



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“Dedicarización de una cepa comercial de
Pleurotus”

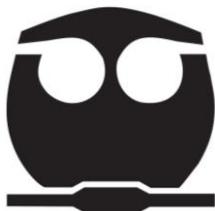
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

BLANCA ESTELA NÚÑEZ ARVÍZU



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: José Manuel Méndez Stivalet**
VOCAL: **Profesor: Rebeca Ramírez Carrillo**
SECRETARIO: **Profesor: Jacinto Eduardo Mendoza Pérez**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Edgar Axel Donjuán Guerrero**
2do SUPLENTE: **Profesor: Azucena Ibeth Carballo Villalobos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Facultad de Química, Conjunto "E", Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 324, UNAM.

Asesor del tema: _____

Dra. Rebeca Ramírez Carrillo

Sustentante: _____

Blanca Estela Núñez Arvízu

AGRADECIMIENTOS

A dios por estar conmigo todos los días de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por permitirme ser parte de esta gran institución.

A la Dra. Rebeca Ramírez por la paciencia, orientación, apoyo, por todos los consejos tanto académicos como de vida y por darme el honor de trabajar bajo su tutoría.

A todos mis profesores a lo largo de mis años como estudiante, ya que cada uno de ellos me ha dejado enseñanzas para la vida

A mi jurado, gracias por el tiempo dedicado a la revisión este trabajo, valiosos comentarios y correcciones, en particular al Profesor José Manuel Méndez Stivalet, quien es una maravillosa persona y también fue mi profesor de varias orgánicas, agradezco a la vida por permitirme conocerlo.

DEDICATORIAS

A mi mamá por el amor, las sonrisas, las lágrimas, los abrazos, el tiempo compartido, los regaños y sus sabios concejos, TE AMO MAMI.

A mi hermano por ser quien es, por todos esos momentos juntos tanto buenos como malo, concejos y por todo lo que nos falta vivir, TE AMO HERMANITO.

A mi padre por el apoyo y el amor a pesar de la distancia.

A mis amigos:

Jacky, Moni y Sara por todo este tiempo juntas y que la vida nos siga dando la dicha de seguir estándolo.

Liz, Gabo, Topo, Chuy, Lili, Marilin, Marisol, Hendi por los momentos que hemos compartido desde que nos conocemos (fiestas, bailes, comidas, conciertos, viajes, travesuras etc) y la lata que nos falta dar.

A la familia Villanueva: Sra Adela, Sr Enrique, Pati y Erick, Chucho, Santi, Alin, Esme, comadrta Rosita, gracias por ser parte de mi familia

A la Sra. Pati y su hija Pati por toda la ayuda y apoyo que me han tanto a mí como a mi familia

A Capitán III, Roco, Chocolate, Leonardo, Bili, La 1 y la 2 por ser una compañía hermosa, latosa y calientita

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. ANTECEDENTES	2
2.1. ¿Qué es un hongo?	2
2.2. Importancia de los hongos en la naturaleza.....	4
2.3. Valor alimenticio de los hongos.....	5
2.4. Importancia de <i>Pleurotus</i>	6
2.5. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	7
2.5.1. Descripción taxonómica:.....	7
2.5.2. Características macroscópicas:	8
2.6. División y ciclo de vida de los hongos.....	9
2.7. Producción nacional de hongos comestibles.	12
2.8. Mejoramiento genético de hongos comestibles	13
2.8.1. Mejoramiento genético a partir de progenies meióticas.....	14
2.8.2. Mejoramiento genético por medio del proceso de dedicariotización.....	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos particulares.....	18
5. HIPÓTESIS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. Secuencia experimental	20
6.2. Material biológico	23
6.3. Medios de cultivo	23
6.3.1. Extracto de malta agar.....	23
6.3.2. Soluciones dedicariotizadoras	23
6.3.3. Preparación de solución de extracto de malta	24
6.4. Resiembra de las cepas de <i>Pleurotus</i> (dicarióticas, neohaplontes obtenidos y neohaplontes de la cepa asporógena PAsp14)	24

6.5. Preparación del inóculo para la solución dedicariotizadora	24
6.6. Dedicariotización	25
6.7. Clasificación de neohaplontes en tipos de compatibilidad	25
7. RESULTADOS	27
7.1. Dedicariotización	27
7.1.1. Experimento 1	27
7.1.2. Experimento 2	30
7.1.3. Experimento 3	30
7.1.4. Experimento 4	31
7.1.5. Experimento 5	32
7.1.6. Experimento 6	33
7.1.7. Experimento 7	33
7.2. Clasificación de neohaplontes en tipos de compatibilidad.	35
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	47
10. REFERENCIAS	49

1. RESUMEN

En México los hongos comestibles del género *Pleurotus*, mejor conocidos como “setas” son el segundo hongo más cultivado a escala comercial, tomando cada vez más importancia puesto que es un alimento de fácil digestión, con un alto valor nutritivo y sabor exquisito.

Este trabajo tiene como objetivo principal llevar a cabo la dedicariotización de una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus*, debido a que por tratarse de una cepa comercial tiene particular importancia para su uso en trabajos posteriores de mejoramiento genético que permitan obtener híbridos y así proveer al mercado nacional y al consumidor de material novedoso, con características sensoriales más aceptables tanto en el estípite, como en el píleo.

La cepa comercial de hongo comestible *Pleurotus ostreatus* K8501, fue sometida al efecto de una solución dedicariotizante (glucosa y peptona) con lo cual fue posible recuperar 73 neohaplontes, utilizando tiempos de maceración de 350, 400, 450 y 600 segundos, concentraciones de la solución dedicariotizadora de 20 o 30 g/L de glucosa anhidra y peptona, tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en la solución dedicariotizadora de 30 o 60 segundos y un volumen de inoculación en medio EMA de 10 μ L para todos los casos. Como resultado de los apareamientos para identificar los 2 tipos de compatibilidad se observó que sólo fue posible obtener uno de los componentes monocarióticos de la cepa. Finalmente al realizar apareamientos entre los 73 neohaplontes obtenidos para la cepa K8501 con 40 neohaplontes de la cepa PAsp14 no fue posible la obtención de híbridos, debido muy probablemente a que los neohaplontes de ambas cepas corresponden al mismo tipo de compatibilidad.

2. ANTECEDENTES

2.1. ¿Qué es un hongo?

Los hongos son organismos microscópicos o macroscópicos que viven sobre diversos materiales orgánicos, tienen células con núcleo (eucariontes) y requieren de otros seres vivos para obtener su alimento (son heterótrofos). Sus células poseen una pared gruesa de un compuesto polisacárido llamado quitina, el cual les provee rigidez y resistencia. La quitina también es el principal constituyente del exoesqueleto de los artrópodos. La mayoría de los hongos son pluricelulares y sus cuerpos están constituidos por filamentos tubulares microscópicos, denominados hifas, que se ramifican y entrecruzan. El conjunto de hifas se conoce como micelio que se observa como una masa blanca y algodonosa (proviene de la germinación de las esporas), de las cuales brotan pequeños o grandes botones, que son estructuras que producirán infinidad de simientes (o esporas) y a través de ellas se reproducirán.

Estas estructuras macroscópicas de reproducción de los hongos constituyen lo que comúnmente se conoce como “hongo”, el verdadero hongo no es necesariamente visible por que se encuentra debajo del suelo y la hojarasca. Estas masas pueden formar uno o varios cuerpos fructíferos (Figura 1). De tal manera que cuando andamos en un bosque colectando hongos, lo que en realidad se hace es coleccionar los cuerpos fructíferos de éstos. Comúnmente tienen el sombrero o píleo, que puede llevar en la parte inferior láminas, venaciones, poros o agujas en forma de finos dientes colgantes; generalmente es el píleo la parte más llamativa del hongo por presentar colores muy variados y además, es la parte más comestible por ser carnosa. El tallo o estípite, es la parte que sostiene al sombrero; puede ser comestible cuando es carnoso, o desechable cuando es fibroso o coriáceo; a veces está adornado en la parte superior como una membrana colgante, a manera de anillo; en la base del pie, puede dilatarse en un bulbo y estar cubierta por una membrana más o menos gruesa o escamosa llamada volva (Guzmán, 1993; Biodiversidad, 2017).

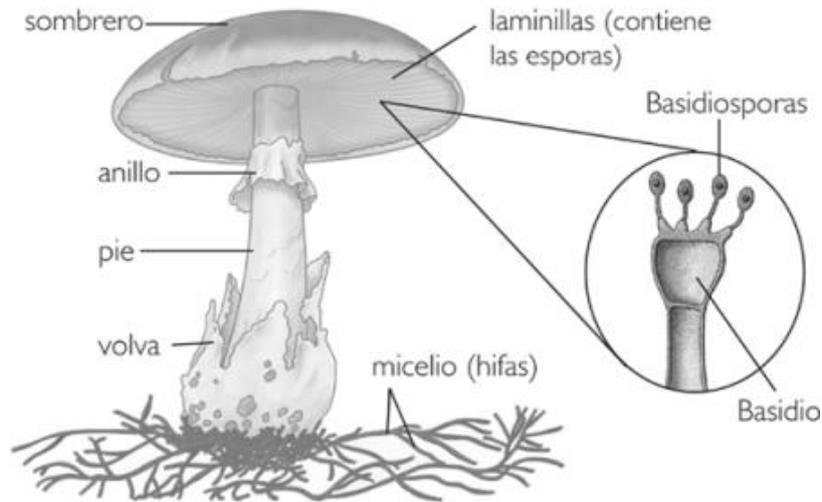


Figura 1. Cuerpo fructífero del hongo

Para alimentarse, los hongos primero descomponen su alimento en pequeñas moléculas que después absorben a través de las membranas de sus células. La mayoría se alimentan de materia orgánica muerta (saprobios), otros son parásitos y algunos son depredadores. Puede encontrarse adheridos a objetos muy variados, como madera, vidrio, metal oxidado, estiércol, humus, plástico, etc. (Biodiversidad, 2017; Fortin, 1999).

Los hongos microscópicos o los llamados mohos que crecen sobre los alimentos, por ejemplo, las masas algodonosas blanquecinas, verdes o anaranjadas que crecen sobre pan, naranjas o tortillas, son hongos microscópicos que nunca forman cuerpos fructíferos macroscópicos. Estos mohos corresponden a los conocidos en micología como: *Rhizopus*, *Penicillium* y *Monilia*, respectivamente (Guzmán, 1993).

Los hongos pueden reproducirse de forma sexual o asexual, produciendo esporas que permiten su dispersión hacia nuevos lugares que les ayudan a sobrevivir en condiciones adversas, como la deshidratación o congelación. También pueden desarrollarse a partir de cualquier fragmento de micelio, por pequeño que sea, aunque esto no ocurre frecuentemente (Biodiversidad, 2017).

Los hongos son conocidos desde tiempos muy antiguos, se sabe que tienen el poder de provocar la muerte. No obstante, muy pocas especies de entre las miles que existen son realmente venenosas, aunque numerosas variedades pueden provocar molestias, como diarrea, dolor de estómago y vómitos. Por esta razón es mejor no ingerirlas si no se sabe a ciencia cierta si son comestibles. Aunque muchas variedades de hongos son comestibles, sólo existen unas 20 variedades realmente exquisitas (Fortin, 1999).

2.2. Importancia de los hongos en la naturaleza.

Debido a que los hongos viven de la descomposición de la materia orgánica en sus diversas formas, incluyendo la basura, hojarasca y otros substratos, estos organismos constituyen la clave para la reincorporación de los materiales orgánicos en el suelo, favoreciendo así la formación o el enriquecimiento de suelos. Son esenciales en el reciclaje de nutrientes en todos los hábitats terrestres; contribuyen a regular las poblaciones de las plantas, animales e insectos que parasitan (Guzmán, 1993; Biodiversidad, 2017).

