



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"MEJORAMIENTO GENÉTICO DE HONGOS COMESTIBLES
A PARTIR DE NEOHAPLONTES DE *Pleurotus eryngii*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

CECILIA MARROQUÍN CORONA



MÉXICO, D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Profra. María de los Ángeles Valdivia López
Vocal	Prof. Hermilo Leal Lara
Secretario	Profra. Rebeca Ramírez Carrillo
1er. Suplente	Profra. Gloria Díaz Ruiz.
2º. Suplente	Prof. Jorge Arturo Aburto Anell.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema:

M en B. Rebeca Ramírez Carrillo.

Sustentante:

Cecilia Marroquín Corona

Agradecimientos

A la Universidad nacional Autónoma de México por la maravillosa experiencia de ser parte de ella.

A la Facultad de Química por ser mi segundo hogar durante estos años. Gracias porque durante mi formación universitaria aprendí que triunfar es una decisión propia. Por enseñarme a ver cada problema como la oportunidad de encontrar una solución.

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 de las AAPAUNAM por el apoyo brindado a través de la Cátedra "Raúl Cetina Rosado".

A la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo por el apoyo, esmero y dedicación en realización de este proyecto. Rebe, gracias por el cariño, por los consejos y abrazos brindados. Por ser una luz en el camino... Gracias por tu amistad.

Al Dr. Hermilo Leal por todo el apoyo e interés en la realización de este trabajo. Gracias por la oportunidad de aprender un poquito de usted, por su cariño y consejos.

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia por sus comentarios, aportaciones y por el tiempo dedicado a la revisión y mejora de este trabajo.

Mary gracias por ser mi inspiración y motivo para ser mejor persona, gracias por tu amor, paciencia y cuidados, pero sobre todo por ser mi hermana y mi mejor amiga.

Abuelita gracias por su apoyo y cariño, Papá gracias por confiar y creer en mi...

Adrix gracias por ser mi cómplice, por hacer divertido cada instante compartido, por tu cariño y tu fabulosa amistad.

Jessi gracias por confiar y creer en mi, gracias por recordarme que cada día es una oportunidad para ser feliz, pero sobre todo gracias por ser mi amiga.

A mis amigos: Kiko, Jair, Gaby, Orquidea, Vale, Priss, Ery, Zoi, Arce, Alfredo, Chente, Lalo, Susta, Saúl y Neri por compartir sonrisas, lágrimas, desvelos y reventones, pero sobre todo por su grandiosa amistad.

Carlos, gracias por todos los hermosos momentos vividos, por las sonrisas y locuras compartidas, por estos cuatro años que dejan en mi vivencias inolvidables....*TK*-CC-

Cecilia Marroquín Corona

Dedicatoria

A las personas más importantes de mi vida: Carmen y Mary este logro es debido a ustedes, a su amor, confianza y apoyo incondicionales.



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	6
3.1 ¿Qué son los hongos?	6
3.2 Taxonomía	6
3.3 Morfología	6
3.4 Nutrición	7
3.5 Reproducción de hongos de tipo tetrapolar heterotálicos (<i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i>)	9
3.6 Patrones de sexualidad: homotalismo y heterotalismo	10
3.6.1 Compatibilidad bifactorial y tetrapolar	11
3.7 Control genético del desarrollo del esporóforo	12
3.8 El hongo comestible <i>Pleurotus eryngii</i>	13
3.8.1 Nombres comunes y científico	13
3.8.2 Clasificación científica	13
3.8.3 Distribución	13
3.8.4 Descripción	13
3.8.5 Hábitat	14
3.8.6 Recolección	14
3.8.7 Usos culinarios	14
3.8.8 Cultivo de <i>P. eryngii</i>	14
3.9 El hongo comestible <i>Pleurotus</i> spp.	15
3.9.1 Nombres comunes y científico	15
3.9.2 Clasificación científica	15
3.9.3 Descripción	16
3.9.4 El cultivo de <i>Pleurotus</i>	16
3.10 El hongo comestible <i>Lentinula edodes</i>	17
3.10.1 Nombres comunes y científico	17
3.10.2 Clasificación científica	17
3.10.3 Descripción	17
3.10.4 Propiedades terapéuticas	17
3.10.5 Técnicas de cultivo	18
3.10.5.1 Cultivo tradicional sobre troncos	18
3.10.5.2 Cultivo en bolsas de aserrín	18
3.11 Mejoramiento genético de hongos comestibles	19
3.11.1 Recuperación de la progenie meiótica	20
3.11.2 Desdicarriotización	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos particulares	23
6. HIPÓTESIS	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1 Material biológico	26
7.2 Preparación de medios de cultivo	26
7.2.1 Solución de extracto de malta	26
7.2.2 Medio de agar extracto de malta	26
7.2.3 Soluciones desdicarriotizadoras	27
7.3 Procedimiento para la desdicarriotización de la cepa de <i>P. eryngii</i>	27
7.3.1 Preparación del inóculo para la desdicarriotización	27
7.3.2 Desdicarriotización de la cepa de <i>P. eryngii</i>	27
7.3.3 Clasificación de los neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad	28



7.3.4	Resiembra de neohaplotentes de <i>Lentinula edodes</i> y monocariotes de <i>Pleurotus</i> spp.	28
7.3.5	Cepas monocariotes y neohaplotentes de <i>Pleurotus</i> spp. solicitadas a otras instituciones de investigación.....	29
7.3.6	Resiembra de cepas dicarióticas para apareamientos di-mono.	30
7.4	Producción de híbridos.....	31
7.4.1	Cruza de neohaplotentes de <i>P. eryngii</i> con monocariotes de <i>Pleurotus</i> spp. y neohaplotentes y de <i>L. edodes</i>	31
7.4.1.1	Revisión microscópica y aislamiento de dicariotes.	31
7.4.2	Cruza de neohaplotentes de <i>P. eryngii</i> con monocariotes de <i>P. pulmonarius</i> y neohaplotentes de <i>P. ostreatus</i>	31
7.4.3	Cruza dicarion – monocarion (di-mono) entre cepas dicarióticas de <i>P. ostreatus</i> y neohaplotentes de <i>P. eryngii</i>	31
7.4.3.1	Revisión microscópica y aislamiento de dicariotes obtenidos por cruzas di-mono.	32
7.5	Evaluación del crecimiento micelial de las cepas híbridas, parentales y reconstituida de los géneros <i>Pleurotus</i> y <i>Lentinula</i>	32
7.6	Fructificación de las cepas híbridas, parentales y reconstituidas de los géneros <i>Pleurotus</i> y <i>Lentinula</i>	32
7.6.1	Preparación del inóculo de grano	32
7.6.2	Preparación de sustratos para la fructificación.	33
7.6.3	Fructificación.....	34
7.7	Análisis estadístico de resultados	34
8.	RESULTADOS	35
8.1	Desdicarionización de la cepa de <i>P. eryngii</i>	35
8.2	Clasificación de los neohaplotentes en los dos tipos de compatibilidad	46
8.3	Obtención de híbridos.....	48
8.3.1	Apareamientos entre neohaplotentes de <i>P. eryngii</i> y neohaplotentes de <i>L. edodes</i>	48
8.3.1.1	Fructificación de los híbridos de <i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>Lentinula</i> con morfología de <i>Lentinula</i>	48
8.3.1.2	Fructificación de los híbridos de <i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i> con morfología de <i>Lentinula</i>	49
8.3.1.3	Fructificación de los híbridos de <i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>Lentinula</i> con morfología de <i>P. eryngii</i>	53
8.3.1.4	Fructificación de los híbridos de <i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i> con morfología <i>P. eryngii</i>	53
8.3.2	Apareamientos entre neohaplotentes de <i>P. eryngii</i> y cepas monocarióticas y neohaplotentes de <i>Pleurotus</i> spp.	57
8.3.3	Apareamientos de tipo di-mono (dicarion–monocarion) entre cepas dicarióticas de tipo comercial de <i>Pleurotus</i> spp. y los neohaplotentes obtenidos de <i>P. eryngii</i>	57
8.3.3.1	Fructificación de los híbridos de <i>P. eryngii</i> x <i>Pleurotus</i> spp. en sustrato de <i>P. eryngii</i>	58
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
9.1	Desdicarionización de la cepa de <i>P. eryngii</i> y clasificación de neohaplotentes en los dos tipos de compatibilidad.	70
9.2	Obtención de híbridos.....	70
10.	CONCLUSIONES	73
ANEXO 1.	Análisis estadístico para la evaluación del crecimiento micelial.....	74
ANEXO 2.	Análisis estadístico de la eficiencia biológica total de las cepas híbridas.....	78
11.	REFERENCIAS	82



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Neohaplontes de <i>Lentinula edodes</i> utilizados para la obtención de híbridos	28
Tabla 2.	Cepas monocarióticas de <i>Pleurotus</i> spp.	29
Tabla 3.	Cepas del género <i>Pleurotus</i> solicitadas a UPIBI y ECOSUR	29
Tabla 4.	Cepas dicarióticas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	30
Tabla 5.	Composición de los sustratos utilizados en la etapa de fructificación de las cepas híbridas, reconstituidas y parentales de <i>P. eryngii</i> y <i>L. edodes</i>	33
Tabla 6.	Condiciones experimentales para la desdicariorización de una cepa comercial de <i>P. eryngii</i> (experimentos 1 y 2).....	36
Tabla 7.	Condiciones experimentales para desdicariorización de una cepa comercial de <i>P. eryngii</i> (experimentos 3-6).	38
Tabla 8.	Condiciones experimentales para la desdicariorización una cepa comercial de <i>P. eryngii</i> (experimentos 7 y 8).....	40
Tabla 9.	Condiciones experimentales para la desdicariorización de la cepa comercial de <i>P. eryngii</i> (experimentos 8-10).	41
Tabla 10.	Condiciones óptimas de desdicariorización de la cepa comercial de <i>P. eryngii</i> (experimentos 11 y 12).	44
Tabla 11.	Experimentos y condiciones donde se dio la recuperación de neohaplontes	45
Tabla 12.	Cruzas de los neohaplontes para su clasificación en tipos de compatibilidad	47
Tabla 13.	Resultados de la prueba de χ^2 para determinar la frecuencia de recuperación entre ambos tipos de neohaplontes (nh1 y nh2)	47
Tabla 14.	Cruzas de neohaplontes de <i>Pleurotus eryngii</i> y <i>Lentinula edodes</i>	50
Tabla 15.	Eficiencia biológica total de las cepas híbridas con fenotipo de <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>Lentínula</i> y <i>P. eryngii</i>	50
Tabla 16.	Características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i>) con fenotipo de <i>L. edodes</i>	51
Tabla 16.1	Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i>) con fenotipo de <i>L. edodes</i>	52
Tabla 17.	Eficiencia biológica de cepas híbridas con fenotipo de <i>P. eryngii</i> en sustrato de <i>Lentínula</i> y <i>P. eryngii</i>	54
Tabla 18.	Características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i>) con fenotipo de <i>P. eryngii</i>	55
Tabla 18.1	Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> x <i>L. edodes</i>) con fenotipo de <i>P. eryngii</i>	56
Tabla 19.	Cruzas Di- mono	60
Tabla 20.	Eficiencia biológica de las cepas híbridas con fenotipo de <i>Pleurotus</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>	60
Tabla 21.	Total de híbridos obtenidos	61
Tabla 22.	Cepas parentales de <i>P. eryngii</i> y <i>Pleurotus</i> spp.	62
Tabla 22.1	Cepas parentales de <i>Pleurotus</i> spp.	63
Tabla 22.2	Cepas parentales de <i>Pleurotus</i> spp y <i>Lentínula edodes</i>	64
Tabla 23.	Características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> / <i>Pleurotus</i> spp.) con fenotipo de <i>Pleurotus</i>	65
Tabla 23.1	Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> / <i>Pleurotus</i> spp.) con fenotipo de <i>Pleurotus</i>	66
Tabla 23.2	Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> / <i>Pleurotus</i> spp.) con fenotipo de <i>Pleurotus</i>	67
Tabla 23.3	Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> / <i>Pleurotus</i> spp.) con fenotipo de <i>Pleurotus</i>	68
Tabla 23.4	Quinta parte de características morfológicas de las cepas híbridas (<i>P. eryngii</i> / <i>Pleurotus</i> spp.) con fenotipo de <i>Pleurotus</i>	69
Tabla 24.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC9, CP50 y PeC9/CP50.....	75
Tabla 24.1	Prueba Duncan para el híbrido PeC9/CP50 y sus respectivas cepas parentales en función de su crecimiento micelial.	75
Tabla 25.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC11, CP50 y PeC11/CP50.	76



