

302827
10
29°



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**APLICACION DEL METODO DE DEDICARIOTIZACION
QUE HACE USO DE PEPTONAS A CEPAS DE
Lentinus edodes.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :

**KARINA DE LACHICA GILES
EMIR SILVESTRE ARTEAGA SANTILLAN**

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

	Páginas
CAPITULO I INTRODUCCION	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Hipótesis	7
1.3 Objetivos	7
CAPITULO II ANTECEDENTES	8
2.1 Hongos comestibles.	8
2.2 Hongos cultivados.	11
2.3 Ciclo de vida de los Basidiomicetes.	14
2.4 <i>Lentinus edodes</i> .	16
2.4.1 Ciclo de vida.	17
2.4.2 Producción comercial.	20
2.5 Características nutricionales.	23
2.6 Propiedades medicinales.	27
2.7 Producción tradicional.	28
2.8 Método de dedicariotización.	34
2.9 Desarrollo de un nuevo método de dedicariotización.	38
CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1 Diagramas de flujo.	40
3.2 Materiales, reactivos y equipos	42
3.2.1 Materiales	42
3.2.1.1 Cepas fungicas	42
3.2.1.2 Sustratos	43

3.2.1.3	Material de laboratorio	43
3.2.2	Reactivos	43
3.2.3	Equipos	44
3.3	Metodología	44
3.3.1	Adaptación del método de dedicario_ tización a cepas de <i>Lentínus spp.</i>	45
3.3.2	Aplicación del método de dedicario_ tización a todas las cepas de <i>Lentínus spp.</i>	45
3.3.3	Aplicación del método alterno para la obtención de monocariotes.	46
CAPITULO IV	RESULTADOS Y DISCUSION	51
4.1	Resultados.	52
4.2	Discusión.	64
CAPITULO V	CONCLUSIONES	66
CAPITULO VI	APENDICE	68
	BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema

Lentinus edodes es un hongo comestible sumamente apreciado por sus características sensoriales y farmacológicas. Su cultivo se remonta a varios cientos de años, teniendo noticias de que hace alrededor de 800 años se desarrolló una forma primitiva de su cultivo en China, llamada Hoang Ko. Otros autores ubican la aparición de las primeras técnicas de cultivo hacia el año 1100 A.C. (31).

De los hongos comestibles cultivados *Lentinus edodes* mejor conocido como Shiitake actualmente ocupa el segundo lugar en la producción mundial con 314 mil toneladas anuales. Esta cifra es superada sólo por el champiñón. Los precios en el mercado de este hongo son muy variables: fluctúan entre 60 y 240 nuevos pesos el kilo de hongo seco. Esta variación depende de la calidad de los cuerpos fructíferos. En los países productores se consume en fresco y su precio fluctúa entre 24 y 30 nuevos pesos el kilo. Dependiendo de la humedad de los hongos, un kilo de hongo seco se obtiene secando entre 7 y 10 kilos de hongo fresco (humedad aproximada 90%) (12).

Considerando el valor comercial de *Lentinus spp* y la gran disponibilidad local de desperdicios agrícolas

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

(utilizados como sustratos) resulta una posibilidad sumamente atractiva para nuestro país; ya que México es un país básicamente agrícola, con una extensión territorial muy grande y por ello, cuenta con una gran cantidad de climas y tipos de vegetación, los cuales confluyen en la formación de mosaicos ecológicamente distintos y con características propias. En el sector agrícola, los cultivos de mayor importancia son el maíz, el frijol, el sorgo, el trigo, la caña de azúcar y el café, entre otros, los cuales generan gran cantidad de residuos lignocelulósicos. De estos cultivos; el café constituye el producto más importante de exportación en México. Una de las opciones más viables y prometedoras de la utilización práctica de los desechos producidos en la industrialización del café, la podría constituir el cultivo de los hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus* y *Volvariella bakeri* en tales medios, ya que el rápido crecimiento de estos organismos, repercutiría en la obtención de una biomasa con alto contenido de proteína en base seca.

Cabe mencionar que desde el punto de vista etnomicológico, el papel que juegan los hongos comestibles en México es de gran importancia, ya que desde tiempos prehispanicos al presente se utilizan en la alimentación. Se sabe que existen más de 200 especies comestibles que crecen en diversos tipos de bosques y que son consumidos en grandes

cantidades por la población indígena y campesina del país, o en menor grado por la población urbana y suburbana, mediante la venta de estos hongos en los mercados locales (23). Sin embargo las cepas actuales presentan serias desventajas entre las cuales podemos mencionar la especificidad de sustratos y periodos de incubación muy prolongados. Por ello sería necesario llevar a cabo un mejoramiento genético de las cepas disponibles en la actualidad, con el fin de mejorar las siguientes características: tiempo de incubación, especificidad de sustratos, rendimientos, condiciones ambientales y morfología.

Existen en general dos formas de lograr un mejoramiento genético de las cepas. Con el procedimiento convencional se hacen fructificar las cepas que van a ser mejoradas, de los esporóforos obtenidos se recolectan las esporas y con estas se realiza un entrecruzamiento de las cepas compatibles. De esta manera se obtienen híbridos que se prueban en términos de las características que se desean mejorar. Este método resulta sumamente tardado y no asegura la obtención de cepas con las características deseadas, debido a que las cepas obtenidas son combinaciones aleatorias y además se obtienen después del proceso de meiosis, donde ya hubo recombinación genética.

El segundo método de mejoramiento genético únicamente puede aplicarse a cepas de tipo dicariótico. Dentro de los hongos comestibles cultivados en la actualidad, *L. edodes* y *P. ostreatus* presentan un ciclo de vida donde se alternan las fases monocarióticas y dicarióticas. Un dicariote caracterizado microscópicamente por la presencia de fibulas, es el resultado de la fusión citoplasmática de dos micelios primarios compatibles o monocariotes. Con este método se puede lograr un mejoramiento genético mediante la separación de cepas dicarióticas con vigoroso crecimiento miceliar, en sus dos componentes monocarióticos. Posteriormente los componentes monocarióticos obtenidos de diferentes cepas dicarióticas son apareadas en todas las posibles combinaciones para después evaluar a los dicariotes resultantes.

En este método se tiene la ventaja de reducir el tiempo requerido para aislar los genotipos presentes en las cepas dicarióticas, debido a que no es necesario obtener el cuerpo fructífero del hongo para la recuperación de la progenie. Aunado a lo anterior los monocariotes separados de las cepas dicarióticas se obtienen sin intervención de la cariogamia y división reductora, lo que significa que de esta manera se obtiene el material genético original de los componentes monocarióticos de la cepa comercial, es decir sin la alteración causada por la división meiótica. Sin embargo,

4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

esta metodología no ha sido probada hasta la fecha para cepas del género *Lentinus*.

La separación artificial de los dicariotes, también conocida como dedicariotización ha sido intentada en el pasado por varios procesos que pueden ser agrupados en métodos mecánicos y químicos. El micelio sin fibulas recuperado después de la dedicariotización es llamado neohaplonte; término introducido por Fries y Aschan para designar un micelio monocariótico derivado de un dicariótico sin intervención de la cariogamia y división reductora. (10).

Harder introdujo la llamada operación micro-quirúrgica. Las cepas adecuadas para este proceso deben presentar células cortas, fibulas largas, hifas simples, ramificadas y no sensibles a la contaminación. (13). La metodología para el tratamiento de las células se ve fuertemente influenciada por numerosos factores del medio ambiente como: temperatura ambiente, humedad, edad y tipo de nutrimento en el medio. Por lo tanto el éxito de la operación era poco reproducible y los neohaplontes se recuperaban con muy bajas frecuencias. La frecuencia más elevada se obtuvo para *Schizophyllum commune* con tan solo el 20%. De acuerdo a los resultados de Harder y Fries la dedicariotización quirúrgica para cepas de: *Pholiota mutabilis*, *Schizophyllum commune*, *Polyporus abietinus* y *Collybia velutipes* no fue satisfactoria. (10,14).

La dedicariotización química inicialmente se realizó haciendo uso de sustancias altamente tóxicas como desoxicolato de sodio o ácido cólico (26). Con este tipo de sustancias se observó que sólo un núcleo del dicarion era recuperado (10,18,26,39). Adicionalmente, el uso de sustancias altamente tóxicas inhibía fuertemente el desarrollo miceliar y los cultivos tenían que ser incubados de seis a dieciséis semanas. El único estudio realizado para *Lentinus spp*, utilizó para la dedicariotización taurocolato de sodio, observándose la recuperación de un sólo núcleo de la cepa dicariótica (27). Hacia 1980 se instrumentó una técnica nueva que hace uso de una solución de peptona, como medio para propiciar la dedicariotización de las cepas. Con esta técnica se observó que para todas las cepas probadas fue posible recuperar ambos núcleos. Esto sugiere que el uso de sustancias tóxicas propicie la recuperación de un sólo núcleo. (20). Sin embargo, en este estudio no se probaron cepas de *Lentinus spp*.

1.2 Hipótesis

El método de dedecariotización que hace uso de peptonas ha sido probado en algunas cepas de basidiomicetos de los géneros *Pleurotus* y *Coprinus* logrando recuperar ambos núcleos por lo que se espera pueda ser exitoso para cepas de género *Lentinus* en las cuales éste método no ha sido aplicado.

1.3 Objetivos

A) Obtener al menos uno de los dos núcleos de cada una de las cepas de *Lentinus spp* para su posterior mejoramiento.

B) Observar si por simple entrecruzamiento de los monocariotes obtenidos es posible obtener nuevas cepas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hongos comestibles.

Los hongos crecen en forma de filamentos microscópicos llamados hifas las cuales forman el micelio al extenderse y ramificarse. El micelio constituye la fase vegetativa del desarrollo fúngico y puede presentar un desarrollo ilimitado en tiempo y espacio. La fase sexual de los hongos esta representada por la producción de basidiosporas.

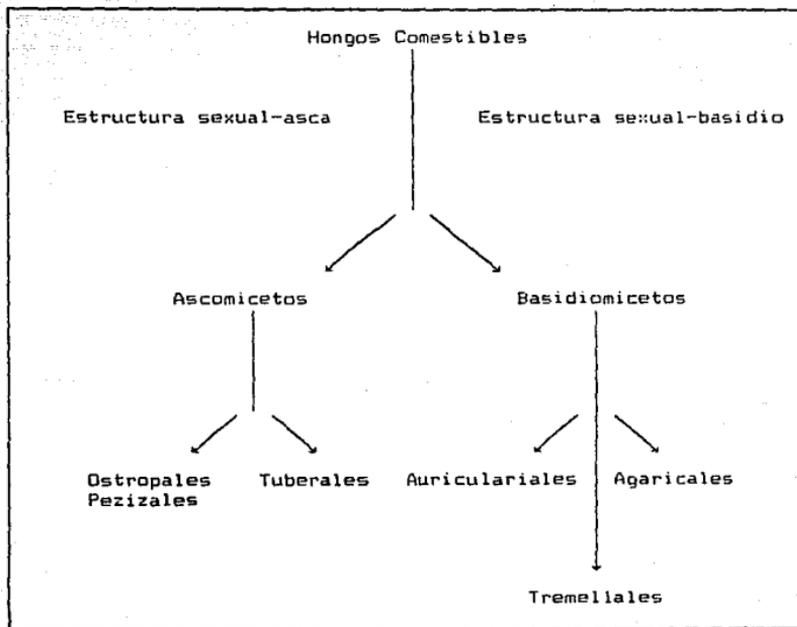
Debido a la naturaleza filamentososa de los hongos y a su carácter heterotrófico se les ha clasificado dentro de un reino aparte del vegetal y animal. Dentro del reino fúngico se han reconocido cuatro clases que son: Zigomycetes y Oomycetes, Basidiomycetes, Ascomycetes y Deuteromycetes. La mayoría de los hongos comestibles pertenecen a la clase de los Basidiomycetes, con basidios no septados y generación de cuatro esporas por cada basidio. El basidio es el sitio donde se lleva a cabo la división nuclear o meiosis y cada basidiospora recibe un núcleo derivado de la meiosis (9).

