



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPATIBILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES
SILVESTRES DE *PLEUROTUS* PROCEDENTES DE
DIFERENTES REGIONES DE MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN
CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. GRACIELA HUERTA PALACIOS

DIRECTOR DE TESIS: DR DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2007



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.

A Ti que con amor siempre iluminas mi camino

A mi fiel compañero Francisco Holguín, porque con amor me motivó a superar los obstáculos para alcanzar la meta.

A mis hijos Adrián Caleb, Thania Carolina y Corina Berenice por brindarme su cariño.

A mi madre, mis hermanos y mis sobrinos por brindarme su ternura.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por brindarme la oportunidad de completar mi formación académica.

Al Colegio de la Frontera Sur por darme la oportunidad de superarme académicamente y desarrollar el trabajo experimental.

Al Dr. Rytas Vilgalys, por permitirme desarrollar la parte molecular de este trabajo en el laboratorio de micología de Duke University, en Carolina del Norte, USA.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera, Dr. José Ernesto Sánchez Vásquez y Dr. Hermilo Leal Lara, por la dirección y asesoría que me brindaron para alcanzar con éxito la meta.

A los miembros del jurado: Dra. Evangelina Pérez Silva, Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos, Dr. Sigfrido Sierra Galván, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus consejos y observaciones.

A Rebeca Ramírez Carrillo la incansable guerrera, esfuérate y se valiente, no temas ni desmayes que EL esta contigo.

A mis compañeros de ECOSUR por su apoyo y amistad: René Andrade Gallegos, Lilia Moreno de Andrade, Azucena Benítez Camilo, Gerardo Hernández.

A todos los compañeros del laboratorio de biotecnología de hongos comestibles del Colegio de posgraduados (Campus Puebla), por el apoyo y amistad brindada durante mi estancia.

A todos aquellos que me brindan su amistad sin condición.

Muchas gracias a todos

CONTENIDO

Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Índice de apéndice.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. El cultivo de <i>Pleurotus</i> en México.....	3
2.2. Mejoramiento genético de <i>Pleurotus</i> en México.....	3
2.3. Sistemática, conceptos de especie y especiación.....	4
2.4. Incompatibilidad sexual.....	7
2.5. Filogenética y marcadores moleculares.....	10
2.6. <i>Pleurotus</i> , sus divisiones infragenéricas.....	12
2.7. Ciclo de vida en Agaricales.....	17
III. CONCLUSIONES DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
IV. OBJETIVOS.....	21
V. HIPÓTESIS.....	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
VII. RESULTADOS.....	23
7.1. Identificación de las especies mexicanas de <i>Pleurotus</i> empleando la región ITS del ADNr.....	25
7.2. Grupos interestériles y Productividad de cepas nativas de <i>Pleurotus</i> procedentes de regiones tropicales y subtropicales de México.....	43
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	68
8.1. Aspectos generales.....	68
8.2. Diversidad genética de <i>Pleurotus</i> en México.....	69
8.3. Grupos interestériles.....	69
8.4. Análisis filogenético.....	70
8.5. Diversidad infraespecífica.....	71

8.6. Propuesta de mejoramiento genético.....	73
IX. CONCLUSIONES.....	76
X. APÉNDICE.....	77
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

Índice de tablas

1. Especies de *Pleurotus*, sinónimos y su distribución natural en el ámbito mundial..... 16

TABLAS ARTÍCULO UNO

1. Cepas de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México, y la especie a la que pertenecen de acuerdo con los resultados del presente estudio..... 38
2. Secuencias de *Pleurotus* del laboratorio de micología de la universidad de Duke, N.C. USA, incluidas en el análisis filogenético, como referencia..... 39

TABLAS ARTÍCULO DOS

1. Cepas de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México, con el nombre de la especie asignado en este trabajo..... 60
2. Cepas monospóricas de *Pleurotus* usadas como referencia..... 61
3. Alelos de incompatibilidad sexual en cepas silvestres mexicanas de *P. djamor*..... 62
4. Alelos de incompatibilidad sexual entre cepas silvestres mexicanas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*..... 62
5. Grupos interestériles de *Pleurotus* identificados por cruza dicarión x monocarión en una colección de cepas silvestres mexicanas..... 63
6. Velocidad de crecimiento de cuatro especies de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México..... 64
7. Productividad media de cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus* calculados a dos cosechas y comparados por el método de Tukey (α 0.05)..... 65
8. Variación en el color de los basidiomas de *Pleurotus djamor*..... 66

Índice de figuras

1. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	18
2. Diagrama general de metodologías utilizada para la caracterización genética de <i>Pleurotus</i>	22
3. Estrategia de mejoramiento genético para <i>Pleurotus</i>	75

FIGURAS ARTÍCULO UNO

1. Verificación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.....	37
2. Árbol consenso basado en el análisis filogenético de las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosómico nuclear para 31 cepas mexicanas de <i>Pleurotus</i> usando el método del vecino más cercano (Neighbor-joining) (longitud 1128, IC 0.69, IR 0.87). Sobre las ramas se indica el valor relativo que soporta las relaciones indicadas (valores de bootstrap basados en 1000 réplicas). El código ECS equivale al código de las cepas en la base de datos del Cepario de Hongos Comestibles ECOSUR y el de CP al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del COLPOS. Las secuencias marcadas con (*) sirvieron de referencia y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micología de Duke University, E.U.A., a cargo del Dr. Rytas Vilgalys.	40
3. Relación filogenética de cepas mexicanas de <i>Pleurotus</i> usando como marcador molecular la fracción ITS1-5.8s-ITS2 del DNAr. Árbol consenso más parsimonioso con longitud de 1089 usando branch-and-bound algoritmo de PAUP (IC 0.69, IR 0.87). El análisis fue basado en un total de 637 bases alineadas. Sobre las ramas se indican los que soportan las relaciones indicadas (bootstrap basados en 1000 réplicas). El código ECS equivale a cepas provenientes del cepario de hongos comestibles de ECOSUR y el de CP al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del COLPOS. Las secuencias marcadas con (*) sirvieron como referencia y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micología de Duke University, E.U.A., a cargo del Dr. Rytas Vilgalys.....	41

FIGURAS ARTÍCULO DOS

1. Diversidad morfológica y genética de cepas mexicanas de <i>Pleurotus</i>	67
---	----

Índice de apéndice

A1. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de <i>Pleurotus djamor</i>	77
A2. Continuación de apéndice 1.....	78
A3. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de <i>Pleurotus pulmonarius</i>	79
A4. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>P. levis</i>	79
A5. Tamaño de esporas, estructuras cistidiales y tipo de sistema hifal en el estípite, de cepas mexicanas silvestres de <i>Pleurotus djamor</i>	80
A6. Tamaño de esporas, estructuras cistidiales y tipo de sistema hifal en el estípite, de cepas mexicanas silvestres de <i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. levis</i> , <i>P. agaves</i> y <i>P. smithii</i>	81

RESUMEN

México cuenta con una mega diversidad biológica, que contrasta con el acelerado deterioro de sus ecosistemas terrestres. Su posición geográfica y diversidad en ecosistemas hace suponer la existencia de una gran diversidad genética entre las cepas de *Pleurotus*. Sin embargo, los trabajos sobre caracterización del germoplasma presente han sido escasos, a pesar de la importancia y comercial de *Pleurotus* en México. En este trabajo, se describió la diversidad morfológica, algunas características fisiológicas y genéticas de 31 cepas silvestres de *Pleurotus* procedentes de 11 diferentes regiones de México. Las cepas se hicieron crecer a 26°C, en EMA, pH 5.5 y fueron cultivadas sobre sustrato para su fructificación.

La diversidad genética fue estudiada por cruzamientos con monospóricos de referencia y dicarion- monocarion, se analizaron sus relaciones filogenéticas usando secuencias de la región ITS 1-5.8S-ITS2 del ADNr. Se estudió la diversidad morfológica, velocidad de crecimiento y productividad.

Las cruza genéticas y el análisis filogenético demostraron la presencia de las especies *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. agaves*, *P. levis*, *P. smithii* y *P. djamor*. *P. djamor* fue la especie más común en la muestra estudiada, mostró amplia diversidad morfológica y fue capaz de crecer en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Mientras que las especies *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* crecieron en regiones templadas o subtropicales.

Seis cepas de *P. djamor* mostraron fructificación temprana (12 días) y cinco productividad sobresaliente (116- 178% de eficiencia biológica). Una cepa de *P. pulmonarius* mostró fructificación continua y dos buena productividad (110-140% EB). Es probable que las cepas *P. agaves* y la de *P. smithii*, hayan perdido su habilidad para fructificar.

ABSTRACT

Mexico is a country having great biological diversity, despite its terrestrial ecosystems are continuously affected by human activities. High genetic diversity between native strains of *Pleurotus* is therefore expected as a result of geographic aspects and ecosystem diversity. However, studies on germplasm characterization of this genus are scarce, despite the social and commercial importance of *Pleurotus* species in Mexico. In this work, it is described the morphological diversity, as well as several physiological and genetic characteristics, of 31 wild Mexican strains of *Pleurotus* from 11 different regions. Strains were grown at 26°C, on malt extract agar (MEA), pH 5.5 and cultivated on substrate for fruiting.

The genetic diversity was studied by crosses between monosporic isolates and di-mon mating using reference strains, as well as analyzing their phylogenetic relationships using sequences of the ITS 1-5.8S-ITS2 region of the rDNA. Morphological diversity, growth rate, and yields were also studied.

Genetic crosses and phylogenetic analyses showed the presence of the following species: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. agaves*, *P. levis*, *P. smithii*, and *P. djamor*. *P. djamor* was the most common species within the sample studied, showed wide morphological diversity, and was capable of growing in tropical, subtropical and temperate regions. *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* grew in temperate or subtropical regions.

Six strains of *P. djamor* showed early fruiting (12 days), whereas other five strains of this species showed good yields (116-178%, biological efficiency). One strain of *P. pulmonarius* had continuous fruiting, and two strains showed good yields (110-140% EB). It is possible that the strains of *P. agaves* and *P. smithii* have lost fruiting ability.

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes el cultivo de *Pleurotus*, fue propuesto como una alternativa de solución a la carencia de alimento de alta calidad en el sector rural de México, esto ocasionó el surgimiento de un gran número de módulos de producción en diversas áreas del país (Martínez-Carrera, 2002). A pesar del gran interés que existe por cultivar “el hongo ostra”, la mayoría de estas pequeñas industrias no ha logrado perdurar, debido a problemas serios de contaminación, dificultades para conseguir semilla de buena calidad y, a la falta de adaptación de las cepas comerciales a las condiciones climáticas que prevalecen en las áreas de cultivo (De León-Monzón *et al.*, 2004).

El escaso número de cepas comerciales que se cultivan en México son de origen americano o europeo y pertenecen a la especie *P. ostreatus*, y si analizamos los rangos de temperatura a las que crece el micelio de las cepas de esta especie, encontraremos que tienen un rango de tolerancia muy amplio pues pueden desarrollarse desde 15 hasta 27°C, alcanzando su óptimo crecimiento a 25°C. Su velocidad de crecimiento disminuye conforme se reduce o se incrementa la temperatura (Li, 1980). Lo anterior, sugiere que el reducido número de cepas comerciales que se cultivan en México sólo expresaría su óptimo crecimiento en regiones con clima templado seco y estarían creciendo en condiciones subóptimas o desventajosas en regiones con clima cálido húmedo, subhúmedo y seco. Algo similar se observa al revisar la temperatura de fructificación de las cepas, las europeas fructifican alrededor de 15 °C, mientras que las cepas americanas pueden fructificar de 4-27 °C (Zadrazil, 1974; Li y Eger, 1978). Eger (1978) mencionó haber recolectado cepas tolerantes a temperaturas altas en Florida, que fructifican a 30 °C.

Es posible que el cultivo de cepas comerciales de *P. ostreatus*, bajo condiciones subóptimas de temperatura en regiones tropicales o subtropicales sea el origen de una colonización lenta del substrato con problemas graves de contaminación y/o baja o nula fructificación.

La expansión del cultivo de *Pleurotus* hacia regiones tropicales y subtropicales, donde la abundancia y diversidad de esquilmos agroindustriales y las condiciones de humedad favorecen el cultivo de hongos, exige la producción de cepas capaces de crecer y fructificar bajo estas condiciones.

Por otro lado, la posición geográfica de México y su diversidad de ecosistemas, hace suponer la existencia de una gran diversidad genética entre las cepas nativas del hongo ostra. A pesar de esto, los trabajos tendientes a la caracterización de este germoplasma y a monitorear las especies de *Pleurotus*, han sido escasos y aislados (Martínez Carrera *et al.*, 1986; Sobal y Martínez Carrera, 1988; Guzmán *et al.*, 1993, 1994, 1995). Actualmente, sólo algunos centros de investigación han dedicado esfuerzos a recuperar y conservar germoplasma nativo de cepas silvestres de hongos comestibles (Martínez-Carrera, 2002; Mata y Salmones, 2003; Huerta, 2004). Dado el creciente interés por producir hongos en nuestro país, es imprescindible desarrollar estudios tendientes a la obtención de cepas adaptables a las diferentes condiciones climáticas, aprovechando el germoplasma nativo. Sin embargo, para poder llevar a cabo un programa sólido de mejoramiento genético que nos permita utilizar la diversidad genética presente en el germoplasma nativo de *Pleurotus*, es indispensable contar con: a) La identificación correcta de las especies b) Conocer las relaciones de compatibilidad sexual entre las líneas de *Pleurotus* e c) Incluir cepas de diferentes orígenes geográficos, para asegurar diversidad en el material de estudio (Vilgalys *et al.*, 1993, 1994, 1996; Petersen, 1995a, 1995b). Con base en lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron las relaciones de incompatibilidad sexual y filogenéticas existentes entre 31 cepas de *Pleurotus* procedentes de diferentes regiones de México y se caracterizó la diversidad morfológica de las cepas procedentes de diferentes regiones.

I. ANTECEDENTES

2.1. El cultivo de *Pleurotus* en México

P. ostreatus (Jacq.: Fr.) P. Kumm., fue cultivado por primera vez en Cuajimalpa, México en 1974. El crecimiento de esta industria permaneció incipiente hasta los 80's, posteriormente recibió un gran impulso, debido a que a las empresas productoras se les dio un enfoque de tipo social, tendiente a resolver la falta de alimentos de alta calidad en el sector rural de México (Martínez-Carrera *et al.*, 1992; Aguilar, 1993). Como ejemplo de esto, en 1992 se estableció un proyecto en Cuetzalán, en la Sierra de Puebla, en donde se desarrolló un modelo de producción que contempló la construcción de módulos de producción, la implementación de cursos de capacitación y la asesoría continua del Colegio de Posgraduados. Este modelo ha demostrado ser económicamente factible.

En áreas tropicales, específicamente en Chiapas, el cultivo de *Pleurotus* forma parte del paquete tecnológico de producción de más de 100 pequeñas industrias, que lo producen con la finalidad de capitalizarse. Estas últimas han perdurado con mucha dificultad, debido a la falta de adaptación de las cepas comerciales a las condiciones climáticas prevalentes en zonas calido húmedas y, a fallas en la aplicación de la tecnología que se utiliza. Esto se agudiza por la escasa o nula asesoría que hay para resolver los problemas que se presentan.

En todos los casos, la tecnología que se utiliza es rústica, empleando como inóculo semilla de cereales colonizadas por el hongo, como substrato desechos agroindustriales y como áreas para fructificación cuartos contruidos con madera, láminas y anaqueles de madera o metal. El sistema de pasteurización de substratos que utilizan las plantas rurales consiste en sumergir el substrato seco en agua caliente (70°C) por 30 minutos (Martínez-Carrera *et al.*, 1992). Mientras que en el norte de Chiapas, utilizan como substrato olote, rastrojo de maíz y cascabillo de café tratados por inmersión alcalina (pH 10.9 ± 0.2) (Villa-Cruz *et al.*, 1999; De León-Monzón *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2004).

2.2. Mejoramiento genético de *Pleurotus* en México

A la fecha no existe un programa de mejoramiento genético basado en el germoplasma nativo. Sin embargo, pueden citarse algunas investigaciones valiosas sobre

genética de *Pleurotus* que se desarrollaron en el país. Los primeros trabajos se efectuaron en la UNAM con la obtención de mutantes acelulolíticos de *P. ostreatus* (Leal-Lara *et al.*, 1986) y en el disuelto INIREB con aislamiento y entrecruzamiento de cepas nativas de *P. ostreatus* (Martínez-Carrera *et al.*, 1984). Posteriormente, se obtuvieron diversos híbridos a partir de cepas aisladas de la región de Jalapa, Veracruz (Martínez-Carrera *et al.*, 1986). Algunas de estas cepas fueron posteriormente entrecruzadas con cepas procedentes de Guatemala. Los híbridos obtenidos se estudiaron en laboratorio, pero no en planta piloto (Martínez-Carrera, 1988). Un buen número de cepas nativas de esta misma región, fueron caracterizadas fisiológicamente y además se describió su capacidad de entrecruzamiento (Sobal y Martínez-Carrera, 1988). Se realizaron estudios con orientación taxonómica que involucran entrecruzamientos de cepas para diferenciar las especies del género *Pleurotus* (Guzmán *et al.*, 1995). Posteriormente, la literatura reporta algunos esfuerzos por mejorar la productividad de cepas de *P. djamor*, aun cuando se menciona que su textura y sabor son poco agradables en fresco. Así, Gaitán y Salmones (1999) y Salmones *et al.* (2004) reportaron la eficiencia biológica (EB) de 62-123% y de 99-114%, 48-70% para cruza seleccionadas y los parentales de *P. djamor*. Por otro lado Valencia *et al.* (2001-2003) reportaron EB de 184.1-205.3% para una cepa llamada POROS, de origen americano.

2.3. Sistemática, conceptos de especie y especiación

Los estudios de sistemática permiten clasificar a los seres vivos en unidades distintivas llamadas especies. En la naturaleza estas pueden ser reconocidas por las semejanzas morfológicas presentes en los individuos que las constituyen. La selección de los caracteres que los identifican, se basa en la información e hipótesis existentes acerca de los taxa, pero la tradición y la intuición juegan un papel importante en la formulación de propuestas (Kuyper, 1988). En Micología, frecuentemente la descripción de una especie está basada en la delimitación de especímenes tipo fundamentada en diferencias morfológicas. Es decir, las características individuales de los organismos son comparados y aquellos que son similares entre sí, son designados como una misma especie. Este método asume que existe aislamiento reproductivo entre los organismos no similares. Una gran desventaja del concepto de especie morfológica, es que se deja a criterio del taxónomo la

decisión de definir que organismos son similares y cuales son diferentes (Smith, 1968). Por esta razón el uso de caracteres morfológicos para separación de especies en hongos ha resultado muchas veces inadecuada (Petersen y Hughes, 1999). Según Hibbett *et al.* (1997), y Kornelis (1999), la simplicidad de los cuerpos fructíferos de los hongos ha limitado el número de caracteres que pueden utilizarse en la separación de especies. Además la evolución convergente parece ser muy frecuente y como consecuencia de esto, linajes con divergencia evolutiva, pueden tener caracteres morfológicos similares. Como ejemplo, señalaron que los hongos con laminillas no forman un grupo monofilético.

Hasta ahora la selección de caracteres y la importancia que se les da en la identificación de especies, ha originado opiniones diversas sobre la veracidad de este criterio, dando lugar a la proliferación de otros conceptos de especie entre los que sobresalen: Ernest Mayr propuso el concepto de especie biológica (CEB), que se define como grupos de poblaciones naturales, verdaderamente o potencialmente interfecundas y separadas de otros grupos comparables por aislamiento reproductivo. Este concepto es muy objetivo y condujo al descubrimiento de especies crípticas “especímenes morfológicamente similares pero con aislamiento reproductivo”. Se argumenta que este concepto considera aspectos ecológicos, en donde la especie es una comunidad reproductiva de poblaciones que ocupan un nicho específico en la naturaleza. También incorpora el concepto de población como una fuerza de atracción entre genes que la mantiene y la separa de otras, por aislamiento reproductivo. Un argumento importante es que los grupos con aislamiento reproductivo, han evolucionando independientemente dando origen a entidades verdaderamente separadas (Futuyma, 1986; Ridley, 1989; Buican, 1997). Sin embargo, la aplicabilidad de este concepto, ha sido señalado como inoperante, debido a que el número de cruces que se tienen que hacer para identificar una especie es astronómico, no puede aplicarse a fósiles y es irrelevante en poblaciones asexuales. También se ha mencionado, que es difícil definir el momento en que la habilidad para cruzarse se interrumpió, pues aunque en algunos casos podría ser relativamente claro, en otros tendría que marcarse con arbitrariedad (Paterson, 1985; Templeton, 1989).

Simpson (1951), citado por Wiley *et al.* (1991), propuso el concepto de especie evolutiva, que es definida como linaje simple (secuencia de poblaciones de ancestro-

descendiente) que evoluciona separadamente de otros linajes, con una tendencia propia y un destino evolutivo. El concepto es bastante vago en lo que respecta al destino y tendencia de la unidad evolutiva.

El concepto filogenético (Cracraft, 1983), hace énfasis en que las especies son entidades biológicas reales que existen en la naturaleza y no son agrupaciones construidas por hombres. Este concepto se basa en la monofilia “grupo que comprende a todos los taxones derivados de un único ancestro común”, en los cuales hay un patrón parental de ancestro descendiente.

La especie fenética forma grupos de organismos basándose en la similitud global. El método da valores a los caracteres fenotípicos y evalúa el parecido de los organismos. Sin embargo, el método no permite asegurar que los grupos resultantes sean naturales. Se le conoce como taxonomía numérica y fue desarrollada por Sokal (1963) y Sneath y Sokal (1973).

La especiación o formación de nuevas especies, es un proceso evolutivo en el que algunas poblaciones de una especie se diferencian. Los dos principales mecanismos de especiación que la originan son: la hibridación (cruce reproductivo entre dos especies distintas que pueden producir individuos viables y fértiles) y la cladogénesis (aislamiento reproductivo de poblaciones diferentes de una especie debido a barreras reproductivas, precigóticas o postcigóticas).

Se conocen tres patrones básicos de especiación: a) la especiación alopátrica, también llamada especiación geográfica o vicariante, se produce cuando una especie ocupa una gran área geográfica que no permite que los individuos que están muy alejados puedan cruzarse, debido a la existencia de barreras geográficas como mares o montañas. La separación durante un largo período de tiempo, da lugar a la aparición de novedades evolutivas en una o en ambas poblaciones que impiden el intercambio genético entre poblaciones. b) La especiación simpátrica ocurre cuando una especie pasa a ocupar un mismo territorio geográfico se diversifica en dos subpoblaciones, debido a diversos mecanismos que evitan el apareamiento o cruza entre los individuos de las poblaciones (aislamiento ecológico, estacional, etológico, mecánico, sexual y genético). c) En la especiación parapátrica o especiación por poliploidía las poblaciones están distribuidas continuamente en el espacio,

pero con intercambio o flujo genético modesto, debido a la evolución de aislamiento reproductivo, que origina divergencia y un posterior aislamiento reproductivo total. Los mecanismos que originan este tipo de especiación son la autoploidía y alopoliploidía (Ridley, 1989).

2.4. Incompatibilidad sexual

Los hongos son un grupo muy grande, que posee diversas estrategias de vida, ciclos de vida, formas de nutrición, dispersión y ecología. En la naturaleza la germinación de esporas forma unidades de micelio que interactúan con otras para formar módulos que en determinadas condiciones pueden originar cuerpos fructíferos producidos a partir de micelio dicarión. Esto sugiere que los hongos presentan mecanismos que les permiten reconocerse a si mismos y reconocer a otros módulos. La incompatibilidad, se ha definido como un sistema genético que controla la competencia por cruzarse en ausencia de diferenciación morfológica. Dos tipos de incompatibilidad sexual han sido descritas: a) la incompatibilidad homogénica, que evita la interacción de micelios con alelos iguales, supone la existencia de por lo menos dos tipos de sistemas de cruce (mating) y promueve el entrecruzamiento de individuos con diferentes sistemas de cruce. Este tipo de incompatibilidad sexual se presenta en basidiomicetos, ascomicetos, zigomicetos y en la mayoría de los hongos heterotálicos. b) El sistema opuesto, incompatibilidad heterogénica, restringe o impide el entrecruzamiento entre micelios con alelos diferentes. Este sistema regula también la compatibilidad vegetativa o somática, que no debe confundirse con incompatibilidad sexual o la interesterilidad (Esser, 1965; 1971).

El estudio detallado de la estructura genética de los sistemas de incompatibilidad de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y los basidiomicetos *Ustilago maydis*, *Coprinus cinereus* y *Schizophyllum commune*, ha mostrado que su expresión puede variar en los diferentes tipos de hongos. Los sistemas de incompatibilidad sexual regulados por un locus con dos alelos (bipolar), han sido reportados en ascomicetos, en algunas royas y la mayoría de los carbonos. En heterobasidiomicetos saprofitos (*Auricularia*, *Exidia* y *Tremella*) el control está dado por un locus y alelos múltiples. Mientras que el sistema tetrapolar (dos locus y alelos múltiples)

ha sido encontrado en la mayoría de los homobasidiomycetes (Raper *et al.*, 1960; Koltin y Raper, 1967; Parag, 1967; Simchen *et al.*, 1969).

Se menciona que la condición de heterocariosis en el micelio se logra cuando dos micelios compatibles se unen, mientras que la formación del cuerpo fructífero sólo se produce cuando los tipos de cruza de cada uno de ellos, es diferente en todos los locus. En ascomicetos las hifas vegetativas forman estructuras especializadas (gametos), que al fusionarse dan origen a las hifas ascógenas, en las cuales los núcleos con sistema de cruza opuesto se dividen pero no se fusionan. La cariogamia, meiosis y esporulación se da sólo cuando se forma una célula especial (asca) en la penúltima célula de las hifas ascógenas. En basidiomicetos superiores, el sistema de cruza de las hifas vegetativas juega un papel esencial en la formación del heterocarión o dicarión. Este tiene una vida vegetativa prolongada y la fusión de núcleos sólo ocurre cuando en los cuerpos fructíferos se diferencian los basidios y es seguida inmediatamente por la meiosis y esporulación (Raper, 1983).

