUSTAVO VALENCIA DEL TORO¹ & HERMILO LEAL-LARA²

¹Departamento de Química, UPIBI, IPN; División de Investigación, ENEP Iztacala, UNAM, México D.F.

²Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, 04510 Ciudad Universitaria, UNAM, México D.F.

ABSTRACT

COMPATIBILITY STUDIES OF *PLEUROTUS* SPP STRAINS PRODUCING FRUIT BODIES OF DIVERSE COLORS. *Rev. Mex. Mic.* 15: 65-71 (1999). Fruit body and spore print colors of 15 strains of *Pleurotus* spp were studied. Upon cultivation of 6 strains producing colored fruit bodies and 2 commercial strains, the highest yields were produced by the commercial strain PLEUS and 2 strains with gray and pink fruit bodies (IE-136 and POROS), with values of 101, 132 and 116 % respectively. Yields of the other 4 strains with colored fruit bodies, IB-67-1 (77%), RP (78%), P-15 (60%), and ECS-127 (65%) were similar to that of the second commercial stain, INIREB-8 (67%). Upon dikaryotization of 7 strains producing fruit bodies of diverse colors, the two monokaryotic components (neohaplonts) were recovered from 3 strains but only one component of the other 4 strains. By pairing all these neohaplonts, these 7 strains were sorted into 3 intersterility groups. Strains with pink and orange fruit bodies belonged to the first group, while strains with gray fruit bodies were found in the second and third groups. The color of the fruit bodies yielded by each strain remained constant throughout this study.

Key Words: *Pleurotus* spp., dikaryotization, breeding, color.

RESUMEN

Se estableció la coloración de los esporóforos y esporadas de 15 cepas de *Pleurotus* spp. Al cultivar 6 cepas productoras de cuerpos fructíferos de colores diversos y dos cepas comerciales se encontró que las cepas IE-136 y POROS presentaron junto con la cepa comercial PLEUS las mayores productividades, 132, 116 y 101% respectivamente mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos de la segunda cepa comercial, la INIREB-8 (67%) respecto a las otras cepas con cuerpos fructíferos de diversos colores, la IB-67-1 (77%), RP (78%), P-15 (60%) y ECS-127 (65%). Se dedicariotizaron 7 cepas productoras de cuerpos fructíferos coloridos recuperándose los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) para tres cepas, y sólo un componente con las otras 4. Al aparear estos neohaplontes se formaron tres grupos interestériles; todas las cepas con cuerpos fructíferos de color rosa y naranja se encuentran en el primer grupo, mientras que las cepas con cuerpos fructíferos grises se encuentran en el segundo y tercer grupos. Se observó que el color de los cuerpos fructíferos obtenidos para cada cepa se mantuvo constante durante este estudio.

Palabras Clave: *Pleurotus* spp., dedicariotización, hibridación, color.

Introducción

El auge que a nivel mundial y nacional ha tenido el cultivo de *Pleurotus* spp. (Chang *et al.*, 1995; Martínez-Carrera, 1997) plantea la necesidad de desarrollar tecnologías para el mejoramiento genético de este organismo, con la finalidad de mejorar sus atributos comerciales como el tamaño y el color. Es importante considerar que la diversidad en color de los productos alimenticios genera una respuesta de aceptabilidad de los mismos y dado que México se ha caracterizado desde tiempos ancestrales por el consumo de muy diversos hongos que presentan diferentes sabores y colores, la introducción en el

mercado de setas de colores diversos puede impulsar la comercialización de este hongo. Se han realizado intentos para la producción de cepas coloridas del género *Pleurotus*, habiéndose recientemente introducido una cepa rosa, la cual está ampliamente comercializada en Asia y Europa.

Para la obtención de cepas coloridas estables de *Pleurotus* spp. resulta necesario estudiar la naturaleza del carácter genético que determina el color de los esporóforos. Las bases genéticas del color en macromicetos no han sido a la fecha estudiadas, existiendo únicamente algunos reportes sobre la aparición de mutaciones espontáneas que afectan el color de los esporóforos. Murakami y Takemaru

(1990) al trabajar con 3 cepas rosas de *Pleurotus salmoneostramineus* detectaron la aparición de una mutante con basidiocarpos blancos. La presencia de mutaciones espontáneas que producen basidiocarpos albinos ha sido asimismo reportada en *Lentinus edodes* (Komatsu & Kimura, 1968), en *Pleurotus ostreatus* (Arita, 1974) y en *Auricularia* (Komatsu, 1977), planteándose en los 3 casos que la mutación es controlada por un sólo gen recesivo.

Por otro lado, el color de los esporóforos ha sido tradicionalmente una característica primordial para la clasificación taxonómica de los macromicetos. No obstante, cada día se presentan mayores contradicciones respecto a la validez de este criterio, ya que existe una gran variabilidad en la coloración de esporadas, primordios y esporóforos con la mayoría de los macromicetos y, particularmente, dentro de las especies del género *Pleurotus*. Se reconoce cada vez más que es indispensable incorporar estudios de compatibilidad sexual para la diferenciación de especies. Por ejemplo, Corner (1981) indicó que no hay diferencias esenciales entre *P. salmoneostramineus* y *P. djamor* var. *roseus*, excepto que el primero produce basidiosporas rosas y el último blancas mientras que Neda *et al.* (1988) reportaron que *P. salmoneostramineus* y *P. djamor* son compatibles, sugiriendo una estrecha relación entre ellas. Bresinsky *et al.* (1987) encontraron una completa compatibilidad entre un buen número de cepas de *P. ostreatus* de diferentes partes del mundo, produciéndose en todos los casos híbridos viables con esporóforos totalmente fértiles. Sin embargo, en 1993, Vilgalys *et al.* realizaron estudios de compatibilidad con 170 cepas de *Pleurotus ostreatus* de colecciones de Estados Unidos y Canadá, encontrando que éstas se clasificaban en 3 especies interestériles, *P. ostreatus*, *P. populinus* y *P. pulmonarius*. Estos autores postularon la existencia del complejo *Pleurotus ostreatus*, el cual en Norteamérica estaba integrado por estas 3 especies. Esta controversia se ha agudizado ya que las condiciones medioambientales pueden también afectar la expresión del color de los basidiocarpos (Li, 1980), aceptándose por lo general que se modifica esencialmente el tono o la intensidad más no el color. En función de la temperatura ambiente y de la intensidad de la luz, es posible que estos se oscurezcan o se aclaren (Eger *et al.*, 1976). Con escasa iluminación y bajas temperaturas los esporóforos tienden a adquirir tonos oscuros pero cuando se les cultiva a altas temperaturas o abundante

iluminación llegan a ser blancos aunque es difícil que se presente una coloración distinta (Li, 1980). En este orden de ideas, el estudio de la segregación del color en *Pleurotus* spp. aportaría elementos de importancia para avanzar en la discusión de la controversia con relación a las especies del género, requiriéndose asimismo esclarecer la influencia del medio ambiente sobre la coloración de los esporóforos.