Tabla 25.1	Prueba Duncan para crecimiento micelial del híbrido PeC11/CP50 y sus respectivas cepas parentales.	76
Tabla 26.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC12, CP253 y PeC12/CP253.....	76
Tabla 26.1	Prueba Duncan para crecimiento micelial del híbrido híbrido PeC12/CP253 y sus respectivas cepas parentales.	77
Tabla 27.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 6 cepas híbridas y 4 parentales con fenotipo de <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>Lentinula</i>	78
Tabla 27.1	Prueba Duncan para clasificar las 6 cepas híbridas y 4 parentales híbridas (con fenotipo de <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>Lentinula</i>) de acuerdo a su eficiencia biológica total.	78
Tabla 28.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) de 6 cepas híbridas con fenotipo de <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>	78
Tabla 28.1	Prueba Duncan para clasificar las 6 cepas híbridas (con fenotipo de <i>L. edodes</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>) de acuerdo a su eficiencia biológica total.	79
Tabla 29.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 6 cepas híbridas con fenotipo de <i>P. eryngii</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>	79
Tabla 29.1	Prueba Duncan para clasificar las 5 cepas híbridas y 1 parental (con fenotipo de <i>P. eryngii</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>) de acuerdo a su eficiencia biológica total.	79
Tabla 30.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 5 cepas híbridas y 1 parental con fenotipo de <i>P. eryngii</i> en sustrato de <i>Lentinula</i>	80
Tabla 30.1	Prueba Duncan para clasificar las 5 cepas híbridas y 1 parental (con fenotipo de <i>P. eryngii</i> en sustrato de <i>Lentinula</i>) de acuerdo a su eficiencia biológica total.	80
Tabla 31.	Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (8 semanas de cosecha) entre 19 cepas híbridas y 8 cepas parentales con fenotipo de <i>Pleurotus</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>	80
Tabla 31.1	Prueba Duncan para clasificar las 19 cepas (con fenotipo de <i>Pleurotus</i> en sustrato de <i>P. eryngii</i>) de acuerdo a su EB total.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del cuerpo fructífero de un hongo macroscópico (kalipedia, 2008).	7
Figura 2.	Ciclo reproductivo de hongos tipo tetrapolar heterotálicos (Starr, 2008).	10
Figura 3.	Papel de los genes de factores de incompatibilidad A y B en la regulación y mantenimiento del dicarion (Valencia del Toro, 2002).	12
Figura 4.	Diagrama general para llevar a cabo el mejoramiento genético de cepas de hongos comestibles a partir de neohaplontes de <i>P. eryngii</i>	25



1. RESUMEN

El hongo comestible *Pleurotus eryngii*, también conocido como trompeta real o seta de cardo, posee un estípite sumamente grueso, carnoso, no correoso y con características sensoriales muy agradables, además combina con una gran variedad de alimentos. Es un hongo que ha adquirido popularidad debido a su sabor y textura y por ser superior en calidad a los hongos tradicionalmente cultivados en el país (champiñón y setas).

Por las características mencionadas, se realizó un programa de mejoramiento genético con el propósito de obtener nuevas cepas (híbridos) entre *P. eryngii* y cepas comerciales de diferentes géneros y especies (*Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes*). Como resultado se pretende proveer al mercado nacional y al consumidor de material novedoso, con características sensoriales más aceptables en el estípite y píleo.

Así una cepa comercial de *P. eryngii*, fue sometida al efecto de una solución desdicarizante (glucosa-peptona) con lo cual se recuperaron e identificaron los dos componentes monocarióticos o neohaplontes (nh1 y nh2). Éstos se aparearon con neohaplontes de *L. edodes*, obteniéndose 11 híbridos; por apareamientos dicarion-monocarion entre cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. con neohaplontes de *P. eryngii* se obtuvieron 28 híbridos.

Posteriormente se evaluó el desarrollo micelial en AEM de las cepas híbridas, así como de sus respectivas cepas parentales para seleccionar las cepas que se llevaron a fructificación. Un total de 29 cepas híbridas y 10 cepas parentales se fructificaron para evaluar su eficiencia biológica total después de 8 y 12 semanas de producción. Se observaron las características morfológicas de las 29 cepas híbridas evaluadas, 11 se probaron en el sustrato de *P. eryngii* y en el de *L. edodes* y las 18 cepas restantes sólo se evaluaron en sustrato de *P. eryngii*.

Como resultado del análisis estadístico se observó que la mayoría de las cepas híbridas produjo mayor rendimiento que sus correspondientes cepas parentales. Con respecto a la morfología de las cepas se observó que los híbridos con fenotipo de *Lentinula* produjeron mayores rendimientos en el sustrato de *Lentinula*. Para los híbridos con fenotipo de *P. eryngii* dos produjeron mayores rendimientos en el sustrato de *eryngii* y dos en el sustrato de *Lentinula*, siendo en este sustrato donde uno de ellos rebasó el 100% de EB. En general se observó que las cepas híbridas produjeron EB mayores al 100%, lo cual las hace aptas para su uso a escala comercial.



2. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los ecosistemas. Entre ellos las especies comestibles gozan de especial importancia desde tiempos remotos y en los últimos años su consumo se ha incrementado paulatinamente por sus características sensoriales, así como sus propiedades nutrimentales.

La producción de hongos comestibles inició como una auténtica biotecnología tradicional, basada en técnicas sencillas de propagación hace aproximadamente 1000-1400 años en China con el cultivo empírico de "las orejas de ratón" (*Auricularia* spp.) y shiitake (*Lentinula edodes*). El cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus*) de manera similar comenzó hace más o menos 350 años en Francia.

A través del tiempo ha sido posible la incorporación y desarrollo de tecnologías que han mejorado sustancialmente la producción comercial, no sólo de los hongos comestibles mencionados, sino también de especies potencialmente cultivables, como *Pleurotus* (Chang y Miles, 2004; Martínez-Carrera, 2002).

En México el cultivo de los hongos comestibles tuvo sus inicios en 1933 con la especie *Agaricus bisporus*, y hasta 1974 se empezó de manera formal con la producción de *Pleurotus* spp., conocido comercialmente con el nombre de seta (Martínez-Carrera *et al.*, 1990). El champiñón y las setas son los hongos comestibles que en la actualidad más se consumen y cultivan en nuestro país.

Hoy en día la producción comercial de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es aproximadamente 47,468 toneladas anuales. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez Carrera, 2002; Martínez Carrera *et al.*, 2006).

Además de las diferencias entre los métodos de cultivo y/o composición de los sustratos, la selección de genotipos adaptados a sustratos es un camino para mejorar la producción de los diferentes hongos comestibles (setas y shiitake) con el fin de obtener cepas altamente productivas, propias para la producción a escala comercial y



desarrollar información acerca de la adaptación del hongo a sustratos lignocelulósicos específicos (Silva *et al.*, 2005). La selección de los genotipos puede lograrse mediante un programa de mejoramiento genético.

Aunque actualmente hay un auge en el uso de técnicas modernas de ingeniería genética (biología molecular) para programas de mejoramiento genético, en el caso de los hongos comestibles se presenta la dificultad de que son organismos complejos con una amplia gama de características, muchas de las cuales están bajo el control de varios genes. Por tal motivo la mayoría de los programas de mejoramiento genético para hongos comestibles se basan en el sistema natural de recombinación genética producido por el apareamiento de micelios monocarióticos compatibles. El propósito del entrecruzamiento es combinar las características presentes en cepas distintas mediante cruas controladas, para obtener así cepas cuyo genoma posiblemente les permitirá expresar las características de las cepas seleccionadas (Sonnenberg *et al.*, 2005).

En general, existen dos formas de lograr un mejoramiento genético siguiendo este principio: 1) Aislamiento de la progenie meiótica (esporada) y 2) Desdicarizotización (obtención de componentes monocarióticos).

a) Aislamiento de la progenie meiótica. Este método consiste en recolectar las esporas producidas por los esporóforos de las cepas de interés y con aquellas compatibles realizar apareamientos. La gran desventaja de este método radica en la variabilidad genética de las esporas por ser producto de la fusión nuclear y segregación a partir del proceso de meiosis. La literatura reporta que mediante esta metodología los híbridos casi nunca superan los rendimientos de las cepas parentales (Gaitán, 2000; Salmones *et al.*, 2004). Valencia del Toro (2002) reporta 11 cepas híbridas de *Pleurotus* obtenidas por este método. Las híbridos presentaron esporóforos de coloraciones novedosos, pero sus rendimientos fueron bajos (40.9 - 76.3%) lo cual no hace atractivas a las cepas obtenidas para su uso comercial.

Por otra parte Andrade (2007) realizó un mejoramiento genético a cepas de *Lentinula edodes*, obteniendo híbridos con bajos rendimientos (6-85%). La morfología que presentaron los híbridos fue anormal y no característica del género *Lentinula*. Por ello, como los híbridos no presentaron características fenotípicas de interés comercial para



L. edodes el autor concluyó que este método de mejoramiento genético no es el más adecuado para la obtención de cepas mejoradas de hongos comestibles.

b) Desdicariorización: es la separación artificial de un dicariote en sus componentes monocarióticos, que se caracterizan por su micelio sin fíbulas, el cual se denomina neohaplonte. La desdicariorización puede efectuarse por métodos mecánicos y químicos, la segunda emplea sustancias de alta toxicidad como taurocolato de sodio, ácido cólico o soluciones de peptona con glucosa que permiten la recuperación de neohaplontes (Arteaga *et al.*, 1996). El efecto desdicariorizante de las soluciones de glucosa-peptona se atribuye a la presencia de algún compuesto producido durante la esterilización de la solución desdicariorizante pero no se conoce con certeza el mecanismo que provoca la desdicariorización de micelios dicarióticos. La ventaja de este método radica en que la información genética de una cepa se encuentra intacta en los dos monocariotes recuperados, lo cual facilita el proceso de mejoramiento genético.

En trabajos previos donde se empleó esta técnica para el mejoramiento genético de *Pleurotus* spp. se reportan cinco cepas híbridas a partir de tres cepas parentales (IE200, IE201 y IE202) de las cuales sólo dos superaron en EB a una de sus cepas parentales y una de ellas presentó una EB cercana al 100% (Valencia del Toro, 2002).

Por otra parte Ramírez *et al.* (2002) realizaron un trabajo de mejoramiento genético de *Lentinula edodes* con cepas del género *Pleurotus* y obtuvieron 34 híbridos con EB muy variables (7 al 161%). De estos híbridos, 11 presentaron EB mayores al 100% lo cual las hace atractivas para su producción comercial. Sin embargo en dicho trabajo no se logró la expresión de las características fenotípicas de *L. edodes*. Los resultados de todos los trabajos previos de mejoramiento genético a partir de neohaplontes permiten confirmar la eficiencia de este método para obtener cepas mejoradas.

En México se han conseguido ciertos logros en la producción de hongos comestibles pero todavía hay gran hermetismo y una gran cantidad de retos para contribuir a mejorar la industria y adoptar nuevas tecnologías.

Por todo lo anterior y dado que el incremento a nivel mundial y nacional del cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* lo coloca como el segundo hongo más



cultivado, tanto a nivel nacional como internacional, existe la necesidad de desarrollar tecnologías para su mejoramiento genético, con la finalidad de obtener cepas comerciales que permitan ofrecer al consumidor un alimento con atributos comerciales de calidad y al productor contar con cepas de alta calidad que garanticen elevados rendimientos en la producción, en tiempos cortos. Los programas de mejoramiento genético por medio de técnicas tradicionales pueden ser una alternativa viable para proveer de material novedoso al mercado nacional.

Por otro lado *Pleurotus eryngii* es un hongo con creciente interés para su cultivo y comercialización por el mercado nacional como producto gourmet, ya que posee un estípite sumamente grueso, carnoso y con características sensoriales muy agradables, mientras que *P. ostreatus* presenta un estípite corto y de consistencia correosa. Por lo tanto, con base en técnicas tradicionales de mejoramiento genético, se planteó la obtención de híbridos entre ambas cepas, para evaluar si las características organolépticas del estípite y píleo pueden ser mejoradas, buscando con ello la obtención de híbridos con diferentes texturas, tamaños y formas en estípite y píleo, contribuyendo así al mejoramiento genético del género.