La Figura 1 describe el mayor agrupamiento de hongos comestibles; basados en la etapa sexual. Así como los hongos cultivados son de interés, los Basidiomycetes son los más importantes; y de los cuatro subgrupos mencionados; los Agaricales representan la mayoría de los hongos producidos

comercialmente, dentro del cual el género *Agaricus* es el más popular (34).

FIGURA 1

Clasificación general de los hongos comestibles.



(5)

Además de la clasificación dada en la Figura 1: la cual esta basada en la estructura sexual; Chang y Hayes clasificaron a los hongos comestibles de acuerdo a su habitat natural, detectando cinco grupos:

- (i) Hongos que crecen sobre desechos frescos o semi frescos o en residuos de plantas; *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*.
- (ii) Hongos que crecen en materiales ligeramente complejos; *Volvariella volvacea* y *Coprinus comatus*.
- (iii) Hongos que crecen en sustratos muy complejos; *Agaricus bisporus*.
- (iv) Hongos que crecen en tierra y humus; *Lepiota procera* y *Morchella esculenta*.
- (v) Hongos Micorrísicos que requieren condiciones simbióticas; *Bolletus edulis* y *Tuber melanosporum*.

Este criterio utilizado por Chang para clasificarlos ayuda a su identificación y cultivo sobre nuevos sustratos. Otros criterios usados en estudios taxonómicos y filogenéticos de estos hongos son el color, tamaño y forma microscópica de las esporas. (34).

El término hongo comestible se aplica a la estructura resultante de la fase reproductiva conocida como cuerpo fructífero o carpóforo, perteneciente a especies cuyo consumo

no provoca ninguna manifestación de toxicidad para el género humano (34).

Los hongos comestibles son macromicetos; que pueden ofrecer una alternativa barata y nutritiva de un alimento para humanos a gran escala y forraje para animales. El mejoramiento genético de los hongos comestibles requiere de investigaciones sistemáticas para establecer hechos y principios para un desarrollo posterior.

2.2 Hongos cultivados

Los hongos comestibles cultivados son aquellos cuyos cuerpos fructíferos se obtienen como resultado de la comercialización del proceso de cultivo de las cepas comestibles (34).

El cultivo de hongos comestibles en la actualidad, se ha manifestado como una alternativa para satisfacer en gran medida, las necesidades proteicas y nutricias de la población que habita en los países subdesarrollados; en función de su bajo costo de producción, alto contenido proteínico y su obtención en grandes cantidades en un lapso relativamente corto.

De las quince especies de hongos cultivados comercialmente a gran escala en diferentes partes del mundo, trece se encuentran creciendo en forma natural en diferentes zonas boscosas de México y consecuentemente pueden llegar a producirse en el país (Tabla 1) (5,7,23).

Tabla 1

Especies de hongos comestibles que crecen en México y que son susceptibles de ser cultivados.

Agaricus bitorquis (Quéf.) Sacc.
Flammulina velutipes (Curt. ex Fr.) Sing.
Phallota mutabilis (Scha. eff. ex Fr.) Kumm.
Lentinus cubensis (B. & C.) Sing.
Pleurotus smithii Guzmán.
P. ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kumm.
P. cornucopiae (Paul. ex Fr.) Gill
Volvariella bombycina (Shaeff. ex Fr.) Sing.
V. bakeri (Murr.) Shafter.
Auricularia fusco-succinea (Mont.) Farl.
A. polytricha (Mont.) Sacc.
Tremella fuciformis Berl.
Diclyophora industrialis (Vent. ex Pers.) Desv.

(23)

Nota:

De los hongos señalados en esta tabla, Lentinus cubensis probablemente es un sinónimo de L. edodes.

La palabra combinada "hongos cultivados" se refiere a los cuerpos fructíferos macroscópicos u hongos comestibles los cuales son cultivados comercialmente. Estos hongos crecen artificialmente; bajo condiciones ambientales y nutrimentales controladas. Para su cultivo se utilizan materiales de desperdicio que contienen grandes cantidades de lignina y celulosa o medios específicos.

El primer hongo cultivado y en la actualidad el más difundido, cultivado y estudiado, es el *Agaricus bisporus*. Este hongo se cultiva sobre composta de estiércol de caballo y paja. Se consume principalmente en Europa y Estados Unidos de América. El desarrollo biotecnológico a través de los años ha hecho posible que las técnicas de cultivo puedan ser adaptadas para otros hongos. Los cuatro hongos más populares son: el hongo Japonés ó shiitake, *L.edodes*; el hongo de invierno, *F. velutipes*; el hongo Chino cultivado en cascarilla de arroz y paja, *V. volvacea* y el hongo ostra, *P. ostreatus*, así como otras especies de *Pleurotus*. (34).

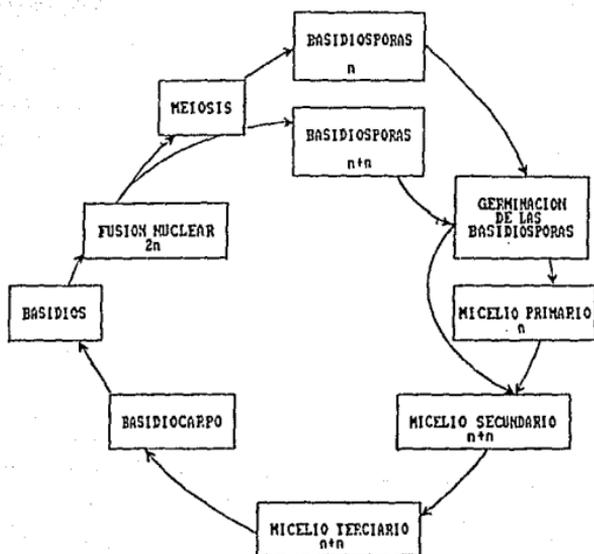
Recientemente, se ha observado en México un marcado interés por la producción comercial de hongos comestibles. En la actualidad existen algunas empresas dedicadas al cultivo de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus spp.*, conocidos en el mercado nacional como champiñón y setas, respectivamente.

2.3. Ciclo de vida de los Basidiomycetes.

En el ciclo de vida de un basidiomycete típico (Figura 2), el micelio se obtiene de la germinación de las esporas, el cual rápidamente se convierte en micelio septado y uninucleado. Este micelio conocido como primario por lo general no es capaz de producir cuerpos fructíferos. Para que éstos se produzcan, debe haber interacción entre dos micelios compatibles y así dar origen al micelio binucleado o secundario. La compatibilidad de los micelios puede estar regulada por uno o dos factores (A ó A y B). La organización del micelio secundario por factores genéticos y ambientales da origen al micelio terciario. Este constituye al basidiocarpo o cuerpo fructífero, donde se desarrolla el basidio y ahí se generan las esporas. Para ello primero hay una fusión nuclear (siendo éste el único momento en el cual los hongos son diploides o $2n$) a continuación se presenta la meiosis, la cual da origen a cuatro núcleos haploides (n). Estos núcleos pueden generar esporas uninucleadas en las especies heterotálicas o binucleadas para las especies homotálicas. (15).

FIGURA 2

Ciclo biológico general de los Basidiomicetes.



(15)

2.4 Lentinus edodes

Traído probablemente de China hace cientos de años, *Lentinus edodes*, mejor conocido como shiitake en el mercado internacional, es una especie comestible ampliamente consumida en el sureste de Asia, donde se ha cultivado empleando técnicas bastante sencillas. La producción anual de este hongo a nivel mundial alcanza las 314,000 toneladas. Dicha producción tiene lugar fundamentalmente en Japón, China, Taiwan, Corea y Tailandia; donde se cultiva sobre troncos o aserrín de diversas especies de árboles; pertenecientes principalmente a la familia *Fagaceae*.

Shiitake ha sido clasificado bajo diferentes nombres: *Cortinellus shiitake*, *Cortinellus edodes*, *Cortinellus berkeleyans*, *Armillaria edodes* y *Lentinus edodes* (33). Actualmente se le clasifica dentro de la clase de los basidiomicetes; orden Agaricales, familia *Tricholomataceae*, género *Lentinus*, especie *edodes*. Se conocen diferentes especies silvestres comestibles, sin embargo, *Lentinus edodes* es la más conocida y cultivada en el mundo.

Este hongo se caracteriza por presentar guanosina 5' monofosfato, compuesto que le confiere un sabor distinto. Por otra parte, contiene un compuesto conocido como lentionina, el cual es una sustancia aromática que lo caracteriza.

Lentinus edodes es un hongo que contiene vitamina D₂ cuya formación es inducida por el secado de los cuerpos fructíferos al sol o con radiación ultravioleta.

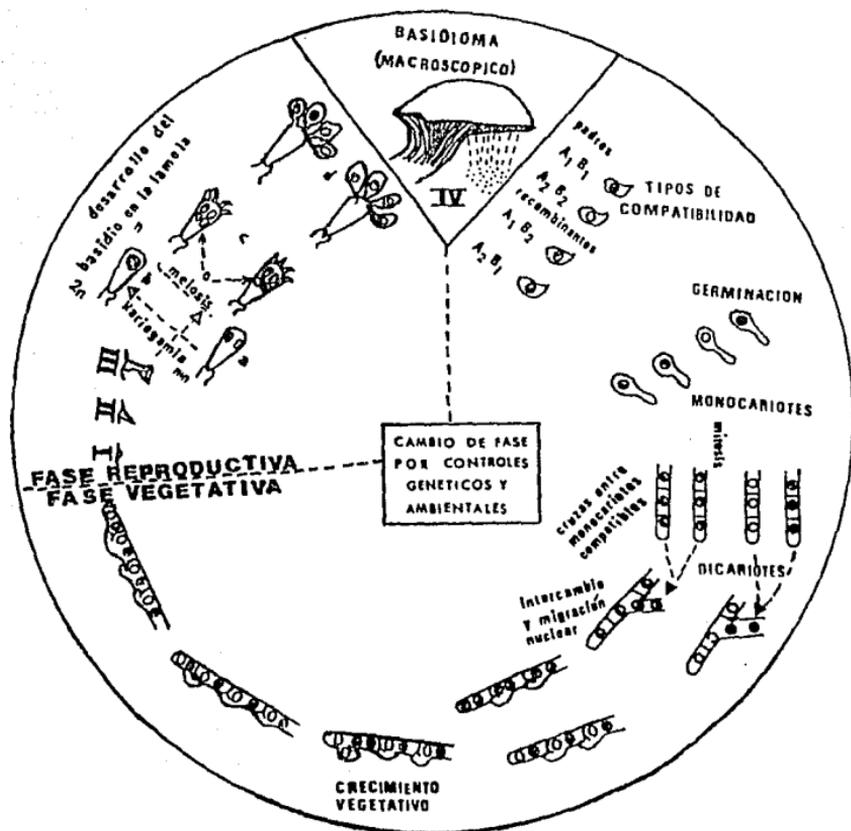
Shiitake es un hongo de la pudrición blanca de la madera (son aquellos que consumen a los componentes estructurales de los tallos de las plantas superiores: hemicelulosa, celulosa y lignina) que posee un complejo enzimático con grandes posibilidades de aplicación. En primer lugar la transformación de la madera en cuerpos fructíferos utilizados en la alimentación del hombre, simultáneamente favorece la descomposición de la madera para su posterior utilización como alimento de ganado ó para la producción de pulpa de papel o de otros productos, dada la selectividad para descomponer la lignina. La transformación de la lignina en los productos señalados depende de la eficiencia en la degradación de ésta (33).