Los vegetales verdes pueden asimilar los nutrientes del suelo, en parte, gracias a la acción de los hongos que han degradado la materia orgánica, facilitando que sea absorbida por las raíces. Por otra parte, en los bosques de coníferos y de encinos, hay infinidad de hongos que viven asociados con las raíces de los árboles, ayudando esta asociación tanto al hongo, como al árbol, en un mayor crecimiento de ambos. Esta asociación, la cual se llama micorriza, se encuentra ampliamente difundida en México en los bosques y su importancia forestal es indiscutible.

Existen especies de hongos que son parásitas, unas parasitan animales y otras vegetales, las primeras constituyen por su importancia toda una especialidad en la medicina, ya que son muchas las especies de hongos que atacan al hombre, tales como las llamadas “tiñas” o el “pie de atleta”. Los hongos que provocan enfermedades en los vegetales, ocasionan fuertes pérdidas en cultivos de importancia económica, tales como: plátano, uvas, frijol, maíz, trigo entre otros; todos estos hongos son microscópicos, excepto algunos ejemplos

macroscópicos, como el conocido “cuitlacoche” del maíz y los hongos leñosos que atacan los árboles como *Ganoderma sessile*, *Pleurotus smithii* y varias especies de *Polyporus* y *Fomes* (Guzmán, 1993).

2.3. Valor alimenticio de los hongos.

La composición química de los hongos varía según la especie, incluyendo:

Proteínas: en proporción de 20 a 40% de su peso seco, tal cantidad de proteínas los coloca por arriba de la mayoría de los vegetales, frutas y verduras que se consumen en una dieta típica. **Aminoácidos:** La calidad y cantidad de aminoácidos esenciales que los constituyen son de 16 a 21 aminoácidos.

Vitaminas: Son una fuente significativa de vitaminas como la tiamina (B1), riboflavina (B12), ácido ascórbico (C), vitamina D₂ (ergosterol), ácido pantoténico, niacina y biotina entre otras.

Minerales: encontrándolos en cantidades significativas como: calcio, fósforo, cobre, potasio y hierro.

El contenido de grasas, carbohidratos y calorías es bastante bajo lo que lo hace un alimento ideal, además de sabroso, nutritivo y bajo en calorías constituyendo una excelente opción alimentaria (Barba Chávez *et al.*, 2013)

Las setas (hongos del género *Pleurotus*) son ricas en calcio y riboflavina. Además se les atribuye numerosas propiedades medicinales. Tales como: laxante, antibiótico, ayuda a disminuir el colesterol y afrodisíacos (García Rollán, 2007; Fortin, 1999).

En el caso particular de las setas, su contenido de agua es elevado (90-95%), aumentando con la edad y disminuyendo por estancias en el frigorífico, tomando como ejemplo 100 g de *Pleurotus ostreatus* fresco hay, además de agua:

- 0.8 – 2 g proteínas.
- 3 – 6 g carbohidratos.
- 0.05 – 0.3 g grasas.
- 0.5 – 1 g compuestos minerales.
- 15 - 20 calorías.

Durante la cocción, la mayor parte del contenido de agua se pierde, quedando prácticamente concentrados los otros componentes, a lo que en parte se debe el sabor particular de los hongos (Pérez Silva *et al.*, 2015).

Los hongos se pueden comprar frescos, secos, congelados o en conserva, algunas especies de hongos se pueden comer crudas (champiñón cultivado, boleto comestible, seta de ostra, etc.), no obstante, la mayoría de los hongos silvestres son comestibles después de la cocción (Fortin, 1999).

2.4. Importancia de *Pleurotus*.

El género *Pleurotus* comprende especies lignícolas, generalmente de color blanco, amarillento o rosado, a veces grisáceo o moreno, con forma de embudo, pétalo de flor o concha de ostra, y que carecen de estípite, o bien éste es lateral o excéntrico y corto, aunque a veces puede ser mediano o largo. *P. ostreatus*, *P. cornucopioides* y *P. mexicanus* son hongos muy apreciados entre los comestibles, en particular el primero, que en algunos países es cultivado en escala industrial. Es un ejemplar muy estimado, sobre todo el que tiene forma de ostra. Es un buen sustituto de champiñón cultivado. Se recomienda no ingerirlo con alimentos muy fuertes, debido a que no percibirá bien su sabor (Fortin, 1999).

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* crece saprofiticamente en ambientes naturales sobre troncos de árboles caídos y otras plantas leñosas en descomposición. Es un hongo semi-anaeróbico que soporta un 32% de CO₂ y fija nitrógeno atmosférico. Zervakis y Venturella (2002) consideran que cada cepa tiene un potencial bioquímico distinto, por ejemplo, en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual puede ser utilizado como criterio para identificar la calidad de cepas que sean convenientes para programas de

hibridación. Por lo tanto, *Pleurotus* y muchos basidomicetos, producen compuestos de interés industrial tales como ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, enzimas y otros metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas gracias a estas características, los hongos tienen diversas aplicaciones en ámbitos biotecnológicos tales como: el ambiente, farmacológico y alimentario.

2.5. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.



Figura 2. *Pleurotus ostreatus*

2.5.1. Descripción taxonómica:

Dominio:	Eucaria
Reino:	Fungi
Subreino:	Dicaría
Filum:	Basidomicota
Subfilum:	Basidomicotina
Clase:	Agaricomycetos
Subclase:	Agaricomycetae
Orden:	Agaricales
Familia:	Pleurotaceae
Género:	<i>Pleurotus</i>

2.5.2. Características macroscópicas:

Sombrero o píleo: 5-20 cm de diámetro, con forma semicircular o de concha.

Superficie del sombrero: Color variable que suelen ser grises u ocre grisáceos, aunque existen formas de color gris plateado, verdi-azules e incluso próximas al pardo, esto suele dar lugar a la creación de múltiples variedades. De piel lisa, separable y brillante, sobre todo con lluvia cuando resulta un tanto lubricada, el borde se presenta enrollado en los especímenes jóvenes, quedando después fino y algo ondulado.

Láminas: Dispuestas radialmente que van desde el pie que lo sostiene hasta el borde del sombrero. Separadas unas de otras, aunque algunas estén bifurcadas, son de color blanco o ligeramente crema.

Pie o estípote: 1-2 x 1 cm, blanco, pubescente, muy corto y totalmente lateral, hay individuos en los que apenas es perceptible debido a que está incrustado en el sustrato.

Carne: consistente y tenaz de color blanco, de olor fúngico suave, sabor dulce y agradable.

Esporas: Vistas al microscopio son alargadas, casi cilíndricas, cuando se depositan en masa forman un polvillo harinoso de color blanco con tono lila-grisáceo.

Hábitat: otoño y principios de invierno sobre árboles muertos, en heridas de troncos y troncos caídos: cultivados en paja y madera (Lohmeyer y Künkele, 2006; García Rollán, 2007).

En México recibe el nombre de oreja u oreja de cazahuate, pero los cultivadores de hongos lo denominan también *Pleurotus* o pleuroto. Puede ser cultivado en un medio preparado con materiales celulósicos, como fragmentos de papel, aserrín de pino o con paja de gramíneas y harina de frijol, al que se le adicionan algunas sales minerales como carbonato y sulfato de calcio; pajas de

trigo o cebada, astillas de álamo y eucalipto, bagazo de caña de azúcar, pulpa y cascarilla de café, tamo de amaranto, olote de maíz, fibras de algodón, bagazo de maguey pulquero o tequilero, de henequén y uva, residuos de las cosechas de jamaica y plátano, lirio acuático, zacates verdes, tallos de plátanos, entre otros materiales provenientes de residuos agroindustriales; también es cultivado en tocones o troncos de árboles muertos, debido a que tienen la capacidad de desdoblar la lignina sin que sea necesario efectuar una fermentación previa u otro tipo complicado de preparación química o biológica. En países orientales es frecuente el cultivo en frascos o vasijas de boca ancha, llenándolos con una mezcla de aserrín, maíz y salvado de arroz (Barba Chávez et al., 2013; Cayetano-Catarino y Bernabé-González, 2008; Chairez-Aquino et al., 2015; de León-Monzón et al., 2004; Flores Macías et al., 2013; Job, 2004; García, 2007; López-Rodríguez et al., 2008; Manjarrés et al., 2010; Sánchez Vázquez et al., 2007; Varnero et al., 2010).

Algunas cepas de *P. ostreatus* destruyen más rápidamente la lignina que la celulosa. De manera que es posible que sólo se conserve la última en los materiales lignocelulósicos donde dichas cepas son cultivadas, por lo que el residuo celulósico y hemicelulósico puede ser aprovechado, por ejemplo, como forraje para el ganado, por que es de más fácil digestión que los materiales que contienen lignina. No obstante, el cultivo de estos hongos en escala industrial todavía presenta algunas dificultades, pues las cepas silvestres esporógenas producen reacciones alérgicas en las personas susceptibles que manejan el cultivo de esta especie. En la actualidad se pretende cultivar sólo las cepas asporógenas obtenidas por mutación y selección genética con objeto de evitar dicha acción nociva de las esporas del hongo (Barba Chávez et al., 2013).

2.6. División y ciclo de vida de los hongos.

Los hongos filamentosos se dividen en inferiores y superiores, por las características de sus hifas:

Hongos inferiores: En las hifas el citoplasma es generalmente continuo, no está separado por septos, posee numerosos núcleos minúsculos que se desplazan

libremente por una corriente citoplasmática que también permite el transporte de elementos nutritivos al interior del micelio (se les conoce como mohos).

Hongos superiores: tienen septos con perforaciones centrales que permiten el paso del citoplasma (Molina Bastidas *et al.*, 2013).

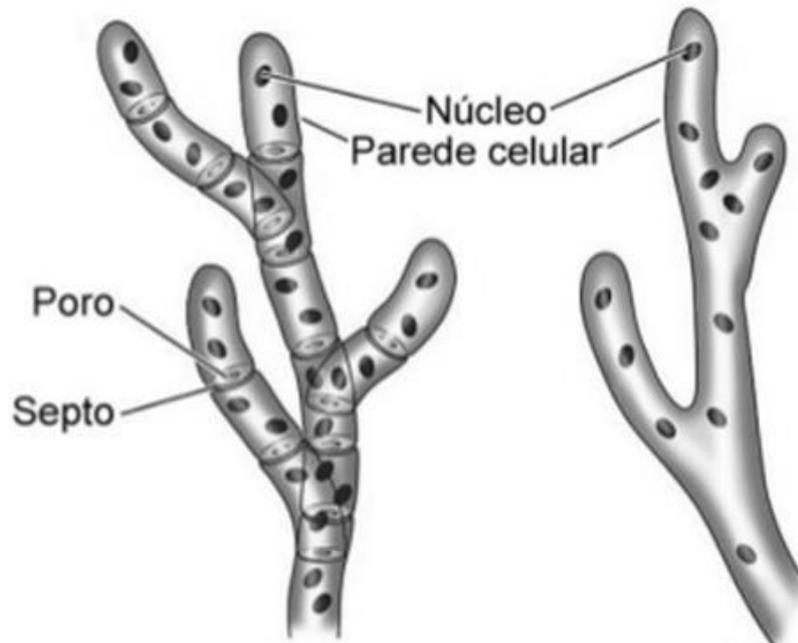


Figura 3. a) Hifas con septos b) Hifas sin septos

El ciclo de vida de los hongos superiores está dividido en dos fases de crecimiento:

Vegetativo: Involucra un aumento lineal del micelio, cuando se dan en condiciones de baja temperatura, humedad y oxígeno elevados, en algunos casos, luz.

Reproductivo: El micelio cesa su crecimiento vegetativo y comienza a producir cuerpos fructíferos. En las laminillas que se encuentran en la parte inferior del píleo se forman los basidios, cuando los núcleos dentro de cada basidio se fusionan (cariogamia) se producen 4 núcleos, los cuales mediante meiosis darán lugar a las cuatro basidiosporas, las cuales se desprenden mediante la esporulación, cuando estas caen germinan y forma una hifa que va creciendo y

ramificándose por el medio, formando lo que se conoce como micelio primario el cual posee un núcleo idéntico al de la basidiospora original, conocido como homocarión, este tipo de micelio rara vez dará lugar a nuevos cuerpos fructíferos, excepto en ciertas especies, como: *Coprinus fugaces* y *Volvariella volvacea*.