Por otra parte la obtención de híbridos entre las especies *Pleurotus* y *Lentinula* probablemente pueda proveer la obtención de setas novedosas, cuya morfología presente características organolépticas aceptables, y que posiblemente posean algunas propiedades terapéuticas (antitumorales, hipocolesterolémicas y antivirales), como las que presenta shiitake.



3. ANTECEDENTES

3.1 ¿Qué son los hongos?

Los hongos son organismos eucarióticos, no poseen clorofila, son típicamente filamentosos y se reproducen por esporas. La pared celular de la mayoría de las especies está compuesta de quitina combinada con otros glúcidos complejos, entre los que se encuentra en ocasiones la celulosa. Como tales son incapaces de sintetizar sus nutrimentos y por consiguiente, llevan una vida saprófita (viven sobre materia orgánica muerta), parásita (provocan enfermedades en plantas, animales y el hombre) o micorrizica (requiere un efecto simbiótico con las raíces de árboles) (Martínez-Carrera *et al.*, 1990).

3.2 Taxonomía

Los hongos se clasifican en dos grandes grupos o divisiones: los *Myxomycota* y los *Eumycota*. El primero se refiere a ciertos hongos gelatinosos en sus primeras fases y polvorientos en sus fases adultas, los *Eumycota* son los hongos verdaderos, éstos se dividen en cinco subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina.

El grupo Mastigomycotina incluye todos los hongos que producen esporas flageladas móviles (zoosporas) y sus hifas son no septadas. El grupo Zygomycotina no presenta esporas flageladas móviles, las esporas sexuales se forman dentro de una célula llamada esporangio y sus hifas carecen de septos. Los hongos del grupo Deuteromycotina se diferencian por no tener reproducción sexual incluye a todos los hongos que rara vez presentan una etapa sexual, o bien se desconoce ésta, los del grupo Ascomycotina producen sus esporas en estructuras especializadas denominadas ascos y los hongos del grupo Basidiomycotina se caracterizan por tener basidios en los cuales se forman sus esporas sexuales (Deacon, 1988).

3.3 Morfología

La mayoría de las especies de hongos está constituida por filamentos largos y delgados llamados hifas, en la mayoría de los casos, las hifas se ramifican y entrelazan formando una estructura filamentosa denominada micelio.



Los hongos se agrupan en microscópicos y macroscópicos dependiendo de si presentan o no cuerpos fructíferos visibles a simple vista, cuyo nombre es esporóforo o carpóforo (Deacon, 1988).

Un esporóforo macroscópico está formado por un pie o estípite, que sostiene un píleo o sombrero, y que algunas veces emerge de una cazoleta basal (volva). Las láminas son estructuras foliáceas dispuestas de forma radial desde el margen hacia el estípite y cubiertas de basidios por ambas caras; el conjunto de basidios dispuestos en las láminas membranáceas constituyen el himenio. Algunos hongos poseen un anillo alrededor del estípite por debajo del margen del píleo como se muestra en Figura 1 (Wainwright, 1992).

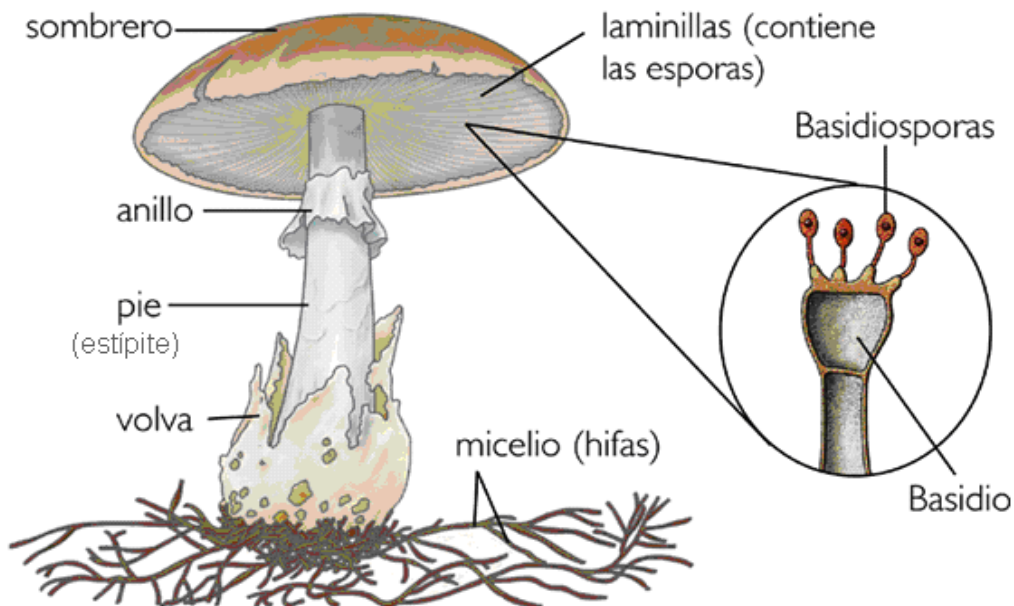


Figura 1. Esquema del cuerpo fructífero de un hongo macroscópico (kalipedia, 2008).

3.4 Nutrición

Los hongos están considerados generalmente como quimioheterótrofos estrictos, son incapaces de realizar la fotosíntesis y por consiguiente necesitan sustratos ricos en energía para la biosíntesis. Las moléculas orgánicas más simples como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, se obtienen a través de la membrana celular. Sin embargo, las moléculas más complejas como los disacáridos, deben degradarse en el exterior de la célula por medio de enzimas extracelulares, principalmente hidrolasas y oxidasas (Deacon, 1988).



Los carbohidratos de origen vegetal constituyen la fuente de energía más abundante para los hongos en la naturaleza, casi todos utilizan glucosa, maltosa, sacarosa, almidón, quitina, lignina, hemicelulosa y celulosa. Sin embargo, la celulosa es el polímero más disponible para los hongos en una amplia gama de ecosistemas.

La degradación de las celulosas se lleva a cabo por dos enzimas producidas comúnmente por los hongos: la endo- β -glucanasa y la β -glucosidasa, la primera rompe las cadenas de celulosa produciendo varias moléculas (como la celobiosa y la celotriosa), mientras que la β -glucosidasa hidroliza los enlaces de las moléculas producidas por la glucanasa para dar glucosa, la cual es asimilada por la célula. La celulosa en forma cristalina requiere una tercera enzima, la exo- β -glucanasa, que separa unidades sucesivas de celobiosa de los extremos de las cadenas de celulosa, es una enzima de frecuencia mucho más restringida, pues son pocos los hongos que la producen, entre éstos se encuentran los ascomicetes y los basidiomicetes (Deacon, 1988).

Con respecto a los requerimientos de nitrógeno, se puede generalizar que todos los hongos utilizan aminoácidos, la mayoría puede utilizar amonio y unos cuantos pueden utilizar nitrato, presentando una preferencia marcada por el amonio. Otras fuentes incluyen urea, hidroxilamina, L-aminoácidos y péptidos; siendo los D-aminoácidos fuentes pobres de nitrógeno y en ciertos casos tóxicos. Dada una fuente de carbono adecuada, muchos hongos crecen con nutrientes orgánicos simples, ya que pueden sintetizar los constituyentes celulares necesarios a partir de nitrógeno inorgánico, fósforo, potasio, azufre, etc. (Wainwright, 1992).



3.5 Reproducción de hongos de tipo tetrapolar heterotálicos (*Lentinula* y *Pleurotus*)

Cuando el micelio de un hongo ha acumulado suficientes nutrientes, se forman unos pequeños nudos hifales o primordios del basidiocarpo (en la periferia de la colonia), los cuales al desarrollarse forman diminutos esporóforos, cuyos tejidos se expandirán rápidamente dando lugar a la formación de los esporóforos. Estas fructificaciones son el resultado de los procesos de reproducción sexual del hongo y constituyen los cuerpos reproductores, en los que el hongo forma las esporas que constituyen la semilla de dispersión del hongo. Las esporas son de origen sexual, y pueden ser microscópicas o macroscópicas, en el caso de los basidiomicetos, las esporas son sexuales (Deacon, 1988).

Cuando las basidioesporas caen sobre el sustrato adecuado, germinan produciendo hifas que al ramificarse integrarán el micelio. El micelio originado por una espora produce micelio de tipo monocariótico (un solo núcleo). Cuando el micelio monocariótico o primario, se fusiona con otro micelio primario compatible se produce un micelio dicariótico o secundario, cuyas células tendrán dos núcleos cada una. Esta unión sexual se llama plasmogamia y constituye el primer paso en la reproducción sexual del hongo. En donde los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común. Las fíbulas constituyen la huella del intercambio nuclear entre las células, es decir ha ocurrido la plasmogamia, ya que una fíbula aparece debido a un intercambio nuclear y es consecuencia de la conjugación del micelio monocariótico para originar el micelio dicariótico. En un principio se origina como una pequeña ramificación en el extremo de una hifa en crecimiento para posteriormente curvarse en forma de gancho (Deacon, 1988). A partir del micelio secundario se forman los cuerpos fructíferos, en su himenio se forman los basidios, en los que antes de madurar, se lleva a cabo la cariogamia (fusión nuclear) segunda etapa importante, que es la fusión nuclear definitiva de los dos núcleos que aparentemente se unieron en la plasmogamia. El núcleo del cigoto resultante sufre rápidamente una meiosis (tercera etapa) en la cual los genes de tipo reproductivo y los que controlan otras características, se segregan en los cuatro núcleos hijos resultantes. Es decir ocurre la recombinación genética. El basidio tetranucleado produce cuatro extensiones tubulares denominadas esterigmas cuyos ápices se expanden formando las esporas, finalmente los núcleos haploides migran a través de los esterigmas hacia las basidiosporas.



Los hongos son haploides en casi todo su ciclo de vida (desarrollo micelial y producción de fructificaciones), únicamente la célula formada en la cariogamia es diploide. Sin embargo, dicha célula con núcleo diploide se divide inmediatamente formando cuatro células haploide o basidiosporas (Deacon, 1988).

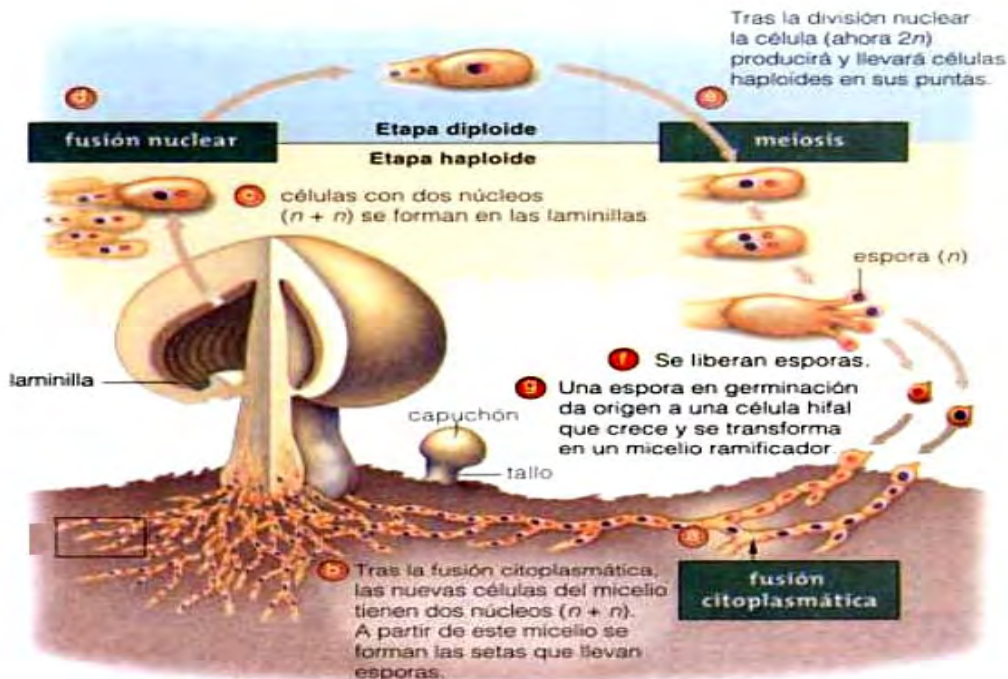


Figura 2. Ciclo reproductivo de hongos tipo tetrapolar heterotálicos (Starr, 2008).