En el 90 % de los Homobasidiomycetes el control de la sexualidad es heterotálica y de esos, el 61 % es tetrapolar como en *Schizophyllum* y *Pleurotus* y el 39 % es bipolar. En este último caso el cuerpo fructífero produce sólo dos grupos de incompatibilidad (A_1 y A_2).

El estudio de la estructura fina y el funcionamiento de los genes de incompatibilidad mostraron que la heterogeneidad de estos factores es producida por la recombinación de genes en la meiosis y la acumulación de mutaciones. Así mismo, se observó que cada factor presenta formas alélicas que se distribuyen en las poblaciones de hongos en el mundo. Se calculó que para el caso de *S. commune* existen alrededor de 9 alelos $A\alpha$ y 32 $A\beta$ y del factor $B\alpha$ y $B\beta$ 9 de cada uno. En base en esto, se estimó que en la naturaleza existen alrededor de 288 diferentes tipos de A y 81 factores B, por lo que su potencial de cruza es de 98.4% y la frecuencia de recombinación de A y B es de 9.5% y 2.3% respectivamente (Raper *et al.*, 1960; Koltin y Raper, 1967; Parag, 1967; Raper, 1983).

En el caso de *Pleurotus* se reportó que los factores de incompatibilidad tienen multialelos en los factores A y B, lo que explica el alto porcentaje de intercompatibilidad entre cepas de la misma especie y de diferente origen geográfico (Bresinsky *et al.*, 1977,

1987). Eugenio y Anderson (1968), reportaron la presencia de 17 factores A y 20 B al estudiar 10 carpóforos de Minnesota y uno de Michigan en Estados Unidos; por lo que estimaron que podían existir alrededor de 63 A y 190 B en esta población natural de *P. ostreatus*. Por otro lado Zervakis y Balis (1995), mencionaron que en Grecia, la población natural de *P. pulmonarius* localizada en una superficie de 5Km² estaba formada por 64 alelos A y 44 B. En México Sobal y Martínez (1988), detectaron 16 factores A y 18 B al revisar los alelos de 10 líneas de *P. ostreatus* y estimaron que existían cerca de 48 A y 95 B en la naturaleza.

El uso de técnicas de clonación evidenció que las proteínas codificadas por los genes de sistemas de cruza, son diferentes entre individuos haploides, que la expresión es afectada directa o indirectamente por la expresión de genes que regulan el desarrollo del carpóforo, tanto en ascomicetos como en basidiomicetos. La secuenciación de los genes del sistema de cruza mostró que en la mayoría de los casos, los genes codifican para una proteína y presentan asociaciones con otras proteínas. Esto ha sido claramente demostrado en el caso de *S. cerevisiae*, donde *mat a* y *mat α* codifican para proteínas diferentes. Los locus “a” y “α₂”, son factores de transcripción de proteínas que interactúan con secuencias de ADN, para activar o reprimir la transcripción del gen “α₁” que es un operador de transcripción típico de haploides. Mecanismos análogos han sido descritos en basidiomicetos. En *Coprinus cinereus* el gen del mat A, codifica para factores de transcripción HD₁ y HD₂ y el mat B, para una proteína de activación tipo feromona, necesaria para la fusión de micelios. Esta se forma como respuesta a una proteína que funciona como feromona. Su funcionamiento es similar en los sistemas bipolares y tetrapolares. (Kües y Casselton, 1992; Schrick *et al.*, 1997; Zhong y Steffenson, 2001; Dorak, 2002). Un mapeo del genoma de *P. ostreatus*, mostró que el locus del mat B esta formado por dos subunidades *mat Ba* y *mat Bβ* (Larraya *et al.*, 1999, 2000, 2001).

En *S. cerevisiae* se describe un mecanismo tipo “switch”, que puede convertir una célula “a” en una “α” y viceversa, cuando en la población todas las células son del mismo tipo de sistema de cruza. Esto permite la formación de células “a / α” diploides, que esporulan después de pasar por meiosis. Esta fructificación se conoce como fructificación homocariótica y ha sido descrita en *Agrocybe aegerita*, *Agaricus bitorquis*, *P. ostreatus* y

P. djamor (Labarère y Noël, 1992; Martínez-Carrera *et al.*, 1995).

La incompatibilidad vegetativa es un evento común en la naturaleza, que se expresa durante el crecimiento vegetativo, es regulado por la presencia de dos núcleos diferentes en el micelio (heterocarión o dicarión). Se conoce como incompatibilidad somática en basidiomicetos e incompatibilidad heterocarióntica o vegetativa en ascomicetos y ha sido revisado extensamente (Esser, 1965; Prud'Homme, 1965; Glass y Kulda, 1992; Kay y Vilgalys, 1992; Malik y Vilgalys, 1999).

2.5. Filogenética y marcadores moleculares

La filogenética trata de encontrar y definir la historia genealógica de grupos de organismos y propone una clasificación que refleje exactamente estas relaciones; de tal manera que la historia genealógica a nivel de especie y de taxa superiores sea la historia de la especiación (Wiley *et al.*, 1991). Esto sólo será posible si el análisis filogenético se basa en características discretas apropiadas. Tradicionalmente los caracteres morfológicos han sido utilizados para reconstruir filogenias; sin embargo, para el caso de hongos la convergencia de varios de los caracteres morfológicos y la falta de fósiles han limitado su reconstrucción. Bruns *et al.* (1991), mostraron que es posible hacer análisis cladístico con datos moleculares, porque la molécula de ADN tiene homólogos en posición e identidad y esta compuesto de genes con secuencias conservadas y secuencias intergénicas variables. Algunas técnicas moleculares como: hibridaciones de ADN, isoenzimas, fragmentos de restricción producidos por RFLP en el ADNmt o ADNr, han mostrado que la similaridad o la falta de similaridad (según sea el caso), puede usarse como criterio para reconocer los miembros de un mismo grupo. Sin embargo, su alcance puede ser limitado, por lo que se sugiere formar grupos genéricos en base a características fenológicas, como una aproximación preliminar. (Vilgalys y Johnson, 1987; Vilgalys *et al.*, 1991; Avise, 1994; Iraçabal y Labarère 1994; Iraçabal *et al.*, 1995; Bunyard *et al.*, 1996). Diferentes marcadores han sido propuestos para resolver indefiniciones en la sistemática de algunos géneros de hongos. La homología entre las hibridaciones ADN-ADN de las especies que forman el complejo de *Collybia dryophila*, demostró ser muy útil en la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y modelos de especiación (Vilgalys y Johnson, 1987). La

electroforesis de proteínas y el análisis de isoenzimas, fue empleado para ofrecer información sobre las relaciones fenéticas entre y dentro de las especies de *Pleurotus* (May y Royse 1988, Zervakis y Labarère, 1992, Zervakis *et al.*, 1994, Bunyard *et al.*, 1996). Los patrones producidos por enzimas de restricción (RFLPs) sobre ITS1-5.8S-ITS2, IGS1-5S-IGS2 o la subunidad grande del ARNr nuclear o mitocondrial, fueron usados en la identificación de especies, en los géneros de los taxa: *Coprinus* spp (Hopple y Vilgalys, 1999), *Pleurotus* (Sagawa *et al.*, 1992; Iraçabal y Labarère, 1994; Iraçabal *et al.*, 1995; Matsumoto y Fukumasa-Nakai, 1995; Bunyard *et al.*, 1996), *Morchella* (Bunyard *et al.*, 1994) y *Laccaria* (Sweeney *et al.*, 1996). Hibbett y Vilgalys (1991), demostraron la relación evolutiva de *Lentinus* con la familia Poliporaceae. Estas técnicas resolvieron algunas dificultades en la diferenciación de especies o en caracterización de la variabilidad genética de las especies. Sin embargo, algunos autores mencionaron que las diferencias en los fragmentos de ADNr producidos por la digestión con enzimas no siempre pueden ser interpretadas como formas alélicas, la presencia de mutaciones en los sitios de corte puede ocasionar confusiones.

Una aproximación más rigurosa pudo lograrse, al amplificar y secuenciar los genes de ARNr para estudios filogenéticos en hongos (White *et al.*, 1990). El ADN ribosómico tiene copias múltiples formando una familia de genes. Cada gen tiene regiones conservadas que se transcriben y no conservadas que no se transcriben (ITS) que pueden ser amplificadas por PCR usando cebadores universales ITS. El análisis de secuencias en la región espaciadora del ADNr proporcionó datos apropiados para describir las relaciones filogenéticas en los complejos: *Armillaria*, *Rhizoctonia solani*, *Pleurotus*, *Hebeloma crustuliniforme* que concuerda con los grupos interestériles y morfológicos identificados (Chillali *et al.*, 1998; Vilgalys *et al.*, 1991; González, 1992; Neda y Nakai, 1995; Hopple y Vilgalys, 1999; Kornelis, 1999). Otros autores han propuesto el uso de secuencias del ADNr de la mitocondria, para estudios de filogenética en el ámbito de especies (González y Labarère, 2000). El estudio de la subunidad corta (SSU) del ADNr, ha permitido redefinir al phylum *Chitridiomycota* y dio soporte a la hipótesis de que ascomicetos y basidiomicetos son grupos evolutivamente relacionados (Bruns *et al.*, 1991, 1993; Blackwell *et al.*, 2003). Por otro lado Moncalvo *et al.* (2000) sugirió que la subunidad larga (LSU) del ADNr puede

ser utilizada como herramienta para definir los grupos monofiléticos del complejo Agaricales.

La comparación de secuencias de las regiones ITS e IGS del ADNr, han sido utilizadas para describir los patrones de diversidad y distribución geográfica en algunos de los complejos de hongos: *Pleurotus*, *Armillaria mellea*, *Lentinula*, *Collybia s. str.*, *Schizophyllum commune* (Coetzee *et al.*, 1992; Vilgalys *et al.*, 1994; Hibbett *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2000; James *et al.*, 2001).

El desarrollo de la técnica de RAPD's puede producir patrones específicos para un taxón o por genotipo, se ha convertido en una herramienta utilizada para detectar la variabilidad del germoplasma en hongos, la especificidad entre hospederos y patógenos, patrones de dispersión o la presencia de líneas específicas y la heterocariosis en el micelio (Paran y Michelmore, 1993; Balali *et al.*, 1995; McClelland *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1996; Rohel *et al.*, 1997; Roberts y Crawford, 2000).

2.6. *Pleurotus*, sus divisiones infragenéricas

Los criterios morfológicos utilizados por la taxonomía tradicional, no han permitido definir con claridad la separación taxonómica de especies en “los hongos ostra”, que se incluyen en el género *Pleurotus* (Bresinsky *et al.*, 1977, 1987; Petersen y Hughes, 1993; Vilgalys *et al.*, 1993).

La ubicación del género en taxa superiores ha sido sujeta a controversias. En un tiempo existió consenso en que los géneros *Panus*, *Pleurotus* y *Lentinus*, estaban estrechamente relacionados. Sin embargo, al estudiar su afinidad con otras taxa superiores, la ubicación en Agaricales fue cuestionada por Pegler (1983), quien propuso separar estos tres géneros de Agaricales. El sugirió que podían estar más estrechamente relacionados con ciertos hongos poliporoides, por presentar una trama estructural típicamente dimítica en *Lentinus* y *Panus* y secundariamente monomítica en *Pleurotus* (Corner, 1981). La presencia de hifas gancho (comunes en *Polyporus*) en algunas especies de *Lentinus*, hizo suponer que este grupo tuvo un poliporoide como ancestro común, por lo que se les ubicó en el Orden Aphylophorales y familia Lentinaceae (Gilbertson y Ryvarden, 1986).

Alexopoulos *et al.* (1996), después de hacer un análisis y discusión de los trabajos sobre ultra estructura celular y biología molecular, propuso la siguiente hipótesis sobre la posición de *Pleurotus* en los taxa superiores: Phylum Basidiomycota, Clase Hymenomycetes, Orden Agaricales y Familia Tricholomataceae.

Por otro lado, Hibbett y Thorn (1994), describen el hábito nematófago en *Pleurotus* y confirman la producción de gotas nemostáticas en *Lentinus tuberregium*, apoyando en base a esta característica, su inclusión en el género *Pleurotus*. Otros autores aceptaron que el ataque y el consumo de nematodos, sea utilizado como argumento que demuestra la monofilia de *Hohenbuehelia* y *Pleurotus*, y por el contrario la capa gelatinizada en el basidioma de *Hohenbuehelia* y *Resupinatus* es producto de evolución independiente, por lo que proponen separarlos de la tribu *Resupinatae* (Thorn *et al.*, 2000). Recientemente Moncalvo *et al.* (2000) usando como marcador LSU-ADNr, propusieron excluir *Hohenbuehelia* y *Pleurotus* de Tricholomataceae; y que se agrupen en la familia Pleurotaceae, ya que formaron un grupo monofilético soportado por 81% de bootstrap. Con base a la información generada recientemente, se describe la siguiente ubicación taxonómica para *Pleurotus*: [Fungi](#), [Basidiomycota](#), [Basidiomycetes](#), [Agaricomycetidae](#), [Agaricales](#), [Pleurotaceae](#) (Kirk *et al.*, 2001).

Por otro lado Petersen y Hughes (2006), mencionaron que aún en la descripción morfológica del género, no se incluyen todas las especies de *Pleurotus*: El basidioma pleurotoide, excluye a *P. dryinus* (Pers.: Fr.) P. Kumm. y *P. levis* (Berk. y M.A. Curtis) Singer, que tienen estípites central; la esporada blanca a *P. pulmonarius* (Fr.) Qué. y *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland, cuyas esporadas tienen tintes violáceos; las laminillas decurrentes, son dudosas en *P. calyptratus* (Lindblad) Sacc.; un velo parcial se presenta en los especímenes del complejo *P. dryinus*, mientras que está bien desarrollado en *P. calyptratus*. Así mismo, apoyando la sugerencia hecha por Miller (1984); sugirieron que en la descripción debe incluirse la formación de micro gotas nemostáticas, sobre estructuras simples y cortas, como un carácter que se presenta después que las cepas han sido cultivadas.

La alta variabilidad genética y la plasticidad fenética que presenta el género, ha limitado la separación de especies usando criterios morfológicos, varios autores

documentaron la inconsistencia de algunos caracteres al modificar las condiciones de temperatura, luz, humedad o sustrato en las que crecen los especímenes. Entre estos se encuentran: el color y forma del carpóforo, tamaño de esporas, presencia o ausencia de hifas esqueléticas, tamaño y posición del estípote etc. (Anderson *et al.*, 1973; Bresinsky *et al.*, 1977, 1987; Eger *et al.*, 1979; Petersen y Hughes, 1993; Vilgalys *et al.*, 1993). Debido a esta situación una misma especie pudo haber sido identificada bajo diferentes nombres ocasionando confusiones y controversias en el pasado, especialmente en los taxa que incluyen los complejos: *P. ostreatus* formado por *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm, *P. colombinus* (Qué!) Qué!, *P. pulmonarius* (Fr.) Qué! y *P. sapidus* (Schulzer) Sacc. (Anderson *et al.*, 1973; Eger *et al.*, 1979); las formas rosas *P. salmoneostramineus* Vassiljeva, *P. ostreatoroseus* Singer y *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn (Pegler, 1977; Guzmán *et al.*, 1993; Petersen y Hughes, 1993); *P. citriniopileatus* (Lindb. Apud. Fr.) Sacc., similar a las especies de *P. cornucopiae* (Paulet: Pers.) Rolland (Ohira, 1990); Las formadoras de coremios *P. cystidiosus* (O. K. Mill.), *P. abalonus* Han, Chen y Cheng y *P. smithii* Guzmán, (Guzmán *et al.*, 1991; Zervakis, 1998).

Algunos trabajos basados en criterios morfológicos y tendientes a inventariar la riqueza micológica de México, señalaron la presencia de *P. cornucopiae*, *P. levis*, *P. djamor*, *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. smithii* y *P. mexicanus*, entre otras (Guzmán, 1973; Guzmán, y García-Saucedo, 1973; Herrera y Guzmán, 1973; Guzmán y Jonson, 1974; Ayala y Guzmán, 1984; Chacón y Guzmán, 1984; Guzmán *et al.*, 1980, 1993, 1994, 1995; Hernández-Ibarra, *et al.*, 1995; Andrade *et al.*, 1996).

Muchas de estas ambigüedades taxonómicas, fueron ocasionadas por fallas en identificación, por ausencia de especímenes tipo, por el desconocimiento del efecto que producían las condiciones ambientales y el sustrato, sobre la morfología de diferentes taxa y a la escasa información sobre la compatibilidad (Anderson *et al.*, 1973; Eger *et al.*, 1979; Bresinsky *et al.*, 1987).

Los experimentos de sistemas de cruza, desarrollados por Ohira (1990); Petersen y Hughes (1993); Vilgalys *et al.* (1993); Petersen (1995a y 1995b); Zervakis y Balis (1996); Zervakis (1998), permitieron diferenciar 15 Grupos interestériles y describir su distribución geográfica. Con esto se demostró que la especiación en *Pleurotus* esta asociada al

establecimiento de barreras genéticas de tipo reproductivo entre las poblaciones, sin que ellas presenten una diferenciación morfológica clara (Tabla 1).

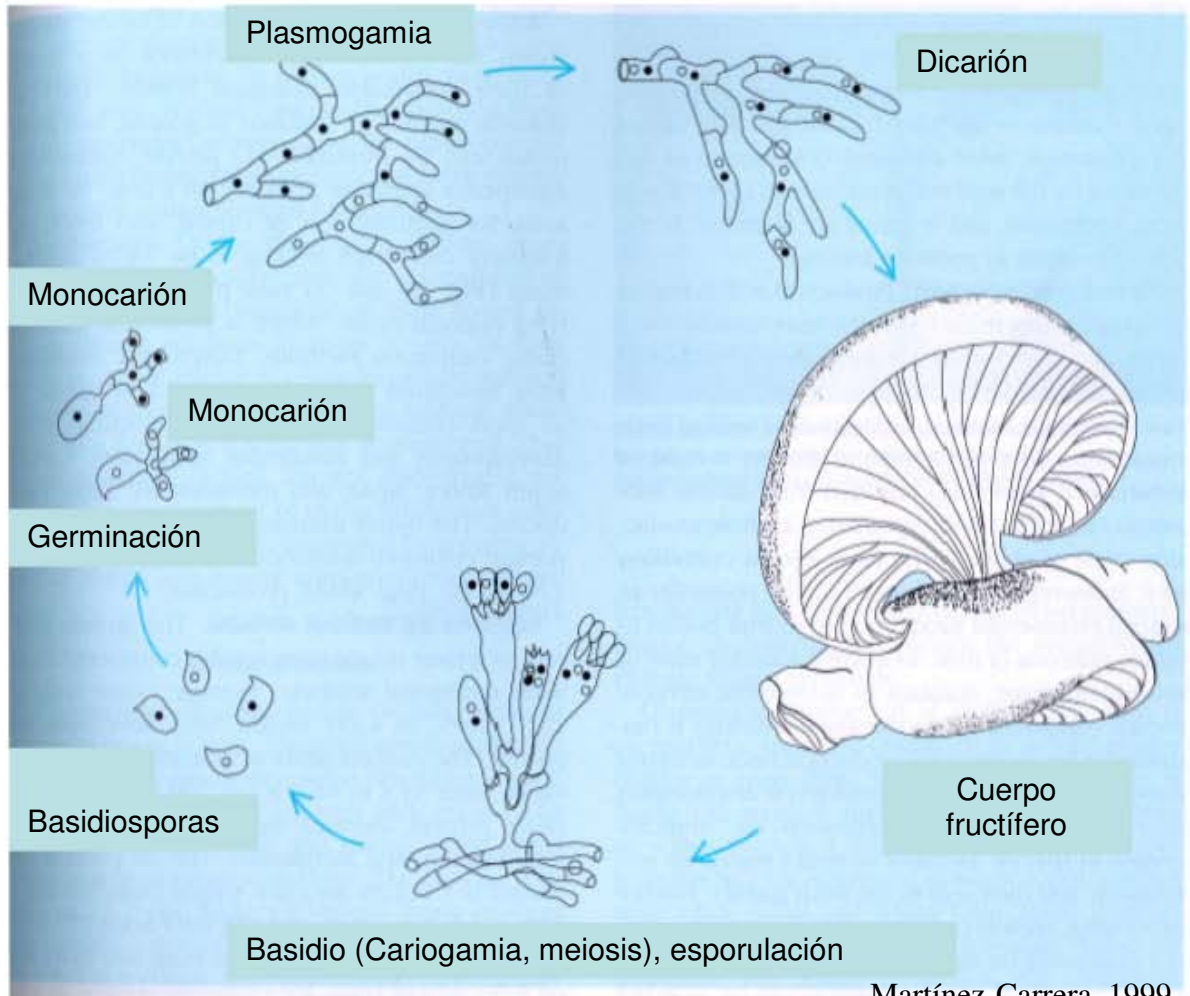
Tabla 1. Especies de *Pleurotus*, sinónimos y su distribución natural en el ámbito mundial

Grupo	Especie	Sinónimos	Distribución					
			Asia	Norte América	Europa	Australia	África	Sur América
I	<i>P. ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	<i>P. colombinus</i> , <i>P. salignus</i> , <i>P. spodoleucus</i>	x	x	x			
II	<i>P. pulmonarius</i> (Fr.) Quéf	<i>P. sajour-caju</i> , <i>P. sapidus</i>	x	x	x			
III	<i>P. populinus</i> O. Hillber y O.K. Mill.			x				
IV	<i>P. cornucopiae</i> (Paulet) Rolland	<i>P. citrinopileatus</i>	x					
V	<i>P. djamor</i> (Rumph.: Fr.) Boedijn	<i>P. flabellatus</i> , <i>P. euosmus</i> , <i>P. streatoroseus</i> , <i>P. mexicana</i> , <i>P. salmoneostramineus</i>	x	x	x			x
VI	<i>P. eryngii</i> (DC.) Gillet	<i>P. ferulae</i> , <i>P. nebrodensis</i> , <i>P. hadamardii</i> , <i>P. fossulatus</i>	x	x	x			
VII	<i>P. cystidiosus</i> O.K. Mill	<i>P. abalonus</i> , <i>P. smithii</i>	x	x	x			x
VIII	<i>P. levis</i> (Berk. y M.A. Curtis) Singer			x				
IX	<i>P. dryinus</i> (Pers.) P. Kumm			x				
X	<i>P. tuberregium</i>	<i>Pachyma tuber-regium</i> Fr.						x
XI	<i>P. agaves</i> Dennis	<i>P. opuntiae</i>		x				
XII	<i>P. abieticola</i> R.H. Petersen y K.W. Hughes							
XIII	<i>P. brazil</i>		x					
XIV	<i>P. Australis</i> (Cooke y Masse) Sacc.						x	
XV	<i>P. purpureo-olivaceus</i> (G. Stev.) Segecin, P.K. Buchanan y J.P. Wilkie	<i>Resupinatus purpureo-olivaceus</i>						x

Fuentes: Petersen y Hughes, 1993, Vilgalys, et al., 1993, Zervakis y Balis, 1996.

2.7. Ciclo de vida en Agaricales

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos heterotálicos pasa a través de tres diferentes etapas de desarrollo, antes de que el hongo complete su ciclo de vida: homocarión-heterocarión-diploide. El micelio primario u homocarión; llamado así, porque todos sus núcleos son idénticos, o monocarión, cuando se sabe que cada compartimiento hifal contiene un sólo núcleo. Este micelio se desarrolla a partir de la germinación de una basidiospora y aunque en la mayoría de los basidiomicetos parecen ser capaces tener un crecimiento indefinido, no es común encontrarlo en la naturaleza, pues forma casi inmediatamente micelio secundario o heterocarión al entrar en contacto con otro micelio homocarión compatible. Los micelios compatibles se fusionan dando origen a un compartimiento heterocarión que también puede ser llamado dicarión; cuando se conoce que cada compartimiento hifal contiene dos núcleos (Alexopoulos, *et al.*, 1996). Según Raper (1966), la dicarionización del micelio secundario se da a partir de este compartimiento miceliar. Se menciona que ambos núcleos de la célula binucleada se dividen y luego los núcleos hijos, migran hacia el micelio primario que pertenece al grupo de compatibilidad opuesto ("mating type"). De esta forma el micelio resultante tiene un núcleo de cada uno de los micelios que le dieron origen y un mosaico de mitocondrias porque estas no migran. En la mayoría de las especies la división nuclear es regulada por una clase especial de división celular que da origen a la formación de conexiones grapa o fíbulas que son formadas durante la división de los núcleos, en el extremo de la hifa en crecimiento. La presencia de conexiones grapa se considera generalmente, como indicativo de la condición dicariótica; sin embargo, existen excepciones. Finalmente, el micelio dicarión o heterocarión puede dar origen al basidioma entretejiéndose y diferenciándose en formas especializadas como el himenio, donde se encuentran los basidios. En estos ocurre la fusión nuclear y por meiosis se forman las basidiosporas, las cuales inician de nuevo el ciclo (Fig. 1).