Dos hifas de micelio primario compatibles pueden fusionarse de acuerdo a un complejo sistema de genes de cruza, dando lugar a micelio secundario o heterocariótico fértil y dicariótico, por tener dos núcleos en cada septo de sus hifas. Este micelio se caracteriza por tener fíbulas (Figura. 4), las cuales son estructuras indicadoras de hifas dicarióticas. El micelio continuará creciendo hasta que se presenten las condiciones de estrés que disparen la formación del cuerpo fructífero y así comenzar el ciclo nuevamente (Figura 5) (García Rollán, 2007; Molina Bastidas *et al*, 2013).

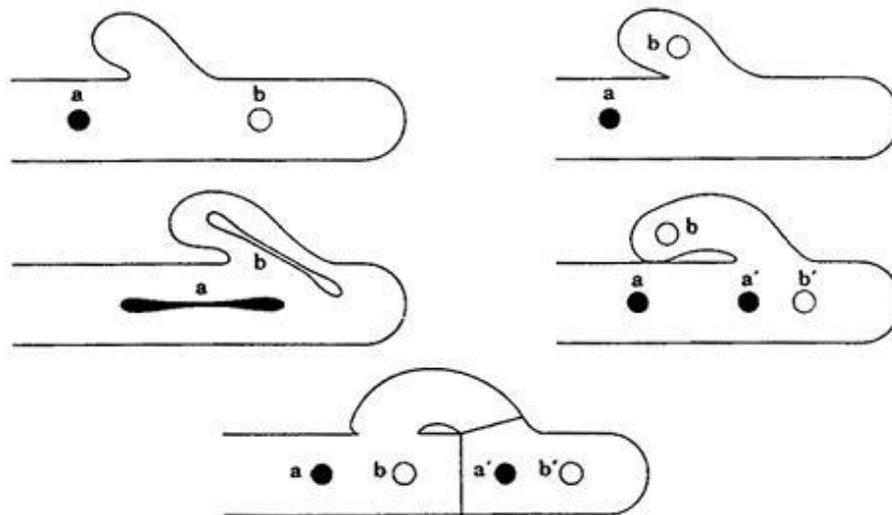


Figura 4. Formación de fíbulas

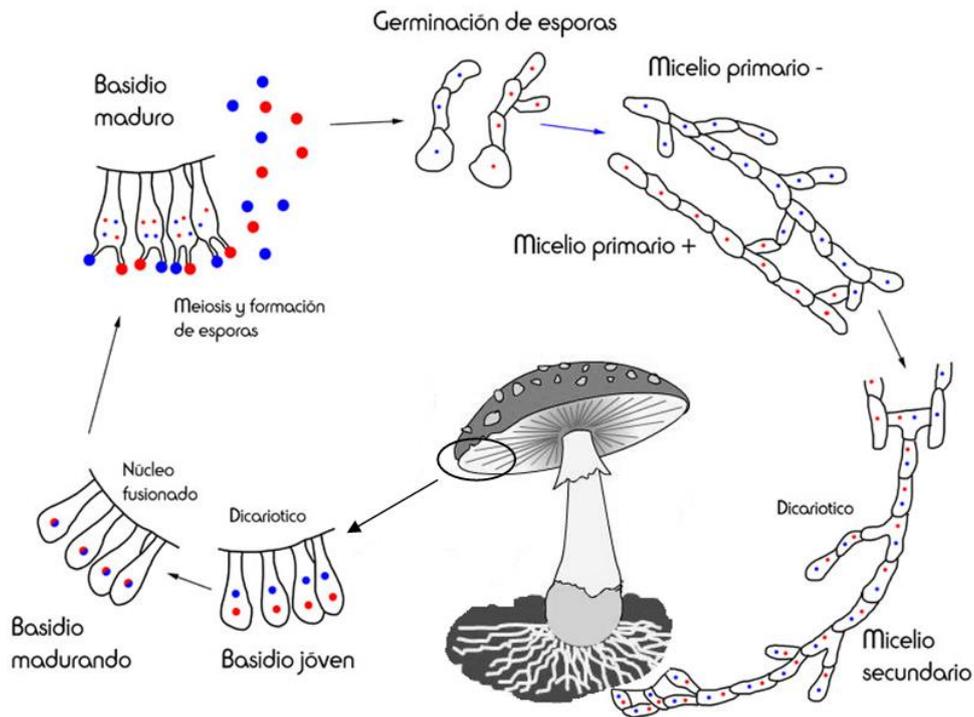


Figura 5. Ciclo de vida de los hongos heterotálicos tetrapolares

2.7. Producción nacional de hongos comestibles.

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que poco a poco va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Actualmente las especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo son: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* spp. (seta, ostra), *Lentinula edodes* (shiitake), *Ganoderma* (reishi), *Grifola* (maitake) y *Ustilago* (cuitlacoche). En 2011 en México se estimó una producción de 63,374 ton anuales de hongos comestibles, funcionales y medicinales, frescos y procesados (Martínez-Carrera *et al.*, 2012). El género *Agaricus* es el hongo comestibles más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte *Lentinula edodes* es producido principalmente en Japón, *Volvariella volvacea* en países Asiáticos y *Pleurotus* spp. en México y Sudamérica (Chang, 1999).

La producción anual de hongos y setas en México supera las mil cuatrocientas toneladas, y el Estado de México es el que más hongos y setas produce en el país (SAGARPA, 2016).

La producción mundial de hongos comestibles registró un incremento anual de 6.2 millones de toneladas para el 2004, de las cuales 38,708 toneladas fueron producidas en México lo que constituye un 59% del total de la producción de los países Latinoamericanos (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Solo hay pocas especies de hongos comestibles en el mundo que son cultivadas en escala industrial en relación con los cientos de especies de hongos comestibles que se desarrollan en estado silvestre (Barba Chávez *et al.*, 2013).

Las setas ocupan el segundo lugar de producción en México, solo después del champiñón. Actualmente, el género *Pleurotus* es cultivado en 21 estados de México y se observa que el interés por cultivarlo se incrementa no sólo en este país, sino en la mayoría de los países Latinoamericanos, como estrategia de desarrollo económico, producción de alimento y utilización de subproductos agrícolas. México es el principal productor de *Pleurotus* en América Latina.

Este hongo se puede encontrar actualmente en cualquier supermercado con una oferta gastronómica medianamente amplia y figura en la carta de muchos restaurantes.

Además de las diferencias entre los métodos de cultivo y/o composición de los sustratos, la selección de genotipos adaptados a sustratos es un camino para mejorar la producción de los diferentes hongos comestibles (setas y shiitake) con el fin de obtener cepas altamente productivas, propias para la producción a escala comercial y desarrollar información acerca de la adaptación del hongo a sustratos lignocelulósicos específicos (Silva *et al.*, 2005). La selección de genotipos puede lograrse mediante un programa de mejoramiento genético.

2.8. Mejoramiento genético de hongos comestibles.

En general, existen dos formas de lograr un mejoramiento genético siguiendo este principio:

- 1) Aislamiento de la progenie meiótica (esporas).
- 2) Dedicarización (obtención de componentes monocarióticos).

2.8.1. Mejoramiento genético a partir de progenies meióticas.

El mejoramiento genético a partir de progenies meióticas consiste en recolectar las esporas producidas por los esporóforos de las cepas de interés para posteriormente hacerlas germinar y por medio de entrecruzamientos entre cepas compatible obtener micelio dicariótico. Sin embargo, existen reportes de que mediante tal metodología los híbridos no siempre superan a las cepas parentales (Gaitán-Hernández, 2000; Salmones *et al.*, 2004). Este método es muy lento debido a que es necesario fructificar las cepas en un inicio para obtener las esporas y posteriormente para evaluar las características de las cepas obtenidas es necesario llevarlas a la etapa de fructificación. Otra desventaja de este método es la necesidad de realizar un gran número de apareamientos para encontrar las características deseadas en la progenie. Esta incertidumbre sobre el aporte genético presente en las basidio esporas se debe a que para la obtención de la progenie meiótica es necesario que el micelio dicariótico pase primeramente por la cariogamia, donde se fusionan los núcleos del micelio dicariótico produciendo un núcleo zigótico y posteriormente pasa al proceso de meiosis dónde se obtienen cuatro núcleos haploides que contienen el material genético en una combinación diferente a la que se encontraba en las cepas monocarióticas que dieron origen a la cepa parental.

2.8.2. Mejoramiento genético por medio del proceso de dedicariotización.

La dedicariotización consiste en la separación artificial de los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) de una cepa dicariótica. Los neohaplontes tienen como característica la obtención de un micelio sin fíbulas y su obtención se puede llevar a cabo por métodos mecánicos y químicos. La operación microquirúrgica es un método físico de baja reproducibilidad y muy escasa recuperación de neohaplontes. La dedicariotización química emplea sustancias de alta toxicidad como taurocolato de sodio y ácido cólico o sustancias menos tóxicas como son: el uso de soluciones de peptona y glucosa, donde probablemente el efecto dedicariotizante se atribuye a la presencia de algún compuesto tóxico producido durante la esterilización de la solución dedicariotizante. Sin embargo, no se conoce con certeza el mecanismo que provoca la dedicariotización de micelio dicariótico. Miles y

Raper (1956) y Tokimoto *et al.*, (1978) propusieron la siguiente hipótesis: la destrucción del dicariote por agentes químicos resulta en un defecto en la fusión entre las fibras y la penúltima célula durante el proceso, lo que ocasiona que la fibra y la penúltima célula contengan un solo núcleo y se forme el neohaplonte. La ventaja que presenta este proceso, es que la información genética de una cepa se encuentra intacta en los dos monocariotes recuperados, lo cual facilita el proceso de mejoramiento genético, puesto que el método de progenies meióticas, presenta variabilidad genética de las esporas por ser producto de la fusión de núcleos y segregación a partir del proceso de meiosis.

3. JUSTIFICACIÓN

Los factores que han inducido al hombre para apreciar a los hongos como alimento son su consistencia carnosa, fácil digestión, alto valor nutritivo y sabor exquisito. Lo que ha llevado al cultivo de los hongos en locales higiénicamente controlados para que nos permita consumirlos en cualquier época del año y no sólo en temporada de lluvias.

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* crece saprofiticamente en ambientes naturales sobre troncos de árboles caídos y otras plantas leñosas en descomposición. Es un hongo semianaeróbico que soporta un 32% de CO₂ y fija nitrógeno atmosférico. Zervakis y Venturella (2002) consideran que cada cepa tiene un potencial bioquímico distinto, por ejemplo, en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual puede ser utilizado como criterio para identificar la calidad de cepas que sean convenientes para programas de hibridación. Por lo tanto, *Pleurotus* y muchos basidomicetos, producen compuestos de interés industrial tales como: ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, enzimas y otros metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas, gracias a estas características, los hongos tienen diversas aplicaciones en ámbitos biotecnológicos tales como: el ambiente, farmacológico y alimentario.

El género *Pleurotus*, mejor conocido como “setas” es el segundo hongo más cultivado a escala comercial en México y va tomando cada vez más importancia por lo que surgen programas sociales para la producción de este hongo en beneficio de las familias mexicanas (SAGARPA, 2016).

Existen pocos trabajos enfocados en las cepas de *Pleurotus ostreatus* y su proceso de dedicariotización. Si bien el proceso de dedicariotización no es nuevo, no existe mucha información para este género y especie en particular, por lo que en este trabajo se enfoca en dar a conocer más información sobre: sensibilidad que tiene el efecto mecánico para lograr la obtención de fragmentos muy pequeños que coadyuven en la obtención de ambos componentes monocarióticos de la cepa, con los cuales será posible su

posterior apareamiento con otras cepas diferentes con el fin de obtener nuevas variedades y así proveer al mercado nacional y al consumidor de material novedoso, con características sensoriales más aceptables en el estípite y píleo.