2.4.1 Ciclo de vida de *Lentinus edodes*.

El ciclo de vida de *Lentinus edodes* es el mismo que presenta un Agarical típico. Sus basidiosporas uninucleadas germinan sin presentar un tubo germinal, produciendo un micelio uninucleado haploide extendido, conocido como homocarión. La división nuclear se presenta como una constricción del núcleo elongado. El homocarión tiene cuatro

polaridades diferentes no diferenciadas morfológicamente. Durante la fase sexual la fusión de dos talos compatibles forma el dicarion. El micelio sigue creciendo hasta la formación de un primordio, que posteriormente se desarrolla en un estípite y un píleo. Esta última estructura se encuentra formada por el himenio. El plegamiento del himenio produce las láminas, mismas que se forman continuamente en la parte inferior del cuerpo fructífero. El himenio desarrolla células terminales especializadas. El basidio es inicialmente binucleado y es el sitio en donde se lleva a cabo la fusión nuclear y la meiosis. La fase diploide es muy corta y del esterigma surgen cuatro basidiosporas sobre la superficie externa del basidio. Las basidiosporas se liberan finalmente del esterigma y el ciclo se inicia nuevamente .(Fig.3) Una característica morfológica de *Lentinus edodes* es que carece de anillo y volva en el cuerpo fructífero (33).

FIGURA 3
CICLO DE VIDA DE LENTINUS EDODES



(15)

- I Primordios
- II Basidioma con láminas.
- III Desarrollo del basidio
- IV Basidioma macroscópico

2.4.2 Producción comercial de *Lentinus edodes*.

La producción comercial de *Lentinus edodes* se realiza sobre troncos de maderas duras incubados bajo condiciones naturales, de 12 a 24 meses, periodo en el cual se propicia su desarrollo vegetativo. Una vez que los troncos son invadidos con micelio vegetativo se le dan las condiciones necesarias para promover la fructificación (33).

La producción y consumo de *Lentinus edodes* se han visto incrementadas a partir de la segunda guerra mundial, no sólo en el número de personas que lo consumen, sino también en cuanto al consumo per-capita (31). Actualmente el principal país productor es Japón con un 80% de la producción mundial. No obstante, diferentes países occidentales como Canadá, Estados Unidos de América y algunos países europeos han instrumentado su producción.

De los hongos comestibles cultivados Shiitake ocupa el segundo lugar en la producción mundial con 314 mil toneladas anuales (8), cifra superada sólo por el champiñón (Tabla 2). Los precios en el mercado de este hongo son muy variables dependiendo de la calidad de los cuerpos fructíferos.

El shiitake fue cultivado por primera vez en México en 1984 por la empresa "Hongos Leben, S. de R.L. de C.V.", en

Guadalupe Victoria, estado de México. El cultivo se llevó a cabo usando como sustrato aserrín de encino (especie no determinada), almidón, levadura deshidratada y sulfato de calcio, empleando una modificación de la técnica descrita por la patente de la Compañía Kinoko de E.E.U.U. (23).

El cultivo comercial del shiitake en nuestro país es prometedor y representaría una actividad con enorme potencial de exportación, ya que puede deshidratarse y comercializarse sin dificultad. Estados Unidos de América actualmente es uno de los mayores consumidores de shiitake seco proveniente del Japón.

Gracias a las propiedades medicinales (antivirales y antitumorales) recientemente descubiertos en esa especie, existe una tendencia generalizada de aumento en el consumo tanto en E.E.U.U. como en Europa (24).

Tabla 2.

Producción mundial de hongos comestibles en 1986.

ESPECIE	NOMBRE COMUN	PESO (miles TON)	%
<i>Agaricus bisporus</i>	Hongo en botón (champiñon)	1 227	56.2
<i>Lentinus edodes</i>	Shittake	314	14.4
<i>Volvariella volvacea</i>	Hongo de la paja	178	8.2
<i>Pleurotus spp.</i>	Hongo ostion	169	7.7
<i>Auricularia spp.</i>	Hongo oreja de la madera	119	5.5
<i>Flammulina velutipes</i>	Hongo de invierno	100	4.6
<i>Tremella fuciformis</i>	Hongo oreja de plata	40	1.8
<i>Pholiota nameko</i>	Nameko	25	1.1
Otros		10	0.5
TOTAL		2 182	100.0

(6)

2.5 Características nutrimentales

Es común comparar entre sí a los alimentos por su contenido proteico. En el caso de los hongos ocurre lo mismo, de aquí que haya tablas que comparen el contenido proteico de los hongos con la carne u otros productos. Sin embargo, se han fijado otros parámetros de comparación tales como el contenido de aminoácidos esenciales presentes en el alimento, con respecto a los requerimientos de la dieta humana (Índice nutrimental) (31). En la Tabla 3 se reportan datos con algunos índices nutrimentales y en la cual se ubica *Lentinus edodes* con sólo 13 puntos de valor nutrimental en comparación de los 54 puntos para el pollo y 31 para la soya, pero encima de 11 puntos para el maíz (30). Por otra parte, en la tabla 4 se muestran los datos comparativos de la composición porcentual de diversos hongos comestibles, (2). Estos datos indican que *Lentinus edodes* tiene bajo contenido de proteínas (13.4%) si se compara con otros hongos de consumo usual en México como *Pleurotus ostreatus* (26.6% de proteína), sin embargo *Lentinus edodes* es un hongo rico en hidratos de carbono (70.7%) y por lo tanto de alto valor energético (392 Kcal/100g).

Finalmente en la tabla 5 se muestra que *Lentinus edodes* puede proporcionar cantidades apreciables de tiamina y ácido nicotínico y algunos nutrimentos inorgánicos como calcio,

sodio, fosforo y fierro (2).

Tabla 3.

Valor nutritivo de *Lentinus edodes* en comparación con otros alimentos.

INDICE NUTRIMENTAL	ALIMENTO
59	Pollo
43	Carne de res
35	Carne de cerdo
31	Soya
26	Espinacas
21	Frijoles
20	Cacahuete
17	Col
14	Pepino
13	<i>Lentinus edodes</i>
11	Maiz
10	Nabo
9	Papa
8	Tomates
6	Zanahoria

(30)

Nota:

El índice nutritivo es proporcional al contenido de aminoácidos esenciales presentes en el alimento, referidos a los requerimientos de la dieta humana.

Tabla 4.

Composición química proximal de diferentes especies
de hongos comestibles cultivados.

ESPECIE	HUMEDAD INICIAL	PROTEINA CRUDA (NX6.25) %	GRASAS %	CARBOHIDRATOS COMO GLUCOSA %	FIBRA %	CENIZAS %	Kcal sobre 100g
<i>Agaricus brunnescens</i>	88.7	23.9	8.8	52.1	8.0	8.0	381
<i>Lentinus edodes</i>	91.8	13.4	4.9	70.7	7.3	3.7	392
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	90.9	26.6	2.0	50.7	13.3	6.5	300
<i>Pleurotus ostreatus</i>	90.8	38.4	2.2	48.9	8.7	9.8	345
<i>Volvariella volvacea</i>	90.1	21.2	10.1	47.5	11.1	10.1	369
<i>Volvariella diplasia</i>	90.4	40.6	2.6	---	17.4	11.5	---

(2)

Nota:

Los datos se reportan en base seca, la humedad corresponde al porcentaje de peso fresco y el valor energético son las Kcal/100 g peso seco.

Tabla 5.

Contenido de vitaminas y nutrimentos inorgánicos (mg/100g de peso seco) de diferentes especies de hongos cultivados.

ESPECIE	<i>Agaricus brunnescens</i>	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Volvariella volvacea</i>
TIAMINA	8.90	7.80	4.80	1.20
RIBO- FLAVINA	3.70	4.90	4.70	3.30
ACIDO NICOTI- NICO	42.5	54.9	100.7	91.9
ACIDO ASCORBICO	26.5	0	0	20.2
Ca	71.0	98.0	33.0	71.0
Fe	8.8	8.5	15.2	17.1
K	2850	0	3793	3455
Mg	0	0	0	0
Na	106	61	837	374
P	912	476	1348	677

(2)

2.6 Propiedades medicinales.

En la medicina tradicional China y Japonesa *Lentinus edodes* ocupa un lugar importante por las propiedades curativas que se le atribuyen (36).

Se ha probado la presencia de una sustancia llamada eritadenina la cual reduce los niveles de colesterol en plasma. En pruebas realizadas en ratas, la excreción de colesterol se incrementa, debido quizá a la aceleración en el transporte (33). En el hombre también se ha observado este efecto en individuos sometidos a la ingestión de Shiitake durante una semana (37). Algunas sustancias aisladas del cuerpo fructífero como el polisacárido lentionina, por ejemplo, inhiben el sarcoma implantado en un ratón hasta en un 80%. Además, impide su desarrollo en un 100% si la sustancia es administrada antes de la implantación. Los extractos de esporas de *Lentinus edodes* se han utilizado de manera efectiva contra el virus de la influenza (37). Así mismo, se han encontrado sustancias que estimulan la respuesta inmune y la producción de interferón. Por último, de los cuerpos fructíferos del hongo se han aislado algunas proteínas que pudieran ser utilizadas contra algunos virus de plantas. (19).

2.7 Producción tradicional

2.7.1 Inóculo

Actualmente la producción de *Lentinus edodes* tiene lugar principalmente sobre troncos de árboles de madera dura. Como inóculo se utilizan trozos de troncos de encino en forma de bastón, generalmente de 1.5 cm de diámetro y 2.0 cm de largo aproximadamente y salvado de trigo. Estos se remojan y colocan en botellas para posteriormente ser esterilizados en autoclave. Después de ello, se inocula con micelio. Las botellas se incuban entre 24 y 28°C (3).