Materiales y métodos

Material biológico.- Las 15 cepas de *Pleurotus* spp. utilizadas en este estudio se encuentran en la colección del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM, indicándose en la Tabla 1 el origen y las especies correspondientes. Para el mantenimiento de las cepas y la propagación micelial se utilizó agar extracto de malta (EMA) con 1.5% de extracto de malta y 2% de agar, el cual fue esterilizado en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 20 minutos. Para obtener cultivos miceliales frescos, las cajas petri con EMA se inocularon con un fragmento de agar invadido con micelio proveniente de un cultivo en almacenamiento. Las cajas petri recién inoculadas se incubaron a 28 °C hasta la que el margen del micelio en crecimiento empezaba a tocar las orillas de la caja petri, colocándose entonces en el refrigerador.

Fructificación de cepas para determinar eficiencia biológica y coloración.- Para preparar el inóculo, se colocó la mitad de un cultivo micelial de una caja petri en una bolsa de polipropileno con 500 g de trigo estéril y se incubó a 28°C hasta su completa propagación. El substrato se preparó con paja de trigo cortada a un tamaño de 3 a 5 cm. Una vez humedecida a saturación, se colocó 1 kg de paja húmeda en bolsas de polipropileno y se esterilizó por 1 hora a 121°C y 15 libras. Cuando las bolsas se enfriaron a 28°C, se agregaron 200 g de inóculo a cada bolsa, preparándose 10 réplicas por cepa. Las bolsas se incubaron a 28°C en obscuridad y se perforaron después de cinco días de incubación. Una vez que el micelio invadió el substrato se le retiró la bolsa y se colocó en la cámara de fructificación a una temperatura entre 15 y 21°C, humedad de 75-80%, un ciclo de iluminación de 12 h de luz difusa por 12 h de obscuridad y 20 minutos de aireación dos veces al día. De los esporóforos producidos se obtuvieron las esporadas correspondientes determinándose la coloración de acuerdo al Handbook de colores de Kornerup y Wanscher (1967) y al Atlas de colores

por Koppers (1979). Para los esporóforos se tomaron por lo menos dos diferentes fructificaciones, considerándose en cada caso la primera cosecha obtenida. La producción de esporóforos (g de hongos frescos por 100 g de sustrato seco) se determinó únicamente hasta la segunda cosecha.

Dedicarización de cepas.- Siguiendo el procedimiento de Leal-Lara (1980) y Arteaga-Santillán *et al.* (1996) se preparó una solución con 20 g/l de glucosa anhidra y 20 g/l de peptona en agua destilada, colocándose 50 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml que fueron esterilizados a 121°C y 15 lb por 30 minutos. Para inocular estas soluciones se utilizaron cajas petri con colonias en crecimiento que ocupaban 2/3 partes de la caja petri. La totalidad del agar cubierto con micelio de una caja se depositó en un homogeneizador estéril, se añadieron 50 ml de

agua estéril y se homogeneizó por 2.5 minutos. Se tomaron 100 µl del homogeneizado para inocular cada matraz con solución de peptona-glucosa, los que se incubaron a 28°C. Al observarse desarrollo micelial se homogeneizó el contenido del matraz por 30 segundos; 20 µl de este homogeneizado fueron inoculados en cajas petri. Éstas se incubaron a 28°C y al desarrollarse las colonias se determinó microscópicamente la presencia de fibulas. Aquellas que presentaron hifas sin fibula (neohaplontes) fueron sembradas en agar extracto de malta para verificar la ausencia de fibulas al desarrollarse nuevamente. Los neohaplontes obtenidos fueron apareados para identificar los dos componentes de las cepas dicarióticas.

Tabla 1.-Cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. seleccionadas para estudiar la segregación del color.

Cepa	Procedencia(Especie)	Crecimiento Micelial ²		Color ¹	
		(Tipo/Abundancia)		Esporóforo	Esporada
Cepas Comerciales (Controles)					
INIREB-8	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. ostreatus</i>)	F	EX	Gris cafésáceo (N ₄₀ A ₃₀ M ₃₀)	Cafésáceo (N ₁₀ A ₁₀ M ₁₀)
PLEUS	XICO, PUEBLA, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	EX	Gris cafésáceo (N ₄₀ A ₃₀ M ₃₀)	Cafésáceo (N ₁₀ A ₁₀ M ₁₀)
Cepas Coloridas					
ECS-127	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Gris (N ₇₀ A ₃₀ M ₁₀)	Cafésáceo (N ₂₀ A ₁₀ M ₂₀)
ECS 130	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Rosa carey 8A3 (N ₀₀ A ₃₀ M ₄₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)
1B-67-1	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	EX	Naranja grisáceo 5B3, (N ₁₀ A ₁₀ M ₁₀)	Rosáceo 7A2 (N ₀₀ A ₁₀ M ₂₀)
1B-67-2	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Amarillo grisáceo 4B3 (N ₁₀ A ₃₀ M ₂₀)	Rosáceo 7A2 (N ₀₀ A ₁₀ M ₂₀)
1B-67-3	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Gris naranja 5B2 (A ₃₀ M ₁₀ C ₁₀)	Rosáceo 7A2 (N ₀₀ A ₁₀ M ₂₀)
IE-136	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. columbinus</i>)	F	R	Gris (N ₄₀ A ₄₀ M ₂₀)	Lila claro (N ₁₀ A ₀₀ M ₂₀)
IE-200	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamur</i> , var. sal)	A	EX	Blanco (N ₀₀ A ₀₀ M ₀₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)
POROS	Stamets, USA (<i>P. ostreatoroseus</i>)	F	R	Rosa (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)
P-15	Pleos, Italia (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Gris 6D1 (N ₅₀ M ₀₀ C ₀₀)	Rosáceo 7A2 (N ₀₀ A ₁₀ M ₂₀)
P-5	Quebec, Canadá (<i>Pleurotus</i> sp)	A	EX	Amarillo grisáceo 4B3 (N ₁₀ A ₃₀ M ₂₀)	Violáceo (A ₃₀ M ₂₀ C ₃₀)
RP	Productor en D.F., Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	R	Rosa (N ₁₀ A ₀₀ M ₇₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)
UAP-7	U. de Puebla, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	EX	Naranja pardusco 5C4 (N ₄₀ A ₄₀ M ₃₀)	Violeta (A ₇₀ M ₃₀ C ₂₀)
UAP-9	U. de Puebla, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	EX	Beige naranja 6B2 (A ₃₀ M ₁₀ C ₂₀)	Violeta (A ₇₀ M ₃₀ C ₂₀)

(1) El color de cuerpos fructíferos y esporadas se determinó de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos

(2) Crecimiento micelial. Tipo: A = algodonoso, F = filamentosos, Abundancia, Ex = exuberante, R = regular.