Dado que la mayoría de las cepas con las que se trabaja en los laboratorios de investigación son de procedencia extranjera, sería de gran utilidad contar con cepas con características que satisfagan tanto las necesidades de los productores, como del consumidor, evitando así la necesidad de importar cepas que por lo general no se adaptan a las condiciones locales de producción. Además la importación y dependencia de cepas del extranjero requiere de altos costos, lo que repercute directamente en el precio de venta del producto al consumidor.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Dedicarización de una cepa del género *Pleurotus* para su uso en la obtención de híbridos por apareamiento de neohaplontes.

4.2. Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones para la dedicarización de una cepa del género *Pleurotus ostreatus*.
- Clasificación de neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad
- Apareamiento de neohaplontes para la obtención de híbridos de *Pleurotus ostreatus*.

5. HIPÓTESIS

Será posible recuperar ambos componentes monocarióticos de la cepa dicariótica de *Pleurotus ostreatus* K8501 mediante el proceso de dedicariotización utilizado para otras cepas del mismo género.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Secuencia experimental

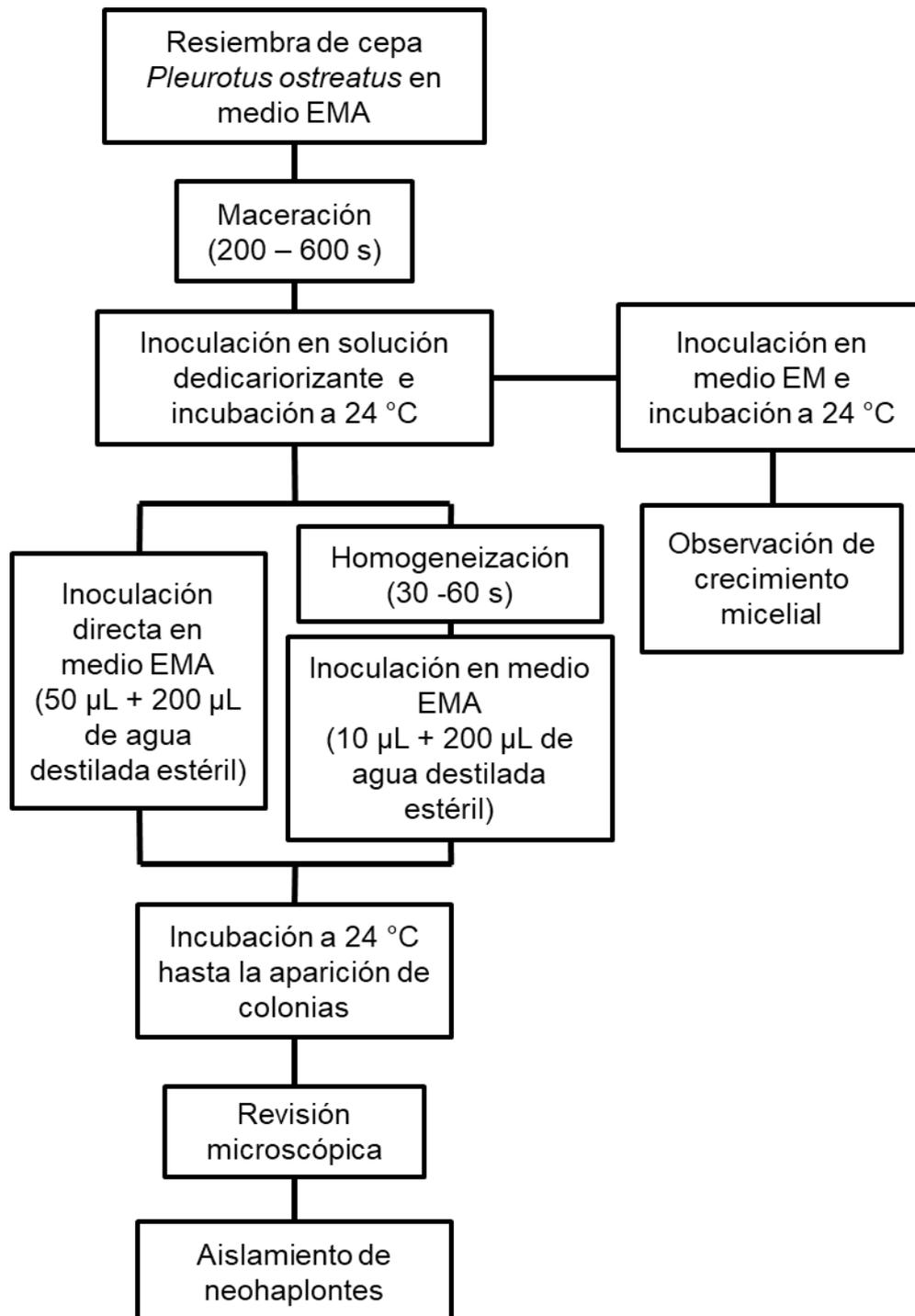


Figura 6. Primera etapa: Dedicariorización de la cepa de *Pleurotus ostreatus*

K8501

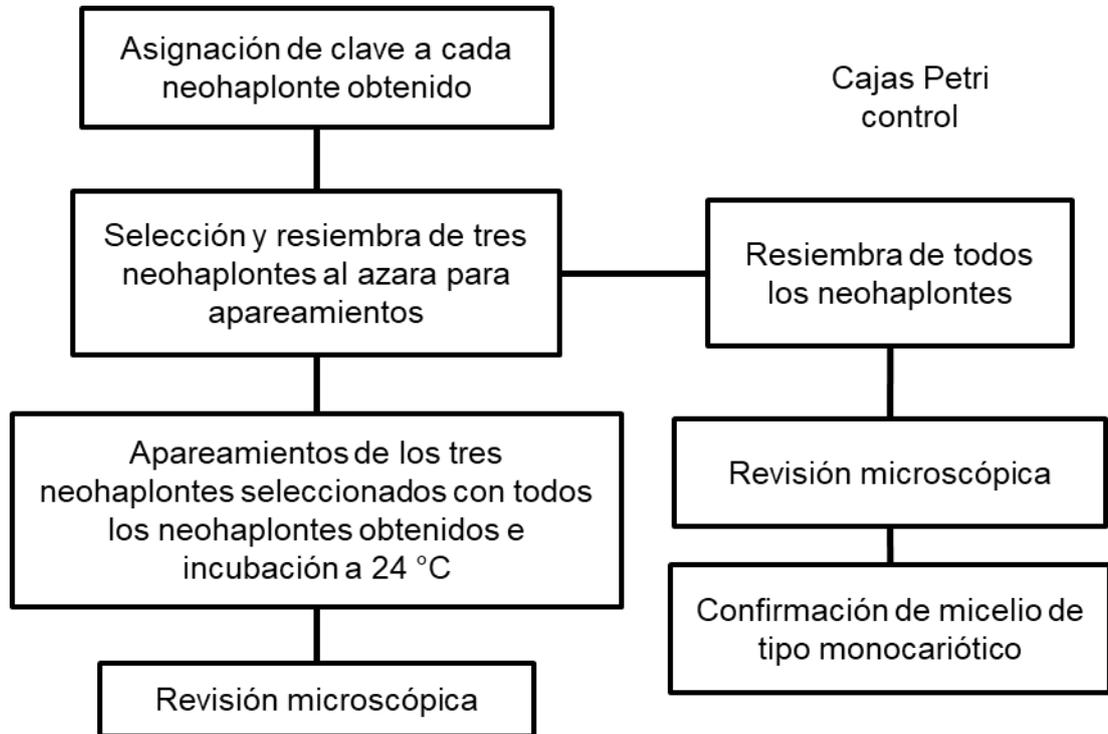


Figura 7. Segunda etapa: Clasificación de neohaplonces en tipos de compatibilidad

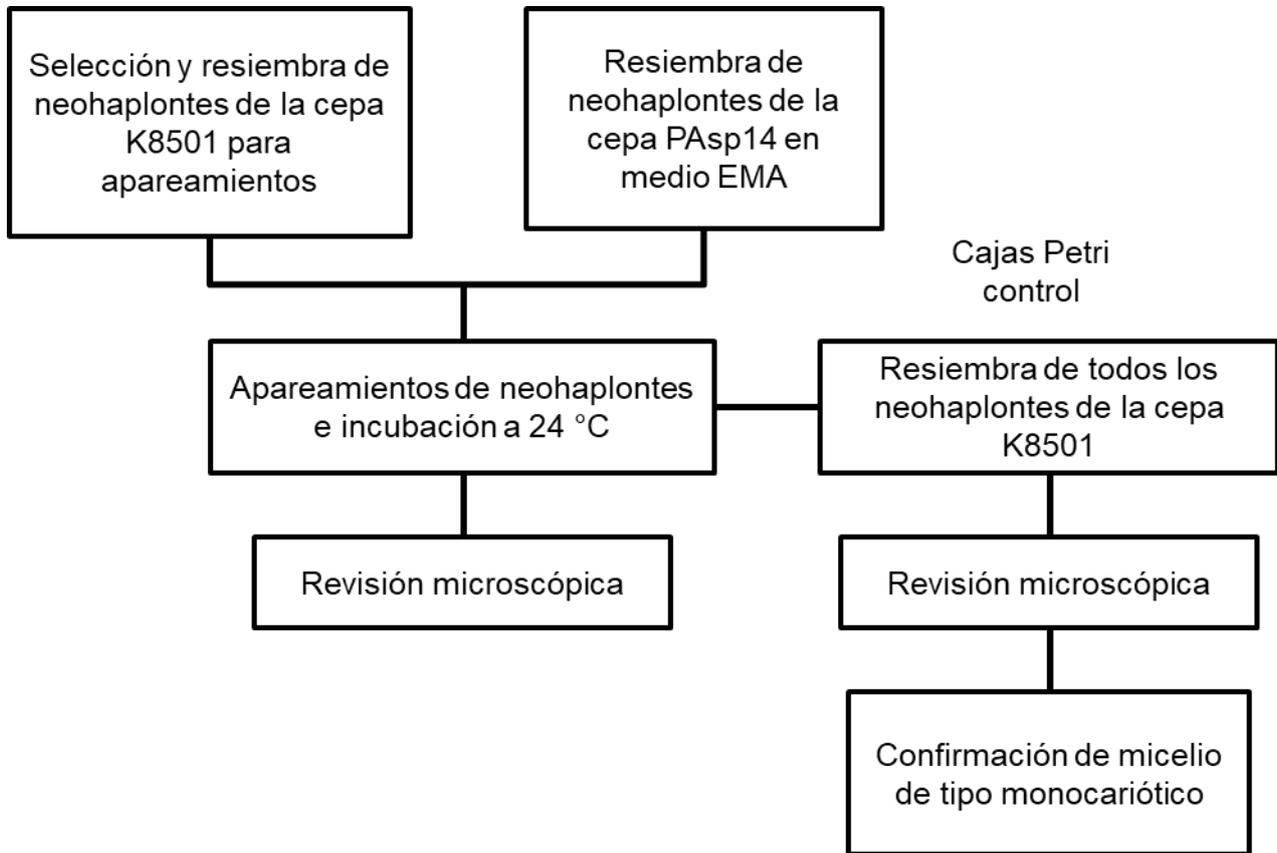


Figura 8. Tercera etapa: Obtención de híbridos

6.2. Material biológico.

Para este trabajo se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* con clave K8501. Esta cepa se obtuvo del cepario de la Facultad de Química del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 324 de la UNAM y sus principales características se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1: Claves y características del material biológico

Clave del cepario	Tipo de cepa	Clave en el trabajo
K8501	<i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa comercial)	K8

6.3. Medios de cultivo.

6.3.1. Extracto de malta agar.

El medio extracto de malta agar (EMA) se prepara disolviendo 7.5 g de extracto de malta en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1 L, a continuación se agregan 9 g de agar bacteriológico y se agita el matraz para hidratar el agar. Finalmente se agregan los 400 mL de agua destilada faltante y se esterilizan en autoclave a 121 °C, 15 lbs de presión durante 45 minutos. Del medio estéril se vacían 10 mL en cajas Petri estériles con la ayuda de una jeringa de llenado continuo, una vez solidificado el medio, las cajas Petri se colocan dentro de bolsas de plástico y se incuban a 24 °C durante 24 horas para verificar su esterilidad. Este medio se utiliza para la propagación micelial de todas las cepas y para realizar los apareamientos.