2.7.2. Preparación de inóculos

La preparación de inóculos representa un paso importante en la producción de *Lentinus edodes*. En los cultivos sintéticos siguen empleándose pequeños troncos de encino suplementados con salvado de arroz. Se han empleado, otros sustratos para el inóculo: granos de maíz (28), granos de arroz suplementados con aserrín de encino y carbonato de calcio (30), granos de trigo mezclados con aserrín y salvado de trigo (1), aserrín mezclado con salvado de arroz y trozos de madera. Así mismo se han propuesto medios líquidos como el Zapeck y melaza, extracto de malta y extracto de levadura, extracto de levadura, peptona y glucosa y glucosa-alanina

entre otros, para preparar inóculos en cultivos sumergidos (35).

2.7.3. Inoculación e incubación de troncos

El tiempo óptimo de tala de los árboles que se emplean para el cultivo es entre otoño y el inicio de la primavera. Se talan en otoño debido a que en esta época la corteza de la madera es gruesa evitando la invasión de otras especies de hongos. Por otra parte, el contenido de azúcar se incrementa considerablemente en los troncos permitiendo su fácil acceso al micelio que los invade. De los árboles talados se cortan leños de 1 a 1.5 metros de largo y de 5 a 15cm de diámetro. Se hacen entre 15 y 20 cavidades por cada tronco de forma tal que coincida con el tamaño del inóculo. Una vez que los inóculos han sido insertados en cada incisión, ésta se cubre con cera para evitar la evaporación.

Después de la inoculación, las "camas de leños" se colocan en posición favorable para el desarrollo del micelio en un patio de tendido que suelen ubicarse en los bosques. La humedad en los patios de tendido no debe ser excesivamente alta pues ello favorecería la contaminación con Ascomycetes y/o Basidiomycetes principalmente. Por otra parte, si en estos patios no se mantiene la humedad suficiente, las pilas se secarán. Este es el punto más importante a controlar. Es

necesaria una buena circulación de aire en los patios de tendido. Las temperaturas óptimas de crecimiento micelial oscilan entre 24°C y 28°C.

Generalmente el crecimiento del micelio sobre el tronco alcanza su máximo desarrollo en un periodo comprendido entre un año y un año y medio a partir del momento de la inoculación. Al final del crecimiento vegetativo los troncos suelen ser trasladados a un patio de cultivo para dar las condiciones de fructificación (3).

2.7.4. Sustratos utilizados en la producción de *Lentinus edodes*

Se ha puesto mucho énfasis en la productividad y el crecimiento de *Lentinus edodes*, que están muy relacionados con el tipo de madera que se emplea en su producción (12). Los productores japoneses señalan a algunas especies de encinos como los más aptos para su cultivo. Los resultados de la mayoría de los experimentos realizados con medios sintéticos, indican que los aserrines de especies de *Quercus* son los mejores para la producción. No obstante, se han empleado fuentes alternativas de aserrines de maderas duras y blandas suplementadas para obtener mejores rendimientos.

En sustratos de aserrín el crecimiento micelial se evalúa haciendo una estimación visual de su desarrollo vegetativo. También pueden estimarse los cambios que ocurren en la composición del sustrato, tales como la disminución de peso seco, cambios en el pH, en la humedad, en la concentración de glucosamina y por último, cambios en los títulos enzimáticos.

El contenido de agua en los sustratos de aserrín afecta en gran medida el crecimiento micelial de *Lentinus edodes*. En los sustratos cuyos contenidos de agua son menores al 40%, no se presenta crecimiento micelial. Los reportes en cuanto a las cantidades óptimas de agua en el cultivo de aserrín son variables, aunque los rangos que han dado mejores resultados oscilan entre 70 y 90% (12).

En los experimentos realizados por Han (12), en relación a las temperaturas de crecimiento de *Lentinus edodes* en sustratos de aserrín, se observó que las tres cepas con las que trabajó crecieron a temperaturas que variaron entre 22°C y 32°C, con rangos de temperatura óptima entre 22°C y 28°C. Los crecimientos presentados en las temperaturas señaladas dependieron en gran medida de las cepas utilizadas en los experimentos.

2.7.5 Fructificación

Es deseable que durante la formación de los cuerpos fructíferos las temperaturas oscilen entre los 12°C y los 20°C. Durante el periodo de fructificación la humedad relativa en los cuartos de cultivo debe ser más elevada y constante que durante su desarrollo vegetativo. Los cuerpos fructíferos del Shiitake crecen en primavera y en otoño. En primavera son más abundantes, de mejor calidad y adecuados para el secado.

En los cultivos que se mantienen en invernaderos, la inducción de la fructificación ocurre de manera diferente. Los troncos inoculados que se mantienen en condiciones secas se sumergen en agua fría para estimular la formación de los cuerpos fructíferos. Inmediatamente después los troncos son colocados en el invernadero. Con humedades bastante altas, el periodo de aparición de los hongos por este método oscila entre 7 y 14 días. (31).

Los métodos para la inducción de los cuerpos fructíferos se han ido enriqueciendo con la finalidad de incrementar y acelerar la producción (33). Se han probado diferentes tratamientos químicos en cultivos de aserrín tales como ácido acético, ácido cítrico y ácido nítrico (12). De igual forma se han probado el extracto de levadura, y

hormonas vegetales como giberelinas, clorohidrina, colchicina (12). Con los compuestos señalados se han hecho diferentes diluciones acuosas en las cuales se sumergen los sustratos invadidos del micelio de *Lentinus edodes*. Los resultados indicaron que el ácido tartárico en una solución de 30 ppm y el extracto de levadura al 5% disminuyen el tiempo en la formación de primordios e incrementan el rendimiento en relación a los compuestos químicos utilizados. No ocurrió así con respecto al agua fría en donde no se aprecian diferencias significativas. Con las hormonas vegetales, sí se observaron incrementos significativos en la productividad.

La aereación representa un factor importante en la fructificación, no sólo provee al cuerpo fructífero de oxígeno, también remueve metabolitos volátiles como el dióxido de carbono que puede inhibir su desarrollo. La buena aereación tiene mayor importancia durante el desarrollo del primordio (22).

2.7.6 Secado

La etapa final para la conservación de *Lentinus edodes* es el secado, el cual se realiza, por lo general con calor artificial, en un secador de charolas para preservar el buen sabor y el brillo del basidiocarpo (31).

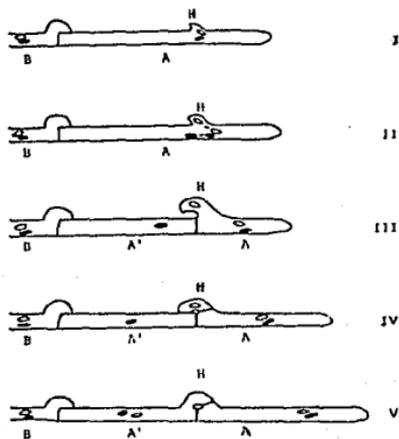
2.8 Método de dicariotización

Como se había mencionado anteriormente la separación artificial de los dicariones se intentó en el pasado con varios procesos que pueden ser agrupados en métodos mecánicos y químicos. Harder introdujo la llamada operación micro-quirúrgica (13). Esta se lleva a cabo en tipos de hifas en el estado III o IV del proceso de formación de las fibulas (Figura 4) cortando la célula terminal A y la célula H con una aguja microbiológica (estado IV en la Figura 4). La división dicariótica de la célula (A) forma un crecimiento hacia afuera de la célula en forma de gancho (H) cuya punta se dirige hacia el lado contrario del crecimiento de la hifa. Uno de los núcleos haploides se divide mitóticamente en la célula (H). Un núcleo permanece en la célula hija mientras que el otro regresa a la célula principal. Simultáneamente el segundo núcleo haploide se divide también y lo que resulta de la división emigra en direcciones opuestas a lo largo de la célula principal. Después de la formación de la septa en la célula principal y en la célula (H); resultan 3 células, (A), (A') y la célula (H). La célula (H) presenta un posterior crecimiento que se dirige a la nueva célula subterminal (A') fusionándose a ella. Después, el núcleo de la célula (H) migra hacia la célula (A') (29).

Los neohaplontes así recobrados difieren entre cada uno y de los tipos originales respecto a la morfología, crecimiento y respuesta fisiológica.

FIGURA 4

Crecimiento de un dicarion por división nuclear conjugada y formación de fibulas.



(29)

Los métodos de dedicariotización por vía química hacen uso de sustancias químicas sumamente tóxicas lo cual provoca una inactivación selectiva de uno de los núcleos por las sustancias tóxicas, causando una división asimétrica del dicariote tratado. Miles y Raper (26) incubaron los dicariones por más de tres semanas en un medio líquido conteniendo 0.15% de taurocolato de sodio ó 0.12% de ácido cólico. Esto dió buenos resultados en lotes, donde ya existía la posibilidad de dedicariotizar para obtener monocariotes que forman oidias. En lotes incapaces de producir oidias, la dedicariotización tuvo éxito sólo con ciertas cepas de *Favolus alveolaris*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus betulinus*, y *Polyporus versicolor*, que mostraron previamente altos niveles de dedicariotización en los controles (arriba del 60%).

Takemaru (38) confirmó la eficacia de otros derivados del ácido cólico como el colato de sodio y oxagall para la dedicariotización de *Collybia velutipes*, *Coprinus macrorhizus*, *Lentinus edodes* y *Pholiota nameko*. Cada especie requirió de diferentes concentraciones para llevar a cabo la dedicariotización. En un experimento con 3 diferentes dicariotes de *C. velutipes* y 3 dicariotes de *C. macrorhizus*, exclusivamente uno de los componentes nucleares fue encontrado de 20 neohaplontes recuperados para cada dicariote. Adicionalmente también se recuperaron algunas mutantes morfológicas (39). Para *Coprinus myceliocephalus* en

un medio con 0.5% de ácido cólico la tasa de dedicariotización fue muy baja y sólo un tipo de núcleo fue recuperado (25).

El efecto del tauroclorato de sodio fue comparado con el arseniato de sodio, sulfato de cobre, dicromato de sodio, pentaclorofenato de sodio, sulfato de zinc, creosota y ácido bórico en lotes de 24 especies de basidiomicetos patógenos de la madera. (18). Con excepción de un lote de *Cortolus sanguineus* ningún efecto fue observado con tauroclorato de sodio aun a concentraciones muy altas (0.64%). Ninguno de los otros tóxicos mostraron un efecto dedicariotizante. En los casos exitosos, sólo uno de los componentes nucleares era recuperado. Puesto que se observó una marcada inhibición en el crecimiento, asociada a las concentraciones de los tóxicos químicos usados para la dedicariotización, los cultivos fueron incubados por lo menos de 8 a 16 semanas. Estos resultados fueron confirmados en pruebas con tóxicos similares y otras especies de Basidiomicetos (25).

En resumen los métodos químicos y mecánicos utilizados para dedicariotizar eran poco satisfactorios. Es decir eran muy tardados y producían una regeneración asimétrica de los núcleos así como monocariotes con características diferentes a las cepas originales. En 1980 se introdujo un método nuevo que promete una dedicariotización simétrica y recuperación de ambos núcleos, a través del uso de una solución de peptona

como medio para lograr la dedicariotización (20).

2.9. Desarrollo de un nuevo método de dedicariotización.

Durante el desarrollo del nuevo método para dedicariotizar se estudiaron las siguientes variables:

- Fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico.
- Temperatura de incubación (6, 22, y 30°C).
- Forma de esterilización (autoclave y filtración).
- Volúmen de incubación.
- Volúmen del medio.