3.6 Patrones de sexualidad: homotalismo y heterotalismo

Después de la cariogamia el patrón de sexualidad de los hongos puede ser homotálico o heterotálico. El patrón de sexualidad homotálico u homotalismo es la condición sexual de los hongos, en la que la conjugación se realiza entre el micelio de un sólo individuo, es decir la estructura fructífera es producida por un sólo micelio monospórico. Existen dos tipos de homotalismo entre especies autofértiles:

- Homotalismo primario: las esporas que originaron el micelio son uninucleadas y compatibles entre sí, tiene la posibilidad de progresar a través de heterocariosis a la culminación del ciclo sexual.
- Homotalismo secundario: se establece a partir de una espora que tiene dos núcleos meióticos de diferentes tipos de apareamiento compatibles entre sí y son capaces de formar un micelio secundario (Guzmán *et al.*, 2002).



El heterotalismo se refiere a la formación de micelio secundario a través de dos individuos, puede haber heterotalismo unifactorial o bifactorial, según exista uno o dos juegos de caracteres genéticos.

El heterotalismo unifactorial, tiene como producto final cuatro esporas uninucleadas, con un sólo carácter genético cada una; en el heterotalismo bifactorial, las cuatro esporas uninucleadas formadas poseen un juego de caracteres genéticos, ya que hay cuatro genes ($A_1, A_2; B_1, B_2$) en dos cromosomas controlando los tipos reproductivos, por consiguiente en cada basidio hay cuatro basidiosporas de tipos distintos ($A_1B_1, A_2B_2, A_1B_2, A_2B_1$). Para que tenga lugar la reproducción sexual es necesario que se encuentre dos tipos compatibles (Guzmán *et al.*, 1993).

3.6.1 Compatibilidad bifactorial y tetrapolar

La compatibilidad bifactorial está controlada por un sólo factor, que suele ser denominado factor **A**, dispuesto en un par de cromosomas homólogos que necesitan unirse durante la reproducción sexual, para formar el par de genes alelos o alelomorfos compatibles, A_1A_2 . Los otros tipos de unión (A_1A_1, A_2A_2) son incompatibles y por lo tanto estériles.

La compatibilidad tetrapolar, depende de dos factores situados en los pares de cromosomas homólogos y se denominan factores **A** y **B**, debido a que están ubicados en cromosomas diferentes, la segregación de estos factores durante la meiosis es independiente. Cada núcleo tiene su par de genes alelos o alelomorfos que controlan el mismo tipo de caracteres; se presenta un alelo en cada lugar, en posición idéntica respecto a su cromosoma homólogo formándose así parejas de genes (A_m, A_n y B_o, B_p) en dichos cromosomas, situados en su loci correspondiente. Sólo es fértil la unión sexual en la que se reúnen cuatro alelos diferentes para formar un micelio heterocigótico, por ejemplo con los alelos $A_1A_2B_1B_2$. Un talo con este juego de alelos puede producir basidiosporas de cuatro genotipos diferentes: A_1B_1, A_2B_2, A_1B_2 y A_2B_1 . También es posible que se produzcan espore solamente de dos tipos si la combinación de caracteres se efectúa de la siguiente forma: A_1B_1, A_1B_1, A_2B_2 y A_2B_2 . Esto depende del arreglo de los cromosomas homólogos durante la meiosis y del entrecruzamiento (crossing over) de un par o de ambos pares de cromosomas (Herrera y Ulloa, 1990).



3.7 Control genético del desarrollo del esporóforo.

Los genes de **A** y **B** regulan diferentes funciones celulares durante el apareamiento y la formación del dicarion. Los genes del loci del tipo de compatibilidad **A** controlan la duplicación de los dos núcleos parentales dentro del dicarion e inducen la formación de fíbulas en las células, sincronizando la división nuclear y consecuentemente la formación del septo (figura 3). Una vez efectuada la fusión de micelios monocarióticos, los genes **B** son responsables de la disolución del septo y la migración nuclear. Por otra parte en el dicarion ya establecido, los genes **B** controlan la fusión de fíbulas después la sincronización de la división nuclear y de este modo regulan la liberación del núcleo inicialmente atrapado dentro de la fíbula no fusionada (Kues y Liu, 2000).

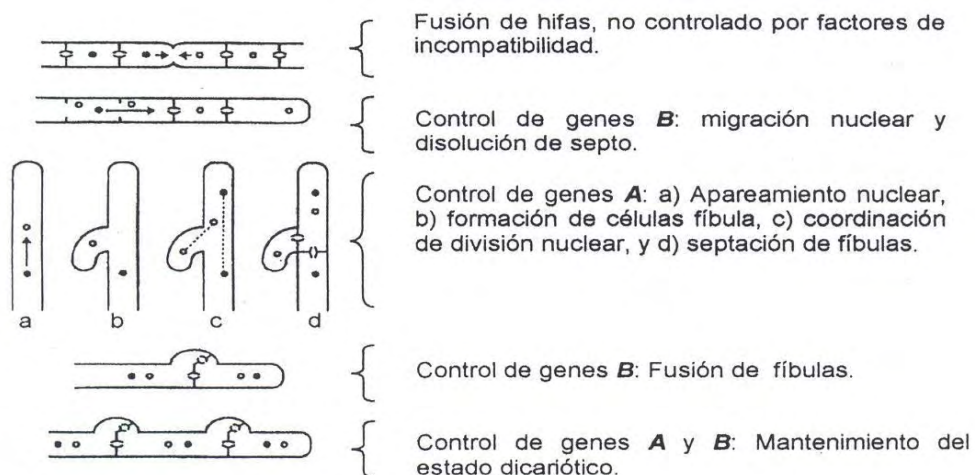


Figura 3. Papel de los genes de factores de incompatibilidad **A** y **B** en la regulación y mantenimiento del dicarion (Valencia del Toro, 2002).



3.8 El hongo comestible *Pleurotus eryngii*



3.8.1 Nombres comunes y científico

"Seta de cardo", "trompeta real" en castellano, "girgola de panical" en valenciano, en chino *xìng bào gū* (Wikipedia, 2008). Nombre científico: *Pleurotus eryngii*

3.8.2 Clasificación científica

Reino: Fungi, filo: Basidiomycota, clase: Homobasidiomycetes, orden: Agaricales, familia:

Pleurotaceae, género: *Pleurotus*, especie: *eryngii*.

3.8.3 Distribución

Los nombres ya aluden a su lugar de crecimiento, que es en los campos sin cultivar donde crece el cardo corredor o *Eryngium campestre*. Está muy difundido por Europa meridional, siendo muy frecuente en toda España. Es una excelente seta comestible típica de los países mediterráneos meridionales (sur de Europa, norte de África y Asia central).

3.8.4 Descripción

El sombrero es al principio hemisférico y luego aplanado de 3 a 12 cm de diámetro, con el borde incurvado y excéntrico con respecto al pie. De color muy variable desde el crema pálido hasta el pardo castaño oscuro.

Las láminas están espaciadas, desiguales y decurrentes, color blanco al principio que posteriormente se torna a crema. El pie o estípite es cilíndrico, macizo "poco correoso", color blanco, mide aproximadamente de 3 - 10 cm. La esporada es blanca, de forma elíptica y alargada de 10-12 x 5-6 micras. Su carne es blanquecina y firme, con un sabor dulce y un olor agradable. Por ello su carne blanca y compacta es muy valorada culinariamente (Wikipedia, 2008).



3.8.5 Hábitat

Suele desarrollarse sobre raíces muertas de distintas plantas. Fructifica en el otoño, particularmente si el suelo ha recibido precipitaciones importantes y se producen temperaturas suaves, ocasionalmente puede salir en primavera, siempre que haya sido lluviosa y cálida. Frecuentemente es atacado por larvas.

3.8.6 Recolección

Suele recolectarse junto a los cardos, sobre las raíces de la planta desarrollada en el año anterior, de los que se nutre. Por lo tanto no tenemos que buscarlo en los bosques. Se le encuentra desde el final del verano hasta el invierno.

En su recolección se debe cortar las setas por la base del pie, sin hurgar en el terreno, de modo que no se estropee el micelio que está creciendo en el sustrato, para que puedan salir nuevas floraciones. No arrancarla, sino cortarla, para evitar dañar el micelio y evitar la posibilidad de una segunda fructificación (Gardencenterejea, 2008).

3.8.7 Usos culinarios

La seta de cardo es una de las setas más apreciada por sus características sensoriales apropiadas para todo tipo de platillos. Su sabor es más delicado que los champiñones y las setas (*Pleurotus ostreatus*). Su carne es blanca, suave, firme, de olor fúngico y sabor delicado. Es muy combinable con carnes, pescados y hortalizas, tiene un sabor suave y textura fina (Wikipedia, 2008).

3.8.8 Cultivo de *P. eryngii*

Es una seta de mayor calidad que las otras del mismo género conocidas, pero su cultivo es más difícil y se presentan fracasos que han impedido hasta ahora su explotación a escala comercial, lo que le ha dado aún mayor posicionamiento como alimento "Gourmet".

La recolección del producto silvestre no está al alcance de todos, ni es suficiente, ni todos los años es homogénea, y por ser también superior en calidad a los hongos tradicionalmente cultivados (champiñón y setas), se está intentando desde hace



muchos años cultivarla sobre algunos sustratos tales como: paja de trigo complementada con otros materiales como salvado en un 20% (García, 1998).

Su crecimiento es lento, por ello es necesario esterilizar completamente el sustrato. Posterior a la esterilización, cuando la temperatura ha descendido a 25°C aproximadamente, se inocula el sustrato con el micelio puro y se incuba a 24-25°C. El micelio crece bien a un pH de 7.5 – 8.0. Para que en la fructificación el pH no descienda, se debe adicionar carbonato de calcio al sustrato.

Cuando el micelio ha conseguido invadir totalmente el sustrato hay que inducir la formación de primordios, quitando el plástico de las bolsas o abriéndolas por arriba, proporcionando una humedad ambiental de 95% y bajando la temperatura a 10 – 15°C. Durante la producción se suelen obtener dos oleadas o brotes bastante distanciados, además requiere de ventilación y luz. La cosecha puede representar hasta un 30% del peso del sustrato seco (García, 1998).

3.9 El hongo comestible *Pleurotus* spp.



3.9.1 Nombres comunes y científico

Pleurotus, gírgola, seta común, seta de ostra, hongo ostra, orejón, seta de chopo. Nombre científico: *P. ostreatus*, *P. djamur*, *P. pulmonarius*.

3.9.2 Clasificación científica

Reino: Fungi, filo: Basidiomycota, clase: Homobasidiomycetes, orden: Agaricales, familia: Pleurotaceae, género: *Pleurotus*, especie: *ostreatus*, *djamur* y *pulmonarius*



3.9.3 Descripción

Las especies de *Pleurotus* en general son conocidos por su forma de paraguas, sombrero de 5-15 cm, muy excéntrico y variable, normalmente en forma de concha, con el margen primero incurvado y después recto, a menudo ondulado. La cutícula, que es separable, es lisa y brillante, de color muy variable, beige, gris claro, gris negruzco o gris azulado. Láminas juntas, decurrentes hasta la base del pie, de color crema. Esporada de color gris liláceo. Pie muy corto de 1-4 x 1-2 cm, excéntrico o completamente lateral, recubierto de vellosidades de color blanco, carne firme y fibrosa, blanca, de olor agradable a veces algo anisado (García, 1998).

Las setas poseen su pie más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, de hecho a este hongo técnicamente se la llama *Pleurotus*, término que deriva del griego pleura o pleurón (costado o lado) y del latín otus, oreja.

Para que la seta se desarrolle adecuadamente se requiere de una temperatura y humedad adecuadas, así como aire que aporte oxígeno y cierta cantidad de luz (Gaitán, 2004).

3.9.4 El cultivo de *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus* se han convertido en un producto comestible ampliamente reconocido en la industria de los hongos cultivados. Su técnica de producción sencilla y barata, así como su habilidad para crecer de manera rápida en diversos residuos orgánicos y su adaptación a diversas condiciones climáticas, son características atractivas que han aumentado el interés de muchos cultivadores. Las setas crecen de manera natural en troncos en descomposición o en diferentes materiales obtenidos como subproductos de las actividades agrícolas. Por esta razón es posible cultivarlas en desechos de la agroindustria tales como pulpa de café, bagazo de caña de azúcar y diversas pajas de cereales (Martínez *et al.*, 2006).