6.3.2. Soluciones dedicatorizadoras.

Para preparar las soluciones dedicatorizadoras se utilizaron diferentes concentraciones de glucosa anhidra High Purity® (20 y 30 g/L) y peptona bacteriológica Oxoid® (20 y 30 g/L) disueltas con agua destilada en el mismo matraz. De las soluciones dedicatorizadoras se colocaron 50 mL en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad y se esterizaron a 121 °C y 15 lbs de presión durante 45 minutos. Una vez frías las soluciones dedicatorizadoras se incuban a 24 °C durante 24 horas para verificar su esterilidad. Estas soluciones

se emplearon para obtener los dos componentes monocarióticos de las cepas de *Pleurotus*.

6.3.3. Preparación de solución de extracto de malta.

La solución de extracto de malta (EM) se prepara con 15 g de extracto de malta Bioxon disueltos en 1 litro de agua destilada, dosificando 50 mL de la solución en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad y se esterilizan a 121 °C y 15 lbs de presión durante 30 minutos.

6.4. Resiembra de las cepas de *Pleurotus* (dicarióticas, neohaplontes obtenidos y neohaplontes de la cepa asporógena PAsp14).

Para la propagación micelial de las cepas se resiembran en medio extracto de malta (EMA) y colocan 5 inóculos de 0.3 mm de diámetro en 5 puntos equidistantes de la placa de agar, a una distancia de los bordes de la caja de aproximadamente 1.5 cm. Las cajas se incuban a 24 °C hasta observar colonias de alrededor de 3 cm de diámetro. Todas las colonias se observan al microscopio para confirmar, que las cepas estén libres de contaminaciones y corroborar su carácter dicariótico o monocariótico.

6.5. Preparación del inóculo para la solución dedicariotizadora.

Para la propagación de las cepas de *Pleurotus* se resiembra la cepa en medio de extracto de malta agar (EMA), colocando 5 inóculos de 0.3 mm de diámetro en 5 puntos equidistantes de la placa de agar, a 1 cm de distancia del borde de la caja. Las cajas se incuban a 24 °C hasta observar colonias de alrededor de 3 cm de diámetro. Las 5 colonias previamente desarrolladas en EMA se colocan en un vaso homogeneizador estéril (waringblendor) con 50 mL de agua destilada estéril y fría. El homogeneizador se opera por diferentes tiempos (200 hasta 600 segundos) a la velocidad más alta.

Los matraces con solución dedicariotizadora y solución de extracto de malta se inoculan con 30 y 50 µL del macerado e incuban a 24 °C hasta la aparición del micelio.

6.6. Dedicariotización.

Una vez que se observa desarrollo micelial en los matraces con solución dedicariotizadora, se toman alícuotas de 30 y 50 μL de la solución dedicariotizadora y se inoculan en placas con EMA. Estas cajas Petri se incuban a 24 °C hasta la aparición de colonias. Además se homogeneiza el contenido de los matraces en un vaso estéril del homogeneizador (waringblendor) durante 60 segundos y se inoculan 30 μL del homogeneizado en placas con EMA. Las placas también se incuban a 24 °C hasta la aparición de colonias. El micelio procedente de dichas colonias se examina al microscopio para determinar la presencia o ausencia de fíbulas. Las colonias en donde se observa ausencia de fíbulas son aisladas y resembradas en EMA para verificar la ausencia de fíbulas al desarrollarse nuevamente.

6.7. Clasificación de neohaplontes en tipos de compatibilidad.

Para la identificación de los dos componentes monocarióticos de la cepa dicariótica, se seleccionan 3 neohaplontes y se cruzan con todos los neohaplontes obtenidos en medio EMA. Estos apareamientos se realizan cortando un cubo de agar con micelio del neohaplonte seleccionado de aproximadamente 2 mm de lado, para colocarlo en una caja Petri con medio EMA, colocando al lado de éste y lo más cercano posible otro cubo de agar con micelio de igual tamaño de un neohaplonte diferente. En cada caja Petri se realizan 5 apareamientos (Figura 9). Como control en otra serie de cajas Petri con medio EMA se coloca un cubo de agar con micelio de cada uno de los neohaplontes previamente obtenidos para verificar su carácter monocariótico. Las cajas Petri se incuban a 24 °C hasta observar la aparición de colonias y en ese momento se examinan al microscopio primero las colonias desarrolladas en medio EMA de cada uno de los neohaplontes para confirmar su carácter monocariótico. A continuación se revisan al microscopio las cajas Petri que contienen los apareamientos para determinar la presencia o ausencia de fíbulas.

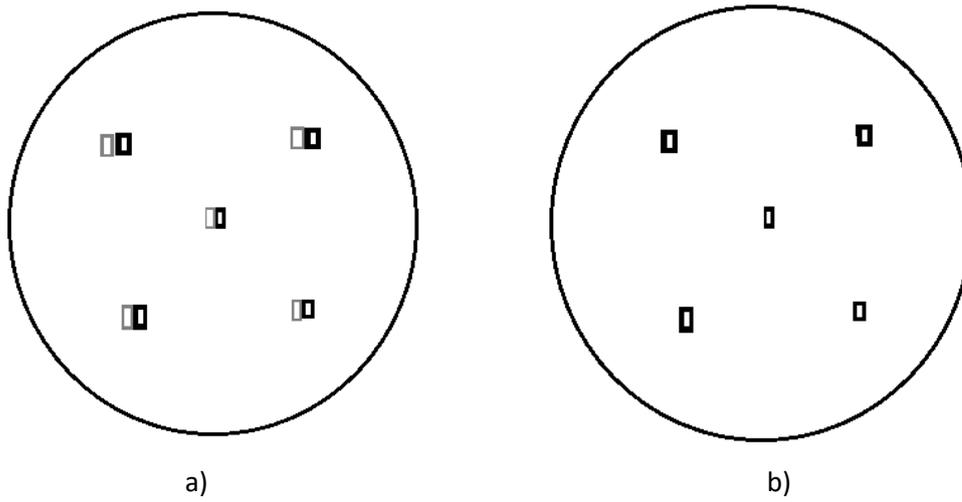


Figura 9. a) Apareamiento de neohaplontes para determinar tipos de compatibilidad, b) Inoculación de todos los neohaplontes en medio EMA para confirma carácter monocariótico

7. RESULTADOS.

7.1. Dedicariotización.

Para la dedicariotización de la cepa K8501 de *P. ostreatus* se realizaron 7 experimentos en los cuales las condiciones de dedicariotización que se utilizaron fueron: tiempos de maceración desde 200 hasta 600 segundos, concentraciones de peptona y glucosa de 20 y 30 g/L, volumen de inoculación de 30 y 50 μ L, tiempos de incubación de 3, 5 y 8 días. Como resultado se observó crecimiento micelial tanto en solución dedicariotizante, como en medio EMA. Una vez que se observaron colonias en la solución dedicariotizante se inocularon 50 μ L en medio EMA y posteriormente se homogeneizó el contenido del matraz con la solución dedicariotizante por 60 segundos e inoculó nuevamente con 10 μ L en medio EMA. Cuando se observó desarrollo micelial en las cajas con medio EMA éstas se revisaron al microscopio para observar el tipo de crecimiento micelial (ya sea dicariótico o monocariótico cuando se logró la dedicariotización de la cepa). En la Tabla 2 se presentan los resultados de los 7 experimentos realizados para la dedicariotización de la cepa K8501 de *P. ostreatus*.

Adicionalmente en los experimentos 2 y 3 se inoculó la misma cantidad de macerado que en la solución dedicariotizadora en medio de extracto de malta líquido con el fin de verificar el crecimiento de la cepa y compararlo con el crecimiento en solución dedicariotizadora (visualmente), una vez estandarizado se dejó de utilizar el medio de extracto de malta líquido.

7.1.1. Experimento 1.

Las condiciones en las que se llevó a cabo este experimento fueron: tiempos de maceración de 200, 250 y 300 segundos, concentración de peptona y glucosa en la solución dedicariotizante de 20 g/L, volúmenes de inoculación de 30 y 50 μ L. En este caso se tomaron 12 matraces de solución dedicariotizadora y se inocularon 4 matraces para cada tiempo de maceración (200, 250 y 300 segundos) y 2 cajas con medio EMA para cada volumen de inoculación (30 y 50 μ L). Todos los matraces y cajas Petri inoculados se incubaron a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial se tomaron

2 matraces de cada tiempo de macerado con diferente volumen de inoculación y se inocularon 3 cajas con medio EMA con 50 μL más 150 μL de agua destilada estéril en forma directa. Adicionalmente se seleccionó el matraz que presentó el menor crecimiento micelial con solución dedicariotizante y éste se homogeneizó por 30 segundos y se inocularon 3 cajas con medio EMA con 10 μL del homogeneizado y se adicionaron 150 μL de agua destilada estéril.

Como se observa en la Tabla 2 en todos los tiempos de macerado el crecimiento micelial al 3er día de incubación fue regular para la solución dedicariotizante y abundante para el medio EMA. Al 5to día de incubación el crecimiento micelial fue abundante en solución dedicariotizante e incontable en medio EMA, finalmente al 8vo día de incubación ya fue incontable en ambos medios. Sin embargo, en todos los casos el tipo de micelio fue dicariótico.

Tabla 2. Resultados de los experimentos de dedicariotización de la cepa K8501 de *P. ostreatus*.

Experimento	Condiciones para dedicariotizar				Desarrollo micelial ¹						Tipo de micelio en EMA ² (inoculado con homogeneizado)
	Tiempo de maceración (s)	Concentración (g/L)		Volumen de inoculación (μL)	Solución dedicariotizadora			Medio EMA			
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)						
					3	5	8	3	5	8	
1	200	20	20	30	R	A	I	A	I	I	Dicariótico Dicariótico
				50	R	A	I	A	I	I	
	250	20	20	30	R	A	I	A	I	I	Dicariótico Dicariótico
50				R	A	I	A	I	I		
300	20	20	30	R	A	I	A	I	I	Dicariótico Dicariótico	
			50	R	A	I	A	I	I		
2	300	20	20	30	R	A	I	E	R	A	Dicariótico
	350	20	20	30	E	E	R	E	R	R	Dicariótico, Monocariótico
3	350	20	20	30	N	N	E	N	E	E	Dicariótico, Monocariótico
	400	20	20	30	A	A	I	A	I	I	Dicariótico
4	450	20	20	30	A	A	I	A	I	I	Dicariótico
	500	20	20	30	A	A	I	A	I	I	Dicariótico
	550	20	20	30	A	A	I	A	I	I	Dicariótico
5	500	30	30	30	E	R	A	N	E	R	Dicariótico
	550	30	30	30	E	E	R	E	E	R	Dicariótico
	600	30	30	30	N	E	E	N	E	E	Dicariótico, Monocariótico
6	600	30	30	30	N	N	E	N	N	E	Dicariótico, Monocariótico
7	350	30	30	30	E	E	R	E	E	R	Dicariótico
	400	30	30	30	E	E	R	E	E	R	Dicariótico, Monocariótico
	450	30	30	30	E	E	R	E	E	R	Dicariótico, Monocariótico

1. Desarrollo micelial en solución dedicariotizadora y medio EMA. N: nulo, E: escaso, R: regular, A: abundante, I: incontable.