Determinación de los factores de compatibilidad.-

Los neohaplontes recuperados se propagaron individualmente en cajas petri con EMA hasta que el diámetro de las colonias alcanzó 2 a 4 cm. Para determinar la compatibilidad entre colonias monocarióticas, del margen en crecimiento de una colonia se cortó un trozo cúbico de agar con micelio de 4mm de lado, el cual se colocó en una caja con medio EMA. Al lado de este fragmento se colocó otro trozo de igual tamaño proveniente de un monocariote distinto. En cada caja se realizaron 4 apareamientos hasta completar la combinación de todos los neohaplontes. Después de 2 a 5 días de incubación se determinó con la ayuda del microscopio la presencia de fibulas en tres puntos de las colonias formadas por cada apareamiento, identificándose de esta manera los factores de compatibilidad de las diferentes cepas.

Análisis estadístico de resultados.- Para detectar diferencias significativas estadísticamente en la producción de esporóforos se utilizó el análisis de varianza y en caso de encontrar diferencias significativas, se utilizó la prueba de rango múltiple de Tuckey para clasificar a las cepas de acuerdo a su capacidad de producción. Para determinar la proporción en que se recuperaron los dos tipos de neohaplontes se aplicó la prueba de χ^2 .

Resultados

A la fecha se ha logrado establecer una colección importante de cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. que producen cuerpos fructíferos de colores diversos (Tabla 1). En algunos casos la coloración de los esporóforos y de las esporadas que se determino no coincidieron con las reportadas por los donantes, lo cual puede deberse a las diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas por los donantes y en este estudio. Se observó por ejemplo que las cepas IB-67-1, IB-67-2 y IB-67-3, que fueron donadas como cepas productoras de esporóforos rosas, su coloración pudo diferenciarse empleando los atlas de colores en coloración naranja grisáceo, amarillo grisáceo y gris naranja, respectivamente. Así mismo la cepa IE-136 reportada por los donantes (Instituto de Ecología, Jalapa) como productora de esporóforos de color azul, los produjo grisáceos. Se observa en la Tabla 1 que las cepas ECS-130, POROS y RP presentaron una coloración rosa, la cual permaneció a lo largo de la primera cosecha, la cepa IE-200 presentó color blanco, mientras que el resto de las

cepas mostraron colores desde gris (ECS-127, IE-136 y P-15), gris "cafesáceo" (INIREB-8 y PLEUS), gris naranja o amarillento (cepas IB-67 y P-5) hasta naranja beige y pardusco (UAP-7 y UAP-9). Se observó asimismo una variación entre las diferentes cepas en el color de sus esporadas. Por lo regular fueron color durazno en las cepas con esporóforos rosas y blanco, rosáceo en las cepas con esporóforos gris y gris claro y violeta o violáceo en las cepas con cuerpos fructíferos de color beige naranja y pardusco.

Tabla 2.-Productividad en paja de trigo de cepas de *Pleurotus* spp.

Cepas	Color	Producción Total* (g/100 g substrato seco)
Cepas Comerciales (Controles)		
INIREB-8	Gris cafesáceo	67.36±4.13 b
PLEUS	Gris cafesáceo	100.7±3.19 a
Cepas Coloridas		
ECS-127	Gris	64.70±2.86 b
IB-67-1	Naranja grisáceo	76.91±2.68 b
IE-136	Gris	132.36±5.43 a
POROS	Rosa	115.58±7.88 a
P-15	Gris	59.53±4.97 b
RP	Rosa	77.7±11.76 b

*Valor promedio de 10 réplicas ± ESM (error estándar de la media). Valores que no comparten la misma letra indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

En la Tabla 2 se presentan las productividades al término del segundo brote para ocho cepas dicarióticas, dos de las cuales, INIREB-8 y PLEUS; son actualmente utilizadas en México para la producción comercial. No obstante, dos cepas coloridas, IE-136, POROS presentaron junto con la cepa control PLEUS las mayores productividades, 132, 116 y 101% respectivamente, mientras que las productividades de las otras cepas coloridas, IB-67-1 (77%), RP (78%), P-15 (60%) y ECS-127 (65%) no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto a la otra cepa control INIREB-8 (67%). Algunas de las cepas con características de mayor interés para el mejoramiento genético (color y alta productividad) fueron dedicariotizadas y así recuperar sus componentes monocarióticos para después

aparearlos en todas las posibles combinaciones y estudiar la expresión y estabilidad de los colores en los nuevos híbridos. Se recuperaron los dos componentes monocarióticos de las cepas ECS-127, IB-67-1 e IE-200, en una relación 1:1 de acuerdo a la

prueba de χ^2 , mientras que sólo fue posible recuperar uno de los componentes monocarióticos de las cuatro cepas restantes, ECS-130, IE-136, POROS y RP (Tabla 3).

Tabla 3.- Recuperación de componentes monocarióticos (neohaplontes) de cepas de *Pleurotus* spp.

Cepas Dicarióticas	Neohaplontes Recuperados			Componentes Recuperados	Prueba χ^2 para recuperación simétrica (nh1:nh2 = 1:1)*
	Total	Tipo nh1	Tipo nh2		
ECS-127	12	6	6	2	0.00 (1.000)
IB-67-1	5	2	3	2	0.20 (0.654)
IE 200	15	8	7	2	0.06(0.79)
ECS 130	12	12	0	1	—
IE-136	5	5	0	1	—
POROS	2	2	0	1	—
RP	4	4	0	1	—

*Entre paréntesis se presenta el valor de la significancia (p).

Tabla 4. Tipos de compatibilidad de componentes monocarióticos de cepas de *Pleurotus* spp.

Tipos De Compatibilidad	Cepas	Grupo 1					Grupo 2		Grupo 3	
		$A_m B_m$				$A_n B_n$	$A_o B_o$	$A_p B_p$	$A_q B_q$	
		ECS-130 ₁	IB-67-1 ₁	IE-200 ₂	POROS ₁	IB-67-1 ₂	IE-200 ₁	ECS-127 ₁	ECS-127 ₂	IE-136 ₁
$A_m B_m$	ECS-130 ₁	—	—	—	—	+	+	—	—	—
	IB-67-1 ₁	—	—	—	—	+	+	—	—	—
	IE-200 ₂	—	—	—	—	+	+	—	—	—
	POROS ₁	—	—	—	—	+	+	—	—	—
$A_n B_n$	IB-67-1 ₂	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	IE-200 ₁	+	+	+	+	—	—	—	—	—
$A_o B_o$	ECS-127 ₁	—	—	—	—	—	—	+	—	—
$A_p B_p$	ECS-127 ₂	—	—	—	—	—	—	+	—	—
$A_q B_q$	IE-136 ₁	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Color en el Dicariote original	Rosa carey	Naranja grisáceo	Naranja pálido	Rosa	Naranja grisáceo	Naranja pálido	Gris	Gris	Gris	Gris

El signo (+) indica formación de fibulas, el signo (-) indica apareamiento incompatible o ausencia de fibulas.