3.10 El hongo comestible *Lentinula edodes*



3.10.1 Nombres comunes y científico

Shitake en Japón y xianqu en China. Nombre científico: *Lentinula edodes*.

3.10.2 Clasificación científica

Reino: Fungi, filo: Basidiomycota, clase: Homobasidiomycetes, orden: Agaricales, familia: Marasmiaceae, género: *Lentinula*, especie: *edodes*.

3.10.3 Descripción

Es una seta de sombrero convexo de 4 a 16 cm de diámetro y de color variable de ocre parduzco claro a pardo-rojizo con cierto tono violáceo. Al madurar se torna más oscuro por el centro y suele agrietarse, viéndose la carne más clara en el fondo de las grietas. También son frecuentes las escamas, de tamaño y color variables, sobre todo en la periferia, cuyo margen está enrollado de joven. Sus esporas son alargadas y de color blanco. El estípite a menudo excéntrico, blanquecino por arriba y de tono más claro que el sombrero por abajo, donde es algo escamoso. La carne es blanquecina, de sabor ácido agradable (García, 1998).

3.10.4 Propiedades terapéuticas

L. edodes presenta diversas propiedades funcionales, como acción antitumoral e hipocolesterolémica y en estudios recientes se ha confirmado su potencial antimicrobiano y antioxidante (Good *et al.*, 2007). Dichas propiedades se deben a la presencia de sustancias biológicamente activas en los esporóforos (principalmente en la pared celular) y el micelio de *L. edodes* y en su mayoría se trata de polisacáridos y complejos polisacárido-proteína.



3.10.5 Técnicas de cultivo

Básicamente se distinguen dos tipos de cultivo de *L. edodes*: 1) Cultivo tradicional sobre troncos y 2) Cultivo en bolsas con aserrín.

3.10.5.1 Cultivo tradicional sobre troncos

El cultivo sobre troncos ha sido el tradicional en Oriente utilizando troncos de árboles de hoja ancha, tales como encino, hayas, abedul, álamos y sauces de 5 a 20 cm de diámetro. Los troncos son talados en invierno y se apilan en el bosque formando capas en direcciones cruzadas para permitir la circulación del aire y reducir la humedad hasta un 40-45%.

Los troncos son inoculados con micelio propagado en aserrín con 20% de salvado de trigo o arroz y 3% de glucosa, humedecido y esterilizado. Cuando los troncos ya están invadidos por el micelio, después de 5 a 16 meses (dependiendo de la clase de tronco y sobre todo de la temperatura), los troncos se llevan al sitio definitivo para la fructificación que será inducida por las lluvias (o riegos) y los cambios de temperatura que suceden naturalmente en primavera y otoño. La producción de esporóforos en los troncos sucede por oleadas o brotes separadas entre sí por un tiempo muy variable (3 a 6 meses) y pueden mantenerse los troncos en producción por un período de 2 a 6 años, obteniéndose rendimientos de 10 a 20% del peso seco de la madera (García, 1998).

3.10.5.2 Cultivo en bolsas de aserrín

A principios de 1970 en Taiwan, Japón y China, se empezó a producir shiitake comercialmente en residuos madereros como el aserrín de maderas duras, bajo condiciones controladas de temperatura, luz, humedad relativa del medio ambiente y contenido de humedad del sustrato.

El gran progreso para el cultivo a escala comercial fue el uso de bolsas de plástico esterilizables, en las cuales el sustrato puede comprimirse, esterilizarse, inocularse y permitir la propagación del micelio. El sustrato suele mezclarse con salvado de trigo o arroz, restos de maíz o de semillas de algodón, cáscaras de cacahuates, etc., se ajusta el contenido de humedad, se esteriliza y se inocula con el micelio del hongo. En estas bolsas el micelio se propaga formando un bloque sólido al cabo de 30-70 días; cuando



aparecen manchas húmedas cafés sobre la superficie del bloque, el sustrato esta listo para pasar a la etapa de fructificación, en ese momento la bolsa es retirada. Para estimular la formación de primordios se debe incrementar la humedad relativa por medio de riegos continuos, disminuir la temperatura del ambiente (12 - 20°C) y dar ciclos 12 horas de luz natural o artificial por 12 horas de oscuridad (Schmidt, 2006). Los rendimientos que se reportan mediante el empleo de este tipo de cultivo son del 70-261% (Ramírez y Leal, 2002).

3.11 Mejoramiento genético de hongos comestibles

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

Cualquier programa de mejoramiento genético de hongos comestibles depende del conocimiento biológico de la especie que se desea mejorar, por lo que es necesario conocer su ciclo de vida, patrón de sexualidad, hábitat natural, sustrato en el que se desarrolla, requerimientos nutricionales y ambientales, así como su relación con otros organismos y la disponibilidad de diversidad genética en el material (color, tolerancia a la temperatura, resistencia a enfermedades, patrones de producción durante la fructificación, número de brotes y período entre éstos, así como el peso de los esporóforos). De las variables involucradas dependerá en gran medida el éxito del programa, el cual buscará lograr la mejor combinación de genes que controlen las características de interés comercial (Chang, 2000).

Actualmente hay un auge en el uso de técnicas de biología molecular para programas de mejoramiento genético con distintos tipos de organismos. En el caso de los hongos comestibles, no obstante se presenta la dificultad de que son organismos complejos con una amplia gama de características, muchas de las cuales están bajo el control de varios genes. Por tal motivo la mayoría de los programas de mejoramiento genético para hongos comestibles se basan en el sistema natural de recombinación genética producido al aparear micelios monocarióticos compatibles. El propósito del



entrecruzamiento es combinar las características presentes en distintas cepas mediante cruzas controladas para obtener así cepas cuyo genoma posiblemente les permitirá expresar las características de las cepas seleccionadas (Sonnenberg *et al.*, 2005). En general, existen dos posibilidades para obtener el material inicial para un programa de mejoramiento genético de este tipo: 1) Aislamiento y recuperación de la progenie meiótica (esporada) y 2) Desdicarización (obtención de componentes monocarióticos).

3.11.1 Recuperación de la progenie meiótica

Este método consiste en recolectar las esporas producidas por los esporóforos de las cepas de interés para efectuar apareamientos compatibles de una misma progenie. Sin embargo, existen reportes de que mediante tal metodología los híbridos no siempre superan a las cepas parentales (Gaitán, 2000; Salmenes *et al.*, 2004). Por otra parte es un método lento debido a que es necesario fructificar las cepas en un inicio para obtener la esporada y en una ocasión posterior para evaluar las características de las cepas obtenidas se llevan nuevamente a fructificar. Otra desventaja de este método es la necesidad de realizar muchas cruzas ya que no se tienen las bases genéticas y moleculares para asegurar la presencia de las características deseadas en la progenie obtenida. Esta incertidumbre sobre el aporte genético presente en las basidioesporas se debe a que para su segregación el micelio dicariótico sufre primeramente la cariogamia y posteriormente la meiosis. Durante la cariogamia se fusionan los núcleos del micelio dicariótico produciendo un núcleo zigótico, el cual sufre la meiosis, fase en la cual se da la recombinación genética y se producen cuatro tipos de esporas que contienen el material genético en una combinación diferente a la que se encontraba en las cepas monocarióticas que originaron el dicariote.



3.11.2 Desdicariorización

La desdicariorización es la separación artificial de un dicariote en sus componentes monocarióticos, que se caracterizan por un micelio sin fíbulas, el cual se denomina neohaplonte.

Este método tiene la ventaja de reducir el tiempo requerido para aislar los genotipos presentes en las cepas dicarióticas debido a que parte de cepas dicarióticas de las cuales se pueden aislar sus componentes monocarióticos y no se requiere de la esporada, por tanto no es necesario fructificar las cepas seleccionadas. Por otra parte los componentes monocarióticos de una cepa representan la composición genética completa de la misma, por lo que aumentan las posibilidades de obtener cepas cuyo genoma les permita expresar las características deseadas.

La desdicariorización puede efectuarse por métodos mecánicos y químicos. La operación microquirúrgica es un método físico de baja reproducibilidad y muy escasa recuperación de neohaplontes. La desdicariorización química emplea sustancias de alta toxicidad como taurocolato de sodio, ácido cólico o soluciones de peptona con glucosa. El taurocolato de sodio utilizado por Nishibori y Kinugawa (1978) para la desdicariorización de *L. edodes* es una sustancia fungistática que desdicarioriza a la cepa a concentraciones que inhiben seriamente el crecimiento micelial. Al utilizar peptona de carne el crecimiento micelial de las cepas de *L. edodes* resulta muy lento requiriéndose tiempos de incubación de hasta 45 días, sin embargo permite la recuperación de neohaplontes (Arteaga *et al.*, 1996).

El efecto desdicariorizante de las soluciones de glucosa-peptona se atribuye a la presencia de algún compuesto tóxico producido durante la esterilización de la solución desdicariorizante pero no se conoce con certeza el mecanismo que provoca la desdicariorización de micelios dicarióticos. Miles y Raper (1956) y Tokimoto *et al.*, (1978) propusieron la siguiente hipótesis: la destrucción del dicariote por agentes químicos resulta en un defecto en la fusión entre las fíbulas y la penúltima célula durante el proceso, lo que ocasiona que la fíbula y la penúltima célula contengan un solo núcleo y se forme el neohaplonte.



4. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de los hongos comestibles ha tomado gran importancia en los últimos años, debido a que se han convertido en una alternativa nutrimental por su contenido de proteínas, fibra, vitaminas y minerales. Además su cultivo y comercialización poseen un alto potencial económico que anualmente deja ganancias por millones de dólares.

Considerando que las setas corresponden al segundo hongo más cultivado tanto a nivel nacional, como internacional los programas de mejoramiento genético por medio de métodos tradicionales, pueden ser una alternativa viable para proveer de material novedoso al mercado nacional.

El hongo comestible *Pleurotus eryngii* no se produce a escala comercial en nuestro país, es introducido en el mercado nacional como producto de importación en la categoría "gourmet". Este hongo posee un estípite sumamente grueso, carnoso, no correoso y con características sensoriales muy agradables, además de combinar con una gran variedad de alimentos. Por ser superior en calidad a los hongos tradicionalmente cultivados en el país (champiñón y setas) esta variedad es muy apreciada y dado que su valor comercial es elevado (\$400 – 500 /kg) resulta interesante tratar de obtener híbridos con características comercialmente aprovechables entre cepas de *P. eryngii* con cepas comerciales de *Pleurotus* spp y/o *L. edodes*.

Con la obtención de híbridos entre cepas del mismo género (*P. ostreatus* y *P. eryngii*) se planteó obtener híbridos donde se mantuvieran las características del estípite de *eryngii* y se eliminaran las características indeseables de las otras especies de *Pleurotus* (estípite delgado y correoso) y se promueva la selección de cepas con estípite delgado o grueso, no correoso, con grandes píleos con morfologías semejantes ya sea a las típicas de *Pleurotus* o a las de *eryngii*. Además se buscó la obtención de colores novedosos en las nuevas cepas. En la obtención de híbridos entre *P. eryngii* y *L. edodes* se planteó obtener cepas con características sensoriales novedosas en términos del grosor y tamaño del estípite, forma y color del píleo, así como en sabores y aromas novedosos. De esta manera podría diversificarse y ampliarse la capacidad de los productores para competir con mayor cantidad de productos a nivel nacional e internacional. Y con este tipo de proyectos de mejoramiento genético podría contribuirse a incrementar la rentabilidad del proceso de cultivo de hongos comestibles en nuestro país y eliminar la dependencia cepas y tecnología del extranjero.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener cepas híbridas de interés comercial por apareamientos entre neohaplontes de *Pleurotus eryngii* con cepas monocarióticas y dicarióticas de *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes*.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) de una cepa comercial de *P. eryngii*.
- Clasificar los neohaplontes obtenidos de *P. eryngii* para evaluar la recuperación los dos tipos de compatibilidad de la cepa dicariótica original.
- Comprobar si la recuperación de los 2 neohaplontes es en una proporción 1:1.
- Aparear neohaplontes de *P. eryngii* con neohaplontes de *L. edodes* para la obtención de híbridos.
- Aparear neohaplontes de *P. eryngii* con cepas monocarióticas y neohaplontes de *Pleurotus* spp. para obtener híbridos.
- Realizar cruzas tipo di-mono (dicarion–monocarion) entre cepas dicarióticas comerciales de *P. ostreatus* y neohaplontes de *P. eryngii* para la obtener híbridos.
- En caso de obtener híbridos:
 - Seleccionar las cepas híbridas que se llevarán a fructificación.
 - Evaluar la eficiencia biológica, características fenotípicas y organolépticas de las cepas híbridas fructificadas.
 - Seleccionar las cepas híbridas con altos rendimientos y características novedosas para su uso comercial.