Martínez-Carrera, 1999

Figura 1. Ciclo de vida de *Pleurotus*

II. CONCLUSIONES DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- a. Se han generado algunos híbridos de *Pleurotus*, sin embargo a la fecha no existe un programa de mejoramiento genético basado en el germoplasma nativo.
- b. Para llevar a cabo un programa de mejoramiento genético que nos permita utilizar la diversidad genética presente en el germoplasma nativo, es necesaria la identificación correcta de las especies y conocer las relaciones de compatibilidad sexual que hay entre las líneas de *Pleurotus*.
- c. La identificación de especies basada en criterios morfológicos, asume que organismos con morfología similar pertenecen a la misma especie y que, existe aislamiento reproductivo entre los organismos no similares.
- d. La simplicidad morfológica que hay en los hongos y la alta frecuencia de evolución convergente, limita el número de caracteres que pueden utilizarse en la separación de especies.
- e. La alta variabilidad genética y la plasticidad fenética del genero *Pleurotus* ha limitado la separación de especies usando criterios morfológicos.
- f. Es necesario definir que caracteres morfológicos, fisiológicos, ecológicos, genéticos y químicos, permiten colocar a un espécimen de estudio, dentro de un grupo monofilético. Las herramientas moleculares actuales pueden ayudar a este trabajo.
- g. Hay evidencias moleculares que señalan los aciertos en el uso de algunos caracteres morfológicos, al identificar como grupos monofiléticos a varias familias del orden Agaricales y Poliporales.
- h. Los estudios sobre los sistemas de cruce en *Pleurotus* permitieron diferenciar 15 Grupos interestériles y describir su distribución geográfica. Con esto también se demostró que la especiación del hongo ostra esta asociada al establecimiento de barreras genéticas de tipo reproductivo entre las especies, sin que ellas presenten diferenciación morfológica clara.
- i. El control de la sexualidad en *Pleurotus* es heterotálica, tetrapolar y bifactorial con multialelos. Esto explica los altos porcentajes de intercompatibilidad entre cepas pertenecientes a la misma especie pero de diferente origen geográfico.

- j. El análisis de la región espaciadora ITS1-5.8S-IT2 del ADN ribosómico, proporcionó datos apropiados para describir las relaciones filogenéticas en el complejo *Pleurotus*, que coincide con los grupos interestériles y grupos morfológicos.

I. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la diversidad morfológica, fisiológica y genética de cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus* procedentes de diferentes regiones.

Objetivos Específicos

- a. Identificar las especies de *Pleurotus* presentes en una muestra de 31 cepas mexicanas procedentes de diferentes regiones tropicales, subtropicales y templadas del país, mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico.
- b. Identificar los grupos interestériles de *Pleurotus* en una colección de 31 cepas mexicanas procedentes de regiones tropicales, subtropicales y templadas del país.
- c. Describir las características de productividad, diversidad morfológica y de velocidad de crecimiento de los grupos interestériles de *Pleurotus*, presentes en la colección de cepas estudiadas.

II. HIPÓTESIS

- a. Probar la presencia de diversidad de especies y genes en una colección de cepas de *Pleurotus* procedentes de diversas regiones de México.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta un diagrama con las metodologías que se desarrollaron para hacer la descripción morfológica, genética y filogenética de la colección de cepas de *Pleurotus* nativas de México. La descripción a detallada de estos métodos se encuentra en los artículos ubicados en la sección de resultados.

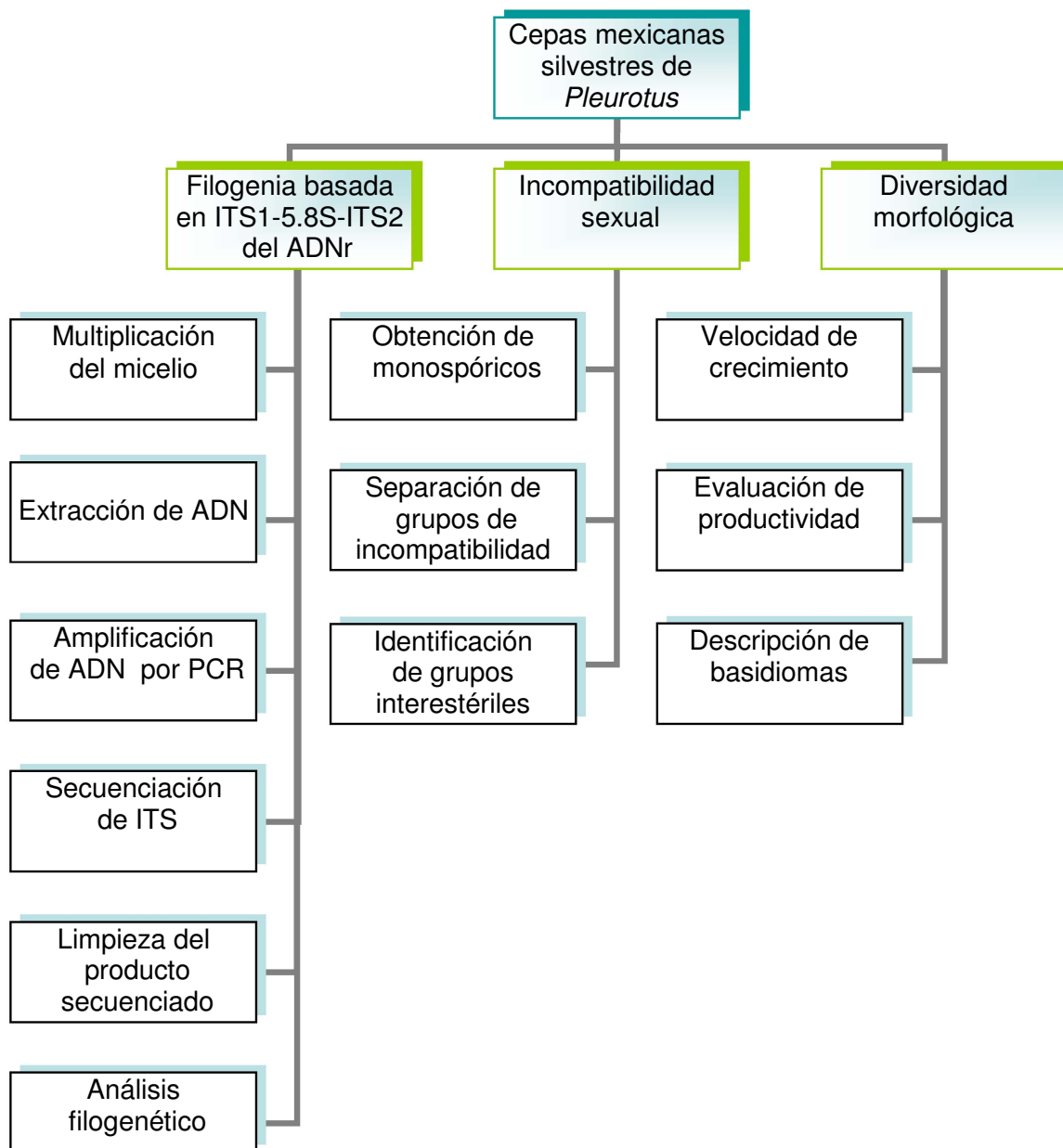


Figura 2. Diagrama general de metodologías utilizada para la caracterización genética de *Pleurotus*.

VII. RESULTADOS

Capítulo 1

Identificación de las especies mexicanas de *Pleurotus* empleando la región ITS del ADNr



MICOLOGIA APLICADA INTERNATIONAL

© PRINTED IN BERKELEY, CA, U.S.A.

[HTTP://WWW.MICAPLINT.COM](http://www.micaplint.com); [HTTP://REDALYC.UAEMEX.MX/REDALYC](http://redalyc.uaemex.mx/redalyc)

D. Martínez-Carrera
dcarrera@colpos.mx
Fax: (52) 222-2852162
Tel.: (52) 222-2852798
Apartado Postal 701
Puebla 72001, Puebla, Mexico

Mayo 30, 2007

M.C. GRACIELA HUERTA PALACIOS ET AL.
ECOSUR, Tapachula, Chiapas
Presente

Por este medio, tengo el agrado de informarle que su trabajo intitulado:

Genetic relationships between Mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA

(Identificación de las especies mexicanas de *Pleurotus* empleando la región ITS del ADNr)

ha sido aceptado para su publicación en nuestra revista. Tan pronto tengamos las recomendaciones finales de los editores nos pondremos en contacto con Ud. nuevamente.

Sin otro particular, reciba Ud. un afectuoso saludo de mi parte.

Atentamente,

Dr. D. Martínez-Carrera
Editor Responsable
MICOLOGIA APLICADA INTERNATIONAL

Identificación de las especies mexicanas de *Pleurotus* empleando la región ITS del ADNr

Graciela Huerta^{1*}, Daniel Martínez-Carrera², J. Ernesto Sánchez¹, Hermilo Leal-Lara³ y Rytas Vilgalys⁴

¹El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Km. 2.5 Carr. Ant. Aeropuerto, Tapachula, Chiapas 30700, México

²Colegio de Posgraduados campus Puebla. Km.1.5 Ant. Carr. Cholula, Puebla, México.

⁴Facultad de Química, Conjunto E Lab. 324, UNAM Cd. Universitaria, México, D.F.

⁵Department of Biology, Duke University, Durham, N.C. 27858

Resumen

Se identificaron, mediante criterios filogenéticos, las especies de *Pleurotus* presentes en una colección de 31 cepas mexicanas, procedentes de 11 diferentes regiones tropicales, subtropicales y templadas de México. Se amplificó y secuenció la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico y mediante un análisis de distancia (el vecino más próximo) y de máxima parsimonia, se demostró la presencia de las siguientes seis especies: *Pleurotus ostreatus* (IC 65%), *P. pulmonarius* (IC 72%), *P. agaves* (IC 99%), *P. djamor* (IC 98%), *P. levis* (IC 98%) y *P. smithii* (IC 100%). El análisis diferenció las secuencias mexicanas de las europeas para la mayoría de los casos en *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*.

Palabras clave: *Pleurotus*, ITS de ADNr, relaciones filogenéticas.

Abstract

A sample (31) of *Pleurotus* strains from eleven tropical, subtropical and temperate regions of Mexico were identified by phylogenetic analysis. The ITS1-5.8S-ITS2 region from the rDNA was amplified and sequenced in all strains studied. Six species were identified using methods of neighbor-joining and maximum parsimony: *P. ostreatus* (CI 65%), *P. pulmonarius* (CI 72%), *P. agaves* (CI 99%), *P. djamor* (CI 98%), *P. levis* (CI 98%), and *P. smithii* (CI 100%). Differences were found between Mexican and European sequences in most cases of *P. ostreatus* and *P. pulmonarius*.

Key words: *Pleurotus*, ITS region of rDNA, phylogenetic relationships.

* Correo electrónico del autor: Graciela Huerta; e-mail: ghuerta@ecosur.mx

Introducción

Los genes y sus espaciadores en el ADN ribosómico nuclear (ADNr) presentan grados de conservación diferentes a través del tiempo, y han sido utilizados para analizar las relaciones filogenéticas en un amplio rango de niveles taxonómicos (White *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991; Hibbett y Thorn, 1994). Se tienen bien documentadas las ventajas de la secuenciación directa de genes de la región espaciadora interna (ITS) de los genes 18S-28S del ADN ribosómico nuclear (ADNr), para describir las relaciones filogenéticas de especies o poblaciones. Esta región tiene tres componentes, la subunidad 5.8S altamente conservada, y dos espaciadores ITS1 e ITS2 con alto grado de variabilidad producto de mutaciones de punto y/o deleciones. Estas características aseguran que sólo secuencias de taxa estrechamente relacionadas pueden ser alineadas (Lee y Taylor, 1992). Algunas características generales de la región ITS que promueven su uso en estudios filogenéticos de hongos son: un tamaño aproximado de 700 pares de bases y el elevado número de copias del gen, lo cual facilita la detección, amplificación, clonación y secuenciación.

La presencia de regiones altamente conservadas en los flancos de los espaciadores ha permitido la generación de oligonucleótidos universales (Hillis, 1988). El alcance del análisis de secuencias de la región espaciadora de ADNr se ha mostrado al describir relaciones filogenéticas que coinciden con los grupos interestériles y morfológicos, en los complejos de *Armillaria*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria*, *Pleurotus* y *Rhizoctonia solani* (Vilgalys *et al.*, 1994; Neda y Nakai, 1995; Chillali *et al.*, 1998; Kornelis, 1999).

La alta variabilidad genética y la plasticidad fenética que presenta el género *Pleurotus*, ha limitado la separación de especies y ha propiciado fallas en su identificación, o que incluso una misma especie sea identificada bajo diferentes nombres científicos, ocasionando confusiones y controversias. Algunos trabajos basados en criterios morfológicos y tendientes a inventariar la riqueza micológica de México, reportaron la presencia de *Pleurotus cornucopiae* (Paulet: Pers.) Rolland, *P. levis* (Berk. y M.A. Curtis) Singer, *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn, *P. ostreatoroseus* Singer, *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm, *P. flabellatus* (Berk. y Broome) Sacc., *P. smithii* Guzmán, y *P. mexicanus*

Guzmán, entre otras (Guzmán, 1973; Guzmán *et al.*, 1980, 1993, 1994, 1995). Por otro lado, varios autores señalaron que *P. djamor*, ha sido equivocadamente identificado en la literatura mexicana como *P. ostreatus* y propusieron que en México sólo hay dos grupos interestériles de *Pleurotus*: *P. djamor* y *P. smithii* (Guzmán *et al.*, 1980, 1991, 1993). Contrario a esto, la diversidad de ecosistemas presentes en México hace suponer de entrada la existencia de una amplia diversidad genética entre las cepas nativas del género *Pleurotus*. Por otro lado, dado el creciente interés por producir hongos comercialmente en nuestro país, es imprescindible desarrollar estudios tendientes a la obtención de cepas adaptables a las diferentes condiciones climáticas, así como a las necesidades del mercado, aprovechando el germoplasma nativo. Sin embargo, para poder llevar a cabo programas sólidos de mejoramiento genético, es necesario primeramente conocer la diversidad de las cepas mexicanas silvestres y su correcta identificación taxonómica, así como las interrelaciones que existen entre ellas.

En el presente trabajo, se identificaron las especies de *Pleurotus* presentes en una muestra de 31 cepas mexicanas procedentes de diferentes regiones tropicales, subtropicales y templadas del país, mediante la amplificación y secuenciación la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico.

Materiales y métodos

Origen de las cepas

Se estudiaron 31 cepas procedentes de distintas colecciones, donde están consideradas como silvestres y pertenecientes al género *Pleurotus*. Los registros de las cepas indicaron procedencia de los siguientes estados de: Chiapas (8), Hidalgo (1), Jalisco (3), Morelos (4), Michoacán (1), Nuevo León (2), Puebla (3), Tabasco (1), Tlaxcala (1), Veracruz (5) y Yucatán (2), [Tabla 1].

Extracción del ADN y amplificación

El micelio de las 31 cepas se cultivó sobre almidón soluble - extracto de levadura - fosfato (YPSS), pH 5.5, por 10 días, a 26° C y bajo condiciones de oscuridad. Este fue

cosechado, raspando cuidadosamente con una espátula la superficie del medio y colocándolo en tubos eppendorf de dos ml. Se deshidrató en un concentrador (Speed-vac, Savant instrument, Farmingdale, N.Y., E.U.A.) y se congeló a -20° C. Se hicieron mini-preparaciones del ADN usando como buffer de extracción CTAB (2X), y la metodología descrita por Zolan y Pukkila (1986). El ADN se resuspendió en 25-50 μ l de agua bidestilada estéril y se guardó a -20° C. Las regiones ITS1 e ITS2, incluyendo el gen 5.8S, fueron amplificadas utilizando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS 4 (TCCTCCGCTTATT GATATGC (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción de PCR incluyó: 3.75 μ l de agua bidestilada estéril, 2.5 μ l buffer de PCR 10X, con 10 mM $MgCl_2$, 2.5 μ l de BSA (albúmina de suero de bovino), 4 μ l dNTPs (2mM de cada dNTP), 1 μ l de cada iniciador (1 μ M), 0.25 μ l de Taq polimerasa (5 u / μ l), 2 μ l de DNA (10 ng) y una gota de aceite mineral para evitar la evaporación (Vilgalys *et al.*, 1994). Se usaron las condiciones estándares para amplificación de ADN: 94° C por 3 minutos y 35 ciclos de (1 min a 94° , 50° C por 30 seg., 72° C por 1 min.), enlazados entre sí por 7 minutos a 72° C. La presencia de productos de PCR fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Fig. 1). Los productos PCR fueron secuenciados usando la reacción y condiciones siguientes: 4.0 μ l de Big Dye Kit con ampliTaQ DNA polimerasa, 20 μ l de iniciador ITS1 o ITS4, 4.0 μ l producto PCR de ITS y una gota de aceite mineral, para evitar la evaporación de la muestra. Para procesarlas se utilizó un secuenciador automático (modelo ABI1373 Perkin-Elmer, E.U.A.) Dye terminador sequencing chemestries (ABI Perkin-Elmer), usando 2 min., para desnaturalización a 96° C, seguidos por 25 ciclos (96° C por 30 seg., 50° C por 15 seg., y 60° C por 4 min.). El producto fue liberado de impurezas al hacerlo pasar por columnas de cefadex. Los cromatogramas fueron recopilados usando el software Genes Codes Corp., secuenciador versión 2.0.

Análisis filogenético

Además de las 31 secuencias generadas en este trabajo, se incluyeron 22 secuencias provenientes de la colección de secuencias del laboratorio de micología de la Universidad de Duke, N.C., E.U.A., pertenecientes a *P. agaves* (2), *P. calyptratus* (1), *P. cornucopiae* (2), *P. cystidiosus* (1), *P. djamor* (5), *P. dryinus* (1), *P. eryngii* (2), *P. ostreatus* (2), *P.*

pulmonarius (3), *P. levis* (1), *P. smithii* (1) y *Hohenbuehelia* (1) como grupo externo (Tabla 2). Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X, usando los parámetros estándares para alineamiento múltiple y posteriormente fueron revisadas y optimizadas visualmente (Thompson *et al.*, 1997). Las regiones con alineamientos ambiguos fueron removidas y se uniformizó la longitud de las secuencias eliminando los extremos. Posteriormente, fueron importadas al software PAUP versión 4.0b 10x para su análisis (Swofford, 2000). Se consideraron los siguientes parámetros en el análisis filogenético: 1) los vacíos existentes en el alineamiento fueron considerados como un carácter adicional de estado. 2) Cuando el tamaño de los vacíos fue mayor de uno, fueron recodificados como una única inserción/delección, la cual fue considerada como un quinto carácter de estado. Las inferencias filogenéticas se hicieron usando el criterio del vecino más cercano, estimando la distancia entre secuencias por Tamura-Nei (1993). Se hizo una búsqueda heurística, con el fin de encontrar la filogenia con mayor parsimonia, adicionando una secuencia al azar al árbol inicial, hasta encontrar el algoritmo para cambio en la reconexión a una rama, bisección del árbol (TBR) (Swofford, 2000). Los valores de “bootstrap” para los nodos fueron calculados en base a 1000 replicas de remuestreo para cada búsqueda heurística con TBR. Los 100 árboles más parsimoniosos fueron respaldados.

Resultados

Filogenia de las cepas mexicanas de *Pleurotus*

El ITS1, ITS2 y el gen 5.8S del DNAr fueron completamente secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y con inserción de espacios dieron un total de 790 caracteres alineados. De los cuales sólo 667 caracteres fueron incluidos en el análisis. El resto, localizados en la parte inicial y final de las secuencias fueron eliminados para uniformizar el tamaño de las secuencias y por presentar alineación no clara. Las secuencias presentaron 171 caracteres constantes, 185 no informativos y 311 parsimoniosamente informativos. El análisis filogenético basado en una matriz de distancia calculada por el modelo de Tamura- Nei (1993), usando el algoritmo de agrupación de vecinos más cercanos (“neighbor joining”), generó un árbol consenso de 1104 mejores

árboles. Tuvo una longitud de 1128 pasos, un índice de consistencia de (IC) 0.69, 0.31 de índice de homoplasia (HI), 0.87 como índice de retención (RI) y un índice de consistencia reescalado de (RC) 0.60 (Fig. 2). La hipótesis filogenética, separa con claridad los siguientes complejos morfológicos: el primero incluyó a *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn, *P. agaves* Dennis y *P. calyptratus* (Lindblad) Sacc. y el segundo a *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quéll., *P. eryngii* (DC.) Gillet, y los separa claramente de *P. dryinus* (Pers.: Fr.) P. Kumm., *P. levis* (Berk. y M.A. Curtis) Singer, *P. cornucopiae* (Paulet: Pers.) Rolland y del grupo formador de coremios, *P. smithii* (Guzmán) y *P. cystidiosus* (O. K. Mill.). Las secuencias D478 y CP-18 de Xalapa, Veracruz (*P. smithii*), formaron un grupo monofilético muy cercano a *P. cystidiosus* de origen europeo, con el cual tuvieron 56 % de similitud en cuanto a la posición de sus bases y la consistencia de la agrupación fue de 100% y 99%, respectivamente. La secuencia CP-30 formó un grupo monofilético consistente con *P. levis* (D2269) y tuvo una similitud de 58%.

Las secuencias de las cepas identificadas morfológicamente y por tipo de apareamiento como *P. djamor* formaron un grupo monofilético no resuelto (C 98%), que mostró dos unidades de vicarianza geográfica, una de ellas agrupó las secuencias provenientes de Tabasco (D1847 y D234) y una de Yucatán (CP-171) y la otra incluyó secuencias ECS-0174 y -0176 de Jalisco y Veracruz (ECS-0176). La similitud entre las secuencias del grupo *P. djamor* fue de 60-63%.

Las secuencias de las cepas CP-98, CP-194 y ECS-0165, formaron un grupo monofilético con las secuencias de referencia pertenecientes a *P. agaves*, (C 99%) y presentaron de 66 a 68 % de las bases en la misma posición.

Los grupos monofiléticos correspondientes a las especies *P. calyptratus*, *P. djamor* y *P. agaves*, fueron agrupadas en un solo clado, sugiriendo que las especies antes mencionadas son especies hermanas de separación reciente, evolutivamente hablando.

Las secuencias de las cepas ECS-0191, -0158, -0183, -0110, -0170, -0156 y las referenciales de *P. pulmonarius* (D2347 y D2349), formaron un grupo monofilético con una consistencia de 72%, donde cinco secuencias mexicanas formaron un grupo que sugiere vicarianza geográfica y es soportado por un 87% de remuestreo. El análisis muestra que se trata de una especie hermana de *P. ostreatus* y *P. eryngii*.

La secuencia de la cepa de Nuevo León ECS-0184 y la de referencia ECS-01102 formaron un grupo monofilético junto con las referenciales de *P. ostreatus*, y lo separa de *P. eryngii* (IC 80). Las secuencias referenciales *P. eryngii* (IC 96) formaron grupos internos. La similitud en este grupo fue de 72-73%.

El análisis de las secuencias heurístico por máxima parsimonia generó 1089 árboles de los cuales se presenta el árbol consenso (Fig. 3), el cual no presenta ninguna controversia con el obtenido por el método del vecino más cercano. El índice de consistencia fue de 0.69, el de homoplasia de 0.31, el de retención de 0.87 y el de consistencia reescalado fue de 0.60.

Discusión

Se considera que la identificación de especies filogenéticas por secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, es un método muy confiable ya que mostró concordancia total con los grupos interestériles identificados mediante apareamiento sexual. Los resultados obtenidos concuerdan con los trabajos de Vilgalys *et al.* (1994), y Neda y Nakai (1995) para el caso de *Pleurotus*, y de Chillali *et al.* (1998) y Kornelis (1999) en los casos de los complejos de *Armillaria* y *Hebeloma crustuliniforme*.

Análisis filogenético

El análisis diferenció claramente seis linajes soportados por altos porcentajes de remuestreo (70% o >), donde se encuentran incluidas las especies: *P. smithii*, *P. levis*, *P. djamor*, *P. agaves*, *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*. Separó las secuencias mexicanas de las europeas que se utilizaron como referencia en las agrupaciones correspondientes a *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Esto fue observado con anterioridad al estudiar la especiación en *Pleurotus* y *Grifola frondosa* en Norte América (Vilgalys *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2002). Estas particiones filogeográficas no están correlacionadas con formación de barreras de inter esterilidad, según los resultados obtenidos al aparear las cepas de referencia de origen europeo con las mexicanas, en cada uno de los casos. La excepción a este patrón, fue la secuencia ECS-0156 proveniente de Veracruz, que fue agrupada con las secuencias

europas. Una explicación a esta relación, es el flujo de genes de cepas europeas hacia las cepas mexicanas, propiciado por la introducción de cepas extranjeras, con fines de investigación y/o comerciales.

Las secuencias de *P. smithii* (CP-18 y D478) formaron un grupo monofilético muy cercano a *P. cystidiosus*. Estos resultados, coincidieron con lo reportado por Zervakis *et al.* (2004), quien los considera como especies diferentes debido a que su distribución geográfica evita cruza ocasionales que pudieran revertir la barrera reproductiva incompleta que existe entre estas especies. Contrario a esto Capelari y Fungaro (2003), mencionaron que *P. smithii* y *P. cystidiosus* pertenecen a una misma especie, por presentar incompatibilidad parcial (17.5%) al confrontar aislamientos monospóricos procedentes de ambas cepas y patrones de RAPD similares. Zervakis *et al.* (2004) sugirieron la existencia de barreras reproductivas incompletas que se manifiestan como una incompatibilidad parcial poco frecuente entre dos especies evolutivamente cercanas y señala que la separación geográfica de las especies evita que compartan el mismo pool de genes y limita la formación de híbridos. Otros casos de incompatibilidad parcial entre especies fueron reportados entre líneas de *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* provenientes de Nueva Zelanda y *P. calyptratus* y *P. djamor* (Petersen y Ridley, 1996; Shian-Ren, 2000).

Las secuencias pertenecientes a las especies *P. calyptratus*, *P. djamor* y *P. agaves* formaron un grupo monofilético en donde *P. calyptratus* es considerada como especie hermana de *P. djamor*, según Vilgalys *et al.* (1996). Según Shian-Ren (2000), algunas poblaciones de estas dos especies, mostraron compatibilidad parcial, sugiriendo que la interesterilidad entre estas especies es resultado de especiación alopátrica. Se puede considerar que *P. agaves* es especie hermana de *P. djamor* y *P. calyptratus* con barreras reproductivas completas. La distribución geográfica de *P. djamor* y *P. agaves* se sobreponen y presentan una morfología muy parecida que puede ser confundida, mientras que la presencia de velo en *P. calyptratus* permite una clara diferenciación.