Al aparear los neohaplontes recuperados se observó la presencia de tres grupos interestériles (Tabla 4). Dentro del primero se encuentran las cepas ECS-130, IB-67-1, IE-200, y POROS agrupándose

sus neohaplontes dentro de 2 tipos de compatibilidad con factores totalmente distintos, el $A_m B_m$ y el $A_n B_n$. Los 2 componentes de la cepa ECS-127 se ubican dentro de un segundo grupo interestéril con los tipos

de compatibilidad A_qB_o y A_pB_p , observándose una situación similar con el único neohaplonte recuperado de la cepa IE-136 cuyo tipo de compatibilidad sería A_qB_q . No obstante, cabe también la posibilidad de que algunos de estos tipos de incompatibilidad correspondieran a los tipos complementarios de alguno de estos grupos, es decir que los factores del grupo 2 fuesen A_mB_n y A_nB_m . Para elucidar esta situación es necesario obtener los cuatro tipos de compatibilidad de las progenies meióticas de cada cepa dicariótica con lo que ya sería posible verificar sus patrones de interhibridización.

Discusión

En la mayoría de los estudios realizados con cepas productoras de basidiocarpos coloridos no se ha utilizado un patrón de referencia confiable con relación al color, lo que constituye una seria limitación. Esto adquiere mayor importancia al realizar estudios genéticos con el género *Pleurotus*, en donde se han observado cambios de tonalidad en los esporóforos debido a las condiciones del medio ambiente utilizadas ya que esto podría confundirse con un cambio de color debido a una variación genética. Por ello, en este estudio se controlaron las condiciones ambientales para que el color de los esporóforos se mantuviera constante. Al utilizar el atlas de colores se contó asimismo con un parámetro confiable para evaluar el color de los cuerpos fructíferos y comprobar la estabilidad de este parámetro durante el experimento. Como puede observarse con los datos reportados en la Tabla 1, el uso de las claves del atlas de colores es un método objetivo para registrar la coloración de esporóforos y esporadas. De esta forma fue posible confirmar en ciertos casos las coloraciones reportadas por los donantes, aunque algunas cepas mostraron coloraciones distintas a las indicadas.

Las altas productividades obtenidas con las cepas coloridas IE-136 y POROS, iguales a las de la cepa comercial PLEUS, las hacen de gran interés para un programa de mejoramiento genético ya que en ellas se combinan 2 características valiosas (Tabla 2). Las menores productividades presentadas por las otras cepas coloridas no representa una desventaja ya que son comparables a la productividad de la segunda cepa comercial, INIREB-8, la cual es ampliamente utilizada por productores locales de *Pleurotus* y en experimentos previos ha mostrado buenos

rendimientos (102 %) al tercer brote (Valencia del Toro *et al.*, 1997).

En este estudio se confirmó el efecto dedicariotizador de la peptona P (oxid) (Leal-Lara, 1980) que demostró ser muy efectiva con tres de las cepas de *Pleurotus* ya que fue posible recuperar sus 2 componentes monocarióticos aún a partir de un pequeño número de aislamientos (Tabla 3). Si bien nuevamente se observó la diferente susceptibilidad de las cepas a la dedicariotización (Arteaga-Santillan *et al.*, 1996), al aumentar el número de aislamientos es factible que se recuperen ambos tipos de neohaplontes de las 4 cepas que presentaron una dedicariotización asimétrica. Es también probable que aún realizando un gran número de aislamientos no se recupere el segundo componente del dicariote ya que como previamente se ha postulado (Arteaga-Santillan *et al.*, 1996), cada componente monocariótico de una cepa puede presentar diferente susceptibilidad a los distintos fenómenos que se han propuesto para explicar la dedicariotización, ya sea el efecto de sustancias tóxicas o bien la alteración del proceso de reproducción del material nuclear del protoplasma o de la pared celular dicariótica. No obstante las limitaciones anteriores, los componentes monocarióticos de algunas de las cepas coloridas estudiadas en el presente trabajo fueron recuperadas por dedicariotización.

Mediante apareamientos entre los neohaplontes recuperados en este estudio, fue posible precisar ciertas relaciones entre las distintas cepas coloridas, identificándose los 3 grupos de intersterilidad mostrados en la Tabla 4. Si bien existe la probabilidad de que alguno de estos 3 grupos interstériles corresponda a uno de los tipos complementarios, esta es bastante remota dado que se observa una clara separación de las cepas de acuerdo al color de sus esporóforos; las cepas de colores naranja y rosa se encuentran dentro del grupo 1 mientras que las cepas de colores grises se encuentran dentro de los grupos 2 y 3. Por otro lado ya que dentro del grupo 1 se encuentra la cepa IE 200, donada por el Instituto de Ecología como *Pleurotus djamur* var. *salmonostramineus*, las otras 4 cepas dentro de este primer grupo deberán pertenecer a esta misma especie a pesar de la diferencia en la coloración de esporóforos y esporas (Tabla 1). Estas contradicciones aumentan al considerar que dentro del grupo 1 se encuentra también la cepa POROS, que de acuerdo al donante pertenece a la especie *Pleurotus ostreatoroseus*.

Los resultados anteriores es poco probable que estuvieran influenciados por una pérdida de la capacidad de entrecruzamiento de los neohaplontes ya que no existe evidencia al respecto en investigaciones previas, (Leal-Lara, 1980; Ramírez-Carrillo, 1989; Arias-García, 1998). En todos los casos reportados, fue posible entrecruzar los neohaplontes obtenidos, ya sea entre aquellos de la misma cepa o bien aquellos provenientes de cepas diferentes, así como entre monocariotes meióticos y los neohaplontes recuperados.

En términos generales estos resultados remarcan la importancia de las pruebas de compatibilidad sexual para determinar la ubicación taxonómica de las diferentes cepas de *Pleurotus*, ya que su valor es de mayor peso que las características morfológicas que normalmente se han utilizado para la clasificación taxonómica (Petersen, 1995).

Los híbridos que se obtuvieron al aparear los neohaplontes de las diferentes cepas coloridas de *Pleurotus* son de gran valor. Con sus progenies podrá estudiarse la segregación del carácter que determina el color de los esporóforos en *Pleurotus*. Representan el punto de partida para el desarrollo de cepas con colores estables y novedosos ya que en estos híbridos se encuentra el material genético original de las cepas dicarióticas seleccionadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto IN 501696) de la DGAPA, UNAM y del proyecto 1019PB del CONACyT, y asimismo a la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo por su apoyo en la evaluación estadística de los resultados y por la revisión crítica del manuscrito.