Los resultados indicaron que la dedicariotización se llevó a cabo en dos medios que contenían:

- Glucosa al 2% y glicina en concentraciones desde el 0.1 hasta el 0.6%.
- Peptona P (Oxoid) al 0.5%, glucosa al 2%, adicionado o no de glicina al 0.5%.

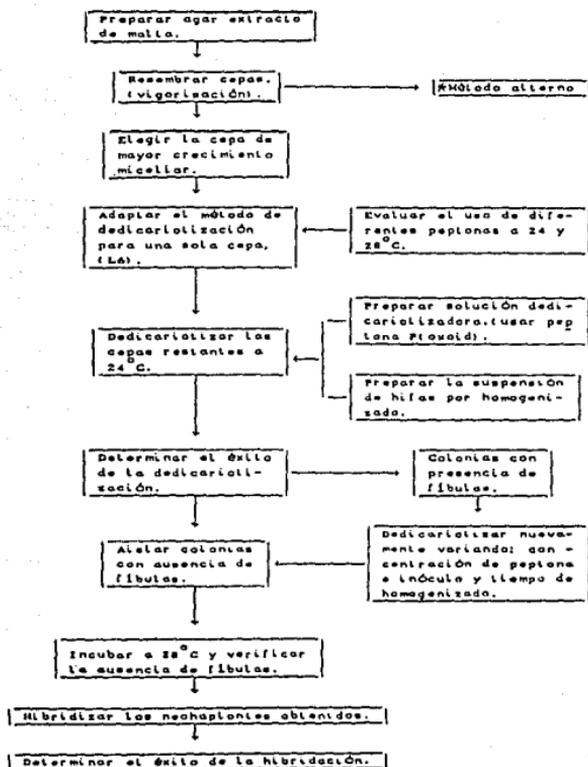
En términos generales para lograr una completa dedicariotización Leal Lara (20) recomienda utilizar una solución al 2% de glucosa, conteniendo peptona P (OXOID) en concentraciones desde 2.5 hasta 30 g/l u otra peptona de carne, rica en glicina y pobre en fosfatos y magnesio, o glicina de 3 a 8 g/l, o mezclas de tales peptonas y glicina.

La dedicariotización es influenciada por varios factores como la cantidad de inóculo, la presencia de sustancias orgánicas, el método de esterilización, condiciones de espacio y tal vez la profundidad de la capa del líquido.

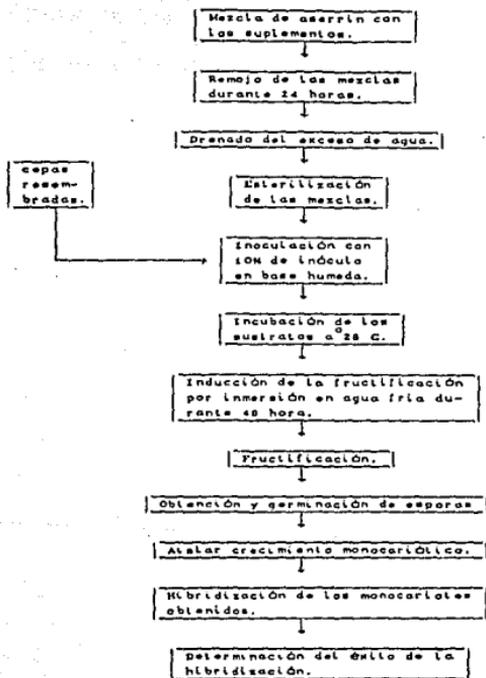
III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagramas de flujo.

Método para la dedicariotización de las cepas.



* Método alternativo para la obtención de monocariotes.



3.2 Materiales, reactivos y equipos

3.2.1 Materiales

3.2.1.1. Cepas fungicas

Se utilizaron 9 cepas de *Lentinus*, las cuales se mantuvieron en refrigeración en cajas de Petri con medio sólido de agar extracto de malta (1.5% extracto de malta, 2% de agar).

Cepas dicarióticas de *Lentinus*:

<u>Nombre de la cepa</u>	<u>Letra y No. de la cepa.</u>
<i>Lentinus dactyloides</i>	L-2
<i>Lentinus edodes</i>	L-3
<i>Lentinus ponderosus</i>	L-5
<i>Lentinus tigrinus</i>	L-6
<i>Lentinus spp</i>	L-8
<i>Lentinus edodes</i> S-1	L-9
<i>Lentinus edodes</i> S-2	L-10
<i>Lentinus edodes</i> S-3	L-11
<i>Lentinus edodes</i> Ch Chunchon	L-13

3.2.1.2. Sustratos

- Bagazo de caña recolectado en el ingenio de Zacatepec, Morelos.
- Salvado de trigo procedente de tiendas naturistas.
- Aserrín de pino procedente de la carpintería de la Facultad de Química de la UNAM.

3.2.1.3. Material de laboratorio

- Matraces Erlenmeyer 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer 125 ml.
- Probeta de 1000 ml.
- Tubos con rosca de 15 mm de diámetro.
- Cajas de Petri estériles desechables.
- Agitadores de tubos (Vortex).
- Embudos de filtración rápida.
- Papel filtro Whatman No.1.
- Pipetas de 25 ml.

3.2.2 Reactivos

Todos los reactivos son grado analítico

- Agar bacteriológico (Bioxon).
- Extracto de malta (Complementos alimenticios).

- Dextrosa anhidra en polvo (J.T. Baker).
- Cloruro de calcio (Merck).
- Peptona de soya (Bioxon).
- Peptona de caseína (Bioxon).
- Peptona de caseína (Merck).
- Peptona de soya (Merck).
- Peptona de carne (JVC).
- Peptona de soya (Bioxon).
- Peptona de carne (Bioxon).
- Peptona P (Oxoid).
- Hidróxido de sodio 1 N (Baker).

3.2.3 Equipo

- Campana de flujo laminar (Veco).
- Incubadora (Felisa).
- Autoclave vertical (Tecnica Ind. Decovi).
- Balanza granataria (Sartorius).
- Homogeneizadora (Waring Commercial Blender).
- Micropipeta (Pipetman Gilson 100 μ l).
- Jeringa de llenado continuo de 5 ml (Sartorius).

3.3 METODOLOGIA

Para la realización de este trabajo primeramente se resembraron todas las cepas en agar extracto de malta al 1.5% (Apéndice 6.1.1) con la finalidad de vigorizarlas, obteniendo

micelio nuevo, ya que se encontraban preservadas en refrigeración (Apéndice 6.2.1 y 6.2.2).

3.3.1 Adaptación del método de dedicariotización a cepas de *Lentinus spp.*

Para adaptar el método de dedicariotización se eligió la cepa de mayor crecimiento miceliar (L6) evaluando el uso de diferentes peptonas en la solución estandar dedicariotizadora (Apéndice 6.3.1) a 24 y 28^oC.

3.3.2 Aplicación del método de dedicariotización a todas las cepas de *Lentinus spp.*

Una vez evaluado el efecto dedicariotizante de las diferentes peptonas con la cepa L6, se eligió la que favoreció mas la obtención de monocariotes (Peptona P de Oxoid) para realizar la dedicariotización de las cepas restantes (Apéndice 6.3.3), para lo cual se preparó la solución dedicariotizadora (Apéndice 6.3.1) y la suspensión de hifas por homogenizado (Apéndice 6.3.2).

Quando los micelios sean visibles en la solución dedicariotizadora se procede a determinar el éxito de la dedicariotización (Apéndice 6.3.4) aislando las colonias con ausencia de fibulas.

Se decidió dedicariotizar nuevamente las cepas en donde se observó crecimiento dicariótico (Apéndice 6.3.3) incrementando la concentración de peptona P de Oxoid a 20 y 30 g/l y variando el volumen de inóculo a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 y 2.0 ml y por otro lado se redujo el tiempo de homogeneizado a 1 minuto, con el objeto de determinar si con estas variaciones es posible obtener micelio monocariótico. Se procede a determinar el éxito de la dedicariotización (Apéndice 6.3.4) y se aíslan las colonias con ausencia de fibulas.

Una vez verificada la ausencia de fibulas se resiembran los neohaplontes obtenidos en agar extracto de malta (Apéndice 6.1.1). Los neohaplontes resemebrados se hibridizan y se determina el éxito de la hibridización (Apéndice 6.4)

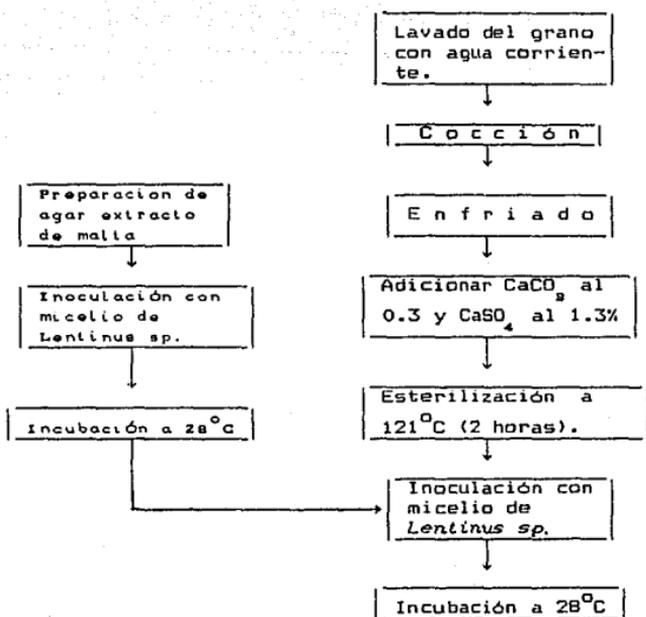
3.3.3 Aplicación del método alternativo para la obtención de monocariotes.

Al mismo tiempo que se vigorizan las cepas (Apéndice 6.1.1, 6.2.1 y 6.2.2) se procede a realizar el método alternativo con la finalidad de obtener monocariotes; para ello se prepara el inóculo de grano (Apéndice 6.5.1). Se le conoce como inóculo de grano al crecimiento miceliar obtenido en el grano de algún cereal como trigo, centeno o mijo. El inóculo de grano se utiliza para sembrar la cepa deseada en un sustrato determinado y obtener sus cuerpos fructíferos o

esporoforos. En la Figura 5 se presenta el procedimiento para preparar el inóculo de grano.

Figura 5

Procedimiento en la preparación del inóculo.



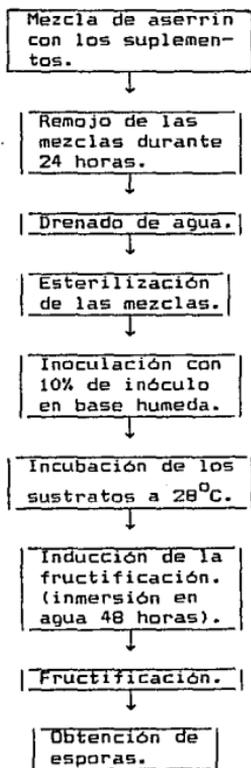
Una vez que el micelio ha invadido el inóculo de grano se procede a realizar la mezcla de aserrín con los suplementos (Apéndice 6.5.2). Cuando la mezcla ha sido esterilizada se procede a realizar la inculación (Apéndice 6.5.3) y se dejan incubar las bolsas con sustrato inoculado en estufas de incubación (Apéndice 6.5.4).