Se confirma que las cepas rosas ECS-0127, -0130, -0174, -0175 y -0176 (*P. salmoneostramineus* Lj N. Vassiljeva, *P. ostreatoroseus* Singer) y blancas de *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn, identificadas anteriormente como diferentes especies pertenecen a una misma especie al ser agrupadas en un solo clado del árbol y al mostrar compatibilidad

en los ensayos de apareamiento (datos no presentados en este artículo). Esto coincide con lo reportado por Guzmán *et al.* (1993, 1994); Neda y Nakai (1995) y Nicholl y Petersen (2000).

Diversidad genética de *Pleurotus* en México

El análisis filogenético de secuencias ITS1-5.8S- ITS2 del ADN ribosómico, reveló la existencia de diversidad de especies y de diferentes poblaciones en las especies mejor representadas. Ratificó la presencia de *P. djamor* y *P. smithii* reportadas por Guzmán *et al.* (1980, 1991, 1993, 1994, 1995), y reveló la presencia de cuatro especies más: *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *P. levis* y *P. agaves*. Evidenció fallas en la identificación de la especie de algunas cepas, INIREB 8 y 20, reportadas como *P. ostreatus*, por Martínez-Carrera (1988) y Martínez-Carrera *et al.* (1986), y HEMIM 32 reportada como *P. djamor* por Navarro *et al.* (1996), las cuales fueron identificadas este trabajo como *P. pulmonarius*, con base a sus relaciones de filogenéticas y apareamiento sexual (datos no presentados en este artículo).

P. djamor muy probablemente sea la especie de más amplia distribución en México, capaz de desarrollarse en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Mientras que la distribución de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* parece estar restringida a regiones templadas o subtropicales. Con el fin de complementar la información sobre la distribución de geográfica de las especies de *Pleurotus* y la posible existencia de otras especies, se recomienda intensificar las recolectas en las regiones centro, oeste y norte de México y continuar con los estudios filogenéticos que permitan generar hipótesis más robustas.

La identificación correcta de las especies de *Pleurotus* en la colección de cepas estudiadas, aumenta la eficiencia de las pruebas de cruzamientos en un programa de mejoramiento, y reduce la cantidad de trabajo requerido para seleccionar las cepas que se usarán como progenitoras en un programa de mejoramiento, tendiente a generar cepas de alta productividad capaces de desarrollarse en regiones tropicales y con buenas cualidades culinarias.

Agradecimientos

Mis agradecimientos al Dr. Tim James y Dra. Ursula Painter por la asesoría en el desarrollo del trabajo experimental.

Referencias

- Bruns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Capelari, M. and Fungaro, M.H.P. (2003). Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *coremiopleurotus*. *Mycological Research* 107: 1050-1054.
- Chillali, M., Wipf, D., Guillaumin, J.J., Mohammed, C. and Botton, B. (1998). Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. *New Phytologist* 138: 553 – 561.
- Farris, J.S. (1989). The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Guzmán, G. (1973). Hongos mexicanos (macromicetos) en herbarios del extranjero. II Especies del herbario Farlow, de la universidad de Harvard, E.U.A. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 7: 121-127.
- Guzmán, G., Valenzuela, R. and Canale, A. (1980). Primer registro de *Pleurotus smithii* de América del sur y obtención de la fase asexual de la cepa mexicana. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 14: 17-26.
- Guzmán, G., Bandala, V. M. and Montoya, L. (1991). A comparative study of theleomorphs and anamorphs of *Pleurotus cystidiosus* and *Pleurotus smithii*. *Mycological Research* 94: 64-70.
- Guzmán, G., Montoya, L., Salmones, D. and Bandala, V. (1993). Studies of the Genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamor* in Mexico and other Latin-American Countries, Taxonomic Confusions, Distribution and Semi-Industrial Culture. *Cryptogamic Botany* 3: 213-220.
- Guzmán, G., Montoya, L., Mata, G. and Salmones, D. (1994). Studies in the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the studies of basidiomata obtained in culture. *Mycotaxon* 50: 365-378.
- Guzmán, G., Montoya, L., Bandala, V. M., Mata, G. and Salmones, D. (1995). Studies in the Genus *Pleurotus*, IV. Observations on the pink forms growing in Mexico based in the interbreeding of two different strains. *Mycotaxon* 53: 247-259.
- Hibbett, S. and Thorn, R.G. (1994). Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia* 86: 696-699.
- Hillis, D.M. (1988). Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Systematics Zoology* 37: 63-66.

- Kornelis, A.D. (1999). Species y speciation in the *Hebeloma crustuliniforme* complex. Ph.D. thesis. Wageningen Universiteit. Netherlands.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9: 636-653.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M. and Quirarte, M. (1986). Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Revista Mexicana de Micología*. 2: 227-238.
- Martínez-Carrera, D. (1988). Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala. *Revista Mexicana de Micología* 4: 281-286.
- Navarro, M., Sobal, M. and Acosta-Urdapilleta, L. (1996). Estudio comparativo de algunos híbridos de *Pleurotus ostreatus* Morelos, México. *Micología Neotropical Aplicada* 9: 117-124.
- Neda, H. and Nakai, T. (1995). Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial sequences of 18S ADNr and ITS-1. In: *Science and cultivation of edible fungi* (eds. Elliot, T.). Balkema, Rotterdam, Netherlands. 161-168.
- Nicholl, D.B.G. and Petersen, R.H. (2000). Phenetic plasticity in *Pleurotus djamor*. *Mycotaxon* 76: 17-37.
- Petersen, R. H. and Ridley, G.S. (1996). A new Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. *Mycologia* 88: 198-207.
- Shen, Q., Geiser, D.M. and Royse, D.J. (2002). Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern north American and Asian isolates. *Mycologia* 94(3): 472-482.
- Shian-Ren, L. (2000). Evolutionary genetics of speciation in basidiomycetes : genetic studies of reproductive isolation in *Pleurotus djamor/calytratus* complex. Ph.D. Thesis, Duke University, USA.
- Swofford, D.L. (2000). *PAUP* Phylogentic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Thompson, J., Gibson, D., Plewniak, T.J., Jeanmougin F. and Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Vilgalys, R., Smith, A. and Sun, B.L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Evolution* 91: 4599-4603.
- Vilgalys, R., Moncalvo, J.M., Liou, S.R. and Volovsek, M. (1996). Recent advances in Molecular Systematics of the genus *Pleurotus*. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products* (eds. D.J. Royce). Penn State Univ. P. USA. 91-101.

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press. USA. 315-332.
- Zervakis G.I., Moncalvo, J.M. and Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology* 150:715-26.
- Zolan, M.E. and Pukkila, P.J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.

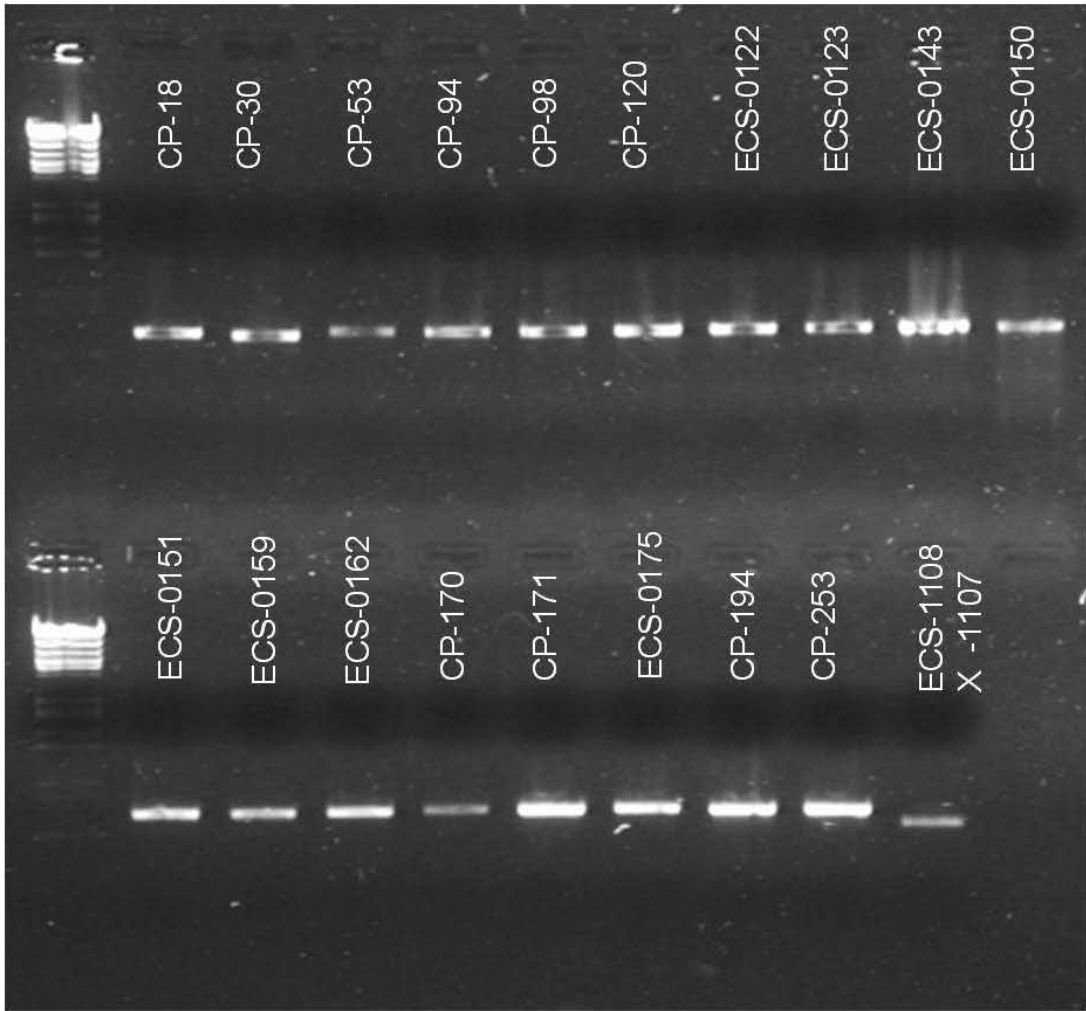


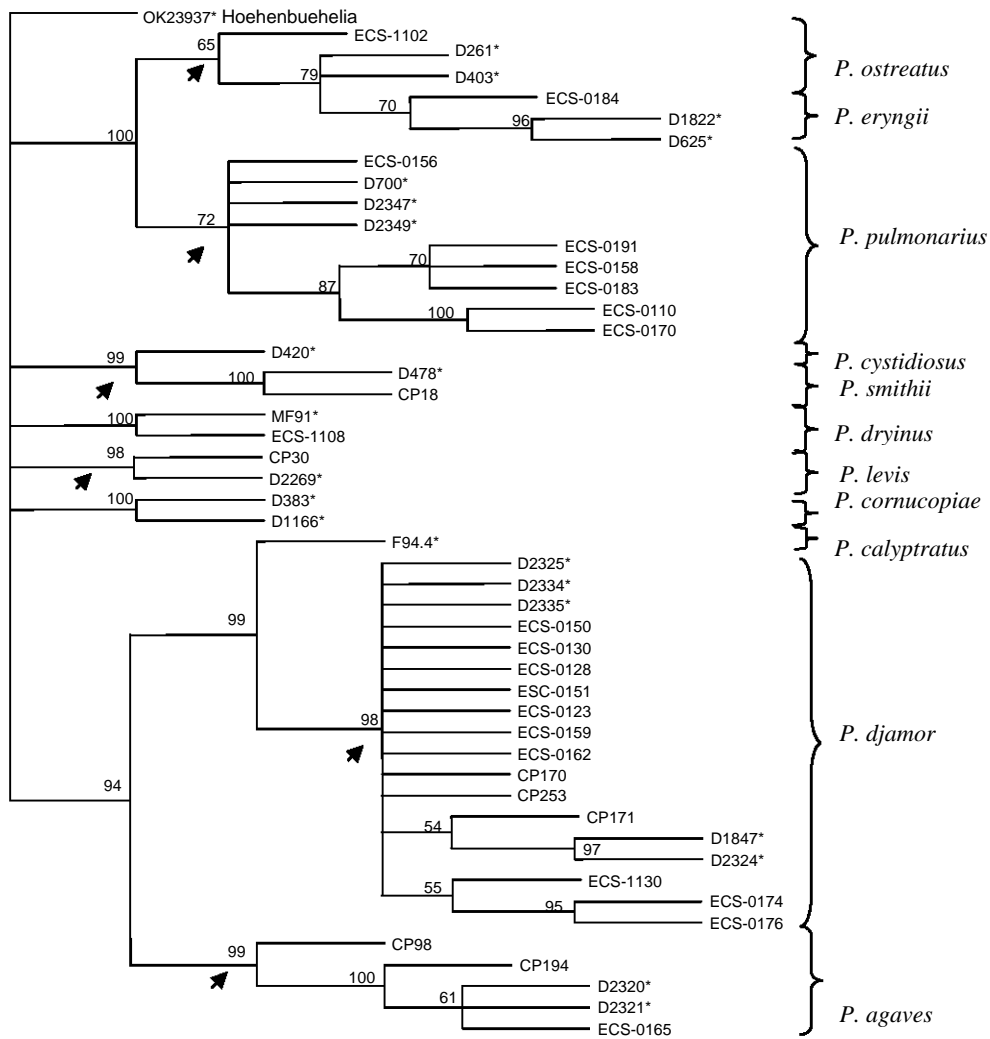
Figura 1. Verificación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 1. Cepas de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México, y la especie a que pertenecen de acuerdo con los resultados del presente estudio.

Región	Código ECOSUR	Estado	Localidad	Especie
Norte	ECS-0183	Nuevo León	F. C. Forestales, UANL, Linares	<i>P. pulmonarius</i>
	ECS-0184	Nuevo León	F.C. Forestales, UANL, Linares	<i>P. ostreatus</i>
Sur	ECS-0122	Chiapas	Talquián, Unión Juárez	<i>P. djamor</i>
	ECS-0123	Chiapas	Talquián, Unión Juárez	<i>P. djamor</i>
	ECS-0127	Chiapas	El Águila, Cacahoatán	<i>P. djamor</i>
	ECS-0128	Chiapas	CAE Rosario Izapa, Tuxtla Chico	<i>P. djamor</i>
	ECS-0130	Chiapas	CAE Rosario Izapa, Tuxtla Chico	<i>P. djamor</i>
	ECS-0143	Chiapas	Km. 1.5, Carr. Tap., - P. Madero	<i>P. djamor</i>
	ECS-0150	Chiapas	Fracc. Los Laureles, Tapachula	<i>P. djamor</i>
	ECS-0151	Chiapas	Yajalón	<i>P. djamor</i>
	CP-253	Tabasco	Centla, Tabasco	<i>P. djamor</i>
	CP-170	Yucatán	Mérida, Yucatán	<i>P. djamor</i>
	CP-171	Yucatán	Mérida, Yucatán	<i>P. djamor</i>
Centro	ECS-0158	Puebla	Xonacatlán	<i>P. pulmonarius</i>
	CP-30	Puebla	Autopista Puebla-Cholula Km 1	<i>P. levis</i>
	CP-120	Puebla	Presa conejillo, col. Rev., Atlixco	<i>P. djamor</i>
	CP-194	Tlaxcala	San Isidro Buensuceso, Tlax	<i>P. agaves</i>
	CP-98	Hidalgo		<i>P. agaves</i>
	ECS-0165	Morelos	UAEM	<i>P. agaves</i>
	ECS-0159	Morelos	UAEM	<i>P. djamor</i>
	ECS-0162	Morelos	Sta. Catarina de Tepoztlán	<i>P. djamor</i>
	ECS-0170	Morelos	Acatlipa de Temixco	<i>P. pulmonarius</i>
	CP-18	Veracruz	Jardín botánico F.J Clavijero, Jalapa	<i>P. smithii</i>
Este	ECS-0110	Veracruz	Instituto de Ecología, Jalapa	<i>P. pulmonarius</i>
	ECS-0156	Veracruz	Km. 7 Carr. Coatepec-Jalapa vía las trancas	<i>P. pulmonarius</i>
	ECS-0191	Veracruz	Instituto de Ecología, Jalapa	<i>P. pulmonarius</i>
	ECS-0176	Veracruz	Coatepec	<i>P. djamor</i>
	ECS-0172	Michoacán	Gtz. Zamora	<i>P. djamor</i>
	ECS-0174	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>
	ECS-0175	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>
Oeste	ECS-01130	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>

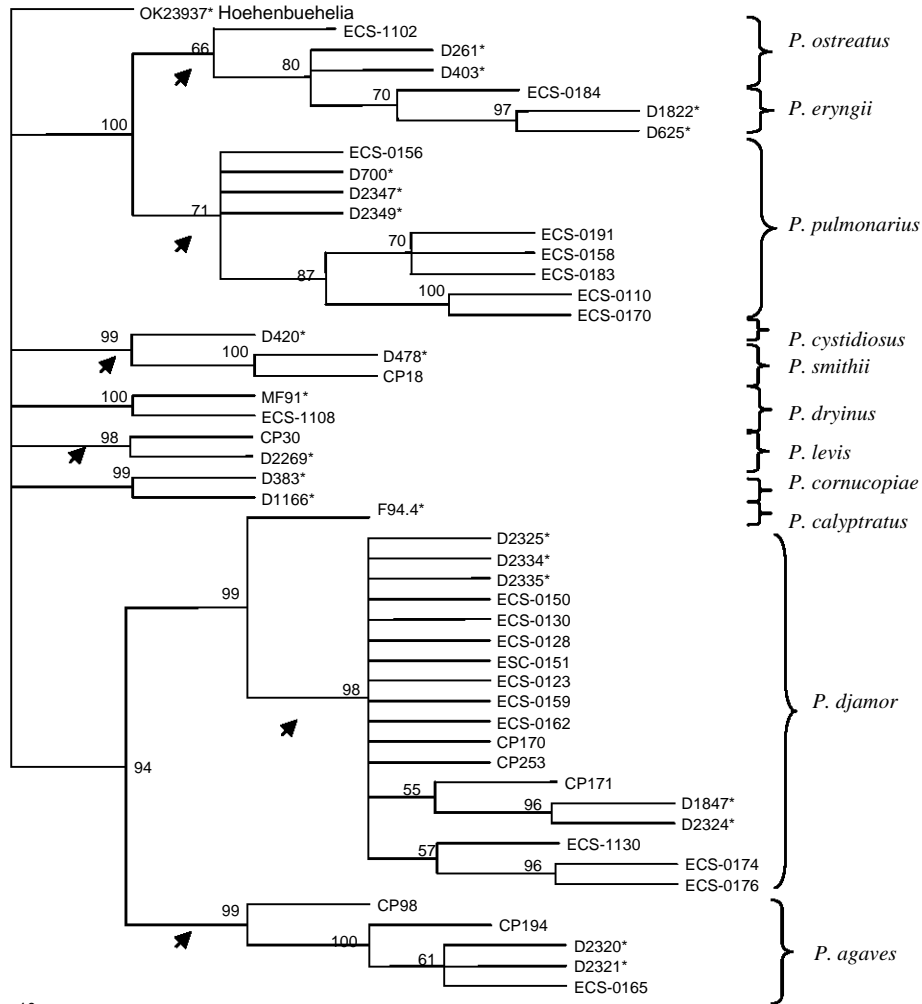
Tabla 2. Secuencias de *Pleurotus* del laboratorio de micología de la universidad de Duke, N.C. USA, incluidas en el análisis filogenético, como referencia

Cepa	Especie	Origen	Fuente bibliográfica	Número en el banco de genes
D261 D403	<i>P. ostreatus</i>	RV83.233, TN,	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04073
		RLG9960, AZ,	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04081
D700	<i>P. pulmonarius</i>	WC152 Columbia, Brit.	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04093, U04131
D2347		RHP4203.11, Suiza	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D2349		RHP4203.10, Suiza	Vilgalys,R, Lab.	
D1847	<i>P. djamor</i>	Cultivar, Japón	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04071, U04110
D2324		RHP4326.8, Tabasco México	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D2325		RHP4326.14, Tabasco, México	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D2334		RHP6270.6, Jalapa, México	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D2335		RHP6270.1, Jalapa, México	Vilgalys,R, Lab.	S/N
F94.4		<i>P. caliptratus</i>	F94.4	Vilgalys,R, Lab.
D2320	<i>P. agaves</i>	RHP6241.8,	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D2321		RHP6241.6,	Vilgalys,R, Lab.	S/N
D625 D1822	<i>P. eryngii</i>	MW85, Europa, ATCC 58080, Asia,	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994 Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04089 U04067
D383		CBS276.33, Inglaterra	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04079, U04118
D1166	<i>P. cornucopiae</i>	ATCC38547, Alemania	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04059,U04098
D420	<i>P. cystidiosus</i>	ATCC28599, IN	Vilgalys,R. and Sun,B.L., 1994	U04083,U04122
D478	<i>P. smithii</i>	ATCC46391, Mex.,	Vilgalys,R. and Sun,B.L, 1994	U04123
MF91	<i>P. dryinus</i>	MF91.1116, Alemania		
D2269	<i>P. levis</i>	RV94.161.1 NC	Vilgalys,R, Lab.	S/N
OKM2393	<i>Hohenbuhelia</i>		Vilgalys,R, Lab.	S/N



10

Figura 2. Árbol consenso basado en el análisis filogenético de las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal nuclear para 31 cepas mexicanas de *Pleurotus* usando el método del vecino más cercano (Neighbor-joining) (longitud 1128, IC 0.69, IR 0.87). Sobre las ramas se indica el valor relativo que soporta las relaciones indicadas (valores de bootstrap basados en 1000 réplicas). El código ECS equivale al código de las cepas en la base de datos del cepario de Hongos Comestibles ECOSUR y el de CP al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del COLPOS. Las secuencias marcadas con (*) sirvieron de referencia y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micología de Duke University, E.U.A., a cargo del Dr. Rytas Vilgalys.



_10

Figura 3.- Relación filogenética de cepas mexicanas de *Pleurotus* usando como marcador molecular la fracción ITS1-5.8s-ITS2 del ADN ribosómico. Árbol consenso más parsimonioso con longitud de 1089 usando branch-and-bound algoritmo de PAUP (IC 0.69, IR 0.87). El análisis fue basado en un total de 667 bases alineadas. Sobre las ramas se indican los que soportan las relaciones indicadas (bootstrap basados en 1000 réplicas). El código ECS equivale a cepas provenientes del cepario de hongos comestibles de ECOSUR y el de CP al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del COLPOS. Las secuencias marcadas con (*) sirvieron como referencia y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micología de Duke University, E.U.A., a cargo del Dr. Rytas Vilgalys.

7.2. CAPITULO 2

Grupos interestériles y productividad de cepas nativas de *Pleurotus* procedentes de regiones tropicales y subtropicales de México

Grupos interestériles y productividad de cepas nativas de *Pleurotus* procedentes de regiones tropicales y subtropicales de México

Graciela Huerta^{1*}, Daniel Martínez-Carrera², J. Ernesto Sánchez¹ y Hermilo Leal-Lara³

¹El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Km. 2.5 Carr. Ant. Aeropuerto, Tapachula, Chiapas 30700, México

²Colegio de Posgraduados campus Puebla. Km.1.5 Ant. Carr. Cholula, Puebla, México

³Facultad de Química, Conjunto E Lab. 324, UNAM Cd. Universitaria, México, D.F.

Resumen

Se caracterizaron cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus djamor* (19), *P. pulmonarius* (6), *P. ostreatus* (1) y *P. levis* (1) en medio de cultivo y sobre pulpa de café. Se describe la variedad en formas, tamaño, color, textura y sabor de los basidiomas en fresco. Se encontraron cinco cepas de *P. djamor* con fructificación temprana (12 días) y cinco con productividad sobresaliente (Eficiencia Biológica 116-178%). Para *P. pulmonarius* una de las cepa con fructificación continua y dos con productividad sobresaliente (EB 110-140%). Tres cepas de *P. agaves* no fructificaron a 26°C y sólo la ECS-0165 produjo unos cuantos basidiomas deformes al cambiar la temperatura de fructificación a 21°C. Es probable que las cepas antes mencionadas y la de *P. smithii* hayan perdido su habilidad para formar la fase sexual, por el manejo que se da a las cepas en los bancos de germoplasma mexicanos.

Palabras clave: Desarrollo micelial, cultivo de hongos, *Pleurotus*, México.

Abstract

Wild Mexican strains of *Pleurotus djamor* (19), *P. pulmonarius* (6), *P. ostreatus* (1), and *P. levis* (1) were characterized in culture medium and coffee pulp substrate. Variations of shape, size, color, texture, and taste from fresh basidiomata are described. Six early fruiting strains (12 days) were found in *P. djamor*, as well as five strains showing good yields (116-178%, biological efficiency). In *P. pulmonarius*, one strain showed continuous production of fruit bodies, whereas two strains had good yields (BE 110-140). Three strains of *P. agaves* did not fruit at 26°C, and only the strain ECS-0165 produced several abnormal fruit bodies when temperature was changed to 21°C. It is possible that these strains, as well as that of *P. smithii*, have lost fruiting ability.

Key words: Mycelial growth, mushroom cultivation, *Pleurotus*, Mexico.

* Corresponding author: Graciela Huerta; e-mail: ghuerta@ecosur.mx

Introducción

El cultivo de *Pleurotus* en México es considerado una opción para aumentar la producción de alimento por unidad de superficie en las regiones rurales. Su tecnología de producción se basa en el uso de residuos agroindustriales como sustrato. Esto permite aprovechar la energía que estos contienen, en la producción de alimento y evita los problemas que ocasiona su acumulación (Martínez-Carrera *et al.*, 1984, 1992).