Literatura citada

- Arias-García, A. 1998. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para el cultivo comercial por apareamiento entre neohaplontes. Tesis Maestría en Biotecnología. UNAM. México D.F.
- Arita, I., 1974. Genetic study of white fruit-bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 11:58-68.
- Arteaga-Santillán, S. E., R. Ramírez-Carrillo, H. Leal-Lara, 1996. Desdicarización excéntrica de *Lentinus* sp. *Rev. Mex. Micol.* 12: 15-21.
- Bresinsky, A., M. Fisher, B. Meixner, W. Paulus, 1987. Speciation in *Pleurotus* *Mycologia*, 79 (2): 234-245.
- Byung, M., K. Kyung-Soo, Y. Chang-Hyun, y C. Dong-Yeul, 1994. Variations in mitochondrial DNA of *Peurotus sajor-caju*. *Korean Journal of Mycology*, 22(2): 117-121.
- Corner, E. J. H., 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus*. *Men. Shiga. Univ.* 23: 37-43.
- Chang, S: T., S. H. Kwan, N. Y. Kang, 1995. Collection, characterization, and utilization of germ plasm of *Lentinula edodes*. *Canadian Journal of Botany*. 73 (suppl. 1): 995-961.
- Eger, G., G. Eden, E. Wissing, 1976. *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theor. Appl. Genet.* 47: 155-163.
- Komatsu, M., 1977. Fruit-bodies with white pilei of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 15: 55-64.
- Komatsu, M., K. Kimura, 1968. Studies on abnormal fruit-bodies of himenomicetous fungus. V. Fruit-bodies with white pilei of *Lentinus edodes* (Berk.). *Sing. Rep. Tottori Mycol. Inst.* 6: 9-17.
- Kornerup, A., J. H. Wanscher, 1967. *Methuen Handbook of colour*. Methuen & Co., Ltd., London.
- Kuppers, H. 1979. Atlas de los colores. Ed. Blume, Barcelona. España.
- Leal-Lara, H., 1980. Sporelessness in basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dedikarization method. Ph. D. Dissertation. Marburg University, Marburg/Lahn.
- Li, S. T., 1980. Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus* (Jack. Ex Fr.)Kummer. *Bibl. Mycol.* 76: 1-86.
- Martínez-Carrera D., 1997. Producción de *Pleurotus* en México. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología / IX Jornadas Científicas. Tapachula Chiapas, México.
- Murakami, S. T. Takemaru, 1990. Genetic studies of *Pleurotus salmoneostramineus* forming albino basidiocarps. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 28: 199-204.
- Neda, H., H. Furakawa, T. Miyagy, 1988. Two *Pleurotus* species from Okinawa. *Proc. Ann. Meet. Mycol. Soc. Jap.* 51.
- Petersen, H. R., 1995. Contributions of mating studies to mushrooms systematics. *Canadian Journal of Botany*. 73 (suppl.): 831-842.
- Ramírez-Carrillo, R. 1989. Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Tesis Maestría en Biotecnología. UNAM México D.F.
- Valencia-Del Toro, G, M. E. Garín-Aguilar, S. L. Vázquez, 1997. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa, cascarrilla y pajillas del café. *Productos Naturales Vol. 3*. UAM-IZTAPALAPA. ISBN 970-645-120-9.
- Vilgalys, R., A. Smith, B. L. Jun, O. K. Muller, 1993. Intersterility groups in *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Can J. Bot.* 71: 113-128.

Recibido: 9 de octubre 1999. Aceptado: 18 de diciembre 1999.
Solicitud de sobretiros: Gustavo Valencia del Toro

FRUIT BODY COLOR IN *PLEUROTUS* SPP HYBRID STRAINS OBTAINED BY MATINGS OF COMPATIBLE NEOHAPLONTS.

G. Valencia del Toro¹ and H. Leal-Lara²

¹Department of Chemistry, UPIBI, IPN; Research Division, FESI, UNAM; ²Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, National University of Mexico (UNAM), Cd. Universitaria, 04510 México D.F. <tavaltor@servidor.unam.mx >

ABSTRACT

Ten *Pleurotus* spp strains (ECS127_G, ECS187, IB67, IE202, IE200, IE201, INI8, POROS, RP and P15) producing fruit bodies of different colors were chemical dikaryotized to obtain their monokaryotic components (neohaplonts). When these neohaplonts were paired, 5 intersterile groups were recognized. Four strains producing sporophores of different colors were found in the first group, IB67 (gray), IE200 (white), PORO (pink) and RP (pink); their neohaplonts showing the compatibility factors A_mB_m and A_nB_n , respectively. A white (IE201) and a pink (IE202) strain are in the second group, their neohaplonts with compatibility factors A_oB_o and A_pB_p . Two gray strains, INI8 and ECS127, belong to the third group with compatibility factors A_qB_q and A_rB_r . In the fourth group a yellow strain was found, ECS187, with compatibility factors A_sB_s and A_tB_t . Similarly, a gray strain, P15, was found in the fifth group with compatibility factors A_uB_u and A_vB_v . Thirteen hybrid dikaryons were obtained by pairing neohaplonts from groups 1 and 2. The 13 dikaryons were grown on a commercial *Pleurotus* sp substrate and 11 hybrids produced gray fruit bodies. However, yellow fruit bodies were produced by two hybrids resulting from matings of neohaplonts from a white strain (IE201) and a pink one (IE202).

INTRODUCTION

The cultivation of edible mushrooms is an important biotechnological industry, the economic value of which has expanded all over the world in the last decades (Chang 1996, Roysc 1997). *Pleurotus* spp occupies the second place in worldwide mushroom cultivation. In Mexico, its annual production in 1990 was estimated at 356 tons of fresh mushrooms, followed by a marked increase (413%) to 1,825 tons in 1997 (Martinez-Carrera 1997, Sobal et al. 1997). Fruit body color is an extremely variable characteristic in *Pleurotus* spp and depending on cultivation conditions, fruit bodies of various colors, i.e. white, cream, brown, gray and blue gray, are produced (Eger-Hummel 1980, Li 1980). Studies with *P. djamor* have shown that this intersterile group is formed by three different phenotypic varieties with either white, gray or pink fruit bodies, denominated as *P. djamor*, *P. opuntiae* and *P. salmoneostramineus* or *P. ostreatoroseus* (Petersen 1995, Petersen and Ridley 1996, Petersen and Hughes 1999). A similar situation is presented for the *P. citrinopileatus* yellow strains and *P. cornucopiae* gray strains, that according to compatibility studies represent a single intersterile group in spite of their morphological differences (Petersen and Hughes 1999). The genetic study of fruit body color in *Pleurotus* spp is indispensable for a complete understanding of both the mechanisms involved in color expression and a correct classification of the species forming the *Pleurotus* spp complex. To study the mechanisms causing this phenotypic variation, strains were selected that steadily produced fruit bodies of the same color in repeated fruitings. Their monokaryotic components were obtained by chemical dikaryotization in order to produce hybrids for the study of fruit body color expression in such strains.