7.1.2. Experimento 2.

En este experimento se repite el último tiempo de maceración del experimento 1 (300 segundos) y se evalúa un tiempo adicional incrementando a 350 segundos, la concentración de peptona y glucosa en la solución dedicariotizante fue la misma que el primer experimento, el volumen de inoculación fue de 30 μ L, debido a que el crecimiento micelial en el 1er experimento con 50 μ L fue muy abundante. Se utilizaron 4 matraces de solución dedicariotizadora y se inocularon 2 matraces para cada tiempo de maceración (300 y 350 segundos). También se inoculó 1 matraz con medio de extracto de malta para cada tiempo de maceración y 1 caja con medio EMA que se inoculó con 10 μ L del macerado mas 200 μ L de agua destilada estéril para cada tiempo de maceración. Todos los matraces y cajas Petri inoculados se incubaron a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial se tomo 1 matraz con solución dedicariotizante de cada tiempo de macerado y se homogeneizó por 30 segundos, para inocular 30 μ L en 2 matraces con solución dedicariotizante nueva de la misma concentración que se manejó. Adicionalmente se inocularon 30 μ L del macerado en un matraz con medio de extracto de malta y 10 μ L más 200 μ L de agua destilada estéril en una caja Petri con medio EMA.

En este caso, el crecimiento micelial para 300 segundos el 3er día de incubación es regular en la solución dedicariotizante y escaso en medio EMA, al 5to día es abundante en medio dedicariotizante y regular en medio EMA y al 8vo día es incontable en solución dedicariotizadora y abundante en medio EMA. Para 350 segundos de homogeneización al 3er día de incubación es escaso en ambos medios, al 5to día sigue siendo escaso en solución dedicariotizante y regular en medio EMA y al 8vo día el crecimiento fue regular en ambos medios. Sin embargo, en este caso ya fue posible la obtención de micelio de tipo monocariótico antes de la homogeneización, logrando aislar los primeros 11 neohaplontes.

7.1.3. Experimento 3.

En este experimento los tiempos de maceración fueron de 350 y 400 segundos, mientras que el volumen de inoculación y la concentración de peptona y

glucosa en la solución dedicariotizante fueron las mismas que en el experimento 2. Se utilizaron 4 matraces de solución dedicariotizadora y se inocularon 2 matraces para cada tiempo de maceración (350 y 400 segundos). También se inoculó 1 matraz con medio de extracto de malta para cada tiempo de maceración y 1 caja Petri con medio EMA para cada tiempo de maceración (inoculadas con 10 μ L más 200 μ L de agua destilada estéril). Todos los matraces y cajas Petri inoculados fueron incubados a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial se tomó sólo 1 matraz con medio dedicariotizante por cada tiempo de maceración y se inocularon 3 cajas con medio EMA con 50 μ L más 150 μ L de agua destilada estéril en forma directa. Posteriormente el contenido del matraz se homogeneizó por 60 segundos, para inocular 10 μ L más 200 μ L de agua destilada estéril en 2 cajas Petri con medio EMA.

Para el tiempo de maceración de 350 segundos el crecimiento micelial al 3er día de incubación en ambos medio fue nulo (solución dedicariotizante y medio EMA). Al 5to día sigue siendo nulo el crecimiento micelial en solución dedicariotizante, pero ya se presenta un escaso crecimiento micelial en medio EMA y al 8vo día fue escaso el crecimiento en ambos medios. Nuevamente en este caso fue posible la obtención de micelio de tipo monocariótico después de la homogeneización, logrando aislar 21 neohaplontes. Para el tiempo de maceración de 400 segundos desde el 3er día de incubación hay crecimiento abundante en ambos medios. Al 5to día el crecimiento micelial es abundante en la solución dedicariotizadora e incontable en el medio EMA. Al 8vo día de incubación en ambos medios el crecimiento micelial fue incontable y además de tipo dicariótico.

7.1.4. Experimento 4.

En este experimento se incrementó el tiempo de maceración a 450, 500 y 550 segundos, manteniendo constantes el resto de las variables. Para cada tiempo de maceración se inoculó 1 matraz con solución dedicariotizadora (400, 500 y 550 segundos) y una caja Petri con medio EMA (inoculadas con 10 μ L más 200 μ L de agua destilada estéril). Tanto los matraces como las cajas Petri fueron

incubados a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial en cada matraz se inocularon directamente 2 cajas con medio EMA con 50 µL más 200 µL de agua destilada estéril en y posteriormente se homogeneizó por 60 segundos e inocularon 4 cajas Petri con medio EMA con 10 µL más 200 µL de agua destilada estéril.

Como resultado se observó al 3er día de incubación para todos los tiempos de maceración abundante crecimiento micelial en ambos medios. Al 5to día de incubación el crecimiento micelial fue abundante en solución dedicariotizante e incontable en medio EMA. Al 8vo día en ambos medios fue incontable. En este caso el crecimiento en todas las cajas fue de tipo dicariótico.

7.1.5. Experimento 5.

Para este experimento se repitieron los dos tiempos más altos de maceración del experimento 4 (500 y 550 segundos) y un tiempo adicional de 600 segundos. Este caso se incrementó la concentración de peptona y glucosa en la solución dedicariotizante a 30 g/L y se mantuvo el volumen de inoculación (30 µL). Un total de 6 matraces de solución dedicariotizadora fueron utilizados en este experimento, inoculándose 2 matraces y 1 caja Petri con medio EMA para cada tiempo de maceración (500, 550 y 600 segundos). Todos los matraces y las cajas Petri se incubaron a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial sólo se tomó el matraz de 600 segundos y primero se inoculó directamente con 50 µL más 200 µL de agua destilada estéril 2 cajas con medio EMA. Posteriormente se homogeneizó por 60 segundos e inocularon 2 cajas con medio EMA con 10 µL más 200 µL de agua destilada estéril.

Con estos cambios el crecimiento micelial para 500 segundos al 3er día de incubación ya fue escaso en la solución dedicariotizante y nulo en el medio EMA. Al 5to día el crecimiento fue regular en solución dedicariotizante y escaso en medio EMA, finalmente para el 8vo día ya hubo abundante crecimiento en la solución dedicariotizante y regular en el medio EMA, obtenido un crecimiento micelial de tipo dicariótico. Para 550 segundos al 3er y 5to día de incubación el crecimiento fue escaso en ambos medios y para el 8vo día fue regular en

ambos medios y nuevamente el crecimiento micelial fue de tipo dicariótico. Para los 600 segundos el crecimiento micelial fue nulo en ambos medios al 3er día de incubación. Para el 5to y 8vo día de incubación en ambos medios el crecimiento micelial fue escaso y además permitió el aislamiento de un neohaplonte.

7.1.6. Experimento 6.

En este experimento sólo se utiliza un tiempo de maceración de 600 segundos, mientras que el volumen de inoculación y la concentración de peptona y glucosa en la solución dedicariotizante fueron las mismas que en el experimento 5. Para este experimento se utilizaron 4 matraces de solución dedicariotizadora y 1 caja Petri con medio EMA. Todos los matraces y la caja Petri fueron incubados a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó crecimiento micelial se inoculó directamente con 50 µL más 200 µL de agua destilada estéril en 2 cajas con medio EMA. Posteriormente se homogeneizó 60 segundos e inocularon 2 cajas Petri con medio EMA con 10 µL más 200 µL de agua destilada estéril.

Como se observa en la Tabla 2 no hubo crecimiento al 3ro y 5to día de incubación en ninguno de los dos medios, observándose crecimiento a partir del 8vo día de incubación tanto en solución dedicariotizante, como en medio EMA. Nuevamente en este caso fue posible la obtención de micelio de tipo monocariótico después de la homogeneización, logrando aislar 29 neohaplontes.

7.1.7. Experimento 7.

Para este experimento se regresó a utilizar tiempos bajos de maceración (350, 400 y 450 segundos), manteniendo las mismas concentraciones de glucosa y peptona que el experimento anterior (30 g/L). Un total de 6 matraces de solución dedicariotizadora se utilizaron en este experimento, 2 para cada tiempo de maceración (350, 400 y 450 segundos) y 1 caja Petri con medio EMA para cada tiempo de maceración. Todos los matraces y las cajas Petri fueron incubados a 24 °C y se observaron diariamente. En cuanto se observó

crecimiento micelial, uno de los matraces de cada tiempo de maceración se inoculó directamente en 2 cajas Petri con medio EMA con 50 μ L más 200 μ L de agua destilada estéril y el otro matraz se cambió al cuarto frío, después de 3 días en el cuarto frío se inocularon directamente en 2 cajas con medio EMA. Adicionalmente el primer matraz se homogeneizó por 60 segundos e inocularon 2 cajas Petri con medio EMA,

Como se observa en la Tabla 2 en todos los tiempos de maceración el crecimiento fue similar, siendo al 3er y 5to día de incubación escaso en todos los medios y al 8vo día se observó crecimiento regular en todos los medios, dando como resultado la obtención de 11 neohaplontes en los tiempos de maceración de 400 y 450 segundos, tanto los matraces inoculados directamente, como en los homogeneizados.

Finalmente en la Tabla 2 se observa que en los experimentos donde el crecimiento es escaso encontramos ambos tipos de crecimiento tanto monocariótico como dicariótico, de estos experimentos, fue posible el aislamiento de neohaplontes

En resumen, las condiciones en donde fue posible la obtención de neohaplontes (micelio de tipo monocariótico) fueron:

Experimento 2

- ✘ Tiempos de macerado: 350 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 20 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 30 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimentos 3

- ✘ Tiempos de macerado: 350 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 20 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 60 segundos.

- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimentos 5 y 6

- ✘ Tiempos de macerado: 600 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 30 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicatorizadora: 60 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimento 7

- ✘ Tiempos de macerado: 400 y 450 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 30 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicatorizadora: 60 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

En la Tabla 3 se presenta el resumen de la cantidad de neohaplontes obtenidos en cada uno de los experimentos.

Tabla 3. Cantidad de neohaplontes aislados en cada uno de los experimentos

Experimento	Neohaplontes recuperados
2	11
3	21
5	1
6	29
7	11
Total	73

7.2. Clasificación de neohaplontes en tipos de compatibilidad.

En los cinco experimentos donde se obtuvo micelio de tipo monocariótico fue posible aislar un total 73 neohaplontes. Los cuales una vez que fue confirmada en el microscopio la ausencia de fibulas se identificaron con una clave (K8nh1 hasta K8nh73). Con los 73 neohaplontes obtenidos se procedió a realizar las cruas entre ellos para tratar de identificar si fueron obtenidos los dos tipos de compatibilidad de la cepa K8501. Para ello se seleccionaron tres neohaplontes al azar con crecimiento micelial diferente (K8nh1, K8nh10 y K8nh18) y se

procedió a realizar cruzas con todos los neohaplontes obtenidos. Como resultado se observa en la Tabla 4 que de todas las cruzas realizadas ninguna fue positiva, lo que indica que todos los neohaplontes obtenidos pertenecen al mismo tipo de compatibilidad.