Al final del periodo de incubación se induce la fructificación por inmersión en agua fría. Posteriormente se colocan las bolsas en un invernadero hasta la obtención de cuerpos fructíferos (Apéndice 6.5.5). Las esporas de los cuerpos frutíferos maduros se colectan como se indica en el apéndice 6.6.

En la Figura 6 se observa el procedimiento general para la producción y obtención de esporas de cepas de *Lentinus spp.*

Figura 6

Procedimiento general para la obtención de esporas de cepas de *Lentinus sp.*



Una vez recolectadas las esporas (Apéndice 6.6) se germinan y se aíslan los monocariotes obtenidos (Apéndice 6.7). Dichos monocariotes se hibridizan como se indica en el apéndice 6.4 y se determina el éxito de la hibridización examinando al microscopio la presencia de fibulas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

De acuerdo a la característica de un desarrollo miceliar muy lento que presentan las cepas de *Lentinus spp*, la mayoría de las investigaciones realizadas a la fecha se han enfocado a estudiar diferentes aspectos relacionados con los sustratos. Dado lo anterior éste trabajo es parte de un proyecto que pretende reducir el periodo de incubación por medio de un mejoramiento genético de las cepas. Por lo cual se estudiaron las condiciones necesarias para llevar a cabo una separación de los dos componentes monocarióticos (dedicariotización) de las cepas de *Lentinus spp*; a partir de una técnica de dedicariotización utilizada para los géneros de *Pleurotus* y *Coprinus* (20).

Al mismo tiempo se procedió a obtener micelio monocariótico aplicando el método alterno.

4.1 RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta el resultado de la evaluación del efecto de dediacariotización con diferentes peptonas, a 24°C y 28°C con la cepa L6 de *Lentinus tigrinus*.

Con las peptonas de soya (Bioxon), de caseína (Bioxon) y de carne (Bioxon) el micelio encontrado en las seis repeticiones de cada una de estas peptonas fue completamente (100%) dicariótico a ambas temperaturas.

Con la peptona de soya (Merck), el micelio de las seis repeticiones a 24°C y el de cuatro repeticiones a 28°C fue completamente dicariótico. En las dos repeticiones restantes a ésta última temperatura se encontró micelio predominantemente (80%) dicariótico.

Con la peptona de caseína (Merck), a 24°C el micelio de las seis repeticiones fue completamente dicariótico, mientras que a 28°C existen mas variaciones ya que de las seis repeticiones el micelio de cuatro de ellas fue predominantemente dicariótico, una presentó micelio predominantemente monocariótico y una mas proporciones similares de hifa dicariótica y monocariótica.

Con la peptona de carne (JVC), no se obtuvo crecimiento miceliar en ninguna de las temperaturas de incubación.

Con la peptona de carne P (Oxoid) a 24°C el micelio de las seis repeticiones fue predominantemente (80%) monocariótico, y a 28°C tres repeticiones presentaron más micelio dicariótico, y las otras tres repeticiones presentaron igual proporción de micelio dicariótico y monocariótico.

En la Tabla 2 se presenta el efecto dedicariotizante de la peptona de carne P (Oxoid) con distintas cepas de *Lentínus spp.*

Las cepas L2, L3, L8 y L9 a los cuarenta y cinco días de incubación no presentaron crecimiento, mientras que las cepas L10, L11 y L13 a los treinta días de incubación presentaron micelio completamente dicariótico; y solo para las cepas L5 y L6 a los tres días de incubación, el micelio fue predominantemente monocariótico.

Después de estos experimentos sólo fue posible obtener micelio monocariótico para las cepas L5 y L6, procediéndose a recuperar sus neohaplotes.

Para la cepa L5 el número de neohaplotes recuperados fue de veintinueve y para la cepa L6 fue de cincuenta y seis. (ver Tabla 3)

Con las cepas L10, L11 y L13 como después de 30 días de incubación se observó crecimiento dicariótico se decidió incrementar la concentración de peptona de carne P (Oxoid) a 10, 20 y 30 g/l así como el volumen del inóculo a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 y 2.0 ml y por otro lado reducir el tiempo de homogenizado a 1 min, con el objeto de determinar si con estas variaciones era posible obtener micelio monocariótico. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 4.

Con 10 g/l de peptona y 0.1 ml de inóculo a los 24 días de incubación la cepa L10 presentó micelio completamente dicariótico. Con la misma concentración de peptona y 0.2 ml de inóculo a los 30 días de incubación no presentó crecimiento y con 0.3 ml de inóculo a los 24 días de incubación el micelio fue predominantemente monocariótico. Con 20 y 30 g/l de peptona, 0.1, 0.2 y 0.3 ml de inóculo, a los 30 días de incubación no se presentó crecimiento.

En la cepa L11 con 10 g/l de peptona y 0.4, 1.0 y 2.0 ml de inóculo a los 11 días de incubación el tipo de micelio observado fue completamente dicariótico. Con 20 y 30 g/l de peptona y 0.4, 1.0 y 2.0 ml de inóculo a los 30 días de incubación no hubo crecimiento.

En la cepa L13 sólo en la concentración de 10 g/l y con 1.0 ml de inóculo a los 53 días de incubación se encontró

crecimiento completamente dicariótico. Para el resto de las condiciones no hubo crecimiento miceliar.

De las variaciones realizadas en las cepas L10, L11 y L13 sólo se logró obtener crecimiento monocariótico en la cepa L10. Se procedió a recuperar los neohaplotentes de ésta cepa, recuperándose solamente 21 neohaplotentes (Tabla 5).

En la Tabla 6 se presenta la obtención de micelio monocariótico desde la producción tradicional de cuerpos fructíferos hasta la obtención y germinación de esporas.

Solamente para las cepas L3, L8, L9, L10, L11 y L13 se obtuvieron cuerpos fructíferos. De las esporas recolectadas únicamente para la cepa L3 se pudieron germinar 3 de ellas presentando micelio monocariótico.

En la Tabla 7 se presentan los resultados de entrecruzar los neohaplotentes obtenidos por el método de dedicariotización. Todas las cruzas realizadas entre los neohaplotentes obtenidos para las cepas L5, L6 y L10 fueron negativas.

Al entrecruzar las esporas obtenidas por el método alterno de la cepa L3, todas las cruzas fueron negativas.

TABLA 1

Evaluación del efecto dedicariotizante al usar diferentes peptonas con la cepa L6 de *Lentínus tigrinus* a dos temperaturas de incubación.

Tipo de Peptona.	Temperatura de incubación. (°C)	Tipo de micelio *				
		d	d>m	d<m	d=m	m
Soya (Bioxon)	24	6	0	0	0	0
	28	6	0	0	0	0
Soya (Merck)	24	6	0	0	0	0
	28	4	2	0	0	0
Caseína (Merck)	24	0	6	0	0	0
	28	0	4	1	1	0
Caseína (Bioxon)	24	6	0	0	0	0
	28	6	0	0	0	0
Carne (Bioxon)	24	6	0	0	0	0
	28	6	0	0	0	0
Carne (JVC)	24	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Carne P(Oxoid)	24	0	0	6	0	0
	28	0	3	0	3	0

- * Explicación:
 m Exclusivamente monocariote.
 d Completamente dicariótico.
 d>m Predominantemente dicariótico.
 d<m Predominantemente monocariótico.
 d=m Proporciones similares de hifa dicariótica y monocariótica.

Nota: Para evaluar el efecto dedicariotizante de las diferentes peptonas se hicieron 6 repeticiones las cuales se indican con números.

TABLA 2

Evaluación del efecto dicariotizante de la peptona de carne P (Oxoid) sobre distintas cepas de *Lentinus spp.*

Cepa	Tiempo de incubación (días) *	Tipo de micelio **
L2	45	Np
L3	45	Np
L5	3	d<m
L6	3	d<m
L8	45	Np
L9	45	Np
L10	30	d
L11	30	d
L13	30	d

** Nota:

- m Exclusivamente monocariote.
- d Completamente dicariotico.
- d>m Predominantemente dicariotico.
- d<m Predominantemente monocariotico.
- d=m Proporciones similares de hifa dicariotica y monocariotica.
- Np No presentó crecimiento.

* Tiempo de incubación en el cual se observó crecimiento.

TABLA 3

Recuperación de neohaplotes por dedicarionización de las cepas L5 y L6 de *Lentivirus spp.*

Cepa	Neohaplotes recuperados
L5	29
L6	56

TABLA 4

Evaluación del efecto de la concentración de peptona de carne P(Oxoid) y del volumen de inóculo sobre la dedicariotización de diferentes cepas de *Lentinus spp.*

Cepas	Peptona (g/l)	Inóculo (ml)	Incubación (días)*	Tipo de micelio
L10	10	0.1	24	d
		0.2	30	Np
		0.3	24	d<m
	20	0.1	30	Np
		0.2	30	Np
		0.3	30	Np
	30	0.1	30	Np
		0.2	30	Np
		0.3	30	Np
L11	10	0.4	11	d
		1.0	11	d
		2.0	11	d
	20	0.4	30	Np
		1.0	30	Np
		2.0	30	Np
	30	0.4	30	Np
		1.0	30	Np
		2.0	30	Np
L13	10	0.4	53	Np
		0.5	53	Np
		1.0	53	d
	20	0.4	53	Np
		0.5	53	Np
		1.0	53	Np
	30	0.4	53	Np
		0.5	53	Np
		1.0	53	Np

* Tiempo de incubación en el cual se observó crecimiento.

Nota: El tiempo de homogenizado en todos los casos fue de 1 min. en comparación con el que marca la metodología que es de 2.5 min.

TABLA 5

Recuperación de neohaplotes por dedicariotización de la cepa L10 de *Lentinus spp.*

Cepa	Neohaplotes recuperados
L10	21

Tabla 6

Aplicación del método alternativo para la obtención de micelio monocariótico mediante la obtención de esporas germinadas.

Cepas	Crecimiento vegetativo tiempo de incubación (semanas) *					Cuerpos fructíferos obtenidos	Esporas germinadas.
	1	2	3	4	5		No.
L2	0	1	C	C	C	0	--
L3	1	3	3	4	4	3	3
L5	3	3	3	C	C	0	--
L6	1	1	C	C	C	0	--
L8	3	3	4	4	4	2	--
L9	3	3	4	4	4	5	--
L10	3	3	4	4	4	3	--
L11	1	1	3	3	3	2	--
L13	0	2	2	3	4	2	--

• Escala hedónica:
0= crecimiento nulo.
1= escaso.
2= regular.

3= abundante.
4= exuberante.
C= contaminado.

Tabla 7

Entrecruzamiento de los neohaplotones obtenidos por el método de dedecariotización.

Cepa	Neohaplotones recuperados	No.de cruizas realizadas	Tipo de micelio observado *
L5	29	58	m
L6	56	112	m
L10	21	42	m

* Tipo de micelio:
m= monocariótico.