MATERIALS AND METHODS

Biological material.

Ten strains of *Pleurotus* spp were obtained from various sources: strains ECS127_G, ECS187 and PORO from Dr. J.E. Sanchez (ECOSUR, Chiapas of México); strains, IE200, IE201, IE202 and INI8 from Dr. Gaston Guzmán (Instituto de Ecología, Jalapa, Mexico); strain IB67 from M.C. Armando Arias (Universidad de Guadalajara, Mexico); and strains RP and P15 from Dr. Hermilo Leal Lara (National University of Mexico). All strains are stored in the culture collection of the Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, UNAM.

Culture Media

Malt extract agar (MEA) was prepared dissolving malt extract (15%) and agar (2%) in distilled water. It was sterilized in an autoclave at 121°C at 1.2 kg/cm² for 30 minutes and 10 ml sterile medium were poured into sterile petri dishes. After the medium solidified, plates were wrapped in plastic bags and incubated at 28°C for two days to check sterility and then used for storage of strains and propagation of mycelium.

Dedikaryotization solution was prepared dissolving glucose (2%) and peptone P (oxid) (2%) in distilled water. Fifty ml of this solution were poured into 125 ml Erlenmeyer flasks and sterilized in an autoclave (121°C at 1.2 kg/cm² for 30 minutes).

Blending of mycelial cultures.

Four agar cubes (ca. 0.5 cm) were cut from the edge of a growing colony and distributed on each MEA plate to produce mycelial cultures. After four days incubation at 28°C, colonies reached ca. 4 cm diameter. Fifty ml sterile cold water were poured into the sterile jar of a laboratory waring blender, and four colonies were cut and added to the jar. Agar cultures and water were blended at high speed for 60 seconds.

Recovery of neohaplonts from dedikaryotization solution.

Flasks with dedikaryotization solution were inoculated with 50 µl suspension of blended agar cultures and incubated at 28°C. When mycelium growth was visible, 100 or 200 µl of solution were used to inoculate MEA plates. The solution in the flask was poured in the sterile jar of a waring blender and then homogenized for 30 seconds at high speed. MEA plates were inoculated with 20 or 50 µl homogenate and then incubated at 28°C until mycelium growth was noticeable. Mycelium without clamp connections, i.e. monokaryotic type, was identified under the microscope (160x). Each colony was repeatedly sub cultivated in MEA to verify absence of clamp connections.

Identification of the 2 types of neohaplonts.

To identify the two component monokaryotic types of a dedikaryotized strain, two neohaplonts were randomly selected and paired on MEA plates with all recovered neohaplonts from this strain. Plates were incubated at 28°C. After 72 hours, plates were regularly inspected under the microscope to identify dikaryotic mycelium. To confirm a correct identification of all neohaplonts, two new neohaplonts were selected and paired again with all available neohaplonts.

Production of Hybrids

The recovered neohaplonts were propagated individually on MEA plates. Agar cubes (ca. 0.5 cm) were cut from the edge of a growing colony and distributed on each MEA plate to produce mycelial cultures. After four days incubation at 28°C, colonies reached ca. 4 cm diameter. To produce hybrid dikaryons, two neohaplonts were selected and paired on MEA plates, placing agar cubes from each colony close together. Plates were incubated at 28°C and regularly inspected under the microscope to identify dikaryotic mycelium.

Spawn

Wheat grains were washed and cooked for 50 min and then washed again to cool. Excess water was drained, CaSO₄ (1.3%) and CaCO₃ (0.3%) were added (w/w). Five hundred grams supplemented grain were packed in polypropylene bags and autoclave sterilized (2 h at 121°C at 1.2 kg/cm²). Bags with sterile grain were inoculated with mycelium from a seven day agar colony and incubated 21 days at 24°C.

Conditions for substrate incubation and fruiting

The pasteurized wheat straw substrate was provided by a commercial grower (Hongos Leben, Edo, Mexico). Substrate was placed in polypropylene-ethylene bags (32 cm x 49 cm). For each strain, five bags were inoculated with 5% spawn and incubated at 28°C. After 15 days, bags were transferred to the fruiting room and production of fruit bodies was induced by regular watering (three times a day for 20 min), two hours ventilation with humid air after each watering period, and 12 h illumination per day at a temperature of 15 and 30 °C.

RESULTS

Genetic studies of the expression of fruit body color in basidiomycetes require selection of strains that steadily produced fruit bodies of the same color in repeated fruitings. Numerous strains were obtained from different sources, in public and private culture collections. Their phenotypic characteristics were determined by repeated cultivation on MEA and commercial substrates. Table 1 shows ten strains that were finally selected as starting material for this investigation.

Table 2 shows the total number of neohaplonts recovered from each strain. Although it ranged from 5 to 12 neohaplonts, the two monokaryotic components were obtained in all cases. Furthermore, both neohaplont types were present in similar quantities, i.e. a symmetrical dikaryotization was accomplished (Leal-Lara 1980).

Pairings of neohaplonts from all strains in all possible combinations showed that these strains could be arranged in five intersterile groups (Table 3). Strains IB67, IE200, PORO and RP with gray, pink, white and pink fruit bodies, respectively, belong to the first group, with assigned compatibility factors $A_m B_m$ and $A_n B_n$. Strains IE201 and IE202 with white and pink fruit bodies are in the second group ($A_o B_o$ y $A_p B_p$). All strains with pink or white fruit bodies were contained in these two intersterile groups. It is possible that both groups could be complementary; in that case, the compatibility factors of the second intersterile group being $A_m B_n$ and $A_n B_m$. To clear such question, the meiotic progenies of representative strains from each group should be obtained and cross-paired. In the third intersterile group, two strains producing gray fruit bodies were found, INI8 and ECS127_G, with compatibility factors $A_q B_q$ and $A_r B_r$. Intersterile groups 4 and 5 are represented by just one strain, a yellow fruit body producing strain (ECS187) with compatibility factors $A_s B_s$ and

A_uB_t in group 4 and a gray fruit body producing strain (P15) with compatibility factors A_uB_u and A_vB_v.

Table 1. Mycelial growth and color of fruit bodies of *Pleurotus* spp strains.