Tabla 4. Apareamientos entre los neohaplontes de la cepa K8501 para su clasificación en los dos tipos de compatibilidad

Neohaplontes	Apareamientos con neohaplontes tomados al azar			Control
	K8nh1	K8nh10	K8nh18	
K8nh1	-	-	-	-
K8nh2	-	-	-	-
K8nh3	-	-	-	-
K8nh4	-	-	-	-
K8nh5	-	-	-	-
K8nh6	-	-	-	-
K8nh7	-	-	-	-
K8nh8	-	-	-	-
K8nh9	-	-	-	-
K8nh10	-	-	-	-
K8nh11	-	-	-	-
K8nh12	-	-	-	-
K8nh13	-	-	-	-
K8nh14	-	-	-	-
K8nh15	-	-	-	-
K8nh16	-	-	-	-
K8nh17	-	-	-	-
K8nh18	-	-	-	-
K8nh19	-	-	-	-
K8nh20	-	-	-	-
K8nh21	-	-	-	-
K8nh22	-	-	-	-
K8nh23	-	-	-	-
K8nh24	-	-	-	-
K8nh25	-	-	-	-
K8nh26	-	-	-	-
K8nh27	-	-	-	-
K8nh28	-	-	-	-
K8nh29	-	-	-	-
K8nh30	-	-	-	-

Continuación Tabla 4

Neohaplontes	Apareamientos con neohaplontes tomados al azar			Control
	K8nh1	K8nh10	K8nh18	
K8nh31	-	-	-	-
K8nh32	-	-	-	-
K8nh33	-	-	-	-
K8nh34	-	-	-	-
K8nh35	-	-	-	-
K8nh36	-	-	-	-
K8nh37	-	-	-	-
K8nh38	-	-	-	-
K8nh39	-	-	-	-
K8nh40	-	-	-	-
K8nh41	-	-	-	-
K8nh42	-	-	-	-
K8nh43	-	-	-	-
K8nh44	-	-	-	-
K8nh45	-	-	-	-
K8nh46	-	-	-	-
K8nh47	-	-	-	-
K8nh48	-	-	-	-
K8nh49	-	-	-	-
K8nh50	-	-	-	-
K8nh51	-	-	-	-
K8nh52	-	-	-	-
K8nh53	-	-	-	-
K8nh54	-	-	-	-
K8nh55	-	-	-	-
K8nh56	-	-	-	-
K8nh57	-	-	-	-
K8nh58	-	-	-	-
K8nh59	-	-	-	-
K8nh60	-	-	-	-
K8nh61	-	-	-	-
K8nh62	-	-	-	-
K8nh63	-	-	-	-
K8nh64	-	-	-	-
K8nh65	-	-	-	-
K8nh66	-	-	-	-
K8nh67	-	-	-	-

Continuación Tabla 4

Neohaplontes	Apareamientos con neohaplontes tomados al azar			Control
	K8nh1	K8nh10	K8nh18	
K8nh68	-	-	-	-
K8nh69	-	-	-	-
K8nh70	-	-	-	-
K8nh71	-	-	-	-
K8nh72	-	-	-	-
K8nh73	-	-	-	-

Adicionalmente se llevó a cabo otra serie de apareamientos, en este caso se utilizaron los últimos 11 neohaplontes obtenidos (K8nh63 al K8nh73) y se seleccionó un neohaplonte diferente (K8nh57) para llevar a cabo los apareamientos. En la Tabla 5 se observa que nuevamente ninguno de los apareamientos fue positivo, con lo que se confirmó que sólo fue posible obtener un tipo de compatibilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Apareamiento entre once neohaplontes obtenidos de la cepa K8501 con el neohaplonte K8nh57 para su clasificación en los dos tipos de compatibilidad

Neohaplontes	Apareamientos con nuevo neohaplonte tomado al azar	Control
	K8nh57	
K8nh63	-	-
K8nh64	-	-
K8nh65	-	-
K8nh66	-	-
K8nh67	-	-
K8nh68	-	-
K8nh69	-	-
K8nh70	-	-
K8nh71	-	-
K8nh72	-	-
K8nh73	-	-

Como lo muestran las Tablas 4 y 5 todos los neohaplontes obtenidos en los experimentos de dedicariotización fueron del mismo tipo de compatibilidad. Por

ello se realizaron apareamientos con neohaplontes de otra cepa para tratar de obtener híbridos de la cepa K8501.

Para la obtención de híbridos se tomaron los tres neohaplontes (K8nh1, K8nh10 y K8nh18) que se habían utilizado para la clasificación en tipos de compatibilidad de los 73 neohaplontes obtenidos previamente y se aparearon con 44 neohaplontes de la cepa de *P. ostreatus* asporógena PAsp 14, como se muestra en la Tabla 6 nuevamente el resultado de todos los apareamientos fue negativo.

Tabla 6. Apareamiento de tres neohaplontes de la cepa K8501 (K8nh1, K8nh10 y K8nh18) con 44 neohaplontes de la cepa PAsp14

Neohaplontes de la cepa PAsp14	Apareamientos con 3 neohaplontes de la cepa K8501			Control
	K8nh1	K8nh10	K8nh18	
As41-Di	-	-	-	-
As42-Di	-	-	-	-
As43-Di	-	-	-	-
As44-Di	-	-	-	-
As45-Di	-	-	-	-
As46-Di	-	-	-	-
As47-Di	-	-	-	-
As48-Di	-	-	-	-
As49-Di	-	-	-	-
As50-Di	-	-	-	-
As51-Di	-	-	-	-
As52-Di	-	-	-	-
As53-Di	-	-	-	-
As54-Di	-	-	-	-
As55-Di	-	-	-	-
As56-Di	-	-	-	-
As57-Di	-	-	-	-
As58-Di	-	-	-	-
As59-Di	-	-	-	-
As60-Di	-	-	-	-
As61-Di	-	-	-	-
As62-Di	-	-	-	-

Continuación Tabla 6

Neohaplotones de la cepa PAsp14	Apareamientos con 3 neohaplotones de la cepa K8501			Control
	K8nh1	K8nh10	K8nh18	
As63-Di	-	-	-	-
As64-Di	-	-	-	-
As65-Di	-	-	-	-
As66-Di	-	-	-	-
As67-Di	-	-	-	-
As68-Di	-	-	-	-
As69-Di	-	-	-	-
As70-Di	-	-	-	-
As71-Di	-	-	-	-
As72-Di	-	-	-	-
As73-Di	-	-	-	-
As74-Di	-	-	-	-
As75-Di	-	-	-	-
As76-Di	-	-	-	-
As77-Di	-	-	-	-
As78-Di	-	-	-	-
As79-Di	-	-	-	-
As80-Di	-	-	-	-
As81-Di	-	-	-	-
As82-Di	-	-	-	-
As83-Di	-	-	-	-
As84-Di	-	-	-	-

8. DISCUSIÓN

Condiciones para la obtención de neohaplontes de diferentes cepas del género *Pleurotus* en trabajos previos:

Valencia del Toro, 2002 realiza la dedicariotización química de 10 cepas de diferentes colores para la obtención micelio de tipo monocariótico de *Pleurotus* spp., obteniendo ambos componentes monocarióticos en todas las cepas.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 60 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 30 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 20 o 50 μ L.

Sánchez Hernández, 2013, Recupera los componentes monocarióticos de 3 cepas comerciales del género *Pleurotus* por dedicariotización, obteniendo ambos componentes monocarióticos en 2 de ellas.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 60 y 270 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 30 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 60 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 25 μ L.

Guadarrama Mendoza, 2013, somete al proceso de dedicariotización 6 cepas, obteniendo ambos tipos de compatibilidad para 4 de ellas, y solo uno de los componentes monocarióticos para 2 cepas.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico de cepas comerciales del género *Pleurotus*:

- Tiempo de macerado: 40, 60, 65 y 75 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 40, 60 y 65 segundos.

- Volumen de inoculación (EMA): 30 - 90 μ L.

De la Chica Giles y Arteaga Santillán, 1993, Utilizan el método de dedicariotización con diferentes peptonas en 9 cepas de *Lentinula edodes*, obteniendo neohaplontes en 3 cepas y de un sólo 1 tipo de compatibilidad.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 150, 60 segundos.
- Concentración de glucosa 20 g/L y peptona 10 g/L.
- Volumen de inoculación (EMA): 20 y 300 μ L.

Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002, llevan a cabo la dedicariotización de 7 cepas de *Lentinula edodes* obteniendo ambos tipos de compatibilidad en todos los casos.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 5 y 30 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 5 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 20 y 50 μ L.

Segura Moctezuma, 2008, lleva a cabo de proceso de dedicariotización de 4 cepas de *L. edodes*, obteniendo neohaplontes en 3 cepas, teniendo ambos tipos de compatibilidad en sólo 1 de ellas.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 15 y 20 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 20 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 50 μ L.

Obtención de neohaplontes en medio MSD.

- Tiempo de homogeneización: 10 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 20 y 30 μ L.

Marroquín Corona, 2009, lleva a cabo del proceso de dedicariotización en una cepa comercial de *Pleurotus eryngii*, recuperando ambos componentes monocarióticos de la cepa.

Condiciones para la obtención de micelio de tipo monocariótico:

- Tiempo de macerado: 300 segundos.
- Concentración de glucosa y peptona: 30 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 30 segundos.
- Volumen de inoculación (EMA): 25 μ L.

En estudios previos de dedicariotización realizados a cepas de *Pleurotus* spp., se puede observar que las condiciones donde se obtuvieron neohaplontes reportan tiempos de maceración de 60 segundos (Valencia del Toro, 2002), 60 y 270 segundos (Sánchez Hernández, 2013), 40 a 75 segundos (Guadarrama Mendoza, 2013) utilizando concentraciones de la solución dedicariotizadora de 20 g/L de glucosa anhidra y peptona (Valencia del Toro, 2002; Guadarrama Mendoza, 2013), o de 30 g/L de glucosa anhidra y peptona (Sánchez Hernández, 2013). Para los tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en la solución dedicariotizadora se reportan 30 segundos (Valencia del Toro, 2002), 60 segundos (Sánchez Hernandez, 2013) y 40 a 75 segundos (Guadarrama Mendoza, 2013), utilizando volúmenes de inoculación en medio EMA de 20 o 50 μ L (Valencia del Toro, 2002), 25 μ L (Sánchez Hernández, 2013) y de 30 a 90 μ L (Guadarrama Mendoza, 2013), recuperando con dichas condiciones ambos neohaplontes (nh1 y nh2) para la mayoría de los casos.

En el caso de cepas del género *L. edodes*, las condiciones donde se obtuvo micelio de tipo monocariótico fue con tiempos de maceración de 150 y 60 segundos (de la Chica Giles y Arteaga Santillán, 1993), 5 y 30 segundos (Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002), 15 y 20 segundos (Segura Moctezuma, 2008) utilizando concentraciones de la solución dedicariotizadora de glucosa de 20 g/L y peptona de 10 g/L (de la Chica Giles y Arteaga Santillán, 1993), de 20 g/L de glucosa anhidra y peptona (Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002; Segura

Moctezuma, 2008). En este caso los tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora fueron de 5 segundos (Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002) y 20 segundos (Segura Moctezuma, 2008), utilizando volúmenes de inoculación en medio EMA de 20 y 300 μL (de la Chica Giles y Arteaga Santillán, 1993), 20 y 50 μL (Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002) y de 50 μL (Segura Moctezuma, 2008), recuperando con dichas condiciones ambos neohaplontes (nh1 y nh2) para la mayoría de los casos siendo este género mucho más sensible al efecto mecánico de maceración.

Teniendo como único antecedente para una cepa comercial de *Pleurotus eryngii*, Marroquín Corona (2009) reporta tiempos de maceración de 300 segundos, concentración de la solución dedicariotizadora de 30 g/L de glucosa anhidra y peptona, tiempo de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora de 30 segundos y utilizó volúmenes de inoculación en medio EMA de 25 μL recuperando con dichas condiciones ambos neohaplontes de la cepa (nh1 y nh2).

Considerando todos los trabajos previos de dedicariotización se ha observado que las cepas del género *Pleurotus* presentan una alta resistencia al efecto mecánico de maceración. Es decir toleran prolongados tiempos de maceración y además altas concentraciones de peptona y glucosa. Como se describe previamente para la obtención uno o ambos componentes monocarióticos de las cepas del género *Pleurotus* se han reportado tiempos de maceración de 60 a 270 segundos, lo cuales son menores a los tiempos de maceración en donde se obtuvo micelio monocariótico en este trabajo (350 – 600 segundos).

Por otro lado se observó que la cepa de *Pleurotus ostreatus* K8501 también toleró altas concentraciones de glucosa y peptona (30 g/L) como en el caso de algunas cepas de *Pleurotus* spp. o la cepa comercial de *P. eryngii*.

Para los tiempos de homogeneización se utilizaron 30 y 60 segundos, como en el caso de algunas cepas de *Pleurotus* spp. y *P. eryngii*.