En años recientes, el cultivo de este Hongo, fue propuesto como una alternativa para resolver la falta de alimento de alta calidad en el sector rural. Esto produjo el surgimiento de un gran número de módulos de producción en diversas áreas del país. Por lo que la producción de hongos frescos pasó de 27825 toneladas en 1995 a 38708 en el 2001, correspondiendo el 5% a *Pleurotus* (Martínez-Carrera, 2002).

En el Estado de Chiapas la Secretaría de Desarrollo de los Pueblos Indios reporta 100 módulos rurales de producción. En el municipio de Tenejapa hay 53 módulos manejados por mujeres de origen Tzeltal, que producen alrededor de 63.14 Kg. de hongos por ciclo de cosecha, con eficiencias biológicas de apenas 67.7 %. Utilizan cepas de *P. ostreatus* y como sustrato olote, rastrojo de maíz y cascabillo de café tratados por inmersión alcalina, pH 10.9 ± 0.2 (De León-Monzón *et al.*, 2004). La baja producción puede deberse a la falta de técnicas de cultivo bien estandarizadas, baja calidad de la semilla y a escasa adaptación de las cepas comerciales a las condiciones climáticas que predominan en estas regiones, entre otras.

Hasta este momento el cultivo de *Pleurotus* en México ha tenido un éxito limitado, en zonas de clima tropical y subtropical por lo que el desarrollo de cepas adaptadas a crecer y fructificar en estas condiciones utilizando el germoplasma nativo, permitiría que las regiones tropicales y húmedas, en donde abundan los desechos agrícolas, pudieran adjuntarse a la producción de hongos.

Es innegable que las especies silvestres del género *Pleurotus* poseen información genética que puede ser aprovechada para generar nuevas cepas comerciales, pero que hasta ahora ha sido poco estudiada. Muchas de ellas presentan una serie de características favorables tales como una alta competitividad por sustrato con bacterias, levaduras y otro tipo de hongos, se desarrollan y fructifican a altas temperaturas, algunas tienen alta

productividad, fructificación temprana y otras características que podrían aumentar la vida de anaquel de esta seta (Martínez-Carrera *et al.*, 1986; Hernández-Ibarra *et al.*, 1995; Salmones *et al.*, 1997, 2004; Benítez-Camilo, 1998; Gaitán-Hernández y Salmones, 1999; Martínez-Carrera, 2002; Valencia *et al.*, 2001-2003). Por otro lado, se ha mencionado que algunas producen basidiomas muy pequeños, de textura correosa y el sabor algunas veces no es agradable.

El desarrollo de investigaciones tendientes a caracterizar el germoplasma silvestre podría mostrar las alternativas que permitirán mejorar el tamaño, el sabor, etc., mediante métodos de mejoramiento genético.

Esta investigación forma parte de una propuesta más amplia, que tiene como objetivo la caracterización genética y fisiológica de cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus* que servirá como base para desarrollar un programa de mejoramiento genético del hongo ostra. Aquí se describen las características de productividad, diversidad morfológica y de velocidad de crecimiento de cepas silvestres de *Pleurotus* pertenecientes a cuatro especies diferentes.

Materiales y Métodos

Origen de las cepas

Se estudiaron 31 cepas silvestres del género *Pleurotus* procedentes de los estados de: Nuevo León (2), Chiapas (8), Yucatán (2), Tabasco (1), Morelos (4), Puebla (3), Tlaxcala (1), Hidalgo (1), Michoacán (1), Jalisco (3) y Veracruz (5). [Tabla 1].

Velocidad de crecimiento

Se estimó, la velocidad de crecimiento utilizando las mediciones diarias del diámetro micelial de cepas, crecidas sobre 17 ml de extracto de malta agar (EMA), pH 5.5 e incubadas a 26°C. Se prepararon cinco replicas y se utilizó la formula de McNeil y Harvey (1989).

$$\text{Velocidad de crecimiento} = (D_f - D_i) / (T_f - T_i)$$

En donde:

Df = Diámetro final de crecimiento

Di = Diámetro inicial de crecimiento

Tf-Ti=Días de crecimiento micelial

Compatibilidad sexual de cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus*

Para separar los grupos de compatibilidad sexual, 12 monospóricos obtenidos a partir de una esporada procedente de un mismo cuerpo fructífero, fueron apareados en cajas con extracto de malta agar (EMA), pH 5.5. Se hicieron todas las confrontaciones posibles y evitando las cruza recurrentes (Eger *et al.*, 1979). Después de 3 a 5 días de incubación a 26° C, se determinó el tipo de reacción observando una fracción del área de fusión de los micelios al microscopio compuesto. Se consideró reacción positiva, aquella que presentó fíbulas y como negativa la ausencia de éstas.

Identificación de grupos interestériles entre las cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus*

Representantes de cada grupo de incompatibilidad de 10 cepas catalogadas bajo criterios morfológicos como afines a *P. djamor* y a *P. ostreatus* fueron apareadas entre sí, para separar los grupos interestériles (Mon x Mon). Posteriormente, los grupos interestériles identificados entre las cepas silvestres mexicanas fueron apareados con el juego de monospóricos de referencia [Tabla 2]. Las 21 cepas restantes se identificaron por apareamiento de dicarion x monocarion de cepas de referencia.

Evaluación de la productividad

El potencial productivo de las cepas, se determinó al cultivarlas sobre pulpa de café estéril, proveniente de beneficio húmedo, con pH 5.5 a 5.7 y secada al sol. La pulpa fue mojada hasta alcanzar 70% de humedad, se esterilizó e inóculo posteriormente con micelio crecido sobre 50 g de semilla de sorgo por kilo de substrato (Villa-Cruz *et al.*, 1999). Se evaluó la producción de las cepas a dos cosechas y los días transcurridos desde la siembra del substrato hasta la cosecha y con estos datos se calculó la eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R) por cepa (Sánchez y Royse, 2001). Se establecieron cinco replicas por cepa.

EB= (Peso de basidiomas frescos/ Peso de substrato en base seca) x100

TP= Eficiencia Biológica/ No de días transcurridos desde la siembra del substrato hasta la cosecha

R= (Peso de los basidiomas en base seca/ Peso de substrato en base seca) x 100

Descripción morfológica de los basidiomas

Se describió la diversidad de formas en los basidiomas, color, olor, sabor en fresco, textura, el color de la esporada, el tipo de estípite y su posición con relación al píleo, usando los basidiomas obtenidos en la primera cosecha. Los colores se describieron usando las cartas de color de suelo Munsell (2000).

Con un microscopio Nikon YS2alpaphot con reglilla calibrada en ocular alphaphot, se hicieron medidas de esporas, basidios, queilocistidios y se determinó el tipo de sistema hifal cerca del estípite.

Resultados

Grupos interestériles

Los resultados obtenidos de los apareamientos monocarión - monocarión, provenientes de cepas con afinidad morfológica a *P. djamor*, se presentan en la tabla 3 y las que se agruparon como afines a *P. ostreatus* se muestran en la tabla 4. Estas y las cruces entre monocarión y dicarión [Tabla 5] permitieron diferenciar 3 grupos interestériles que fueron identificados como *P. pulmonarius* (ECS-0110, -0156, -0158, -0170 y -0191), *P. ostreatus* (ECS-0184) y *P. djamor* (19 cepas). La falta de cepas de referencia o la similaridad en alelos de compatibilidad, no permitió identificar la especie de algunas cepas. Estas fueron identificadas mediante criterios filogenéticos usando la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, como: *P. agaves* (ECS-0165, CP-194, -98), *P. levis* (CP-30), *P. smithii* (CP-18) y *P. pulmonarius* (ECS-0183), esta información se presentó como parte de la publicación "Identificación de las especies mexicanas de *Pleurotus* empleando la región ITS del ADNr".

Sistema de apareamiento sexual y relaciones de compatibilidad

Las autocruzas de monospóricos revelaron un sistema de apareamiento bifactorial heterotálico, con alelos múltiples, para todas las cepas examinadas. Corroborando toda la información generada en estudios de compatibilidad de *Pleurotus*, previos a este trabajo (Eger *et al.*, 1979, Vilgalys *et al.*, 1993, Petersen, 1995a, 1995b, Petersen y Hughes, 1993).

Las pruebas de compatibilidad entre 26 monospóricos provenientes de 7 cepas de *P. djamor* mostraron porcentajes de cruzas de 25 a 100%, y el 29% del total de los apareamientos dieron 100% reacción positiva. Se identificaron 5 alelos A y 6 B [Tabla 3]. Mientras que en *P. pulmonarius*, se encontró un número balanceado de alelos diferentes en el control de la compatibilidad tres alelos A y B al aparear 11 monospóricos provenientes de 3 cepas [Tabla 4]. Los ensayos de apareamiento entre dicarición x monocarición de referencia agruparon 12 cepas más en *P. djamor*, dos en *P. pulmonarius*, una en *P. ostreatus* y seis no pudieron ser identificadas debido a la falta de monocarición de referencia o la similaridad entre los alelos [Tabla 5].

Velocidad de crecimiento

Se determinó el crecimiento micelial en medio de cultivo y la productividad de 19 cepas mexicanas silvestres de *P. djamor*, 6 de *P. pulmonarius*, 1 de *P. ostreatus*, 1 de *P. levis* en pulpa de café. Las cepas ECS-0165, -0194, CP-98 de *P. agaves* y CP-18 de *P. smithii* no se incluyen, debido a que a pesar de colonizar el substrato no fructificaron a 26°C y sólo en el caso de ECS-0165 formó un reducido número de basidiomas deformes, cuando se bajo a 21°C la temperatura de fructificación. Es probable que las cepas de *P. agaves* y de *P. smithii*, hayan perdido su habilidad para formar la fase sexual, por la manipulación continua a la que se someten las cepas conservadas en los bancos de germoplasma.

Las cepas formaron micelio blanco, con o sin radios de crecimiento, bien ramificado, con fíbulas conspicuas, vacuolas abundantes y estructuras atrapadoras de nemátodos. Algunas diferencias fueron observadas en el crecimiento del micelio de las especies:

micelio poco denso, pegado al medio y con cristales de oxalato de calcio en *P. djamor*, crecimiento denso, subaéreo, aéreo para *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Denso pero pegado al medio, con bordes de crecimiento irregulares, con cerdas sobre el micelio y oscurece el medio al envejecer, pero no produce clamidosporas, en el caso de *P. levis*.

Las cepas estudiadas mostraron rangos muy amplios en velocidad de crecimiento, en el caso de *P. djamor*, las cepas ECS-0123, -0128, -0151, -0162, -0174, -0175 y -0176, CP-170, mostraron la mayor velocidad de crecimiento con 11.4 a 12.6 mm por día. Entre las cepas de mas lento crecimiento estuvieron CP-120 (1.4 mm/día), ECS-01130 (3.8 mm/día) y ECS-0172 (4.9 mm/día). En *P. pulmonarius* la comparación de medias por Tukey α 0.05, incluyó las cepas ECS-0158 y -0156 con 13.9 y 11.8 mm/día, en el primer y segundo grupo y a las ECS-0170, -0183 y -0191 con 8.4, 7.1 a 8.5 mm/día en el cuarto. Las cepas únicas de *P. ostreatus* y *P. levis* mostraron velocidades medias de 9.6 y 2.8 mm/día, respectivamente [Tabla 6]. Cabe señalar que la ECS-0123 y -0122 de *P. djamor* formaron primordios en el medio de cultivo, como respuesta al daño mecánico, ocasionado al cortar discos de micelio para resiembra.

Productividad y diversidad biológica

1.) *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn

Capacidad productiva

El micelio de la mayoría de las cepas colonizó el substrato en 7-10 días, formando una cubierta algodonosa poco densa y fructificaron 5-7 días después de someterlos a 26-28 °C y 95% de humedad relativa. Sin embargo, según las temperaturas que prevalecen en los sitios de recolecta, hace suponer que las cepas que pertenecen a esta especie pueden fructificar de 30 a 35 ° C.

La producción de basidiomas fue intermitente, con flujos de producción separados por 7-10 días. Con relación a su capacidad productiva, las cepas mas sobresalientes según Tukey (α 0.05) fueron: ECS-0175, -01130 y -0174 con 178.3, 148.1 y 138.4 de EB respectivamente. El segundo mejor grupo estuvo formado por las cepas ECS-0176 y -0170 con 126.5 y 116.3 % de EB. Las cepas CP-120, ECS-0122, -0127, -0143, tuvieron un rango

de EB media entre 79.5 - 84.9% y las de menor producción fueron: ECS-0128 (64.4%) y - 0150 (63.0%). El tiempo requerido para alcanzar la fructificación fue variable, cinco de las cepas originarias de Chiapas y una de Morelos, llegaron a producción en 12 días, las cepas ECS-01130, CP-171, -253, y -120 produjeron su primera cosecha en 45, 35, 25 y 25 días, respectivamente, y las restantes requirieron de 15 a 18 días. Con relación a la tasa de producción, las cepas ECS-0175, -0174 y CP-170 mostraron los valores más altos (10.5, 8.1 y 7.8 %, respectivamente), fueron seguidas por ECS-0122, -0123, -0127, -0143, -0151, -0162 y -0176, con tasas de producción de 6.1-7.4%. Las cepas con valores más bajos fueron las cepas CP-171 y ECS-0159 [Tabla 7].

Morfología del basidioma

Basidioma de (30) 45-85 (100) mm de diámetro y (3) 4-8 mm de grosor, estipitado a subestipitado en posición lateral y muy raramente central, sólido, coriáceo, superficie aterciopelada a glabra, blanco de (8) 15- 38 x 2.5- 4.0 mm. Olor y sabor del basidioma harinoso, rancio o agradable a hongo. Habito de crecimiento imbricado [Fig. 1].

Píleo flabeliforme, conchado, con colores que pueden ir de blanco con tonos amarillentos en la base (7.5YR 8/1, 8/2), blanco grisáceo (Gley 2 8/10B, 7/10B, 8/5B, Gley 1 8/1), primordios rosa claro (10R 8/2), que al madurar pasan a blanco (10R de 8/1) o a rosa pálido (10R 7/2, 7/3). Superficie lisa a finamente tomentosa con la edad, con márgenes enteros, ondulados o lobulados. Himenio con laminas decurrentes que se anastomosan hacia la base del estípite, delgadas, con bordes enteros, de color blanco amarillento (10R de 8/1) a rosa pálido (10R 7/2, 7/3). Contexto blanco, blanco amarillento o rosa pálido, delgado. Textura subcoriácea, coriácea y muy raramente subcarnosa [Tabla 8].

El color de la esporada varía de blanco cremosa (2.5Y 8/1), amarillo pálido (2.5Y 8/3, 7/3), o a rosa pálido a rosa (7.5YR 8/2, 7/3). Esporas cilíndricas con ápice hilar, lisas, de pared delgada, hialinas, no amiloides, de (6.4-) 7.2-9.6 x 3-2.4 μm . Sistema hifal dimítico, basidios de (17.7-) 18.9- 23.6 (-25) x (3.5-) 4.7- 7 (-8.2) y queilocistidios (17.7-) 20-24 μm .

Hábitat y distribución

Esta especie se colectó durante los meses lluviosos del verano. Creció sobre troncos y ramas muertas de diversos árboles y arbustos: madera de cazahuate *Ipomoea arborescens* (Humb. y Bonpl.) G. Don., *Theobroma cacao* L., *Coffea arabica* L. y *C. canephora* Pierre: Froehner, *Yucca* sp, *Ricinus comunis* L., laurel de la India *Ficus microcarpa*, o sobre pseudotallos vivos de plátano (*Musa* AAA subgrupo Cavendish, cultivar enano gigante), plátano macho (*Musa* AAB), palma africana *Elaeis guineensis* Jacq., tulipán africano *Spathodea campanulata*. Su hábito de crecimiento fue principalmente imbricado. Estuvo representada por aislamientos provenientes de zonas tropicales y subtropicales del Sur (Chiapas, Tabasco, Yucatán), Centro (Puebla, Morelos), Oeste (Jalisco, Michoacán) y Este (Veracruz) de México. Fue reportada con anterioridad en el valle central de México por varios autores, quienes además señalaron su amplia distribución en el país y algunos otros hospedantes (Guzmán *et al.*, 1993, 1995).

2.) *P. pulmonarius* (Fr.) Quéf.

Capacidad Productiva

Todas las cepas cubrieron el substrato en 7-13 días, formando una capa de micelio algodonoso muy densa y fructificaron 5-7 días después de retirar las bolsas. La formaron flujos de producción separados entre sí por períodos de 8 a 10 días. Sólo la cepa ECS-0156 mostró producción continua. Las cepas más sobresalientes en cuanto a su EB y tasa de producción fueron ECS-0170, -0191 con 140.1% y 110.5% de eficiencia biológica y una tasa de producción de 7.4%, 5.8% respectivamente. El tiempo requerido por las cepas para llegar a fructificación fue de 17 a 19 días, sólo la cepa ECS-0156 fructificó en 12 días y su fructificación fue continua [Tabla 7].

Morfología del basidioma

Basidiomas de (20) 55-80 (100) mm de diámetro y 4-10 mm de grosor, con estípites excéntrico a lateral, raramente central, sólido, coriáceo a subcoriáceo, superficie

aterciopelada a glabra, blanquecino de 18-25 (35) x 7-19mm. De olor suave a anís y sabor rafinoide, agradable a hongo. Habito de crecimiento cespitoso (Fig 1).

Píleo umbonado, flabelado o conchado, blanco hacia el centro (2.5 YR 8/1, 5YR 8/1 a 10R 8/1) y tonos café grisáceos, café rojizo o café amarillento en los bordes (5YR 6/1 a 4/1, 2.5YR 6/1, 10R 7/1). Superficie lisa a finamente tomentosa con la edad, con márgenes enteros, ondulados o lobulados. Himenio con laminas decurrentes hacia la base del estípite, con lamélulas que rara vez se anastomosan. Delgadas, con bordes enteros, de color blanco amarillento (10R de 8/1). Contexto blanco a marfil, delgado. Textura carnosa y quebradiza.

Esporada de color blanco cremosa (2.5Y 8/1), con tonos lila grisáceo, blanco cremoso con tonos lilas, violácea con tonos grises, o gris con tonos cremosos, gris con tonos violáceos. Esporas cilíndricas con apice hilar, lisas, de pared delgada, hialinas, no amiloides, de (4.72-) 5.9 – 9.84 (-10.62) x (3.24-) 3.54-4.8 μm . Sistema hifal monomítico, basidios de (21.6-) 25.2-26.4 x (-5.2) 7.2- 9.12 μm .

Hábitat, distribución y algunas características fisiológicas

Fructifica en los meses lluviosos del verano. Crecen sobre troncos y ramas muertas de diversos árboles y arbustos: madera de caahuate (*Ipomea wolcottina*), pulpa de café (*Coffea arabica*). Tiene hábito de crecimiento cespitoso. Esta especie estuvo representada por aislamientos provenientes de zonas subtropicales del Norte (Nuevo León), centro (Morelos) y Este (Veracruz) de México. Fue identificada con anterioridad como *P. ostreatus* por la similitud morfológicas que se existe entre ambas especies (Martínez-Carrera, 1988, Martínez- Carrera *et al.*, 1986, Guzmán *et al.*, 1994).

3.) *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm.

Capacidad productiva

Colonizó un kilo de pulpa de café y fructificó en 17 días a 21°C y 95% de humedad relativa. Su eficiencia biológica fue de 74.6%, la tasa de producción de 4.4% y el

rendimiento fue de 0.07. A diferencia de las demás esta cepa presentó fructificación continua.

Morfología del basidioma

Basidiomas de (20) 50- 70 mm de diámetro x 4-8 mm de grosor, con estípite excéntrico a central, sólido, subcoriáceo, superficie aterciopelada a glabra, blanquecino de 18-20 (25) x 7-9mm. De olor agradable a hongo y habito de crecimiento cespitoso a solitario (Fig. 1).

Pileo de forma conchada a subumbilicada, de color gris azul claro (Gley 2 8/5PB) cuando joven a blanco. Superficie lisa, con bordes enteros, ondulados. Laminas decurrentes, delgadas, de bordes enteros y blancas. Textura carnosa y quebradiza (Fig. 1).

Esporada de color blanco cremosa (2.5Y 8/1) con tonos lila grisáceo. Esporas cilíndricas con ápice hilar, lisas, de pared delgada, hialinas, no amiloides de (7.67-) 8.26-8.85 (-9.44) x (2.95-) 3.54-4.13 μm . Sistema hifal monolítico, basidios de (25-) 27.6-33 x 6.2-8 μm .

Hábito y distribución

Es posible que esta especie se encuentre principalmente en el norte del país, asociada a bosques caducifolios y con fructificaciones en otoño.

4.) *P. levis* (Berk. y M.A. Curtis) Singer

Capacidad productiva

Requirió de 44 días para colonizar el substrato y 21 para producir basidiomas, fructifica a 21°C y 95% de humedad. Su eficiencia biológica fue de 71.34% al crecer sobre substrato de paja de *Digitaria decumbens* (70%) y pulpa de café (30%).

Morfología del basidioma

Basidiomas de 30-100 mm de diámetro y 4-10 mm de grosor, con estípite central a excéntrico, adelgazándose hacia la base, duro y fibroso, con superficie tomentosa a subescumulosa por los remanentes del velo, blanquecino de 30 a 70 mm x 7-10 mm. Cuando joven presenta velo parcial de color blanco, que desaparece al madurar. Con olor suave a fruta y sabor a hongo. Hábito de crecimiento cespitoso (Fig. 1).

Pileo convexo a infundibuliforme, con márgenes enrollados de color blanco amarillento (Hue 5Y 8/2) cambiando a amarillo pálido al dañarlo (Hue 5Y 8/6). Superficie tomentosa a fibriloso, subescumuloso en los márgenes, algunas veces apendiculado. Láminas decurrentes, enteras, densas, delgadas, que se anastomosan en el área cercana al estípite, pero no forman red. Contexto blanco, delgado (4 mm de ancho). Textura carnosa y quebradiza.

Esporada de color blanco cremoso con tonos amarillentos (Hue 5Y 8/2). Esporas cilíndricas con apéndice hilar, lisas, de pared delgada, hialinas, no amiloides de (10) 10.4-12 x 3.0- 5.50 μm . Sistema hifal dimítico, basidios de (16.8) 18-21.6 (22.8) μm y queilocistidios 25.2-28 x 9.8-11.2 μm .

Hábitat y distribución

Crece formando basidiomas simples en otoño, sobre madera en descomposición en Cholula, Puebla. Esta especie fue reportada con anterioridad en las localidades de Cartago y Chontla en Costa Rica, sobre *Quercus copeyensis*, *Q. seemanii* y se encuentra depositada en el NYBG The New York Botanical Garden e INBio Instituto Nacional de Biodiversidad en Costa Rica (Punta arenas). En México fue citado como *Lentinus levis* por Sobal *et al.* (1997), pero no ha sido descrito con anterioridad.

Discusión

Grupos Interestériles

Todas las cepas estudiadas presentaron un sistema de cruce bifactorial y ninguna de ellas mostró capacidad excepcional para cruzarse con monospóricos provenientes de diferentes grupos interestériles, contrario a lo reportado por Petersen y Ridley (1996). El análisis de sistemas de cruce reveló la presencia de los grupos interestériles I *P. ostreatus*, II *P. pulmonarius*, V *P. djamor*, VIII *P. levis*, XI *P. agaves*, en México, anteriormente establecidas por Vilgalys *et al.* (1996). El nombre de *P. agaves* fue sinónimizado con *P. opuntia* por Petersen y Hughes (2006) aduciendo la antigüedad del nombre, sin embargo el tipo de esta especie no corresponde al material con el que fue descrito el GI XI. Ellos proponen asignar un lectotipo, debido a las condiciones precarias en las que se encuentra el tipo. La situación no clara de esta especie sugiere la necesidad de desarrollar estudios más detallados tendientes a esclarecer si *P. opuntia* y *P. agaves* son la misma especie con diferente origen geográfico o son dos especies diferentes. Así mismo una revisión más amplia de los especímenes presentes en los herbarios mexicanos y nuevas recolectas permitiría describir la distribución geográfica de esta especie. En este estudio no se logró obtener reacción positiva al confrontar *P. smithii* con los monospóricos referenciales de *P. cystidiosus*.

Diversidad Infraespecífica

La diversidad en color del basidioma, velocidad de crecimiento, eficiencia biológica y las características de sabor y textura en fresco, estuvieron bien representadas en la muestra de cepas identificadas como *P. djamor*. Los datos de colecta y literatura generada en México mostraron que esta especie tiene una amplia distribución en regiones tropicales, subtropicales y bosques mesófilos de regiones templadas. Su presencia fue reportada en Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Distrito Federal, Zacatecas y Nuevo León (Guzmán y García-Saucedo, 1973; Guzmán *et al.*, 1993, 1995; Chacón y Guzmán, 1984;

Guzmán y Guzmán-Dávalos, 1984; Andrade *et al.*, 1996; Nicholl y Petersen, 2000). Esta especie fructifica durante el verano a temperaturas entre 25-35 ° C.

La mitad de los especímenes presentaron basidiomas con sabor y olor harinoso en fresco, una cuarta parte olor agradable a hongo y con sabor harinoso y el resto con olor y sabor a pescado o de aceite. La textura de los basidiomas, fue subcoriácea a coriácea, sólo una cepa produjo basidioma subcarnosos (ECS-0172).

Sin considerar las diferencias en cepas y sustratos, se puede observar que cinco de las cepas evaluadas (EB 116-178%) superaron la eficiencia biológica reportada por Gaitán y Salmones (1999) y Salmones *et al.* (2004), para cruza seleccionadas y los parentales de *P. djamor* (99-114%, 48-70% y 62-123% de EB, respectivamente), pero fueron inferiores a las eficiencias reportadas por Valencia *et al.* (2001-2003) para POROS (184.1-205.3%). Las 15 cepas restantes tuvieron una productividad semejante a la reportada en otros trabajos (Hernández-Ibarra *et al.*, 1995; Salmones *et al.*, 1997).