Strain	Origin (Species)	Mycelial Growth ² (Type/Abundance)		Color ¹	
				Fruit Body	Spore print
ECS127 _G	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Pale yellow (12/2B)	Pale purple (3/7B)
ECS187	Ecosur Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus citrinopileatus</i>)	F	R	Yellow (9/1K)	Pale rose (3/1B)
IB671	U. de Guadalajara, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	EX	Pink gray (3/1B)	Brownish Yellow (10/2A)
IE200	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>sal</i>)	A	R	White (2/1A)	White (2/1A)
IE201	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>sal</i>)	A	R	White (2/1A)	White (2/1A)
IE202	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. djamor</i> var. <i>sal</i>)	A	EX	Coral pink (2/9F)	Peach (10/5B)
INI8	Inst. Ecología, Méx. (<i>P. ostreatus</i>)	F	EX	Pale yellow (12/2B)	Pale rose (3/1B)
P15	Pleos, Italia (<i>Pleurotus</i> sp)	F	R	Gray (35/4A o 36/6A)	Brownish Yellow (10/2A)
PORO	Stamets, USA (<i>P. ostreatoroseus</i>)	F	R	Pink Pearl (1/8F)	Peach (10/5B)
RP	Local grower, D.F. (<i>Pleurotus</i> sp)	A	R	Opera Pink (1/8B)	Peach (10/5B)

(1) The fruit body and spore print color were determined by color atlas of Maerz, and Paul 1950.

(2) Mycelial Growth. Type: A = cottony, F = filamentous; Abundance: EX = exuberant, R=average.

Table 2. Recovery of monokaryotic components (neohaplonts) of *Pleurotus* spp strains.

Dikaryotic Strains	Color of Fruit Bodies*	Recovered Neohaplonts			χ^2 Test for Symmetric recovery* (nh1:nh2 = 1:1)
		Total	Type nh1	Type nh2	
ECS127	Gray	12	6	6	0.00
ECS187	Yellow	8	5	3	0.50
1B67	Gray	5	2	3	0.20
IE200	White	15	8	7	0.06
IE201	White	12	7	5	0.33
IE202	Pink	5	3	2	0.20
INI8	Gray	7	2	5	1.28
P15	Gray	7	4	3	0.14
PORO	Pink	11	8	3	2.27
RP	Pink	9	3	6	1.00

*Fruit bodies color corresponds to the basic colors scale

* χ^2 reference value (P = 0.01)=11.34. Smaller χ^2 values indicate no significant differences

The resulting hybrids were cultivated on *Pleurotus* spp straw substrate to evaluate fruit body morphology. Hybrids resulted from pairings of neohaplonts belonging to group 1 (IB67₁xIE200₁, IB67₂xIE200₂, IB67₁xPORO₂, IB67₂xPORO₁, IE200₁xPORO₁, IE200xPORO₂, IB67₁xRP₂, IB67₂xRP₁, IE200₁xRP₁, PORO₁xRP₂, and PORO₂xRP₁) produced similar fruit bodies, i.e. all were gray colored, although all primordia were cream pink colored. Strikingly, the two hybrids obtained from neohaplonts belonging to group 2 (IE201₂xIE202₁ and IE201₁xIE202₂) produced yellow fruit bodies, a color notably different from the fruit bodies produced by the parental strains. White fruit bodies were produced by strain IE201 and pink ones by IE202. Lilac colored spore prints were produced by all these hybrids.

Hybrid strains IE201₂xIE202₁ and IE201₁xIE202₂ produced fruit bodies showing not only a striking difference in color but also remarkable variations in other morphological characteristics, i.e. primordia initiated as deformed round protuberances, which resulted in clusters gradually differentiated in numerous fruit bodies arising from the original protuberance.

DISCUSSION

The dedikaryotization effect of peptone P (oxid) (Leal-Lara 1980) was confirmed in this study. The two monokaryotic components of the ten *Pleurotus* sp strains treated in this study were recovered. This was possible even with a reduced number of neohaplonts (Table 2) after only 24 - 48 h incubation in the dedikaryotization solution, compared with the six days reported using the original method (Leal-Lara 1980). Moreover, both component monokaryons were symmetrically recovered (1:1). Even though the detailed mechanism for dedikaryotization of higher fungi is not yet known (Miles and Raper 1956, Tokimoto *et al.* 1978, Arita 1974) and the possible production of a toxic substance during sterilization of dedikaryotization solution has been mentioned, no variations were observed among neohaplonts in regards to mycelial growth or mating behavior (Leal-Lara 1980, Arias-García 1998, Valencia-Del Toro and Leal-Lara 1999).

By pairings neohaplonts, it was found that the *Pleurotus* spp strains producing colored fruit bodies were interrelated through the existence of five intersterile groups (Table 3). Group 1 contains a white strain (IE200), 2 pink strains (PORO and RP) and one pink gray strain (IB67). Taxonomic information about these strains is available only for IE200, which according to donors, belongs to *P. djamor* var *djamor* (Instituto de Ecología) and for POROS belonging to *P. ostreatoroseus* (Stamets) while no taxonomic classification was available for the other two strains. Full intercompatibility of these strains is not difficult to accept as long as the white and pink strains are concerned (Comer 1981, Neda *et al.* 1988, Petersen 1995, Petersen and Hughes 1999) and even when regarding strain IB67, with pink gray fruit bodies. On the other hand, taxonomic classification proposed by donors (Instituto de Ecología) for strains of the second intersterile group was confirmed by the results of neohaplont pairings, i.e. strain IE201 with white fruit bodies belonging to *P. djamor* var *djamor* and strain IE202, with pink fruit bodies, belonging to *P. djamor* var *salmoneostramineus*.

Table 4. Fructification of *Pleurotus* spp hybrid strains.

Strains	Characteristics of Fruit Bodies		
	Size (cm)	Weight (g)	Color
INTERSTERILE GROUP 1			
IB67 ₁ xIE200 ₁	5x7-6x8	9-22	Honey Beige (11/6C)
IB67 ₂ xIE200 ₂	6x8-7x10	9-14	Ivory (10/2B)
IB67 ₁ xPORO ₂	5x6-7x8	9-13	Yellow Orange (11/5C)
IB67 ₂ xPORO ₁	7x9-12x14	22-55	Brown Yellow (11/2B)
IB67 ₁ xRP ₂	5x7-6x8	9-22	Honey Beige (11/6C)
IB67 ₂ xRP ₁	7x8-7x10	9-14	Beige (11/2C)
IE200 ₁ xPORO ₁	8x8-8x10	20-35	Ivory (10/2B)
IE200 ₂ xPORO ₂	9x10-10x12	24-27	Cream (10/3D)
IE200 ₁ xRP ₁	5x6-8x8	9-14	Brown Yellow (11/2B)
PORO ₁ xRP ₂	8x10-13x14	23-56	Brown Yellow (11/2B)
PORO ₂ xRP ₁	8x8-6x16	21-38	Ivory (10/2B)
INTERSTERILE GROUP 2			
IE201 ₁ xIE202 ₂	6x7	10	Bright yellow (9/1K)
IE201 ₂ xIE202 ₁	5x6-6x7	11-12	Bright yellow (9/1K)

Separation of these seven rather similar strains into two different intersterile groups can be explained according to the following possibilities. The simplest, though very unlikely, is that compatibility types of strains belonging to group 2, IE201, IE202, correspond to the complementary types of group 1, i.e. they would be $A_m B_n$ and $A_n B_m$. Most likely, strains of each group belong to different biological species and therefore they are not compatible. However, the phenomenon of vegetative incompatibility, frequently observed among basidiomycetes (Larraya 1999) has to be considered. To clarify this issue, monokaryotic progenies from various strains belonging to each group should be obtained and cross-mated.