6. HIPÓTESIS

Si se somete una cepa dicariótica de *Pleurotus eryngii* a los efectos de una solución desdicariorizadora, es posible recuperar sus dos componentes monocarióticos (neohaplontes).

Si se entrecruzan neohaplontes de *P. eryngii* con diferentes neohaplontes de *L. edodes*, se obtendrán dicariotes con características combinadas de las cepas parentales.

Si se efectúan cruzas dicariorión-monocariorión entre una cepa dicariótica de *Pleurotus* spp. y neohaplontes de *P. eryngii*, los nuevos dicariotes presentarán características combinadas de las cepas parentales.

Con el apareamiento de neohaplontes de *P. eryngii* con cepas de *Pleurotus* y *Lentinula* se obtendrán híbridos con mayores eficiencias biológicas y fenotipos atractivos para la producción comercial.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

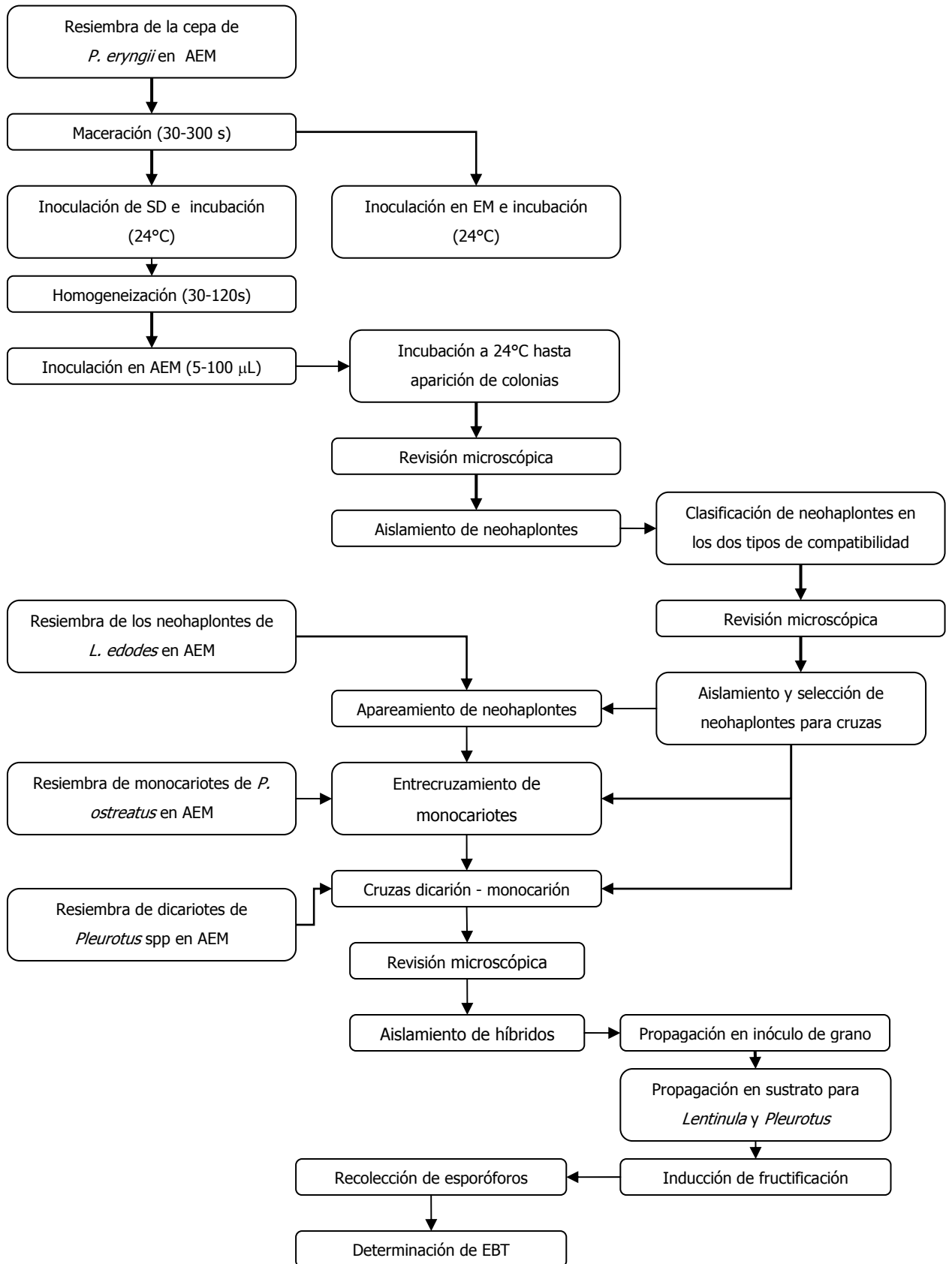


Figura 4. Diagrama general para llevar a cabo el mejoramiento genético de cepas de hongos comestibles a partir de neohaplontes de *P. eryngii*.



7.1 Material biológico

Se utilizó una cepa comercial de *Pleurotus eryngii* (dicariótica), la cual fue sometida al proceso de desdicarización para la obtención de sus dos componentes monocarióticos o neohaplontes.

Para la obtención de híbridos se utilizaron neohaplontes de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*, así como cepas monocarióticas y dicarióticas de *Pleurotus* spp.

Todas las cepas están disponibles en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. Para el mantenimiento de las cepas y la propagación micelial se utilizó medio de agar extracto de malta (AEM).

7.2 Preparación de medios de cultivo

7.2.1 Solución de extracto de malta

Se preparó medio líquido de extracto de malta (EM) con 15 g de extracto de malta Bioxon® disueltos en 1 litro de agua destilada, se dosificaron 50 ml del medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad y se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos. Este medio se utilizó para evaluar la viabilidad del micelio posterior a su macerado.

7.2.2 Medio de agar extracto de malta

El medio agar extracto de malta (AEM) se preparó disolviendo 15 g de extracto de malta y 20 g de agar bacteriológico en 1 litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos. Se colocaron 10 mL del medio estéril en cajas Petri estériles, una vez solidificado el medio, las cajas se colocaron dentro de bolsas de plástico y se incubaron a 24°C durante 24 horas para verificar su esterilidad. Este medio se utilizó para la propagación micelial de todas las cepas y para realizar los apareamientos.



7.2.3 Soluciones desdicariorizadoras

Se prepararon soluciones desdicariorizadoras con diferentes concentraciones de glucosa anhidra High Purity® (20, 25, 30, 40 y 60 g/L) y peptona bacteriológica Oxoid® (20, 25, 30, 40 y 60 g/L). Ambas disueltas con agua destilada en el mismo matraz. Se dosificaron 50 mL de las soluciones desdicariorizadoras en matraces Erlenmeyer independientes de 125 mL de capacidad y se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos. Se incubaron a 24°C durante 24 horas para verificar la esterilidad. Estas soluciones se emplearon para obtener los dos componentes monocarióticos de la cepa de *P. eryngii*.

7.3 Procedimiento para la desdicariorización de la cepa de *P. eryngii*

7.3.1 Preparación del inóculo para la desdicariorización

Se sembró la cepa de *Pleurotus eryngii* en medio de agar extracto de malta (AEM), colocando 5 inóculos de 0.3 mm de diámetro en 5 puntos equidistantes de la placa de agar, a 1 cm de distancia del borde de la caja. Las cajas se incubaron a 24°C hasta observar colonias de alrededor de 3 cm de diámetro. Las 5 colonias previamente crecidas en AEM se colocaron en un vaso de homogeneizador estéril (waring blender) con 50 mL de agua destilada estéril y fría. El homogeneizador se operó por diferentes tiempos (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 300 segundos) a la velocidad más alta. Los matraces con solución desdicariorizadora y solución de extracto de malta se inocularon con 50 y 100 µL del macerado y se incubaron a 24°C hasta la aparición del micelio.

7.3.2 Desdicariorización de la cepa de *P. eryngii*

Al observar desarrollo micelial en los matraces, se tomaron alícuotas de 25 y 50 µL de la solución desdicariorizadora y se inocularon en placas con AEM. Las cajas Petri se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Además se homogeneizó el contenido de los matraces en un vaso estéril de homogeneizador (waring blender) durante 30 segundos y se inocularon 50 y 100 µL del homogeneizado en placas con AEM. Las placas también se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Se examinó al microscopio el micelio procedente de dichas colonias para determinar la presencia o ausencia de fíbulas. Las colonias en donde se observó ausencia de fíbulas fueron



aisladas y resembradas en AEM para verificar la ausencia de fíbulas al desarrollarse nuevamente.

7.3.3 Clasificación de los neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad

Para identificar los dos componentes monocarióticos de la cepa dicariótica, se seleccionaron cinco neohaplontes y se cruzaron con todos los neohaplontes obtenidos en medio AEM. Las cajas se incubaron a 24°C hasta observar la aparición de colonias. Se examinaron al microscopio las colonias desarrolladas para determinar la presencia o ausencia de fíbulas.

7.3.4 Resiembra de neohaplontes de *Lentinula edodes* y monocariotes de *Pleurotus* spp.

Para la propagación micelial de las cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp. existentes en el cepario, éstas se resembraron en medio agar extracto de malta (AEM), colocando 5 inóculos de 0.3 mm de diámetro en 5 puntos equidistantes de la placa de agar, a una distancia de los bordes de la caja de aproximadamente 1.5 cm. Las cajas se incubaron a 24°C hasta observar colonias de alrededor de 3 cm de diámetro. Todas las colonias se observaron al microscopio para confirmar, que las cepas estuvieran libres de contaminaciones y que el micelio correspondiera a su carácter monocariótico.

En las tablas 1 y 2 se presentan las cepas utilizadas tanto de *Lentinula edodes*, como de *Pleurotus* spp.

Tabla 1. Neohaplontes de *Lentinula edodes* utilizados para la obtención de híbridos

Clave de la cepa		
L5-23	L10-4S	L19-2
L5-25	L10-4S2	L20-6
L5-26	L15-5	L20-8
L9-2	L15-11	L21-7
L9- 3	L18-2	L21-8
L9- 8	L18-1S	L21-2S
L9-16	L18-2S	L21-3S
L10-1S	L19-1	L21-20

Tabla 2. Cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp.

Clave de la cepa		
Progenie monocariótica	Neohaplontes obtenidos a partir de cepas comerciales de <i>Pleurotus</i> spp	
PM204	K1508-5	HK35-39
PM206	K1508-7	HK35-40
Monocariotes silvestres	K1508-9	ASP 8
P400	K1508-12	ASP 17
P402	K1508-17	ASP 18
P403	K8501-1	ASP 21
P404	K8501-2	SOM 3015-11
P405	K8501-3	SOM 3015-12
P406	K8501-4	SOM 3015-14
P407	K8501-5	SOM 3015-15
P408	K8501-7	SOM 3015-16
P409	K8501-9	SOM 3015-17
P410	K8501-11	SOM 3015-19
P411	K8501-20	SOM 3015-24
P412	K8501-23	SOM 3015-25
P413	HK35-35	SOM 3015-28
P414	HK35-36	SOM 3015-29
P416	HK35-37	SOM 3015-30
P417	HK35-38	

7.3.5 Cepas monocariotes y neohaplontes de *Pleurotus* spp. solicitadas a otras instituciones de investigación

En la Tabla 3 se presentan las cepas de tipo monocariótico de la especie *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, solicitadas al Dr. Gustavo Valencia del Toro (UPIBI) y a la Dra. Graciela Huerta Palacios de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula (ECOSUR).