Las tasas de producción obtenidas en este trabajo fueron mayores a las reportadas en todos los trabajos anteriormente mencionados, debido a que las cepas que se incluyeron en este trabajo requirieron de un menor número de días para llegar a fructificación. Con relación a la textura subcoriácea que se observó en algunos especímenes nativos, se considera que esta puede ser una cualidad a conservar, pues permite mantener el volumen de los hongos después de ser cocinados, puede ayudar a resistir la manipulación durante el empaque y podría alargar su vida de anaquel. En cuanto al sabor harinoso, aceitoso o a pescado de los basidiomas en fresco, se pudo observar que este se pierde durante la cocción.

Aún cuando se encontró variabilidad en velocidad de crecimiento y eficiencia biológica entre las cepas de *P. pulmonarius*, la morfología y el color de las cepas fue muy similar entre ellas. El número reducido de recolectas incluidas en este trabajo y las incongruencias ocasionadas por el uso exclusivo de caracteres morfológicos para la identificación de esta especie limitó el uso de los reportes bibliográficos, para describir su distribución geográfica en México. Sólo se puede reportar su presencia en Nuevo León, Veracruz, Puebla, y Morelos.

La cepa ECS-0110 proveniente de Veracruz ha sido cultivada a nivel semicomercial en módulos de producción rural, con buenos resultados. Esta, al igual que el resto de las cepas estudiadas tienen excelentes cualidades organolépticas y las mejores cepas alcanzaron eficiencias biológicas de 110-140%, coincidiendo con lo reportado por la literatura [Tabla 7] (Martínez-Carrera, 1988; Martínez-Carrera *et al.*, 1986).

Literatura citada

- Andrade, R.H., S. Chacón y J.E. Sánchez, 1996. Estudio sobre los hongos (Macromicetos) de tres plantaciones de café en el municipio de Tapachula, Chiapas (México). *Rev. Mex. Mic.* 12:79-88.
- Benítez, C.F.A., 1998. Caracterización de 18 cepas de *Pleurotus djamor* nativas de la región del Soconusco, Chiapas. Tesis de licenciatura. Ciencias Químicas UNACH. Tapachula, Chiapas. 57p.
- Chacón, S. y G. Guzmán, 1984. Nuevas observaciones sobre, hongos, líquenes y mixomicetos de Chiapas. *Bol. Soc. Mex.* 19: 245-252.
- Corner, E.J.H., 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 69:1-169.
- Gaitán- Hernández, R. y D. Salmones, 1999. Análisis de la producción de cepas de *Pleurotus djamor*. *Rev. Mex. Mic.* 15: 115-118.
- Guzmán, G. y D.A. García-Saucedo, 1973. Macromicetos del estado de Jalisco, I. Consideraciones generales y distribución de las especies conocidas *Bol. Soc. Mex. Mic.* 7: 129-143.
- Guzmán, G. y L. Guzmán-Dávalos, 1984. Nuevos registros de hongos en el estado de Veracruz. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 221-244.
- Guzmán, G., L. Montoya, D. Salmones y V. Bandala, 1993. Studies of the Genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamor* in Mexico and other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. *Cript. Bot.* 3: 213-220.
- Guzmán, G., L. Montoya, G. Mata y D. Salmones, 1994. Studies in the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus* – complex based in interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. *Mycotaxon* 50: 365-378.
- Guzmán, G., L. Montoya, V.M. Bandala, G. Mata y D. Salmones, 1995. Studies in the genus *Pleurotus*, IV. Observations on the pink forms growing in Mexico based in the interbreeding of two different strains. *Mycotaxon* 53: 247-259.
- Hernández-Ibarra, H., J.E. Sánchez-Vázquez y L.A. Calvo-Bado, 1995. Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp de la región de Tapachula, Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 11: 29-38.
- De León-Monzón, J.H., J.E. Sánchez y J. Nahed-Toral, 2004. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los altos de Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 18: 31-38.
- Martínez-Carrera, D. 1988. Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala. *Rev. Mex. Mic.* 4:281-286.

- Martínez-Carrera, D., M. Quirarte, C. Soto, D. Salmones y G. Guzmán, 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19:207-219.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal y M. Quirarte, 1986. Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Mex. Mic.* 2:227-238.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra, P. Morales y M. Sobal, 1992. ¿Reconversión en la industria de los hongos? *Tecnoindustria* 7: 52-59.
- Martínez-Carrera, D., 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micol. Apl. Int.* 14: 61-74.
- McNeil, B. y L.M. Harvey, 1989. Fermentation a practical approach. IRL PRESS. N.Y. 226.
- Munsell soil color charts, 2000. *Munsell color*. GretagMacbeth N.Y.
- Nicholl, D.B.G. y R.H. Petersen, 2000. Phenetic plasticity in *Pleurotus djamor*. *Mycotaxon* 76: 17-37.
- Salmones, D., R. Gaitán-Hernández, R. Pérez y G. guzmán, 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus* VII. Interacción entre el crecimiento micelital y productividad. *Rev. Iberoamericana Mic.* 14: 173-176.
- Salmones, D., L. Mestizo y R. Gaitán-Hernández, 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Rev. Mex. Mic.* 18: 21-26.
- Sánchez, J.E. y D. Royse. 2001. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* ECOSUR-UTEHA. 290.
- Sobal, M., P. Morales, W. Martínez, D.N. Pegler y D. Martínez-Carrera, 1997. Cultivation of *Lentinus levis* in México. *Micol. Neotrop. Apl.* 10: 63-71.
- Valencia, G., M.E. Garín, J. Jiménez y H. Leal-Lara, 2001-2003. Producción de cepas coloridas de *Pleurotus spp* en sustrato estéril y pasteurizado. *Rev. Mex. Mic.* 17: 1-5.
- Villa-Cruz, V.G., G. Huerta y J.E. Sánchez, 1999. Solid fermentation of a corn cob-coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 11: 67-74.

Tabla 1. Cepas de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México, con el nombre de la especie asignada en este trabajo

Código ECOSUR	Estado	Localidad	Especie
ECS-0184	Nuevo León	F.C. Forestales, UANL, Linares	<i>P. ostreatus</i>
CP-30	Puebla	Autopista Puebla-Cholula Km 1	<i>P. levis</i>
ECS-0110	Veracruz	Instituto de Ecología, Jalapa	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0156	Veracruz	Km. 7 Carr. Coatepec-Jalapa vía las trancas	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0158	Puebla	Xonacatlán	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0170	Morelos	Acatlipa de Temixco	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0183	Nuevo León	F. C. Forestales, UANL, Linares	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0191	Veracruz	Instituto de Ecología, Jalapa	<i>P. pulmonarius</i>
ECS-0122	Chiapas	Talquián, Unión Juárez	<i>P. djamor</i>
ECS-0123	Chiapas	Talquián, Unión Juárez	<i>P. djamor</i>
ECS-0127	Chiapas	El Águila, Cacahoatán	<i>P. djamor</i>
ECS-0128	Chiapas	CAE Rosario Izapa, Tuxtla Chico	<i>P. djamor</i>
ECS-0130	Chiapas	CAE Rosario Izapa, Tuxtla Chico	<i>P. djamor</i>
ECS-0143	Chiapas	Km. 1.5, Carr. Tap.-P. Madero	<i>P. djamor</i>
ECS-0150	Chiapas	Fracc. Los Laureles, Tapachula	<i>P. djamor</i>
ECS-0151	Chiapas	Yajalón	<i>P. djamor</i>
ECS-0159	Morelos	UAEM	<i>P. djamor</i>
ECS-0162	Morelos	Sta. Catarina de Tepoztlán	<i>P. djamor</i>
ECS-0176	Veracruz	Coatepec	<i>P. djamor</i>
ECS-0172	Michoacán	Gtz. Zamora	<i>P. djamor</i>
CP-120	Puebla	Presa conejillo, col. Rev., Atlixco	<i>P. djamor</i>
CP-170	Yucatán	Mérida, Yucatán	<i>P. djamor</i>
CP-171	Yucatán	Mérida, Yucatán	<i>P. djamor</i>
CP-253	Tabasco	Centla, Tabasco	<i>P. djamor</i>
ECS-0174	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>
ECS-0175	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>
ECS-01130	Jalisco	Guadalajara	<i>P. djamor</i>
CP-194	Tlaxcala	San Isidro Buensuceso, Tlax	<i>P. agaves</i>
CP-98	Hidalgo		<i>P. agaves</i>
ECS-0165	Morelos	UAEM	<i>P. agaves</i>

Tabla 2. Cepas monospóricas de *Pleurotus* usadas como referencia

Código ECOSUR	Código de origen	Genotipo	Especie	País de origen	Referencia
ECS-01102	RHP 6689	2(A ₂ B ₁)	<i>P. ostreatus ex. epitypus</i>	Austria	Petersen <i>et al.</i> , 2006
ECS-01103	RHP 6689	8(A ₁ B ₁)			
ECS-01104	RHP 6689	3(A ₂ B ₂)			
ECS-01105	RHP 6689	36(A ₁ B ₂)			
ECS-0192	RHP 4203	10(A ₁ B ₂)	<i>P. pulmonarius</i>	Suiza	Petersen y Hughes, 1993; Petersen, 1995a,1995b; Petersen y Ridley, 1996; Petersen <i>et al.</i> , 2006
ECS-0193	RHP 4203	9(A ₂ B ₁)			
ECS-0194	RHP 4203	14(A ₂ B ₂)			
ECS-0195	RHP 4203	1(A ₁ B ₁)			
ECS-01107	RHP 7947	MA 2*	<i>P. dryinus</i>		Petersen <i>et al.</i> , 2006
ECS-01108	RHP 7947	MA 6*			
ECS-01116	RHP 7947	MA 1*			
ECS-0198	RHP 4478	14(A ₂ B ₂)	<i>P. levis</i>	Puerto Rico	Petersen <i>et al.</i> , 2006
ECS-01114	RHP 4478	10(AB)			
ECS-01100	RHP 8763	1(A ₂ B ₁)	<i>P. cornucopiae</i>	Austria	Petersen <i>et al.</i> , 2006
ECS-0174-2	IBUG7 ₂	2(A ₁ B ₂)	<i>P. djamor</i>	México	Petersen, 1995b
ECS-0174-3	IBUG7 ₂	3(A ₂ B ₂)			
ECS-0174-4	IBUG7 ₂	4(A ₁ B ₁)			
ECS-0176-1	IBUG39	1(A ₁ B ₁)			
ECS-0176-10	IBUG39	10(A ₂ B ₂)			
ECS-0176-15	IBUG39	15(A ₂ B ₁)			

*Monospóricas al azar

Tabla 3. Alelos de incompatibilidad sexual en cepas silvestres mexicanas de *P. djamor*

		♣ECS-0127				ECS-0175				ECS-0176				ECS-0162			ECS-0172				ECS-0174			
ECS-0122		♣38	51	35	50	9	2	3	20	1	10	6	15	4	9	1	1	15	3	6	4	3	2	
		♣A ₃	A ₄	A ₄	A ₃	A ₂	A ₅	A ₅	A ₂	A ₅	A ₂	A ₅	A ₂	A ₅	A ₂	A ₂	A ₂	A ₅	A ₂	A ₅	A ₅	A ₂	A ₅	
		B ₃	B ₄	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₅	B ₆	B ₅	B ₆	B ₅	B ₆	B ₆	B ₅	B ₆	B ₅	B ₆	B ₆	B ₅	B ₆	B ₅	B ₅	
♣7	A ₁ B ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	A ₂ B ₂	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	?	+	+	-	+
8	A ₁ B ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	A ₂ B ₁	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	?	+	-	+
ECS-0127		38	A ₃	B ₃		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		51	A ₄	B ₄		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		35	A ₄	B ₃		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		50	A ₃	B ₄		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ECS-0175		9	A ₂	B ₅		-	+	?	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
		2	A ₅	B ₆		-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	?	+
		3	A ₅	B ₅		-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		20	A ₂	B ₆		+	-	-	-	-	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ECS-0176		1	A ₅	B ₅		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		10	A ₂	B ₆		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
		6	A ₅	B ₆		-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		15	A ₂	B ₅		+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ECS-0162		4	A ₅	B ₆		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		9	A ₂	B ₅		-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		1	A ₂	B ₆		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ECS-0172		1	A ₂	B ₅		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		15	A ₅	B ₆		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		3	A ₂	B ₆		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		6	A ₅	B ₅		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

♣Código de la cepa, ♦Número de monospórico, ♠ Número de alelo,+ Con fibulas, - sin fibulas, ? reacción dudosa

Tabla 4. Alelos de incompatibilidad sexual entre cepas silvestres mexicanas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*.

<i>P. ostreatus</i> <i>ex. epitypus</i>		♣ECS-0184				ECS-0156				ECS-0158		
		♦1	2	4	3	5	4	14	8	4	1	5
		A ₃	A ₁	A ₃	A ₁	A ₁	A ₂	A ₂	A ₁	A ₁	A ₃	A ₃
		B ₁	B ₂	B ₂	B ₁	B ₃	B ₂	B ₁	B ₂	B ₂	B ₁	B ₃
♣A ₁ B ₁	♦8	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
A ₂ B ₂	3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
A ₁ B ₂	36	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
A ₂ B ₁	2	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

♣Código de la cepa, ♦Número de monospórico, ♠ Número de alelo,+ Con fibulas, - sin fibulas

Tabla 5. Grupos interestériles de *Pleurotus* (3) identificados por cruza dicarión x moncarión en una colección de cepas silvestres mexicanas

Estado	Dicarión	<i>P. ostreatus</i>		<i>P. pulmonarius</i>			<i>P. djamor</i>			<i>P. dryinus</i>		<i>P. levis</i>	
		1103 A ₁ B ₁	1105 A ₁ B ₂	0192 A ₁ B ₁	0193 A ₁ B ₂	0195 A ₂ B ₂	0176-1 A ₅ B ₅	0176-6 A ₅ B ₆	0174-2 A ₄ B ₄	1107 A ₁ B ₁	1116 A ₁ B ₂	0197 A ₁ B ₂	0198 A ₂ B ₂
Nuevo León	ECS-0183	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
	ECS-0184	+	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Hidalgo	CP-98	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Chiapas	ECS-0123	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-	-
	ECS-0128	-	-	-	-		+	+		-	-	-	-
	ECS-0130	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-	-
	ECS-0143	-	-	-	-		+	+		-	-	-	-
	ECS-0150	-	-	-	-		+	+		-	-	-	-
	ECS-0151	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-	-
Tabasco	CP-253	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-
Yucatán	CP-170	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-
	CP-171	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-	-
Puebla	CP-30	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
	CP-120	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-
Morelos	ECS-0159	-	-	-	-		+	+	-	-	-	-	-
	ECS-0162	-	-	-	-		+	+	-	-	-	-	-
	ECS-0170	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	ECS-0165	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Tlaxcala	CP-194	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Jalisco	ECS-01130	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-	-
Michoacán	ECS-0172	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-
Veracruz	ECS-0110	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	ECS-0191	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP-18	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de cuatro especies de *Pleurotus* provenientes de diferentes regiones de México

Especie	Cepa	Velocidad de crecimiento en mm/día
<i>P. djamor</i>	ECS-0176	12.6 ± 0.5 a
	ECS-0151	12.6 ± 0.6 a
	ECS-0174	12.5 ± 1.0 a
	ECS-0128	12.3 ± 0.5 a
	ECS-0123	12.1 ± 0.7 a
	ECS-0175	12.0 ± 0.5 a
	CP-170	11.8 ± 1.0 ab
	ECS-0162	11.4 ± 1.0 ab
	ECS-0143	10.3 ± 0.2 bc
	ECS-0130	10.1 ± 0.4 bc
	ECS-0127	9.9 ± 0.4 c
	ECS-0159	9.3 ± 0.2 c
	CP-253	9.2 ± 1.1 cd
	ECS-0122	8.9 ± 0.4 cd
	ECS-0150	7.7 ± 0.8 de
	CP-171	6.6 ± 1.0 de
	ECS-0172	4.9 ± 0.4 ef
	ECS-01130	3.8 ± 0.5 f
	CP-120	1.4 ± 0.3 g
<i>P. pulmonarius</i>	ECS-0158	13.9 ± 0.8 a
	ECS-0156	11.8 ± 0.4 b
	ECS-0110	9.3 ± 0.7 c
	ECS-0191	8.5 ± 0.2 cd
	ECS-0170	8.4 ± 0.4 cd
	ECS-0183	7.1 ± 0.1 d
<i>P. ostreatus</i>	ECS-0184	9.6 ± 0.3
<i>P. levis</i>	CP-30	2.8 ± 0.5

*letras iguales en columnas indican similaridad entre cepas

Tabla 7. Productividad media de cepas mexicanas de *Pleurotus djamor*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* y *P. levis*, calculados a dos cosechas y comparados por el método de Tukey (α 0.05)

Especie	Cepa	Días a cosecha **	Eficiencia biológica (%)	Tasa de producción	Rendimiento
<i>P. djamor</i>	CS-0175	17	178.3 a*	0.149 a	10.49 a
	ECS-01130	45	148.1 ab	0.097 bcd	3.29 fg
	ECS-0174	17	138.4 ab	0.117 ab	8.14 ab
	ECS-0176	17	126.5 bc	0.105 bc	7.44 b
	CP-170	15	116.3 bcd	0.116 a	7.81 ab
	CP-120	25	84.9 cde	0.074 cdef	3.10 fg
	ECS-0122	12	82.0 cde	0.055 ef	6.83 bc
	ECS-0143	12	81.2 cde	0.063 def	6.76 bc
	ECS-0127	12	79.5 cde	0.068 cdef	6.62 bcd
	ECS-0159	45	78.3 de	0.066 def	1.73 g
	ECS-0130	16	78.3 de	0.056 def	4.89 cde
	ECS-0162	12	77.5 de	0.076 cde	6.46 bcd
	ECS-0151	12	76.0 de	0.057 ef	6.33 bcd
	ECS-0172	18	73.8 de	0.074 cdef	4.1 def
	ECS-0123	12	73.7 de	0.067 cdef	6.13 bcde
	CP-253	25	66.8 e	0.059 def	2.67 fg
	ECS-0128	17	64.4 e	0.06 def	3.78 efg
ECS-0150	15	63.0 e	0.04 f	4.20 def	
CP-171	35	53.6 e	0.053 f	1.53 g	
<i>P. pulmonarius</i>	ECS-0170	19	140.1 a	7.4 a	0.11 a
	ECS-0191	19	110.5 ab	5.8 ab	0.11 a
	ECS-0156	12	88.1 b	7.3 a	0.07 bc
	ECS-0110	18	81.3 bc	4.5 bc	0.09 ab
	ECS-0158	17	72.8 bc	4.3 bc	0.06 bc
	ECS-0183	19	62.5 c	3.3 c	0.05 c
<i>P. ostreatus</i>	ECS-0184	17	74.6	0.07	4.38
<i>P. levis</i>	CP-30	65	71.4	0.07	1.1

*letras iguales en columnas indican similitud entre cepas, ** tiempo transcurrido desde la inoculación de sustrato hasta la primera cosecha

Tabla 8. Variación en el color de los basidiomas de *Pleurotus djamor*

Color del Basidioma	Cepas
Gris azulado claro (Gley 1 8/N, Gley 2 7/10B, 8/10B, 8/5B), blanco (2.5YR 8/1) con tonos amarillentos hacia la base (2.5YR 7/1, 7.5YR 8/1, 7.5YR 8/3).	ECS-0122, -0123, -0128, -0143, -0150, -0151, -0162, -01130, CP-170, -171, -253, -120, -0172
Con primórdios de color rosas (10R 8/2, 10R 8/3), basidioma al madurar blancos (10R 8/1, 2.5YR 8/1) a rojo pálido (10R 7/2).	ECS0-127, -159, -0175
Primordios rosas (10R 8/3), basidoma al madurar rosa claro (2.5YR 8/2), blanco rosado (2.5YR 8/1, 10R 8/2), rojo pálido (10R 8/3, 7/3).	ECS-0130, 0174, -0176

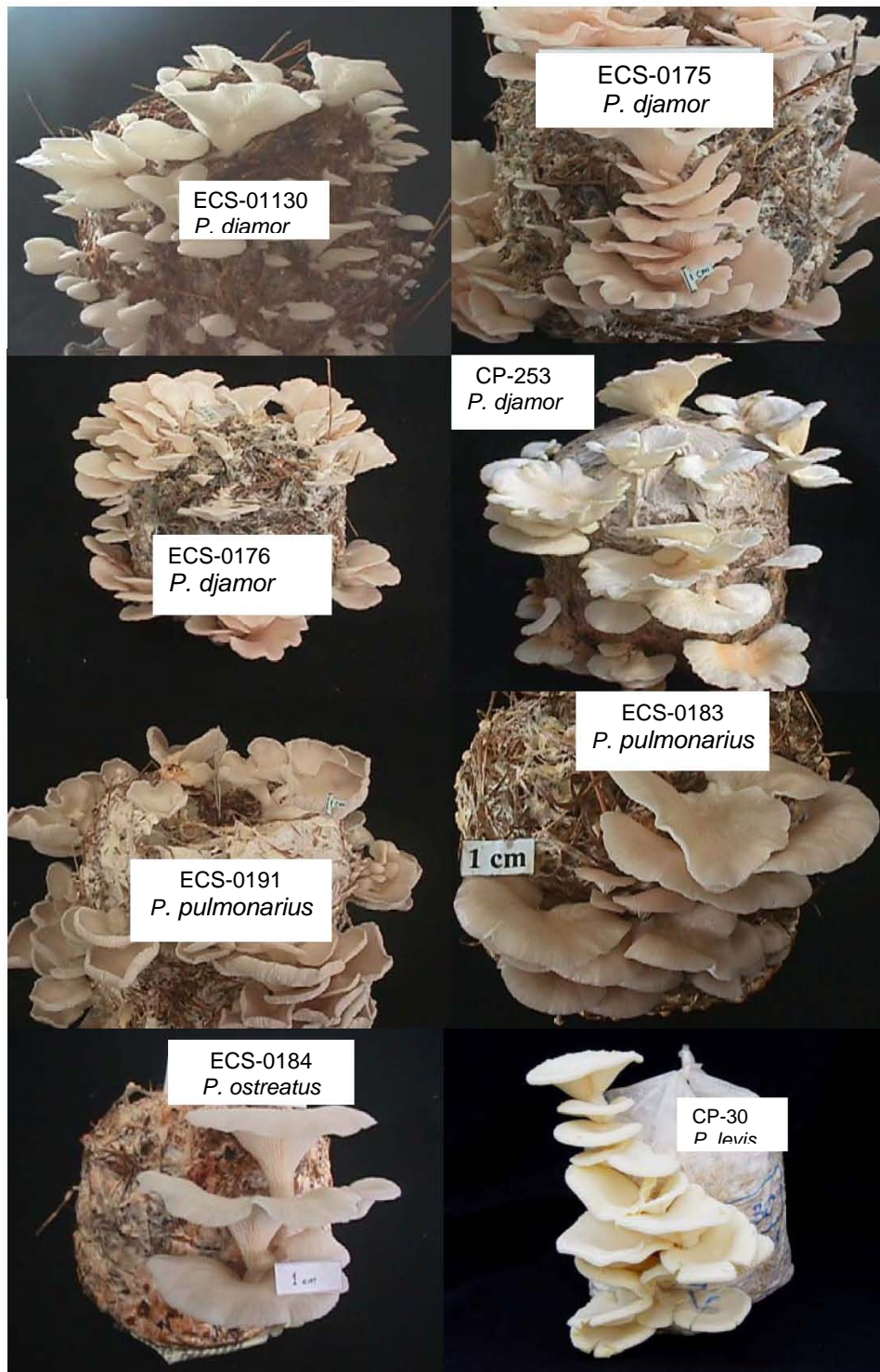


Figura 1.- Diversidad morfológica y genética de cepas mexicanas de *Pleurotus*

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

8.1. Aspectos generales

Las seis especies de *Pleurotus* que se identificaron en este trabajo son el 40% del total de especies reportadas a nivel mundial y son una muestra de la mega diversidad presente en México.

La identificación de especies usando métodos filogenéticos para el análisis de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, permitió generar hipótesis objetivas y replicables sobre las relaciones de parentesco filogenético existentes entre las taxa de *Pleurotus*. Las especies filogenéticas que se proponen en este estudio: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. agaves*, *P. djamor*, *P. levis* y *P. smithii*, mostraron una total concordancia con los grupos interestériles identificados mediante los ensayos de apareamiento sexual. Mientras que el uso de criterios morfológicos solo confirmaron la presencia de las especies *P. djamor* y *P. levis*. El resto de las cepas fueron agrupadas por afinidad morfológica en los complejos *P. ostreatus*, *P. djamor* y en el de *coremiopleurotus*. Vilgalys *et al.* (1991), Vilgalys *et al.* (1994), y Neda y Nakai (1995) para el caso de *Pleurotus*, y Chillali *et al.* (1998) y Kornelis (1999); en los casos de los complejos de *Armillaria* y *Hebeloma crustuliniforme* también encontraron una completa concordancia entre las especies filogenéticas y los grupos interestériles, lo que indica la veracidad de los métodos filogenéticos.

Las autocruzas de monocarióntes, revelaron un sistema de apareamiento bifactorial heterotálico, con alelos múltiples, para todas las cepas examinadas, corroborando toda la información generada en estudios de compatibilidad de *Pleurotus*, previos a este trabajo (Eger *et al.*, 1979; Vilgalys *et al.*, 1993; Petersen y Hughes, 1993; Petersen, 1995a, 1995b). Esto explica los altos porcentajes de intercompatibilidad entre cepas pertenecientes a la misma especie pero de diferente origen geográfico. Contrario al reporte de Petersen y Ridley (1996), que menciona que una cepa de *P. pulmonarius* de Nueva Zelanda presenta compatibilidad sexual con múltiples especies, ninguna de las cepas mexicanas mostró capacidad excepcional para cruzarse con monospóricos provenientes de diferentes grupos interestériles.