Two strains, INI8 and ECS127_G, both producing pale yellow fruit bodies belong to intersterile group 3, which can be assigned to *P. pulmonarius* according to the positive results obtained from pairings of their neohaplonts with tester strains provided by Dr H.R Petersen (data not shown). Intersterility of strain ECS187, the only one belonging to group 4, conforms to its assignment as *P. citrinopileatus* by donors, although closer examination should be undertaken to confirm this; i.e. morphological characteristics and pairings with corresponding American and European test strains. Similarly, such studies should be done with strain P15, the only one belonging to intersterile group 5. Summarizing, from pairing experiments, it can be clearly concluded that strains ECS187 and

P15, as well as the two strains producing yellow fruit bodies, INI8 and ECS127_G, are clearly separated from the pink and white strains selected for this study.

The production of yellow fruit bodies by hybrid strains IE201₂×IE202₁ and IE201₁×IE202₂ was unexpected since they were formed with neohaplonts originated from strains producing pink and white fruit bodies, respectively. They were therefore supposed to contain the genetic information to produce either white or pink fruit bodies. The yellow color in their fruit bodies may be codified by a single gene or a group of genes present in both hybrid strains. Eger-Hummel (1980) stated that fruit bodies of wild *P. ostreatus* present pigments from yellow to orange in very small amounts. The genetic information for this pigmentation may already exist in nature and its phenotypic expression may be triggered by various unknown factors. The way organisms regulate gene expression is an important clue to explain such results. They activate or deactivate genes responding to changes in environmental conditions, the key factors controlling morphogenesis in fungi (Eger-Hummel 1980, Kues and Liu 2000, Kues 2000). Production of yellow fruit bodies by hybrid strains can be also explained in terms of extrachromosomal factors that participate in the expression of white and pink fruit bodies in the parental strains. Dikaryotization involves separation of both monokaryotic components of the dikaryon; thus, communication of cytoplasmic factors with nuclei may be altered, inhibiting consequently normal expression of white or pink color. A similar situation has been observed in relation to the expression of the A compatibility factor in *Schizophyllum commune*, *Coprinus cinereus* and *Ustilago maydis*. A protein sub unit HD2, present in cytoplasm, must be joint to a protein sub unit HD1 found in the nucleus, to form an active transcription factor that should be transported within the nucleus to finally join DNA (Casselton and Olesnicky 1998, Kues and Liu 2000, Kues 2000).

The few studies about the chemical nature of such pigments confirm the complexity of this issue. They suggest both simultaneous presence of various types of pigments in fruit bodies and interchangeability of their structure with the resulting changes in colorations. Takekuma *et al.* (1994) purified an aqueous extract by gel filtration obtaining a chromo protein corresponding to the pink pigment of a *P. salmoneostramineus* strain producing pink fruit bodies. These authors reported the presence in the same extracts of a pale yellow glycoprotein with a β -structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grant IN208798 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of the National University of Mexico (UNAM)

REFERENCES

- Arias-García A. 1998. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para el cultivo comercial por apareamiento entre neohaplontes. *Tesis Maestría en Biotecnología*. UNAM, México D.F.
- Arita I. 1974. Genetic study of white fruit-bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 11:58-68.
- Casselton L.A., N.S. Olesnicky. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 55-70.
- Corner E.J.H. 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus*. *Men. Shiga. Univ.* 23:37-43.
- Chang S.T. 1996. Mushrooms research and development equality ans mutual benefit. *Mush. Biol. Mush. Prod.* 2: 1-10.
- Eger-Hummel G. 1980. Blue-light photomorphogenesis in Mushrooms (Basidiomycetes). *In reproduction in fungi*. C.G. Elliot (Ed.). Chapman and Hall, London.

- Kues U. 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 316-353.
- Kues U. and Y. Liu.. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- Larraya L., M.M. Peñas, S.P.G. Cruz, E. Ritter, G.A. Pisabarro and L. Ramírez. 1999. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to A incompatibility locus in white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 34: 486-493.
- Leal-Lara H. 1980. Sporelessness in basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dikaryotization method. *Ph. D. Dissertation*. Marburg University, Marburg/Lahn.
- Li S.T. 1980. Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus* (Jack. Ex. Fr.) Kummer. *Bibl. Mycol.* 76: 1-86.
- Martínez-Carrera D. 1997. Producción de *Pleurotus* en México. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología / IX Jornadas Científicas. Tapachula Chiapas, México.
- Mears A. and R.M. Paul. 1950. A dictionary of color. McGraw Hill. New York. U.S.A.
- Miles P.G. and J.R. Raper. 1956. Recovery of the component strain from dikaryotic mycelia. *Mycologia*. 48: 484-494.
- Neda H., H. Furakawa and T. Miyagy. 1988. Two *Pleurotus* species from Okinawa. *Proc. Ann. Meet. Mycol. Soc. Jap.* pp 51.
- Petersen H.R. and K. Hughes. 1999. Species and speciation in mushrooms. *Bioscience*. 49 (6): 440-452.
- Petersen H.R. 1995. Contributions of mating studies to mushrooms systematics. *Canadian Journal of Botany* 73 (suppl.) S831-S842.
- Peterson H.R. and S.G. Ridley. 1996. A new Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. *Mycologia* 88: 198-207.
- Royse D.J. 1997. Speciality mushrooms: consumption, production and cultivation. *Rev. Mex. Micol.* 13: 1-11.
- Sobal M.P., D. Morales, N. Martínez, W. Pegler and D. Martínez-Carrera. 1997. Cultivation of *Lentinus levis* in México. *Micol. Neotrop. Apl.* 10:63-71.
- Takekuma S., H. Takekuma, Y. Matsubara, K. Inaba and Z. Yoshida. 1994. A novel mushroom pigment: Isolation and characterization. *Journal American Chemistry*. 116: 8849-8850.
- Valencia-Del Toro G. and H. Leal-Lara. 1999. Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus* spp con cuerpos fructíferos de diversos colores. *Rev. Mex. Micol.* 15: 65-71