Con respecto a los volúmenes de inoculación en medio EMA en este estudio con la cepa K8501 se utilizó un volumen menor (10 μ L) que el reportado para las cepas de *P. eryngii* y, *Pleurotus* spp y *L. edodes*, donde utilizaron volúmenes de 20 hasta 300 μ L.

Como resultado de los experimentos de dedicariotización se observó que en forma semejante a algunos de los trabajos previos tanto de *Pleurotus* (Valencia del Toro, 2002; Sánchez Hernández, 2013; Guadarrama Mendoza, 2013) como de *Lentinula* (de la Chica Giles y Arteaga Santillán, 1993; Ramírez Carrillo y Leal Lara, 2002; Segura Moctezuma, 2008) no fue posible obtener ambos componentes monocarióticos de la cepa, lo cual puede deberse a diferentes factores tales como: alta sensibilidad al efecto mecánico de la maceración del micelio, debido a que a pesar de que resiste tiempos muy prolongados de maceración la estructura del micelio se ve al microscopio hifas muy delgadas en comparación al micelio original (antes de la maceración), lo cual también puede estar asociado al efecto tóxico de las sustancias que se emplean en la solución dedicariotizadora. Otra posible explicación puede ser debida a una modificación en la producción del material nuclear del protoplasma y de la pared celular de las células dicariótica, debido a que se pudo notar al hacer la revisión en el microscopio del medio EMA que conforme aumentaba el tiempo de maceración el micelio se va debilitando (se hace más delgada la hifa y hay menor crecimiento micelial, tardando más tiempo en invadir el medio de cultivo).

En resumen se puede decir que los programas de mejoramiento genético requieren de tiempos prolongados de trabajo, que a largo plazo pueden satisfacer las necesidades de cepas de una localidad o población sin necesidad de recurrir a la compra de cepas extranjeras que no siempre se acoplan a las necesidades de producción y de los consumidores. A través de estos programas de mejoramiento genético se obtienen cepas monocarióticos que pueden ser utilizadas en trabajos posteriores para la obtención de híbridos que cumplan con las necesidades tanto de producción, como con las exigencias de los consumidores.

Además el procedimiento de deducarización tiene como una de sus ventajas sobre progenie meiótica la obtención de neohaplontes que no pasaron por el proceso de meiosis lo que hace que se conserven intactas las características de la cepa original en los dos componentes monocarióticos y que en posteriores apareamientos se pueden lograr obtener con mayor facilidad cepas con las características deseadas.

9. CONCLUSIONES

- En general en los trabajos de dedicariotización realizados se ha observado que las cepas del género *Pleurotus* presentan una alta resistencia al efecto mecánico, es decir toleran mayores tiempos de maceración y altas concentraciones de peptona y glucosa y la cepa K8501 no fue la excepción.
- De los experimentos donde se obtuvo micelio de tipo monocariótico, se lograron aislar un total de 73 neohaplontes.
- Las condiciones en las que se obtuvo micelio monocariótico de la cepa K8501 fueron:

Experimento 2

- ✘ Tiempos de macerado: 350 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 20 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 30 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimentos 3

- ✘ Tiempos de macerado: 350 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 20 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 60 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimentos 5 y 6

- ✘ Tiempos de macerado: 600 segundos.
- ✘ Concentración de glucosa-peptona: 30 g/L.
- ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 60 segundos.
- ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.

Experimento 7

- ✘ Tiempos de macerado: 400 y 450 segundos.
 - ✘ Concentración de glucosa-peptona: 30 g/L.
 - ✘ Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución dedicariotizadora: 60 segundos.
 - ✘ Volumen de inoculación en EMA: 10 μ L.
-
- La obtención de neohaplontes de la cepa K8501 se logró al utilizar: tiempos de maceración de 350, 400, 450 y 600 segundos, concentraciones de la solución dedicariotizadora de 20 g/L o 30 g/L de glucosa anhidra y peptona, tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en la solución dedicariotizadora de 30 o 60 segundos y un volumen de inoculación en medio EMA de 10 μ L para todos los casos.

 - Al realizar los apareamientos entre los neohaplontes obtenidos en todos los casos éstos fueron negativos, lo que confirma la obtención de un sólo tipo de compatibilidad.

 - Al realizar los apareamientos con entre los 73 neohaplontes obtenidos para la cepa K8501 con 40 neohaplontes de la cepa d PAsp14 no fue posible la obtención de híbridos, debido posiblemente a que los neohaplontes de ambas cepas corresponden al mismo tipo de compatibilidad.

10. REFERENCIAS

(04-Agosto-2017)

http://biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/hongos/hongos.html

Barba Chávez, J. M. I., López Cruz, J. I. y Castañeda de León, V. T., (2013). *El cultivo de setas, como proceso del desarrollo industrial de los hongos comestibles*. D.F., México: AGT Editor, S.A. ISBN 978-607-7551-17-1, pp 9-10, 16-17, 60.

Cayetano-Catarino, M. y Bernabé-González, T. (2008). *Cultivo de Pleurotus sobre residuos de las cosechas de Jamaica (Hibiscus sabdariffa) y plátano (Musa paradisiaca)*. Revista Mexicana de Micología, 26, 57-60

Chairez-Aquino, J., Enríquez-del-Valle, J. R., Ruíz-Luna, J., Campos-Ángeles, G. V. y Martínez-García, R. (2015). *Uso del bagazo de Agave spp. y hojas de maíz para cultivar el hongo Pleurotus ostreatus*. Revista mexicana de agroecosistemas, 2 (1), 23-28

Chang, S. T. (1999). *World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on Lentinus edodes*. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1(4), 291-300.

De la Chica Giles, K. y Arteaga Santillán, E. S. (1993). *Aplicación del método de dedicariotización que hace uso de peptonas con cepas de Lentinula edodes* (Tesis de licenciatura). Universidad Motolinia, D.F., México.

De León-Monzón, J. H., Sánchez, J. E., y Nahed-Toral, J. (2004). *El cultivo de Pleurotus en los altos de Chiapas, México*. Revista Mexicana de Micología, 18. 31-38.

Flores Macías, A., Hernández Hernández, F., Payan Zelaya, F. A. J. M., Galicia Castillo, G. M. y Pérez Sánchez, I. (2013). *Producción de setas del género Pleurotus*. D.F., México: Universidad Autónoma Metropolitana. ISBN: 978-607-477-954-7, pp 12.

Fortin, J. (1999). *Guía completa de alimentos*. Reno, Estados Unidos de América: Konemann. ISBN: 3-8290-2450-9. pp 77-78.

Gaitán-Hernández, R. (2000). *Obtención de cepas de Neolentinus suffrutescens por entrecruzamiento, su caracterización in vitro y producción de cuerpos fructíferos a nivel planta piloto*. Revista Iberoamericana de Micología, 17, 20-24.

- García Rollán, M. (2007). *Cultivo de setas y trufas*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. ISBN 978-84-8476-316-1, pp 20-22, 109-110, 145 y 147.
- Guadarrama Mendoza, P. C. (2013). *Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de Pleurotus spp. de la región Mixteca* (Tesis de doctorado en ciencias de bioprocesos). Instituto Politécnico Nacional, D.F., México.
- Guzmán, G. (1993). *Hongo*. D.F., México: Limusa. ISBN 968-18-0032-X, pp 3-4.
- Job, D. (2004). *La utilización de la borra del café como sustrato de base para el cultivo de Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) Kummer*. Revista Iberoamericana de Micología, 21, 195-197.
- Lohmeyer, T. R. y Künkele, U. (2006). *Setas, identificación y recolección*. Barcelona, España: Parragon. ISBN: 978-1-40547806-9, pp 112 y 116.
- López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C. y Borrero, M. (2008). *Evaluación del crecimiento y producción de Pleurotus ostreatus sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca*. Universitas Scientiarum, 13 (2), 128-137.
- Manjarrés, K., Castro, A. y Rodríguez Sandoval, E. (2010). *Producción de lacasa utilizando Pleurotus ostreatus sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña*. Revista Lasallista de Investigación, 7 (2), pp 9-15.
- Marroquín Corona, C. (2009). *Mejoramiento genético de hongos comestibles a partir de neoplontes de Pleurotus eryngii* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., Mayett, Y. y Puebla, B. D. H. (2012). *Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México*. Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo (Agrociencias). Academia Mexicana de Ciencias, pp 449-474.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. y Martínez, W. (2007). *México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestibles*. Ecosur-CONACYT, Cap 6.1, pp 1-20.
- Miles, P. G., & Raper, J. R. (1956). *Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia*. Mycologia, 48(4), pp 484-494.

- Molina Bastidas, J. C., Montoya Villegas, J. C., Wilches Rodríguez, J. C. y Benítez Campo, M. C. (2013). *Principios básicos sobre el cultivo del hongo comestible. Pleurotus spp.* Cali, Colombia: Universidad Autónoma de Occidente. ISBN: 978-958-8713-39-7. pp 22-23.
- Pérez Silva, E., Lappe-Oliveras, P., Martín del Campo, R. y Aguirre Acosta, E. (2015). *Los hongos en la cocina mexicana*. D.F., México: UNAM. ISBN: 978-607-02-7200-4, p 20.
- Ramírez-Carrillo, R. & Leal-Lara, H. (2002). *Symmetrical recovery of monokaryotic components from Lentinula edodes using dedikaryotization*. Mushroom Biology and Mushroom Products, 141-149.
- Salmones, D., Mestizo, L. y Gaitán-Hernández, R. (2004). *Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de Pleurotus djamor (Fr.) Boedijn*. Revista Mexicana de Micología, 18, 21-26.
- Sánchez Hernández, A. (2013). *Recuperación de componentes monocarióticos de cepas comerciales del género Pleurotus por dedicariotización* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Sánchez Vázquez, J. E., Martínez Carrera, D., Mata, G. y Leal Lara, H. (2007). *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Tapachula, México: Ecosur. ISBN: 978-970-9712-40-7. pp 209-224.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (28 de agosto de 2016) <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/los-hongos-y-setas-tradicion-de-buena-alimentacion?idiom=es>
- Segura Moctezuma, S. (2008). *Mejoramiento genético del hongo Lentinula edodes* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Silva, E. M., Machuca, A. & Milagres, A. M. F. (2005). *Evaluating the growth and enzyme production from Lentinula edodes strains*. Process Biochemistry, 40(1), 161-164.
- Tokimoto, K., Hasebe, K. & Komatsu, M. (1978). *Studies on dedikaryotization of Lentinus edodes (Berk.) Sing., 1: Induction of dedikaryotization by gall powder [edible fungi]*. Reports of the Tottori Mycological Institute (Japan), 16, 66 - 72.

- Valencia del Toro, G. (2002). *Estudio sobre la expresión de color de esporóforos en Pleurotus spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas* (Tesis de doctorado en ciencias). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Varnero, M. T., Quiroz, M. S. y Álvarez, C. H. (2010). *Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (Pleurotus ostreatus)*. Información Tecnológica, 21 (2), 13-20.
- Zervakis, G. & Venturella, G. (2002). *Mushroom breeding and cultivation enhances ex situ conservation of Mediterranean Pleurotus taxa*. Managing plant genetic diversity, 351-358.

Figuras

- Figura 1. Cuerpo fructífero del hongo (01–Septiembre–2017) <https://micastadesetas.wordpress.com/2009/07/02/%C2%BF-que-son-la-setas/>
- Figura 2. *Pleurotus ostreatus* (25–Agosto–2017) <http://www.vigorous-tech.com/extract-powder/pleurotus-ostreatus-extract.html>
- Figura 3. Hifas (20-Agosto-2017) <http://bihologramaproenem.blogspot.mx/2016/06/reino-fungi.html>
- Figura 4. Formación de fíbulas (20-Agosto-2017) <http://www.micomania.rizoazul.com/microscopia%20el%20himeneo%20de%20los%20basidiomocetos.html>
- Figura 5. Ciclo de vida de los hongos heterotálicos tetrapolares (30–Agosto–2017) <http://cestadesetas.com/wp-content/uploads/2015/12/8-ciclo-basidios.jpg>