8.2. Diversidad genética de *Pleurotus* en México

Las diferencias en tipos de vegetación y climas predominantes entre las regiones de origen de las 31 cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus*, incluidas en este estudio, permitió detectar variabilidad genética en el material estudiado. El análisis filogenético de secuencias ITS1-5.8S- ITS2 del ADN ribosómico, reveló la existencia de diversidad de especies y de diferentes poblaciones en las especies mejor representadas. Ratificó la presencia de *P. djamor* y *P. smithii* reportadas por Guzmán *et al.* (1980, 1991, 1993, 1994, 1995) y reveló la presencia de cuatro especies más: *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *P. levis* y *P. agaves*. Evidenció fallas en la identificación de la especie de algunas cepas, INIREB 8 y 20, reportadas como *P. ostreatus*, por Martínez-Carrera (1988) y Martínez-Carrera *et al.* (1984, 1986), y HEMIM 32 reportada como *P. djamor* por Navarro *et al.* (1996), las cuales fueron identificadas en este trabajo como *P. pulmonarius*, con base a sus relaciones de apareamiento sexual y filogenéticas.

P. djamor muy probablemente sea la especie de más amplia distribución en México, capaz de desarrollarse en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Mientras que la distribución de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* parece estar restringida a regiones templadas o subtropicales. Con el fin de complementar la información sobre la distribución geográfica de las especies de *Pleurotus* y la posible existencia de otras especies, se recomienda intensificar las recolectas en las regiones centro, oeste y norte de México y continuar con los estudios filogenéticos que permitan generar hipótesis más robustas.

8.3. Grupos interestériles

Todas las cepas estudiadas presentaron un sistema de cruce bifactorial y ninguna de ellas mostró capacidad excepcional para cruzarse con monospóricos provenientes de diferentes grupos interestériles, Petersen y Ridley (1996). El análisis de sistemas de cruce reveló la presencia de los grupos interestériles I *P. ostreatus*, II *P. pulmonarius*, V *P. djamor*, VIII *P. levis*, XI *P. agaves*, en México (Vilgalys *et al.*, 1996). El nombre de *P. agaves* fue sinonimizado por *P. opuntia* por Petersen y Hughes (2006) aduciendo la antigüedad del nombre, sin embargo el tipo de esta especie no corresponde al material con el que fue descrito el GI XI. Ellos proponen asignar un lectotipo, debido a las condiciones precarias en las que se encuentra el tipo. La situación no clara de esta especie sugiere la

necesidad de desarrollar estudios mas detallados tendientes a esclarecer si *P. opuntia* y *P. agaves* son la misma especie con diferente origen geográfico o son dos especies diferentes. Así mismo una revisión más amplia de los especímenes presentes en los herbarios mexicanos y nuevas recolectas permitiría describir la distribución geográfica de esta especie. En este estudio no se logró obtener reacción positiva al confrontar *P. smithii* con los monospóricos referenciales de *P. cystidiosus*.

8.4. Análisis filogenético

El análisis diferenció claramente seis linajes soportados por altos porcentajes de remuestreo (70% o >), donde se encuentran incluidas las especies: *P. smithii*, *P. levis*, *P. djamor*, *P. agaves*, *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*. Separó las secuencias mexicanas de las europeas que se utilizaron como referencia en las agrupaciones correspondientes a *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Esto fue observado con anterioridad al estudiar la especiación en *Pleurotus* y *Grifola frondosa* en Norte América (Vilgalys *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2002). Estas particiones filogeográficas no están correlacionadas con formación de barreras de ínter esterilidad, según los resultados obtenidos al aparear las cepas de referencia de origen europeo con las mexicanas, en cada uno de los casos. La excepción a este patrón, fue la secuencia ECS-0156 proveniente de Veracruz, que fue agrupada con las secuencias europeas. Una explicación a esta relación, es el flujo de genes de cepas europeas hacia las cepas mexicanas, propiciado por la introducción de cepas extranjeras, con fines de investigación y/o comerciales.

Las secuencias de *P. smithii* (CP-18 y D478) formaron un grupo monofilético muy cercano a *P. cystidiosus*. Estos resultados, coincidieron con lo reportado por Zervakis *et al.* (2004), quien los considera como especies diferentes debido a que su distribución geográfica evita cruza ocasionales que pudieran revertir la barrera reproductiva incompleta que existe entre estas especies. Contrario a esto Capelari y Fungaro (2003), mencionaron que *P. smithii* y *P. cystidiosus* pertenecen a una misma especie, por presentar incompatibilidad parcial (17.5%) al confrontar aislamientos monospóricos procedentes de ambas cepas y patrones de RAPD similares. Zervakis *et al.* (2004) sugirieron la existencia de barreras reproductivas incompletas que se manifiestan como una incompatibilidad parcial poco frecuente entre dos especies evolutivamente cercanas y señala que la

separación geográfica de las especies evita que compartan el mismo pool de genes y limita la formación de híbridos. Otros casos de incompatibilidad parcial entre especies fueron reportados entre líneas de *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* provenientes de Nueva Zelanda y *P. calyptratus* y *P. djamor* (Petersen y Ridley, 1996; Shian-Ren, 2000).

Las secuencias pertenecientes a las especies *P. calyptratus*, *P. djamor* y *P. agaves* formaron un grupo monofilético en donde *P. calyptratus* es considerada como especie hermana de *P. djamor*, según Vilgalys *et al.* (1996). Según Shian-Ren (2000), algunas poblaciones de estas dos especies, mostraron compatibilidad parcial, sugiriendo que la interesterilidad entre estas especies es resultado de especiación alopatrica. Se puede considerar que *P. agaves* es especie hermana de *P. djamor* y *P. calyptratus* con barreras reproductivas completas. La distribución geográfica de *P. djamor* y *P. agaves* se sobreponen y presentan una morfología muy parecida que puede ser confundida, mientras que la presencia de velo en *P. calyptratus* permite una clara diferenciación.

Se confirma que las cepas rosas ECS-0127, -0130, -0174, -0175 y -0176 (*P. salmoneostramineus* Lj N. Vassiljeva, *P. ostreatoroseus* Singer) y blancas de *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn, identificadas anteriormente como diferentes especies pertenecen a una misma especie al ser agrupadas en un solo clado del árbol y al mostrar compatibilidad en los ensayos de apareamiento (datos no presentados en este artículo). Esto coincide con lo reportado por Guzmán *et al.* (1993, 1994); Neda y Nakai (1995) y Nicholl y Petersen (2000).

8.5. Diversidad Infraespecífica

La diversidad en color del basidioma, velocidad de crecimiento, eficiencia biológica y las características de sabor y textura en fresco, estuvieron bien representadas en la muestra de cepas identificadas como *P. djamor*. Los datos de recolecta y literatura generada en México mostraron que esta especie tiene una amplia distribución en regiones tropicales, subtropicales y bosques mesófilos de regiones templadas. Su presencia fue reportada en Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Distrito Federal, Zacatecas y Nuevo León (Guzmán y García-Saucedo, 1973; Guzmán *et al.*, 1993, 1995; Chacón y Guzmán, 1984;

Guzmán y Guzmán-Dávalos, 1984; Andrade *et al.*, 1996; Nicholl y Petersen, 2000). Esta especie fructifica durante el verano a temperaturas entre 25-35 °C.

La mitad de los especímenes presentaron basidiomas con sabor y olor harinoso en fresco, una cuarta parte olor agradable a hongo, con sabor harinoso y el resto presentó olor y sabor a pescado o de aceite. La textura de los basidiomas, fue subcoriácea a coriácea, sólo una cepa produjo basidiomas subcarnosos (ECS-0172).

Sin considerar las diferencias en cepas y substratos, se puede observar que cinco de las cepas evaluadas (EB 116-178%) superan la eficiencia biológica reportada por Gaitán y Salmones (1999) y Salmones *et al.* (2004), para cruza seleccionadas y los parentales de *P. djamor* (99-114%, 48-70% y 62-123% de EB, respectivamente). Pero fueron inferiores a las eficiencias reportadas por Valencia *et al.* (2001-2003) para POROS (184.1-205.3%). Las 15 cepas restantes tuvieron una productividad semejante a la reportada en otros trabajos (Hernández-Ibarra *et al.*, 1995; Salmones *et al.*, 1997). Las tasas de producción obtenidas en este trabajo fueron mayores a las reportadas en todos los trabajos anteriormente mencionados, debido a que las cepas que se incluyeron en este trabajo requirieron de un menor número de días para llegar a fructificación. Con relación a la textura subcoriácea que se observó en algunos especímenes nativos, se considera que esta puede ser una cualidad a conservar, pues permite mantener el volumen de los hongos después de ser cocinados, puede ayudar a resistir la manipulación durante el empaque y podría alargar su vida de anaquel. En cuanto al sabor harinoso, aceitoso o a pescado de los basidiomas en fresco, se pudo observar que este se pierde durante la cocción.

Aun cuando se encontró variabilidad en velocidad de crecimiento y eficiencia biológica entre las cepas de *P. pulmonarius*, la morfología y el color de las cepas fue muy similar entre ellas. El número reducido de recolectas incluidas en este trabajo y las incongruencias ocasionadas por el uso exclusivo de caracteres morfológicos para la identificación de esta especie limitó el uso de los reportes bibliográficos, para describir su distribución geográfica en México. Sólo se puede reportar su presencia en Nuevo León, Veracruz, Puebla, y Morelos.

La cepa ECS-0110 proveniente de Veracruz ha sido cultivada a nivel semicomercial en módulos de producción rural, con buenos resultados. Esta, al igual que el resto de las cepas estudiadas tienen excelentes cualidades organolépticas y las mejores cepas

alcanzaron eficiencias biológicas de 110-140%, coincidiendo con lo indicado por la literatura [Tabla 7] (Martínez-Carrera, 1988; Martínez- Carrera *et al.*, 1986).

8.6. Propuesta de mejoramiento genético

Si consideramos que la temperatura alta (>26°C) es una de las limitantes para que las cepas comerciales expresen su máximo potencial y que el 76.8% del territorio nacional presenta clima cálido en sus variantes húmedo, subhúmedo y muy seco, con temperaturas medias anuales de 22 a 26°C, y regiones que superan los 26°C. Podemos asegurar que es urgente generar cepas de *Pleurotus* para regiones con clima cálido. Por otro lado si se quiere lograr que *Pleurotus* sea una alternativa real para resolver los problemas de falta de alimento de alta calidad en el sector rural, es necesario:

- Generar cepas comerciales para clima templado-frío capacidad para crecer y fructificar a una temperatura media de 10 a 18°C. Cepas para clima templado que muestren buen crecimiento y alta productividad de 22 a 25°C y cepas para clima cálido con buen desarrollo y alta productividad entre 25°C y 30°C. Esto se puede lograr siguiendo cualquiera de las siguientes estrategias: a) Establecer un programa utilizando el germoplasma nativo y aquellas especies de *Pleurotus* que tengan la habilidad de crecer y fructificar bajo dichas condiciones b) Introducir germoplasma de *P. ostreatus* con capacidad para crecer y fructificar a 30°C y generar cepas que puedan cultivarse en regiones con clima cálido y templado.

- Un análisis de las características de crecimiento y distribución geográfica de las especies del hongo ostra, permite definir que *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* deberían ser incluidas en un programa de mejoramiento tendiente a generar cepas comerciales para regiones con clima templado y templado frío y *P. djamor* para regiones tropicales y subtropicales.

A continuación se describe una propuesta de mejoramiento tendiente a mejorar la productividad y el tamaño de los basidiomas, utilizando de cepas nativas de *P. djamor* y siguiendo la estrategia de mejoramiento genético para hongos heterotálicos propuesta por Raper (1985).

El objetivo de este programa es incorporar los alelos recesivos de una línea con morfología deseada (s) en los genomas que determinan la productividad ($S y^{n+} \text{ ó } -$). Se

consideró que una cepa tiene morfología deseada, cuando produce basidiomas con píleo > 7 cm, textura subcoriácea o subcarnosa, sabor a hongo y con morfología no deseada cuando forma píleos de 5 cm o menos, textura coriácea, sabor desagradable. La productividad deseada en una cepa es que alcance $EB > 150\% \pm 10$ al ser cultivada sobre un kilo de 70:30 paja de *Digitaria decumbens* y pulpa de café secada al sol, pH 9, estéril y a 28°C. Como productividad no deseada será $EB < 70 \pm 10\%$, bajo la mismas condiciones de cultivo.

Esta propuesta plantea los siguientes supuestos: a) La morfología deseada está determinada por alelos alternos de un gen, b) Los alelos de la morfología no deseada son dominantes sobre la deseada y c) La productividad esta determinada por alelos alternos de varios genes. La verificación de dominancia de alelos para píleo pequeño se hará en F1, esta debe presentar una segregación 1:1 y la evidencia poligénica de productividad se demostrará si la curvas de distribución son ideales bajo condiciones de cultivo idénticas.

Los pasos a seguir en el programa se presentan en la figura 2 y son: a) Obtención de homocariónes a partir de cada uno de los heterocariónes, b) Selección de homocarión con gen de píleo grande y baja productividad, c) dos series de retro cruza del homocarión de píleo grande con el de píleo pequeño y alta productividad. d) cruzar los productos de las series de retrocruzas una con otra.

En cada generación cruzar con homocariónes parentales con un homocarión con sistema de cruce conocido, para identificar el sistema de cruce del homocarión que va a ser retrocruzado. También las cruza pueden llevarse a fructificar para probar la presencia de los alelos “s”, en el homocarión de sistema de cruce compatible. Se seleccionarán 20 líneas de la progenie de cada cruce.

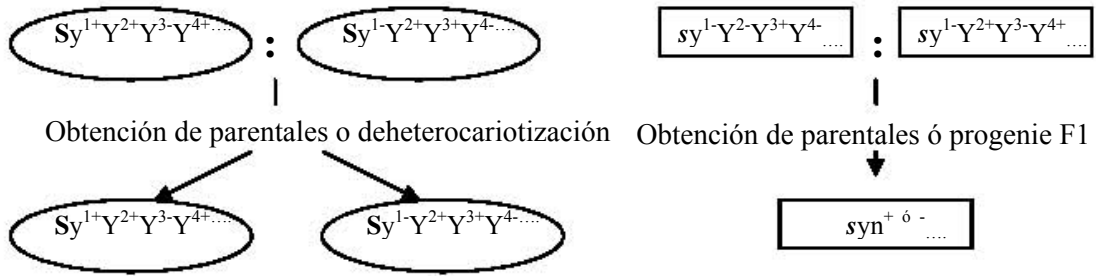


Basidioma grande y baja productividad



Basidioma pequeño y alta productividad

A: Generar homocariones a partir de basidiomas heterocarios



B. Dos series de Retrocruzadas

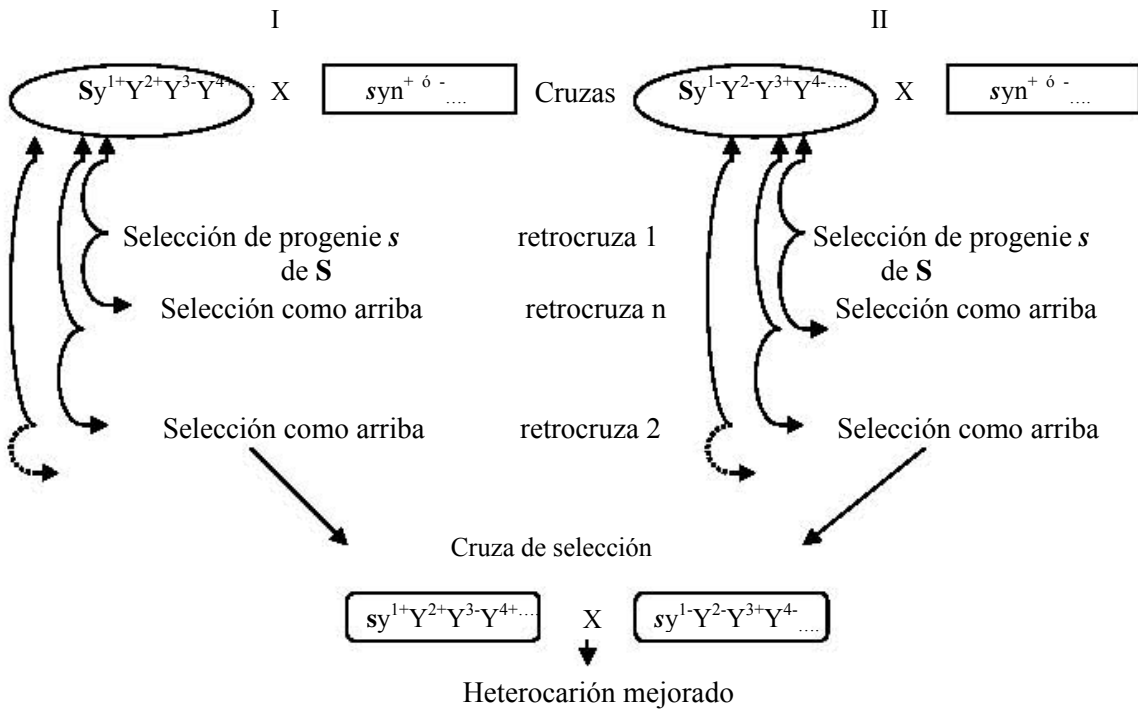


Figura 2. Estrategia de mejoramiento genético para *Pleurotus* (Raper, 1985)

CONCLUSIONES

1. El análisis filogenético de las secuencias ITS1-5.8S- ITS2 del ADN ribosómico, ratificó la presencia de *Pleurotus djamor* y *P. smithii* en México y reveló la existencia de *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *P. levis* y *P. agaves* en México.
2. El análisis de sistemas de cruce reveló la presencia de los grupos interestériles: I *P. ostreatus*, II *P. pulmonarius*, V *P. djamor*, VIII *P. levis*, XI *P. agaves*, en México. Ninguna de ellas mostró capacidad excepcional para cruzarse con monospóricos provenientes de diferentes grupos interestériles.
3. Las especies que se citan en este trabajo representan el 40% del total de especies de *Pleurotus* señaladas a nivel mundial y son una muestra de la mega diversidad que hay en México.
4. Se considera que la identificación de especies filogenéticas por secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, es un método confiable ya que mostró concordancia total con los grupos interestériles identificados mediante apareamiento sexual.
5. *Pleurotus djamor* fue la especie mejor representada en la muestra de estudio, con una amplia distribución en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Presentó la mayor diversidad en color del basidioma, velocidad de crecimiento, eficiencia biológica y características de sabor y textura en fresco.
6. Se requiere establecer al menos dos programas de mejoramiento genético tendientes a generar cepas comerciales de alta productividad y basidiomas grandes (7 a 10 cm de diámetro). Uno basado en el germoplasma nativo e introducido de las especies *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, que produzca cepas para ser cultivadas en regiones con climas templado-frío (temperatura media de 10 a 18°C) y templado (22 a 25°C), y otro basado en el germoplasma de *P. djamor*, que crear cepas cultivables en regiones tropicales y subtropicales (25°C a 30°C).

X. APÉNDICE

A1. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus djamor*

Estado	Cepa	Color del pileo *	Olor	Sabor	Textura	Forma del pileo	Crecimiento	Color de esporada	Posición del pseudoestípite
Chiapas	ECS-0122	Gris azulado claro (Gley 2 8/10B)	Fúngico	Fúngico	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Cremosa con tonos grises	Lateral
	ECS-0123	Gris azulado claro (Gley 2 7/10B)	Fúngico	Picante	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco cremosa	Lateral
	ECS-0127	Primordios blanco rosado (10R 8/2), maduros blanco a rosa pálido (10R 8/1 a 7/2)	Rancio	Aceitoso	Coriácea	Conchado	Imbricado	Café grisáceo con tonos violáceos.	Lateral
	ECS-0128	Gris azulado claro (Gley 2 8/5B)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco amarillento	Lateral
	ECS-0130	Blanco rosado (2.5YR 8/2) a Blanco (2.5YR 8/1)	Rancio	Fúngico	Coriácea	Flabelado	Imbricado	Rosa pálido	Lateral
	ECS-0143	Gris azulado claro (Gley 2 8/5B)	Rancio	Aceitoso	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco amarillento	Lateral
	ECS-0150	Gris azulado claro (Gley 2 8/5B)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco cremosos	Lateral
	ECS-0151	Blanco (2.5YR 8/1) y gris rojizo claro cerca del estípite (2.5 YR 7/1)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Conchada	Imbricado	Blanco cremoso	Lateral
Tabasco	CP-253	Blanco (10R 8/1), con tonos amarillentos (7.5YR 8/3)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Blanca	Lateral
Yucatán	CP-170	Blanco (10R 8/1), con tonos amarillentos (7.5YR 8/1)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Blanco cremoso	Lateral
	CP-171	Blanco (10R 8/1), con tonos amarillentos (7.5YR 8/1)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Blanco cremoso	Lateral
Puebla	CP-120	Blanco (10R 8/1), con tonos amarillentos (7.5YR 8/1, 8/2)	Harinoso	Harinoso	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Blanco cremoso	Lateral

* *Munsell soil color charts*, 2000

A2. Continuación de Apéndice 1

Estado	Cepa	Color del pileo *	Olor	Sabor	Textura	Forma del pileo	Crecimiento	Color de esporada	Posición del pseudoestípite
Morelos	ECS-0159	Primordios blanco rosado (10R 8/2), maduros blanco (10R 8/1) a rosa pálido (10R 7/2)	Pescado	Rancio	Subcoriácea	Conchado	Cespitoso	Cremosa con tonos grises	Lateral
	ECS-0162	Blanco (10R 8/1) con tonos amarillentos (7.5YR8/3)	Rancio	Rancio	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Cremosa con tonos violáceos	Lateral
Jalisco	ECS-0174	Rosa (10R 8/3) a rojo pálido (10R 7/3)	Fúngico	Harinoso	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco cremosa	Lateral
	ECS-0175	Primordios rosas (10R 8/3), al madurar blancos (2.5YR 8/1)	Harinoso	Rancio	Subcoriácea	Conchado	Imbricado	Blanco cremosa	Lateral
	ECS-01130	Blanco (Gley 1 8/1)	Rancio	Rancio	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Blanco cremosa	Lateral
Michoacán	ECS-0172	Blanco cremoso con tonos cafés	Fúngico	Dulce	subcarnosa	Flabelado	Cespitoso	Gris con tonos violáceos	Lateral
Veracruz	ECS-0176	Primordios rosas (10R 8/3), al madurar blanco rosado (10R 8/2)	Fúngico	Harinoso	Subcoriácea	Flabelado	Imbricado	Cremosa con tonos rosas	Lateral

* *Munsell soil color charts, 2000*

A3. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus pulmonarius*

Estado	Cepa	Color del pileo *	Olor	Sabor	Consistencia	Forma del pileo	Crecimiento	Color de esporada	Posición del estípite
Morelos	ECS-0170	Blanco (2.5YR 8/1) a gris rojizo claro (2.5YR 7/1)	Fúngico	Rábano	Coriácea	Umbonado	Cespitoso	Gris con tonos cremosos	Lateral
Puebla	ECS-0158	Blanco (5YR 8/1) a gris claro (5YR 7/1)	Rábano	Ligero a anís	Carnosa, quebradiza	Flabelado	Cespitoso	Gris con tonos lilas	Excéntrico
Veracruz	ECS-0110	Al centro blanco (5YR 8/1), bordes gris (5YR 6/1) a gris oscuro (5YR 4/1)	Anís, dulce	Rábano	Carnosa	Conchado	Cespitoso	Crema con tonos grises (Hue 10YR 8/2, 7/2)	Excéntrico a lateral
	ECS-0156	Al centro blanco (5YR 8/1) y con bordes gris rojizo (2.5 YR 6/1)	Fúngico	Fúngico	Carnosa	Flabelado a conchado	Imbricado	Violácea con tonos grises (10YR 8/1, 8/2, 7/2)	Excéntrico a lateral
	ECS-0191	Blanco (10R 8/1) a gris claro (10R 7/1)	Fúngico	Rábano	Carnoso	Conchado	Cespitoso	Crema con tonos lilas (10YR 8/2, 7/2)	Excéntrico a lateral

* Munsell soil color charts, 2000

A.4. Caracterización morfológica de basidiomas de cepas silvestres mexicanas de *Pleurotus ostreatus* y *P. levis*

Estado	Cepa	Color del pileo *	Olor	Sabor	Consistencia	Forma del pileo	Crecimiento	Color de esporada	Posición del estípite
Nuevo León	ECS-0184	Gris azulado claro (Gley 2 8/5PB)	Fúngico	Rábano	Carnosa	Conchada, umbilicada	Cespitoso	Gris con tonos lila	Central a excéntrico
Puebla	CP-30	Amarillo pálido (Hue5Y 8/2), al raspar (Hue5Y 8/6)	A fruta	Fúngico	Carnosa quebradiza	Aclitocibado de borde incorbado**	Cespitoso primor con velo fugaz	Cremosa con tonos amarillos	Central a excéntrico

* Munsell soil color charts, 2000

** con restos de velo semejando estrías

A5. Tamaño de esporas, estructuras cistidiales y tipo de sistema hifal en el estípote de cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus djamor*