Tabla 3. Cepas del género *Pleurotus* solicitadas a UPIBI y ECOSUR

Clave de la cepa	Especie	Tipo de micelio	Procedencia
UAP1	<i>P. ostreatus</i>	Neohaplontes	UPIBI
UAP2			
POS1			
SEC1			
PCM1			
ECS-0194	<i>P. pulmonarius</i>	Progenie monocariótica	ECOSUR
ECS-0186-6			
ECS-0186-2			
ECS-01103	<i>P. ostreatus</i>		
ECS-01105			



7.3.6 Resiembra de cepas dicarióticas para apareamientos di-mono.

La resiembra de las cepas dicarióticas procedentes del cepario de la UNAM se realizó en medio agar extracto de malta (AEM), colocando 5 inóculos de 0.3 mm de diámetro en 5 puntos equidistantes de la placa de agar, a una distancia de los bordes de la caja de aproximadamente 1.5 cm. Las cajas se incubaron a 24°C hasta observar colonias de alrededor de 3 cm de diámetro. Se inspeccionaron dichas colonias al microscopio para confirmar, que el micelio de las cepas estuviera libre de contaminaciones y que hubiera presencia de fíbulas características del micelio dicariótico.

En la Tabla 4 se presentan las cepas de *Pleurotus ostreatus*, resemebradas para su posterior apareamiento con los dos tipos de neohaplontes obtenidos de *P. eryngii* por medio de cruce di-mono.

Tabla 4. Cepas dicarióticas de *Pleurotus ostreatus*.

Clave de la cepa	Especie	Procedencia
ASP14	<i>P. ostreatus</i>	Alemania
Nh2-Vo8		
PM12		
P401		
P411		
<i>P. ostreatus florida</i>		
CP253	<i>P. djamur</i>	Colegio de Posgraduados, Puebla
CP50	<i>P. ostreatus</i>	
HK35-39		Hongos Leben
K8501-6		
IE201	<i>P. djamur</i>	Instituto de Ecología, Xalapa
IE200	<i>P. djamur</i>	
<i>P. djamur</i>		Cepas comerciales de Toluca
<i>P. ostreatus blanco</i>		



7.4 Producción de híbridos

7.4.1 Cruza de neohaplontes de *P. eryngii* con monocariotes de *Pleurotus* spp. y neohaplontes y de *L. edodes*.

Para la obtención de híbridos se realizaron cruzas entre todos los neohaplontes disponibles de *P. eryngii* en medio AEM con diferentes monocariotes de *Pleurotus* spp. y neohaplontes de *Lentínula edodes*. Todas las cruzas se incubaron a 24°C hasta observar desarrollo de las colonias. Posteriormente las colonias desarrolladas se examinaron al microscopio para determinar la presencia de fíbulas.

7.4.1.1 Revisión microscópica y aislamiento de dicariotes.

Las colonias desarrolladas se observaron al microscopio para determinar la presencia de fíbulas. Las colonias que presentaron micelio de tipo dicariótico, es decir con presencia de fíbulas fueron aisladas en placas de AEM para su propagación y posterior inoculación en inóculo de grano.

7.4.2 Cruza de neohaplontes de *P. eryngii* con monocariotes de *P. pulmonarius* y neohaplontes de *P. ostreatus*.

Se realizaron cruzas entre todos los neohaplontes disponibles de *P. eryngii* en medio AEM con los diferentes monocariotes de *Pleurotus pulmonarius* y neohaplontes de *P. ostreatus*. Las cruzas se incubaron a 24°C hasta observar desarrollo de colonias. Posteriormente las colonias desarrolladas se examinaron al microscopio para determinar la presencia de fíbulas.

7.4.3 Cruza dicarición – monocarición (di-mono) entre cepas dicarióticas de *P. ostreatus* y neohaplontes de *P. eryngii*.

Se colocaron 4 fragmentos de aproximadamente 2 mm de diámetro de un neohaplonte (*P. eryngii*) en medio AEM, las cajas se incubaron a 24°C hasta que se observó colonias de alrededor de 1 cm de diámetro, en ese momento se colocó un fragmento de 2 mm de diámetro, de la cepa dicariótica, en la periferia de la colonia monocariótica.



7.4.3.1 Revisión microscópica y aislamiento de dicariotes obtenidos por cruzas di-mono.

Las cajas se volvieron a incubar después de colocar el fragmento de la cepa dicariótica a 24°C y se inspeccionaron diariamente al microscopio hasta observar fíbulas en la periferia de la colonia monocariótica en el lado opuesto donde se colocó el micelio de la cepa dicariótica, el nuevo micelio dicariótico (híbrido) se aisló en AEM.

7.5 Evaluación del crecimiento micelial de las cepas híbridas, parentales y reconstituida de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula*

Para seleccionar los híbridos que fueron llevados a la etapa de fructificación se evaluó su crecimiento micelial en AEM. Para la evaluación se sembró cada cepa (híbrida, parental y reconstituida). En el centro de una caja Petri se colocó un inóculo de 8 mm de diámetro para todas las cepas y se sembraron 3 cajas por cepa. El crecimiento micelial se midió (por duplicado en cada colonia) a los 3, 6 y 9 días de incubación. Con los diámetros obtenidos a los 9 días de cada cepa híbrida y sus dos cepas parentales se realizó un análisis de varianza para observar si existían diferencias significativas entre las cepas. Cuando se encontraron diferencias significativas se usó la prueba de Duncan para clasificar a las cepas. En el Anexo 2 se reportan los resultados del análisis estadístico (análisis de varianza y clasificación de las cepas por Duncan).

7.6 Fructificación de las cepas híbridas, parentales y reconstituidas de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula*

La obtención de cuerpos fructíferos de las cepas se realizó en tres etapas:

- 1) Producción del inóculo de grano.
- 2) Preparación de sustratos para la fructificación.
- 3) Fructificación.

7.6.1 Preparación del inóculo de grano

Para preparar el inóculo de grano se utilizaron granos de trigo (previamente lavado y libre de impurezas) los cuales se sometieron a una cocción en agua a temperatura de ebullición durante 30-45 minutos. Transcurrido este tiempo se drenó el agua y el grano se enfrió al chorro de agua para detener la cocción. El grano frío se pesó y mezcló con CaSO₄ al 1.3% y CaCO₃ al 0.3% en base húmeda. De la mezcla anterior se colocaron



0.5 kg en bolsas de polipapel. A continuación las bolsas con grano se esterilizaron en autoclave (2 h, 121°C y 15 lbs/in²). Una vez frío el grano se inoculó con micelio previamente propagado en medio de EMA de cada una de las cepas dicarióticas (híbridos, parentales y reconstituidas). Las bolsas ya inoculadas se incubaron a 24°C en condiciones de oscuridad durante 4 semanas, tiempo en el cual se consiguió la invasión total del grano con el micelio. Bajo estas condiciones fue posible la propagación del micelio de todas las cepas dicarióticas seleccionadas para la etapa de fructificación.

7.6.2 Preparación de sustratos para la fructificación.

En esta etapa se utilizaron dos tipos de sustratos para la fructificación de los híbridos obtenidos. Para los híbridos obtenidos entre los neohaplontes de *Pleurotus eryngii* y neohaplontes de *Lentinula edodes*, se utilizó tanto el sustrato empleado para la producción de *P. eryngii*, como el sustrato empleado para la producción de *L. edodes*, ya que ambos géneros (cepas parentales) requieren de diferentes sustratos (tanto en componentes, como en proporciones) para su óptimo desarrollo. Por otra parte para los híbridos obtenidos entre *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus*, sólo se evaluaron en el sustrato utilizado para *P. eryngii*, ya que los requerimientos nutrimental de ambas especies son similares.

En la tabla 5 se presentan las formulaciones de los dos tipos de sustratos utilizados para la fructificación de las cepas.

Tabla 5. Composición de los sustratos utilizados en la etapa de fructificación de las cepas híbridas, reconstituidas y parentales de *P. eryngii* y *L. edodes*

COMPONENTES	SUSTRATOS (Base húmeda %)	
	<i>L. edodes</i>	<i>P. eryngii</i>
Aserrín	50.0	20.0
Cascarilla de algodón	36.0	60.0
Mijo	6.0	-----
Sorgo molido	6.0	-----
Salvado	-----	16.0
Sulfato de amonio	0.5	-----
Ácido cítrico	0.5	-----
Benlate	1.0	-----
Carbonato de calcio	-----	3.0
Sulfato de calcio	-----	1.0



Para preparar los sustratos fue necesario hidratar durante 24 horas el aserrín, mijo y cascarilla de algodón. Posteriormente se drenó el exceso de agua y se pesó la cantidad establecida de cada componente dependiendo de la formulación y se mezclaron todos los componentes en forma homogénea. En todos los casos se ajustó la humedad al 60% aproximadamente.

Una vez preparada la mezcla se colocaron 1.5 kg del sustrato para *Lentinula* en bolsas de polipapel (25x35 cm). Para el caso del sustrato para *Eryngii* se colocó 1 kg en bolsas de polipapel (17x45 cm). A continuación se esterilizó el sustrato a 121°C y 15 libras de presión durante dos horas. Una vez frío el sustrato se inoculó al 5% con el inóculo de grano de cada cepa dicariótica (híbrida, parentales y reconstituida). El sustrato ya inoculado se incubó a 24°C en oscuridad. El sustrato para *Lentinula*, fue incubado por 9 semanas y el sustrato para *P. eryngii* se incubó por 5 semanas en las mismas condiciones.

7.6.3 Fructificación

Completado el tiempo de incubación de cada una de las cepas (híbridas y parentales), inoculadas en sustrato de *Lentinula*, se retiraron las bolsas de plástico que cubrían cada bloque de sustrato. Para los bloques inoculados en sustrato de *Eryngii* sólo se descubrió la parte superior de la bolsa. Posteriormente fueron trasladados al cuarto de fructificación. La fructificación se indujo mediante riegos regulares (4 veces por día durante 15 minutos), ventilación con aire húmedo e iluminación continua. Los cuerpos fructíferos se cosecharon antes de la apertura total del borde del píleo y se recolectaron durante un período de 12 semanas para las cruces de *P. eryngii* y *L. edodes*. Mientras que para las cepas híbridas de *P. eryngii* y *Pleurotus* spp. fue de 8 semanas.

7.7 Análisis estadístico de resultados

Con los valores de eficiencia biológica total de las cepas, tanto híbridas, como parentales se realizó un análisis de varianza para observar si existían diferencias significativas entre cepas. Además se efectuó un segundo análisis de varianza donde se incluyó la variable repeticiones con el objeto de observar si el número de réplicas en cada caso fue el adecuado. Cuando se observaron diferencias significativas entre las cepas se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan para su clasificación y así identificar las cepas más productivas.



8. RESULTADOS

El mejoramiento genético realizado en este trabajo partió de la recuperación de los componentes monocarióticos (neohaplontes) de una cepa de *P. eryngii*. Para ello se buscaron las condiciones óptimas para la obtención de dichos neohaplontes a través de la técnica de desdicariorización.

8.1 Desdicariorización de la cepa de *P. eryngii*

Considerando la metodología desarrollada por Leal-Lara (1980) y Arteaga Santillán *et al.* (1996) para la desdicariorización de cepas de *Pleurotus spp.* y *Lentinula edodes* se sometió la cepa de *P. eryngii* a las siguientes condiciones:

- Tiempos de macerado: 30, 60, 90 y 120 segundos.
- Concentración de glucosa: 20 g/L.
- Concentración de peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogeneización después de observar desarrollo micelial en solución desdicariorizadora: 120 segundos.
- Volumen de inoculación en AEM: 25 y 50 μ L.

En el primer experimento como se aprecia en la Tabla 6, que el crecimiento micelial no disminuyó para los tiempos de maceración de 30 y 60 segundos, mostrando un abundante desarrollo micelial en los tres medios (SD, AEM y EM). La recuperación del micelio fue más lenta al aumentar el tiempo de maceración a 120 s, debido al daño del micelio, sin embargo, en ninguna de las condiciones se observó micelio de tipo monocariótico. Como resultado del primer experimento se concluyó que el volumen de inoculación debía ser disminuido para obtener una menor densidad de colonias en las cajas, además se observó que el daño que sufrió el micelio fue mínimo.

En el segundo experimento (Tabla 6) se usaron los tiempos de maceración en los que hubo una recuperación más lenta del micelio (90 y 120 s) y se incluyó un tiempo mayor de maceración (150 s). Una vez que se observó desarrollo micelial en los matraces se mantuvo el tiempo de homogeneización (120 s) y se disminuyó el inóculo usado 15 y 25 μ L. En este experimento se observó que la disminución de inóculo a 15 μ L favoreció el desarrollo de colonias (pero de tipo dicariótico) en forma aislada, para los tiempos de macerados más amplios (120 y 150 s).