Tabla 8

Entrecruzamiento de los monocariotes obtenidos por el método
alterno de la cepa L3 de *Lentinus spp.*

Cepa	Monocariotes recuperados	No.de cruzas realizadas	Tipo de micelio observado *
L3	3	9	m

* Tipo de micelio:
m= monocariótico.

4.2 DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del efecto dedicariotizante de diferentes peptonas sobre la cepa L6 de *Leptinus tigrinus* a 24°C y a 28°C se puede observar que la peptona de carne P (Oxoid) fue la que presentó mejores resultados ya que su uso favoreció la obtención de monocariotes. De las dos temperaturas probadas la de 24°C fue la que permitió la obtención de micelio monocariótico en las 6 repeticiones realizadas para esta cepa (Tabla 1).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 2; se observó que las condiciones necesarias para obtener neohaplontes en las cepas L5 y L6 fueron: una concentración de peptona de 10 g/l y 0.02 ml de inóculo, una temperatura de 24°C y un tiempo de homogeneizado de 2.5 min. Para las cepas L10, L11 y L13, estas condiciones no permitieron la dedicariotización de las cepas, por ello se decidió variar la concentración de peptona de carne P (Oxoid) y de inóculo para dichas cepas. Con las nuevas variables estudiadas únicamente se logró dedicariotizar la cepa L10 con 10 g/l de peptona, 0.3 ml de inóculo y un tiempo de homogeneizado de 1 min. De acuerdo a lo anterior se observó que cada cepa requiere de diferentes condiciones para la obtención de micelio monocariótico.

De las cruzas realizadas entre los neohaplontes obtenidos para las cepas L5, L6 y L10, no fue posible obtener dicariotes lo que indica que únicamente se logró recuperar con el proceso de dedicariotización uno de los núcleos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Takemaru quien utiliza diferentes sustancias tóxicas para lograr la dedicariotización de las cepas. Por ello es posible que la toxicidad de las sustancias químicas utilizadas en la dedicariotización no influye sobre la recuperación de un solo núcleo.

Al utilizar el método alterno para la obtención de micelio monocariótico se observaron una serie de inconvenientes como: largos periodos de incubación, elevadas contaminaciones, baja densidad de esporas recolectadas, dificultad para germinar las esporas. Por todo lo anterior únicamente se lograron obtener 3 esporas germinadas para la cepa L3, presentando micelio monocariótico. Al hibridizar las 3 esporas obtenidas tampoco fue posible obtener micelio dicariótico, lo que indica que las esporas recuperadas no son compatibles entre si. Es decir posiblemente las 3 esporas sean del mismo tipo de compatibilidad o pertenezcan a dos tipos que no son compatibles entre si.

V. CONCLUSIONES

Al valorar el efecto dedicariotizante de las diferentes peptonas, de acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la peptona de carne P (Dxoid) fue la mas adecuada para la obtención de los neohaplontes, tomando en cuenta que solo fue aplicable a las cepas L5, L6 y L10.

La dedicariotización realizada a diferentes cepas de *Lentinus spp* por medio de una solución de peptona de carne P (Dxoid) unicamente permitió para este género la recuperación de uno de los dos núcleos.

Las condiciones especificadas por el método de dedicariotización no son exitosas para todas las cepas de *Lentinus spp*; comprobandose al obtener neohaplotes solo en las cepas L5 y L6 bajo estas condiciones.

Los neohaplotes obtenidos de las cepas en donde el método de dedicariotización fue exitoso no presentaron compatibilidad lo cual se comprobó al realizar el entrecruzamiento y no obtener el dicariote.

La probabilidad de obtener monocariotes con el método alterno fue muy baja, ya que de las nueve cepas de *Lentinus spp* utilizadas solo para la cepa L3 se lograron obtener 3 esporas germinadas.

SUGERENCIAS.

Al determinar que el método de dedicaritoización puede ser exitoso para algunas especies de *Lentinus spp*, es recomendable seguir haciendo pruebas en lo que se refiere a las variaciones sobre dicho método, para así lograr especificar las condiciones que se requieren para cada especie. Simultáneamente con los neohaplontes obtenidos determinar si presentan compatibilidad con neohaplontes de otros basidiomicetos para dar continuidad al proyecto.

Se recomienda continuar con el trabajo de dicha metodología para con esto dar continuidad al proyecto y así favorecer el desarrollo de la tecnología aplicada a la investigación de alimentos para mejorar la calidad y cantidad de nuevas alternativas alimenticias en nuestro país que demanda a la comunidad científica tecnologías eficientes y suficientes.

VI. APENDICE

6.1 MEDIOS DE CULTIVO.

6.1.1 Medio para la preservación de cepas de *Lentinus spp.*

Las cepas se mantuvieron en refrigeración en cajas de Petri con agar, extracto de malta. Para preparar 500 ml de medio de agar extracto de malta, se pesan 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar y se colocan en un matraz Erlenmeyer de un litro. Se adicionan 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación se tapa el matraz y se deja reposar durante 20 minutos. Posteriormente, se esteriliza en autoclave a 121°C y 6.8 Kg de presión (15 lbs) durante 30 minutos. El medio estéril se vacía en cajas de Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se guardan las cajas de Petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

6.1.2 Medio de crecimiento.

El medio de agar extracto de malta deproteinado (DPMA) fue preparado como lo describió Eger (8). Se prepara primeramente una solución concentrada de extracto de malta deproteinado. Para esto se pesan 20 g de extracto de malta y

se disuelven en 250 ml de agua destilada. Se mide el pH de la solución anterior y se eleva 1.5 unidades con una solución de NaOH 1N. Después se adicionan 1.4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se mezcla y esteriliza en autoclave a 121°C y 6.8 kg de presión (15 lbs) durante 20 minutos. Una vez frío se filtra para obtener la solución concentrada. Posteriormente se toman 75 ml del filtrado y se mezclan con 425 ml de agua destilada, se colocan 50 ml de esta solución en matraces Erlenmeyer de 125 ml, se tapan, y esteriliza en autoclave a 121°C y 6.8 kg de presión (15 lbs) durante 30 minutos.

6.2 CONDICIONES DE CULTIVO.

6.2.1 Propagación vegetativa

Las cajas con 15 ml de agar extracto de malta son sembradas colocando en su parte media un fragmento de agar (5x5 mm de lado) invadido con micelio, cortado de la periferia de una colonia en crecimiento (de cada una de las cepas obtenidas) en medio de agar extracto de malta.

6.2.2 Condiciones de crecimiento miceliar

Para el crecimiento de micelio, las cajas de Petri después de ser inoculadas, se guardan en bolsas de polietileno y se incuaban en oscuridad a $25-28^\circ\text{C}$.

6.3 METODO DE DEDICARIOTIZACION

6.3.1 Solución estandar dedicariotizadora.

Se prepara pesando 20 g de glucosa anhidra y 20 g de peptona de caseína que se disuelven en un litro de agua destilada, de esta solución se toman 50 ml que se colocan en matraces Erlenmeyer de 125 ml, se tapan y se esterilizan en autoclave a 121°C y 6.8 Kg de presión (15 lbs) durante 30 minutos. Esta solución también se preparó utilizando las siguientes peptonas:

1. Peptona de soya (Bioxon).
2. Peptona de soya (Merck).
3. Peptona de caseína (Merck).
4. Peptona de caseína (Bioxon).
5. Peptona de carne (Bioxon).
6. Peptona de carne (JVC).
7. Peptona de carne P (Dxoid).

6.3.2 Fragmentación de los cultivos fungicos.

La suspensión de fragmentos de hifas es producida por homogenización. El micelio resultante de tres cultivos en agar con cerca de 4 cm de diámetro se coloca en un homogeneizador estéril previamente enfriado y se adicionan 50 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente, el

micelio se homogeniza por dos minutos y medio a la velocidad más alta (20).

6.3.3 Dedicariotización.

La solución dedicariotizadora es inoculada con 20 μ l de la suspensión de hifas fragmentadas (homogenizado), descrita en la sección 3.3.4. Dejar incubar hasta que los micelios sean visibles, a una temperatura de 24°C (20).

6.3.4 Determinación del éxito de la dedicariotización.

Cuando los micelios sean visibles en la solución dedicariotizadora, se homogeneiza nuevamente esta solución (Apéndice 6.3.2). Se procede a "platear" sobre cajas de Petri con 10 ml de agar extracto de malta solidificado con 20 μ l del homogeneizado y se incuban a 24°C hasta la aparición de colonias aisladas, se procede a examinar al microscopio para observar la presencia ó ausencia de fibulas. Finalmente se aíslan las colonias que no presenten fibulas, se incuban a 28°C hasta obtener crecimiento, se procede a examinar nuevamente al microscopio para verificar la ausencia de fibulas (20).

6.4 HIBRIDACION DE LOS MONOCARIOTES OBTENIDOS

Para hibridizar monocariotes se corta un cuadro de agar de 0.1 x 0.1 cm de lado de la periferia de una colonia en crecimiento, de cada monocariote a hibridizar. Estos cuadros de agar se colocan en una caja de Petri con medio de extracto de malta lo más cercano posible. Por lo general se realizan en una misma caja de Petri entre 5 y 6 cruza. A continuación se incuban las cajas de Petri a 28°C por 6 días para ser observadas microscópicamente con el ocular de 16 campos de amplificación. Una cruza se determina como positiva cuando al observarla al microscopio se aprecian las fibulas. Para evitar errores se considera que la cruza es positiva cuando estas estructuras son observadas por lo menos en tres diferentes puntos situados de manera equidistante en la periferia de la colonia. La presencia de fibulas que son estructuras que se forman únicamente cuando se lleva a cabo una fusión celular entre las cepas hibridizadas, implica que los dos monocariotes apareados son compatibles y por lo tanto dan origen a la formación de un dicariote.

6.5 METODO ALTERNO PARA OBTENER MONOCARIOTES

6.5.1 Preparación del inóculo de grano.

El grano de trigo se lava y se cuece en agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación

se drena el agua caliente y se enfría el grano al chorro de agua. El grano frío se pesa y se le adicionan CaSO_4 al 1.3% y CaCO_3 al 0.3%, se mezcla y se coloca en frascos de vidrio, que se llenan hasta la mitad de su capacidad.

Los frascos de vidrio se tapan con hule espuma y papel aluminio. Posteriormente se esterilizan los frascos a 121°C y 6.8 kg de presión (15 lbs) durante dos horas. Una vez frío el grano se inocula cada frasco con el micelio proveniente de una caja de Petri sembrada una semana antes. Los frascos inoculados se incuban a 28°C durante 15 días.

6.5.2 Preparación de los sustratos lignocelulósicos para la producción de esporoforos.

Para preparar el sustrato se dejaron remojar por separado el aserrín de pino, el bagazo de caña y el salvado de trigo durante 24 horas. Al final del remojo se drenó el exceso de agua, se realizó la mezcla en base húmeda en una proporción de 50:50 de aserrín de pino : bagazo de caña y 10% de salvado de trigo para cada bolsa de 1 kg de capacidad. Se mezclaron los sustratos y se colocaron en doble bolsa de polipapel para ser esterilizados a 121°C y 6.8 kg de presión (15 lbs) durante 2 horas.