Estado	Cepa	Esporas en μm	Queilocistidios en μm	Sist. hifal en estípote
Chiapas	ECS-0122	8.26-9.44 (-10.03) x 3.54-4.48	21.2-23.6 x 5.3-5.9	Dimítico
	ECS-0123	8.26-9.44 x 3.5-4.13	(17.7) 21.2-23.6 x (5.9) 6.5-7.6	Dimítico
	ECS-0127	7.0-8.26 x 3.5-4.13	(21.2) 27.1- 29.5 x (5.9) 6.5- 7.9	Dimítico
	ECS-0128	(6.48) 7.56-8.4 (9.6) x 3.6-4.08	(18) 21.6-2.2 x (6.6) 7.8-9.3 (11)	Dimítico
	ECS-0130	7.67-9.44x3.54-4.13	20-21.2 x 6.5-7.8	Dimítico
	ECS-0143	9.44-10.62 (-11.8) x 3.54-4.13 (4.72)	20.0-25.9 (28.3) x (5.9) 7-8.26	Dimítico
	ECS-0150	9.44-10.26 x 3.54-4.13	17.7-20.0 x 6.7-8.0	Dimítico
	ECS-0151	(7.2) 7.8-9.36 (9.6) x (3.6) 3.96-4.56	16.8-18 (19.2)x 5.04-6.36 (7.2)	Dimítico
Tabasco	CP-253	9-11 (13) x 4-5	22-24 x 6-8	Dimítico
Yucatán	CP-170	(6) 7-9 x 2.3- 3.0	32-36 (40) x 9-10	Dimítico
	CP-171	9-12 x 2.8-3	22-27.6 x 7.2-8.4	Dimítico
Morelos	ECS-0159	(5.9) 7.08-9.44 x 2.36-3.54	(23) 24-26.4 x 12-14.4	Dimítico
	ECS-0162	9-9.6 (10.8) x 4-4.4	(22) 24-27 x 7.4-8.4 (9.6)	Dimítico
Puebla	CP-120	7.2-8.4 x 2.4-3.6		Dimítico
Jalisco	ECS-0174	7.08-9.44 (11.8) x (2.95) 3.54-4.13	(24) 25.2-27.6 x (6.6) 7.8-9.6	Dimítico
	ECS-0175	5.9-7.67 (8.26) x (2.36) 2.95-3.54	(21.6) 28.8-32.4 x 6.9-8.2	Dimítico
	ECS-01130	(6.44) 7- 8.4 x 2.8- 3.36	19.6- 25 x 7-8.4 (11.2)	Dimítico
Michoacán	ECS-0172	(6.72) 7-8.4 x 4-4.2	22.4-25.2 x 8.96-14	Dimítico
Veracruz	ECS-0176	(4.72) 5.31-8.26 (9.44) x (2.36) 2.95-3.54	(33.6) 35-39 x 9.6-10.8	Dimítico

A6. Tamaño de esporas, estructuras cistidiales y tipo de sistema hifal en el estípite de cepas mexicanas silvestres de *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus*, *P. levis*, *P. agaves* y *P. smithii*

Especie	Estado	Cepa	Esporas en μm	Queilocistidios en μm	Sist. hifal en estípite
<i>P. pulmonarius</i>	Nuevo León	ECS-0183	6.8- 9.8 x 2.8-3.3	*SQ	Monomítico
	Morelos	ECS-0170	(4.7) 5.9-8.2 (9.4) x 4.2-4.4 (4.8)	*SQ	Monomítico
	Puebla Veracruz	ECS-0158	8.2-10 (10.6) x 3.5-4.7	*SQ	Monomítico
		ECS-0110	(6.8) 8.7-9.8 (10.8) x (3.24) 3.84-4.44	*SQ	Monomítico
		ECS-0156 ECS-0191	(5.9) 8.2-10.6 x 3.54-4.72 (4.8) 6- 8.4 x 2.4-3.6	*SQ *SQ	Monomítico
<i>P. ostreatus</i>	Nuevo León	ECS-0184	(7.6) 8.2-8.8 (9.4) x (2.9)3.5-4.1	*SQ	Monomítico
<i>P. levis</i>	Puebla	CP-30	(10) 10.4- 12 x 3.0- 5.50	30-38.4 x 7.2-8.4	Dimítico
<i>P. agaves</i>	Hidalgo Tlaxcala	CP-98	(7) 8-9 x 3.0	*SQ	Monomítico
		CP-194	(9.0) 11- 12.0 x		Dimítico
<i>P. smithii</i>	Veracruz	CP-18	12-16 x 4 – 4.2	*SQ	Monomítico

*SQ sin queilocistidios

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A. A. (1993). Análisis económico y financiero de una planta rural de producción de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*). Estudio del caso Cuetzalan, Pue. Méx. Tesis de M. en C. CEICADAR-CP. Puebla, Pue. México.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. Wiley and Sons, USA: 503-507, 524, 529-531.
- Anderson N.A., Wang, S.S. y Schwandt, I.W. (1973). The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia* 65: 28-35.
- Andrade, R.H., Chacón, S. y Sánchez, J.E. (1996). Estudio sobre los hongos (Macromicetos) de tres plantaciones de café en el municipio de Tapachula, Chiapas (México). *Revista mexicana de Micología* 12:79-88.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 511p.
- Ayala, N. Y G. Guzmán (1984). Los hongos de la península de Baja California 1. Las especies conocidas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19:73-91.
- Balali, G.R., Whisson, D.L., Scott, E.S. y Neate, S.M. (1995). DNA fingerprinting probe specific to isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Mycological Research* 99: 467-470.
- Benítez-Camilo, F.A. (1998). Caracterización de 18 cepas de *Pleurotus djamor* nativas de la región del Soconusco, Chiapas. Tesis de licenciatura. Ciencias Químicas UNACH. Tapachula, Chiapas. 57p.
- Blackwell, M., Vilgalys, R. y Taylor, J.W. (2003). The Fungi <http://tolweb.org/tree?group=GROUPNAME>
- Bresinsky A., Fischer, M., Meixner, B. y Paulus, W. (1987). Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia* 79: 234-245.
- Bresinsky, A., Hilber, O. y Molitoris, H.P. (1977). The genus *Pleurotus* as an aid for understanding the concept of species in basidiomycetes. *In: The concept in Hymenomycetes*. (Ed. H. Clemençon). Proceedings of a herbe symposium held at the University of Lausanne, Switzerland. 1976-1977. J. Cramer Vaduz. 16-20.
- Bridge, P. (2002). The history and application of molecular mycology. *Micologist* 16: 90-99.
- Bruns, T.D., White, T.J. y Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Bruns, T.D., Vilgalys, R., Barns, S.M., Gonzalez, D., Hibbett, D.S., Lane, D.J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T.M., Weisburg, W.G. y Sogin, M.L. (1993). Evolutionary relationships with the

- fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequence. *Molecular Phylogenetics and evolution* 1: 231-241.
- Buican, D. (1997). *L'évolution et les théories évolutionnistes*. Masson. Paris, Francia. 49-80.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S. y Royse, D.J. (1994). A systematics assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28s ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86: 762-772.
- Bunyard, B. A., Chaichuchote, S. y Nicholson, M. S. (1996). Ribosomal DNA analysis for resolution of genotypic classes of *Pleurotus*. *Mycological Research* 100(2): 143-150.
- Capelari, M. y Fungaro, M.H.P. (2003). Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *coremiopleurotus*. *Mycological Research* 107: 1050-1054.
- Chacón, S. y Guzmán, G. (1984). Nuevas observaciones sobre, hongos, líquenes y mixomicetos de Chiapas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19: 245-252.
- Chillali, M., Wipf, D., Guillaumin, J.J., Mohammed, C. y Botton, B. (1998). Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. *New Phytologist* 138: 553 – 561.
- Coetzee, M.P.A., Wingfield, B.D., Harrington, T.C., Dalevi, D., Coutinho, T.A. y Wingfield, M.J. (1992). Geographical diversity of *Armillaria mellea* s.s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 105-113.
- Contreras, E.P., Sokolov, M., Mejía, G. y Sánchez, J.E. (2004). Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. [Journal of Horticultural Science y Biotechnology](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389171704000240). 79: 234-240
- Corner, E.J.H. (1981). The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 69:1-169.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- De León-Monzón, J.H., Sánchez, J.E. y Nahed-Toral, J. (2004). El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los altos de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Micología* 18: 31-38.
- Dorak, M.T. (2002). Compatibility systems in nature. <http://home.att.net/~dorak/hla/compat.html>.
- Eger, G. 1978. New Ways of Breeding and strain protection for practical mushroom cultivation. *Mushroom Science X* (Part II) Proceedings of the tenth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. France P. 415-420.
- Eger G., Li, S. y Leal-Lara, H. (1979). Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia* 71: 577-588
- Esser, K. (1965). Heterogenic incompatibility. *In: Incompatibility in Fungi*. (Eds. Esser, K. y Raper, J.R.). Springer-Verlag. 6-12

- Esser, K. (1971). Breeding systems in fungi and their significance for genetic recombination. *Molecular Genetics and Genomics* 110: 86-100.
- Eugenio, C.P. y Anderson, N.A. (1968). The genetic and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634
- Farris, J.S. (1989). The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Futuyma, D.J. (1986). *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts. P 219-249.
- Gaitán-Hernández, R. y Salmones, D. (1999). Análisis de la producción de cepas de *Pleurotus djamor*. *Revista mexicana de Micología* 15: 115-118.
- Gilbertson, R. y Ryvarde, L. (1986). North American polypores. *Fungiflora* 1. Oslo, Norway.
- Glass, N.L. y Kuldau, G.A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 201-224.
- González, H.M.D. (1992). Classification of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* (Basidiomycotina: Tulasnellales) using ribosomal DNA sequence data. Thesis of the master of science in the department of Botany in the Graduate School of Duke University. 65p.
- González, P. y Labarère, J. (2000). Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology* 146: 209-221.
- Guzmán, G. (1973). Hongos mexicanos (macromicetos) en herbarios del extranjero. II Especies del herbario Farlow, de la universidad de Harvard, E.U.A. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 7: 121-127.
- Guzmán, G. y García-Saucedo, D.A. (1973). Macromicetos del estado de Jalisco, I. Consideraciones generales y distribución de las especies conocidas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 7: 129-143.
- Guzmán, G. y P.D. Jonson (1974). Registros y especies nuevas de los hongos de Palenque, Chiapas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 8: 73-105.
- Guzmán, G., Valenzuela, R. y Canale, A. (1980). Primer registro de *Pleurotus smithii* de América del sur y obtención de la fase asexual de la cepa mexicana. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 14: 17-26.
- Guzmán, G. y Guzmán-Dávalos, L. (1984). Nuevos registros de hongos en el estado de Veracruz. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19: 221-244.
- Guzmán, G., Bandala, V. M. y Montoya, L. (1991). A comparative study of theleomorphs and anamorphs of *Pleurotus cystidiosus* and *Pleurotus smithii*. *Mycological Research* 94: 64-70.

- Guzmán, G., Montoya, L., Salmones, D. y Bandala, V. (1993). Studies of the Genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamour* in Mexico and other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. *Cryptogamic Botany* 3: 213-220.
- Guzmán, G., Montoya, L., Mata, G. y Salmones, D. (1994). Studies in the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the studies of basidiomata obtained in culture. *Mycotaxon* 50: 365-378.
- Guzmán, G., Montoya, L., Bandala, V.M., Mata, G. y Salmones, D. (1995). Studies in the genus *Pleurotus*, IV. Observations on the pink forms growing in Mexico based in the interbreeding of two different strains. *Mycotaxon* 53: 247-259.
- Hernández-Ibarra, H., Sánchez-Vázquez, J.E. y Calvo-Bado, L.A. (1995). Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp de la región de Tapachula, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Micología* 11: 29-38.
- Herrera, T. Y G. Guzmán (1973). Especies de macromicetos citados de México Agaricales. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 7:105-119.
- Hibbett, D.S. y Vilgalys, R. (1991). Evolutionary relationships of *Lentinus* to the polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83(4): 425-439.
- Hibbett, S. y Thorn, R.G. (1994). Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia* 86: 696-699.
- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E. y Donoghue, M.J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94: 12002-12006.
- Hibbett, D.S., Hansen, K. y Donoghue, M. (1998). Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from an expanded rDNA dataset. *Mycological Research* 102: 1041-1049.
- Hillis, D.M. (1988). Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, centred evolution and phylogeny reconstruction. *Systematics Zoology* 37: 63-66.
- Hopple, J.S. y Vilgalys, R. (1994). Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* 86: 96-107.
- Hopple, J.S. y Vilgalys, R. (1999). Phylogenetic relationships in the Mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 1-19.

- Huerta, P. G. (2004). Cepario de hongos comestibles y medicinales. En: Fernández Concha G.C., Sosa V., León de la Luz J.L., León Cortés J. *Colecciones Biológicas Centros de Investigación CONACYT*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F. 26-27.
- Hughes, W., Petersen, R.H., Johnson, J.E., Moncalvo, J.M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Thomas, T. y McGhee, L. (2000). Infragenic phylogeny of *Collybia s. str.* Based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions. *Mycological Research* 105: 164-172.
- Iraçabal, B. y Labarère, J. (1994). Restriction site and length polymorphism of the rDNA unit in the cultivated basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 824-830.
- Iraçabal, B., Zervakis, G. y Labarère, J. (1995). Molecular sytematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141: 1479-1490.
- James T.Y., Moncalvo, J.M., Li, S. y Vilgalys, R. (2001). Polymorphism at the Ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure to the widespread mushroom *Shizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161.
- Kay, E. y Vilgalys, R. (1992). Spatial distribution and genetic relationships among individuals in a natural populations of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 84: 173-182.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. y Stalpers, J.A. (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Ninth Edition. CAB International.
- Koltin, Y. y Raper, J.R. (1967). The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: The resolution of class III B factors. *Molecular Genetics and Genomics* 100: 275-282.
- Kornelis, A.D. (1999). Species y speciation in the *Hebeloma crustuliniforme* complex. Ph.D. thesis. Wageningen Universiteit. Netherlands.
- Kües, U. y Casselton, L.A. (1992). Fungal mating type genes- regulators of sexual development. *Mycological Research*. 96: 993-1006.
- Kuyper, Th. W. (1988). Specific and infraespecific delimitation. In: *Flora Agaricina neerlandica*. (Eds. Bas, C., Kuyper, Th.W., Noordeloos, M.E. y Vellinga, E.C.). Vol. 1. Balkena Rotterdam.
- Labarère, J. y Noel, T. (1992). Mating type switching in the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Genetics* 131:307-319.
- Larraya, L.M., Pérez, G., Peñas, M.M., Baars, J.J.P., Mikosch, T.S.P., Pisabarro, A.G. y Ramírez, L. (1999). Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8): 3413-3417.

- Larraya, L., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G. y Ramírez, L. (2000). A Genetic Linkage Map of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5290-5300.
- Larraya, L.M., Pérez, G., Iribarren, I., Blanco, J.A., Alfonso, M., Pisabarro, A. G. y Ramírez, L. (2001). Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3385-3390.
- Leal-Lara, H., Dosal-Real M.C. y Avilés-Esquivel, M.E. (1986). Obtención de mutantes acelulolíticos de *Pleurotus ostreatus*. 1^{er} Congreso Nacional de micología, Xalapa, Ver.
- Lee, S.B. y Taylor, J.W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9: 636-653.
- Li, S.F. y Eger, G. (1978). Characteristics of some *Pleurotus* strains from Florida, their practical and taxonomical importance. *Mushroom Science X* (Part I) Proceedings of the tenth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. France P. 155-168.
- Li, S.F. (1980). Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A contribution to taxonomy and the genetics to the fruiting process. *Biblioteca Mycologica*. J. Cramer. 86p.
- Malik, M. y Vilgalys, R. (1999). Somatic incompatibility in fungi. *In: Structure and dynamics of fungal populations*. (Ed. Worrall, J.J.). Kluwer Academic Public. p123-138.
- Martínez-Carrera, D. (1988). Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala. *Revista Mexicana de Micología* 4:281-286.
- Martínez-Carrera, D., Quirarte, M., Soto, C., Salmenes, D. y Guzmán, G. (1984). Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 19:207-219.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M. y Quirarte, M. (1986). Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Revista mexicana de Micología* 2: 227-238.
- Martínez-Carrera, D. (1999). Cultivation of oyster mushrooms. *In: Oyster mushrooms. McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology 1999*. (Ed. Licker, M. D.). McGraw-Hill, Inc., New York. Pp. 1-6.
- Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra, A., Morales, P. y Sobal, M. (1992). ¿Reconversión en la industria de los hongos? *Tecnoindustria* 7: 52-59.

- Martínez-Carrera, D., Challen, M.P., Smith, J.F.S. y Elliott, T.J. (1995). Homokaryotic fruiting in *Agaricus bitorquis*: A new approach. *In: Science and cultivation of edible fungi*. Balkena Rotterdam, p. 37-44.
- Martínez-Carrera, D. (2002). Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* 14: 61-74.
- Mata, G. y Salmones, D. (2003). Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in México. *Micología Aplicada Internacional* 15(1):23-29.
- Matsumoto, T. y Fukumasa-Nakai, Y. (1995). Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms and phenetic relationships in natural populations of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mycological Research* 99: 562-566.
- May, B. y Royse, D. J. (1988). Interspecific allozymes variation within the fungal genus *Pleurotus*. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 29-36.
- McClelland, M., Mathhieu-Daude, F. y Welsh, J. (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends in Genetics* 11: 242-246.
- McNeil, B. y Harvey, L.M. (1989). *Fermentation a practical approach*. IRL PRESS. N.Y. 226.
- Miller, O.K. (1984). New concepts in our understanding of *Pleurotus*, *Hohenbuehelia* and their allies. *Korean Journal of Mycology* 12:189.
- Moncalvo, J.M., Lutzoni, F. M., Rehner, S. A., Johnson, J. y Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic relationships of agarics fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematics Biology* 49: 278-305.
- Munsell soil color charts. (2000). *Munsell color*. GretagMacbeth N.Y.
- Navarro, M., Sobal, M. y Acosta-Urdapilleta, L. (1996). Estudio comparativo de algunos híbridos de *Pleurotus ostreatus* Morelos, México. *Micología Neotropical Aplicada* 9: 117-124.
- Neda, H. y Nakai, T. (1995). Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial sequences of 18S ADNr and ITS-1. *In: Science and cultivation of edible fungi* (Eds. Elliot, T.). Balkena, Rotterdam, Netherlands. 161-168.
- Nicholl, D.B.G. y Petersen, R.H. (2000). Phenetic plasticity in *Pleurotus djamor*. *Mycotaxon* 76: 17-37.
- Ohira, I. (1990). A revision of the taxonomic status of *Pleurotus citrinopileatus*. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 28:143-150.
- Parag Y. (1967). Genetics of tetrapolar sexuality in higher fungi: the B-factor, common-B heterokaryosis and parasexuality. *Annual report* 15: 48.
- Paran, I. y Michelmore, R.W. (1993). Development of reliable PCR- based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985-993

- Paterson, H.E. H. (1985). The recognition concept of species. In: *Species and speciation*. (Ed. Vrba, E.S.), Transvaal Museum Monograph No. 4: 21-29
- Pegler, D.N. (1977). *Pleurotus* (Agaricales in India). Nepal, Pakistan. Kew Bulletin 31: 501-510.
- Pegler, D. N. (1983). Agaric flora of the Lesser Antilles. Kew Bulletin additional series 9: 1-668.
- Petersen, R. H. y Hughes, K. W. (1993). Intercontinental interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and other species. *Sydowia* 45: 139-152.
- Petersen, R. H. (1995a). Contributions of mating studies to mushroom systematics. *Canadian Journal of Botany* 73: S831-S842.
- Petersen, R. H. (1995b). There's more to a mushroom than meets the eye: Mating studies in the Agaricals. *Mycologia* 87: 1-17.
- Petersen, R. H. y Ridley, G.S. (1996). A new Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. *Mycologia* 88: 198-207.
- Petersen, R.H. y Hughes, K.W. (1999). Species and speciation in mushroom. *Bioscience* 49: 440-452.
- Petersen, R. H. y Hughes, K. W. (2006). Biological species in *Pleurotus*. <http://fp.bio.utk.edu/Mycology/Pleurotusisg.htm>
- Prud'Homme, N. (1965). Somatic recombination in the basidiomycete *Coprinus radiatus*. In: *Incompatibility in Fungi*. (Eds. Esser, K. y Raper, J.R.). Springer-Verlag. 48-52 p.
- Raina, K., Jackson, N. y Chandlee, J.M. (1996). Detection of genetic variation in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates using RAPD analysis. *Mycological Research*. 100:
- Raper, J.R. (1966). *Genetics of sexuality in higher fungi*. New York: Ronald Press Co. 283p.
- Raper, C.A. (1983). Control for development and differentiation of the dikarion in basidiomycetes. In: *Secondary metabolism and differentiation in fungus*. (Eds. Bennet, J.W., Ciegler, A. y Dekker, M.). N.Y. 195-238.
- Raper, C. A. (1985). Strategies for mushroom breeding. In: *Developmental Biology of Higher Fungi*. (Eds. Moore, D., Casselton, L. A., Wood, D. A. y Frankland, J. C.). P. 513-528. Cambridge University Press, Cambridge.
- Raper, J.R., Baxter, M.G. y Ellingboe, A.H. (1960). The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: The A-factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 46: 833-842.
- Ridley, M. (1989). *L'évolution*. Pour la Science Diffusion Belin. París, Francia. 172.
- Roberts, M.A. y Crawford, D. L. (2000). Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2555-2564.

- Rohel, E., Couteaudier, Y., Papierok, B., Cavelier, N. y Dedryver, C.A. (1997). Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPD-PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species. *Mycological Research* 101: 573-579.
- Sagawa, I., Tanaka, M. y Nagata, Y. (1992). Discrimination of mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length polymorphism. *Journal of General and Applied Microbiology* 38:597-603.
- Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R. y Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus* VII. Interacción entre el crecimiento micelital y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 173-176.
- 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, J.E. y Royse, D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* ECOSUR-UTEHA. 290.
- Schrick, K., Garvik, B. y Hartwell, L.H. (1997). Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics* 147: 19-32.
- Shen, Q., Geiser, D.M. y Royse, D.J. (2002). Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates. *Mycologia* 94(3): 472-482.
- Shian-Ren, L. (2000). Evolutionary genetics of speciation in basidiomycetes: genetic studies of reproductive isolation in *Pleurotus djamor/calyptratus* complex. Ph.D. Thesis, Duke University, USA.
- Simchen, G., Stamberg, J. y Koltin, Y. (1969). The origin of the two-locus incompatibility factors in the tetrapolar fungi. *The American naturalist* 103: 399-405.
- Smith, A.H. (1968). Speciation in higher fungi in relation to modern generic concepts. *Mycologia* 60: 742-755.
- Sneath P.H.A. y Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* San Francisco: W.F. Freeman.
- Sobal, M. y Martínez-Carrera, D. (1988). Potencial de entrecruzamiento de diferentes cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*, aisladas a partir de diversos substratos. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 21-27.

- Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Pegler, D.N. y Martínez-Carrera, D. (1997). Cultivation of *Lentinus levis* in México. *Micología Neotropical Aplicada* 10: 63-71.
- Sokal, R.R. (1963). The Principles and practice of numerical taxonomy. *Taxon* 12: 190-199.
- Sweeney, M., Harmey, M.A. y Mitchell, D.T. (1996). Detection and identification of *Laccaria* species using a repeated DNA sequence from *Laccaria proxima*. *Mycological Research* 100(12): 1515-1521.
- Swofford, D.L. (2000). *PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Templeton, A.R. (1989). The meaning of species and speciation: a genetic perspective 131-156. *In: Speciation and its consequences*. (Eds. Otte, D. y Endler, J.A.). Sinauer Associates, Inc.
- Thompson, J., Gibson, D., Plewniak, T.J., Jeanmougin F. y Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Thorn, R.G., Moncalvo, J.M., Reddy, C.A. y Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid–lentinoid fungi. *Mycologia* 92, 241–252.
- Valencia, G., Garín, M.E., Jiménez, J. y Leal-Lara, H. (2001-2003). Producción de cepas coloridas de *Pleurotus* spp. En sustrato estéril y pasteurizado. *Revista Mexicana de Micología* 17: 1-5.
- Vilgalys, R., y Johnson, J.L. (1987). Extensive Genetic Divergence Associated with Speciation in Filamentous Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84:2355-2358.
- Vilgalys, R., Hopple, J. y Hibbett, D.S. (1991). Phylogenetic implications of generic concepts un fungal taxonomy: The impact of molecular systematics studies. *In: Generic concepts in Mycology*. (Ed. Herbbette, A). Symposium in Lausanne. P. 73-90.
- Vilgalys, R., Smith, A. y Lin-Sun, B. (1993). Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Canadian Journal of Botany* 71: 113-128.
- Vilgalys, R., Smith, A. y Sun, B.L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Evolution* 91: 4599-4603.

- Vilgalys, R., Moncalvo, J.M., Liou, S.R. y Volovsek, M. (1996). Recent advances in molecular Systematics of the genus *Pleurotus*. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products* (eds. D.J. Royce). Penn State Univ. P. USA. 91-101.
- Villa-Cruz, V.G., Huerta, G. y Sánchez, J.E. (1999). Solid fermentation of a corn cob-coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micología Neotropical Aplicada* 11: 67-74.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press. USA. 315-332.
- Wiley, E.O., Siegel-Causey, D., Brooks, D.R. y Funk, V.A. (1991). The complete cladist a primer of phylogenetic procedures. Special publication No. 19. The University of Kansas Museum of Natural History. 158 p.
- Zadrazil, F. (1974). The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom science* IX, part 1. 621-652.
- Zervakis, G. (1998). Mating competence and biological species within the subgenus *Coremiopleurotus*. *Mycologia* 90:1063-1074.
- Zervakis, G. y Labarère, J. (1992). Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *Journal of General Microbiology* 138: 635-645.
- Zervakis G., Sourdís, J. y Balis, C. (1994). Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research* 98: 329-341.
- Zervakis, G. y Balis, C. (1995). Incompatibility alleles and mating behavior between and within *Pleurotus* species. In: *Science and cultivation of edible fungi*. (Ed. Elliott, T.J.). Balkema Rotterdam. 53-62
- Zervakis, G. y Balis, C. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100: 717-731.
- Zervakis G.I., Moncalvo, J.M. y Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology* 150:715-26.
- Zhong, S. y Steffenson, B.J. (2001). Genetic and molecular characterization of mating type genes in *Cochliobolus sativus*. *Mycologia* 93: 852-863.
- Zolan, M.E. y Pukkila, P.J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.