6.5.3 Inoculación del sustrato.

Dejar enfriar las bolsas de polipapel con el sustrato en el interior de la autoclave. Pesar 10 % de inóculo de trigo en base al peso húmedo del sustrato. Mezclar el sustrato con el inóculo, y hacer pequeños orificios en la bolsa interior con una aguja de inoculación esterilizada a la flama.

6.5.4 Incubación.

Dejar incubar las bolsas con sustrato inoculado en estufas de incubación a 28°C entre 40 y 170 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de las cepas. Realizar la medición del crecimiento micelial semanalmente con base en una tabla hedónica establecida previamente. Al crecimiento nulo asignar el valor de cero. Considerar este valor cuando no haya crecimiento en el sustrato y no se presente contaminación. Emplear el valor 1, para designar poco crecimiento. Tomar esta medición de los crecimientos miceliales que cubran un 30 % del sustrato. Codificar el crecimiento regular con el valor de 2, para identificar a aquellas bolsas que presenten un crecimiento micelial que invada entre un 50 - 70 % del sustrato. Denotar los crecimientos abundantes por 3, reportarlos cuando el micelio cubra un 70 - 90 % del sustrato. Representar un crecimiento

exhuberante con la calificación de 4, reportarlo cuando el micelio cubra 100 % del sustrato con un micelio vigoroso. Los hongos y/o bacterias desarrollados sobre los sustratos se determinaran como contaminantes representandose con la letra C.

6.5.5 Condiciones de fructificación.

Al final del periodo de incubación, cortar las bolsas con incisiones laterales y posteriormente sumergirlas en agua a 20°C durante 48 horas.

Colocar las bolsas en un invernadero previamente desinfectado y donde los periodos de iluminación y obscuridad serán los de la luz incidental del día y la noche. La humedad relativa del medio ambiente se mantendrá entre 70 y 80% con la ayuda de un humidificador y la recirculación del aire por medio de un ventilador.

6.6 RECOLECCION DE ESPORAS

El desarrollo de los primordios hasta cuerpos fructíferos maduros tarda de 3 a 5 días. Las esporas de los cuerpos fructíferos maduros se colectan sobre un papel filtro estéril colocado dentro de una caja de Petri estéril. Para ello la base del pie del esporoforo se coloca sobre un cuadro de vidrio para evitar que el papel se humedezca. La caja con

el hongo se introduce en una cámara húmeda. Esto es, una bolsa de polietileno con agua en el fondo y 6 oradaciones a la altura del borde de la caja de Petri para permitir el intercambio gaseoso. La humedad se mantiene colocando una tira de papel absorbente a lo largo de toda la bolsa. Estas cámaras húmedas se mantienen a temperatura ambiente y ciclo de luz natural. Bajo estas condiciones se deja esporular de 12 a 24 horas. Posteriormente se remueve el papel filtro con las esporas y se guarda dentro de un sobre estéril que se introduce en una bolsa de polietileno con unos granos de sílica gel. Las esporas se almacenan en refrigeración a 4°C.

6.7 GERMINACION DE ESPORAS Y AISLAMIENTO DE MONOCARIOTES

Para la germinación de esporas se corta un pequeño pedazo del papel filtro que contiene a las esporas y se deposita en un tubo de ensaye con 1 ml de agua destilada esteril y se agita. La suspensión de esporas resultante se diluye hasta obtener por conteo al microscopio 30 esporas por cada 20 μ l de suspensión. Posteriormente diez cajas de Petri con medio de extracto de malta se inoculan cada una con 20 μ l de la suspensión de esporas y se incuban a 28°C durante 2 días. A partir de este momento se examinan todos los días y durante 10 días todas las cajas con la ayuda de un estereomicroscopio y se transfieren todas las esporas que germinen a cajas de Petri con medio de extracto de malta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Badham, E.R., Is autoclaving Shiitake substrate necessary?, Mushroom J.Tropics 8 :129-136., (1988).
- 2.- Bisaria, R. and Madan, M., Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues, Enz. Micr. Tech., (1983).
- 3.- Campbell, A.C. and Slee, R.W., Comercial cultivation of Shiitake in Taiwan and Japan., 45-53., (1986).
- 4.- Chang, S.T., Sexuality and strain improvements in edible mushrooms., Mushrooms news letter for the tropics, Vol 3, No.1., 2-6., (1982).
- 5.- Chang, S.T. and Hayes, W.A., The Biology and cultivation of edible mushrooms., Academic press, New York., (1978).
- 6.- Chang, S.T., World production of cultivated edible mushrooms in 1986., Mushrooms J. Tropic., 7: 117-120.
- 7.- Dare, P.H., Clark, T.A. and Chu-Chou, M., Consumption of substrate components by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during growth and fruiting on softwood and hardwood based media., Process Biochemistry., 156-160., (Oct.1988).
- 8.- Eger, G., C.Eden. and E.Wissing., *Pleurotus ostreatus* breeding potential of a new cultivated mushroom., Theoret.Appl.Genet., 47: 155-163., (1976).
- 9.- Elliot, T.J., The Biology and Tecnology of the cultivated mushroom., Editores: Flegy, P.B., Spencer, D.M. and Wood., D.A. John Wiley Chichester., (1985).
- 10.- Fries, N. and K, Aschan., The physiological heterogenety

of the dikaryotic mycelium of Polyporus abietinus investigated with the aid of the micro surgical technique., Suensk.Bot. Tidskr., 46: 429-445., (1952).

11.- Guzmán, G., Identificación de los hongos., Limusa México., (1979).

12.- Han, Y.N., Weng, W.T., Chen, L.C. and Ceng, S., Physiology and ecology of Lentinus edodes. (Berk.Sing)!. Mushroom Science XI. Proceeding of eleventh Int. Scient Congress on the cultivation ofr Edible Fungi., Australia., 623-657., (1981).

13.- Harder., Vber mikrochirurgische operationen an Hymenomyseten., Z.Wiss. Mikrosk. mikrosk. Tech. 44: 173-182., (1927.a).

14.- Harder., Zur Frage der Rolle von kern und protoplasma in zellgeschehen und bei der ubertragung von eigenschaften., Z. Bot. 19: 337-407., (1927.b).

15.- Herrera, I y Ulloa, M., El reino de los hongos., Editado por El Fondo de Cultura Económica y la U.N.A.M., México D.F., (1990).

16.- Jablonsky, I., Changes in Biochemical and Physiological activities of substrates colonized by fungi Pleurotus ostreatus, Lentinus edodes, A. aegorita., Mushroom Sci. XI. Proceeding of eleventh International Scientific Congress on the cultivation edible fungi., 659-673., (1981).

17.- Kalber, P., The cultivation of Shitake, Lentinus edodes on supplemented sawdust., Mushroom Science XII part (II).

Proceeding of the twelveth International Congress on the Science and cultivation of edible fungi., Braunschweig-Germany., (1989).

18.- Kerruish, R.M., and E.W. Da Costa., Monokaryotization of cultures of Lenzites Trabea., (Pers.) Fr. and other wood destroying Basidiomycetes by chemical agents., Ann. Bot. 27: 653-669., (1963).

19.- Kobayashi, N., Hiramatsu, A., and Akatsuka, T., Purification and chemical propierties of all inhibitor of plant virus infection from bodies of Lentius edodes., Agric.Biol. chem., 51(3) 883-890., (1987).

20.- Leal Lara, Hermilo., Sporlessness in the Basidiomycete Pleurotus ostreatus (Jacq.ex Fr.) Kümener. A Genetical Study by Means of a New Dedikaryotization Method., Institut fur Pharmazeutische Techonologie der Philipps Universitat., Marburg/Lahn., (1980).

21.- Leatham, G.F., Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom Lentinus edodes during degradation of a lignocellulosic medium., Applied Enviroment Microbiology. Vol 50. No.4. 859-867., (1985).

22.- Leatham, G.F. and Sthamann, M.A., The effects of common nutritionally-important cations on the growth and development of cultivated mushroom Lentinula edodes., XII International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi., Mushroom Science., 12., (1987).

23.- Martinez, Daniel., Quirarte, Marcela., Soto, Conrado.,

Salmones, Dulce y Guzmán, Gastón., Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México., Soc. Mex. Mic., 19: 207-219., (1984).

24.- Martínez, Daniel., Leben, Rodolfo., Morales, Porfirio., Sobal, Mercedes y Saavedra, Alfonso Larqué., Historia del Cultivo Comercial de hongos comestibles en México., Vol XVI. No.96. 33-43., (1991).

25.- McLarent., Chemical Dedikarvotization of *Caprinus myceliocophalus* (Agaricales)., Can. J. Bot., 48: 787-790., (1970).

26.- Miles, P.G. and J.R. Raper., Recovery of the component strains from dikariotic mycelia., Micologia., 48: 484-494., (1956).

27.- Nishibor, K. and Kinugawak, K., Mushroom Science X part(I)., Pricceeding of the Tenth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. France., 201-211., (1978).

28.- Pettipher, G., Cultivation of the Shiitale mushroom (*Lentinus edodes*) in lignocellulosic waste., J.Sci. Food. Agric., Vol 42. 195-198., (1988).

29.- Raper, J.R., Genetics of sexuality in higher fungi. Ronald Press. New York., (1966).

30.- Royse, D.J. and Bahier, C.C., Effect of genotype spawn run time and substrate formulation on biological efficiency of Shiitake., Applied and Enviroment Microbiology., Am. Soc. Microbic. Vol. 52. No.6. 1425-1427., (1986).

- 31.- Royse, D.J., Shisler L.C. and Diehle, D.A., Shiitake mushrooms consumption, production and cultivation., Interdisciplinary Science Reviews., Vol.10, No.4. 329-335., (1985).
- 32.- Royse, D.J., Spear, M.C. and May, B., Single and joint segregation of marker loci in the Shiitake mushroom. Lentinus edodes., J. Gen. Appl. Microbiol., Vol.29. 217-222., (1983).
- 33.- Ruiz Terán, Francisco., Producción del hongo comestible Lentinus edodes en sustratos de desecho lignocelulosicos., Tesis U.N.A.M., México D.F., (1990).
- 34.- Senyah, J.K., Mushrooms form waste materials., Microbiology-4., Editor: Robinson, R.K. and Elsevier., Applied Science., London., 1-12., (1988).
- 35.- Song, C.H. and Cho, K.Y., Synthetic medium for the production of submerged cultures of Lentinus edodes., Micologia., Vol. 76(6). 866-876., (1987).
- 36.- Stamets, P. and Chilton, J.S., The Mushroom cultivator., Agarikar Press., Olympia Washington. E.U.A., (1983).
- 37.- Suzuki, F. and Oshima, E., Influence of Shiitake (Lentinus edodes) on human serum Cholesterol., Mushroom Science IX (Part I). 463-467., (1974).
- 38.- Takemaru, T., Monokaryotization studies in the Basidiomycetes. I. Chemical induction., Rep. Tottori. Myc. Inst., (Japan) 4: 35-38., (1964.a).
- 39.- Takemaru, T., Monokaryotization studies in the Basidiomycetes. II. Neoplasm induced by oxgall treatment.

Rep. Tottori. Myc. Inst., (Japan) 4: 41-43., (1964.b).