Tabla 6. Condiciones experimentales para la desdicariorización de una cepa comercial de *P. eryngii* (experimentos 1 y 2).

Exp.	Condiciones				Desarrollo micelial									Tipo de micelio en AEM	
	Maceración (s)	SD (g/L)		Inóculo (μL)	Extracto de Malta Líquido (EM)			Solución desdicariorizadora (SD)			Homogeneización (s)	Extracto de Malta Sólido (AEM)			
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)							Tiempo de incubación (días)			
					3	5	8	3	5	8		3	5		8
1	30	20	20	25	A	A	A	M	A	A	120	N	I	I	Dicariótico Dicariótico
				50	A	A	A	A	A	A		M	I	I	
	60	20	20	25	M	A	A	M	A	A	120	N	M	I	Dicariótico Dicariótico
				50	A	A	A	A	A	A		M	A	I	
90	20	20	25	E	M	A	E	M	A	120	N	M	A	Dicariótico Dicariótico	
			50	M	A	A	M	M	A		M	M	A		
120	20	20	25	N	E	M	E	M	A	120	N	M	A	Dicariótico Dicariótico	
			50	M	A	A	M	M	A		M	M	A		
2	90	20	20	15	M	M	A	E	M	M	120	N	M	M	Dicariótico Dicariótico
				25	M	A	A	M	M	A		M	M	A	
	120	20	20	15	N	N	E	E	M	M	120	N	M	A	Dicariótico Dicariótico
				25	N	E	M	E	M	A		N	M	A	
	150	20	20	15	N	N	E	N	E	M	120	N	M	M	Dicariótico Dicariótico
				25	N	E	M	E	M	M		M	M	A	

Desarrollo micelial. N: nulo, E: escaso, M: moderado, A: abundante, I: incontable.



En el tercer experimento (Tabla 7) se realizó una doble desdicarionización, es decir, de una SD con crecimiento micelial moderado, se tomó una alícuota y se volvió a inocular en SD, esperando que al someter la cepa a una segunda exposición a la solución desdicarionizadora, ello posiblemente facilitaría la separación de los núcleos y por lo tanto la obtención de neohaplontes. Ésto no produjo los resultados deseados, ya que las colonias observadas fueron dicarióticas, exceptuando en el macerado de 150 s (homogeneización 60 s e inóculo de 15 μ L), donde se encontraron colonias dicariotes, con algunos sectores sin fíbulas. Los resultados obtenidos dieron la pauta para incrementar la concentración de la SD en experimentos sucesivos.

En el cuarto experimento se incrementó la concentración de glucosa y peptona en la SD a 25 y 30 g/L, mientras que el tiempo de maceración no se modificó (120 y 150 s). En la Tabla 7 es posible apreciar que hubo un mayor daño al micelio con el mayor tiempo de macerado (150 s) y la mayor concentración de glucosa y peptona (30 g/L). Sin embargo, no se obtuvieron colonias de tipo monocarióticas. Como resultado de este experimento se concluyó que el volumen de inoculación (10 μ L) debía ser disminuido, para obtener una menor densidad de colonias en las cajas de AEM.

Para el quinto y sexto experimento (Tabla 7), se retomaron las condiciones, disminuyendo el inóculo a 5 μ L en el primero. Como resultado se observó un desarrollo micelial escaso en extracto de malta (líquido y sólido), pero para todos los casos las colonias fueron más aisladas y de tipo dicariótico.

En el sexto experimento, se incrementó el tiempo de homogeneización (120 s) y el inóculo (10 μ L), teniendo como resultado un bajo desarrollo de colonias (aisladas). Con los tres experimentos previos (4-6) se concluyó, que el tiempo de macerado debía incrementarse y mantener una homogeneización y volumen de inoculación moderados, para obtener una menor densidad de colonias (Tabla 7).



Tabla 7. Condiciones experimentales para desdicariorización de una cepa comercial de *P. eryngii* (experimentos 3-6).

Exp.	Condiciones				Desarrollo micelial									Tipo de micelio en AEM	
	Maceración (s)	SD (g/L)		Inóculo (μL)	Extracto de Malta Líquido (EM)			Solución desdicariorizadora (SD)			Homogeneización (s)	Extracto de Malta Sólido (AEM)			
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)							Tiempo de incubación (días)			
					3	5	8	3	5	8		3	5		8
3	120	*20,20	*20,20	10	E	M	A	N	E	A	60	N	M	A	Dicariótico Dicariótico
				15	E	A	A	E	M	A		N	A	A	
	150	*20,20	*20,20	10	N	E	A	N	E	M	60	N	M	A	Dicariótico Dicariótico con hifas monocarióticas
				15	E	M	A	E	M	M		N	A	A	
4	120	25	25	10	E	M	A	N	E	M	60	N	A	I	Dicariótico Dicariótico
				15	E	A	A	N	E	M		N	A	I	
	120	30	30	10	E	M	A	N	E	M	60	N	M	A	Dicariótico Dicariótico
				15	E	A	A	N	M	M		N	M	A	
	150	25	25	10	E	N	N	N	E	M	60	N	M	A	Dicariótico Dicariótico
				15	E	N	M	N	M	M		N	M	A	
	150	30	30	10	E	N	N	E	N	M	60	N	M	M	Dicariótico Dicariótico
				15	E	N	M	E	M	A		N	M	A	
5	150	30	30	5	N	N	E	N	N	E	60	N	E	E	Dicariótico Dicariótico
				10	N	E	M	N	E	M		N	M	A	
6	150	30	30	10	N	N	E	N	E	E	120	N	E	E	Dicariótico

Desarrollo micelial. N: nulo, E: escaso, M: moderado, A: abundante, I: incontable.

* Doble solución desdicariorizante



En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos al incrementar el tiempo de macerado en el séptimo experimento a 180 y 210 s, observándose un mayor daño en el micelio con el mayor tiempo de macerado (210 s) y al mismo tiempo un número reducido de colonias con el inóculo empleado (10 μ L). Como resultado se obtuvieron colonias dicarióticas con algunos sectores sin fíbulas. De este experimento se concluyó que el micelio de *P. eryngii*, presenta una gran resistencia al daño mecánico.

En el octavo experimento se incrementaron las concentraciones de glucosa y peptona respectivamente (30, 40 y 60 g/L) y se retomaron los tiempos de macerado con los que se trabajó previamente (120, 150, 180 y 210 s). Se decidió disminuir la homogeneización a 30 s para evitar la propagación de los dicariotes, debido a que este tipo de micelio se encuentra en mayor proporción que el monocariote en la SD y al homogeneizar mayores tiempos se favoreciera la fragmentación del micelio dicariote. El inóculo en AEM se mantuvo en 10 μ L con el objeto de favorecer el aislamiento de colonias. Los resultados derivados del incremento en la concentración fueron colonias dicarióticas con algunos sectores sin fíbulas para las mayores concentraciones (40 y 60 g/L de glucosa y peptona) y para los tiempos menores de macerado (120 y 150 s). Para los tiempos mayores de macerado (180 y 210 s) se obtuvieron igualmente colonias dicarióticas con sectores sin fíbulas para todas las concentraciones.

En resumen para el octavo experimento el crecimiento y recuperación del micelio en los tres medios (SD, AEM y EM) fue más lento y nulo para la concentración de 60 g/L glucosa y peptona y macerado de 180 s. Lo que indicó que el micelio sufrió un mayor daño. Sin embargo, se obtuvo el mismo resultado que con concentraciones menores, lo cual no hace sustentable el posterior uso de dicha concentración, esto debido posiblemente a que la separación de los componentes monocarióticos no depende de la desestabilización producida por el medio desdicarizante, sino que posiblemente radique en el daño mecánico producido al micelio por el macerado. Como se muestra en la Tabla 9 el mejor tiempo de macerado de este experimento fue 210 s y como no se observaron diferencias entre las concentraciones de 30 y 40 g/L de glucosa y peptona, en los experimentos subsecuentes se utilizó la menor concentración (30 g/L de glucosa y peptona). Por otra parte se puede apreciar que el incremento en el inóculo en AEM favoreció el desarrollo de colonias, debido probablemente a que las condiciones empleadas son más severas, lo cual produjo una recuperación del micelio más lenta.



Tabla 8. Condiciones experimentales para la desdicariorización una cepa comercial de *P. eryngii* (experimentos 7 y 8).

Exp.	Condiciones				Desarrollo micelial									Tipo de micelio en AEM	
	Maceración (s)	SD (g/L)		Inóculo (μL)	Extracto de Malta Líquido (EM)			Solución desdicariorizadora (SD)			Homogeneización (s)	Extracto de Malta Sólido (AEM)			
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)							Tiempo de incubación (días)			
					3	5	8	3	5	8		3	5		8
7	180	30	30	10	N	E	A	N	E	M	60	N	E	M	Dicariótico/secciones monocarióticas
	210	30	30	10	N	E	M	N	E	M	60	N	E	E	Dicariótico/secciones monocarióticas
8	120	30	30	10				N	M	A	30	N	M	A	Dicariótico
	120	40	40	10	E	M	A	N	M	A	30	N	E	M	Dicariótico/secciones monocarióticas
	120	60	60	10				N	E	M	30	N	M	M	Dicariótico/secciones monocarióticas
	150	30	30	10				N	E	M	30	N	E	M	Dicariótico
	150	40	40	10	N	M	A	N	E	E	30	N	E	E	Dicariótico/secciones monocarióticas
	150	60	60	10				N	N	E	30	N	N	E	Dicariótico/secciones monocarióticas
	180	30	30	10				N	E	M	30	N	E	M	Dicariótico/secciones monocarióticas
	180	40	40	10	N	E	M	N	E	E	30	N	E	M	Dicariótico/secciones monocarióticas
	180	60	60	10				N	E	E	30	N	E	M	Dicariótico/secciones monocarióticas

Desarrollo micelial. N: nulo, E: escaso, M: moderado, A: abundante, I: incontable.



Tabla 9. Condiciones experimentales para la desdicariorización de la cepa comercial de *P. eryngii* (experimentos 8-10).

Exp.	Condiciones				Desarrollo micelial									Tipo de micelio en AEM	
	Maceración (s)	SD (g/L)		Inóculo (µL)	Extracto de Malta Líquido (EM)			Solución desdicariorizadora (SD)			Homogeneización (s)	Extracto de Malta Sólido (AEM)			
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)							Tiempo de incubación (días)			
					4	8	11	4	8	11		4	8		11
8	210	30	30	10				N	E	M	30	N	E	M	Dicariótico /secciones monocarióticas
	210	40	40	10	N	N	N	N	N	E	30	N	E	E	Dicariótico /secciones monocarióticas
	210	60	60	10				N	N	E	30	N	N	E	Dicariótico /secciones monocarióticas
9	150	25	25	25				E	M	---	60	N	A	---	Dicariótico
	150	30	30	25	E	A	---	E	M	---	60	N	A	---	Dicariótico /secciones monocarióticas
	150	40	40	25				N	M	---	60	N	M	---	Dicariótico /secciones monocarióticas
	150	60	60	25				N	E	E	60	N	N	E	Dicariótico
10	240							N	E	A	60	N	M	A	Dicariótico
	240	25	25	25				N	E	A	60	N	M	A	Monocariótico/ Dicariótico
	240	30	30	25	N	E	M	N	E	M	60	N	M	A	
	240	40	40	25				N	E	M	60	N	E	M	Dicariótico
	240	60	60	25				N	E	E	60	N	N	E	Dicariótico

Desarrollo micelial. N: nulo, E: escaso, M: moderado, A: abundante, I: incontable.



En el noveno experimento se reconsideró el procedimiento de Valencia del Toro (1999) para la desdicariorización de cepas de *Pleurotus* spp., cuyas condiciones de trabajo fueron:

- Tiempo de macerado: 150 segundos.
- Concentración de glucosa: 20 g/L.
- Concentración de peptona: 20 g/L.
- Tiempos de homogenización después de observar desarrollo micelial en solución desdicariorizadora: 120 segundos.
- Volumen de inoculación (AEM): 50 y 100 μ L.

Considerando la experiencia y los resultados previos (experimentos 3-6 y 8) donde se empleó el mismo tiempo de macerado (150 s) y tomando en cuenta que la concentración de la SD afecta considerablemente al micelio, en el noveno experimento se incrementaron las concentraciones de glucosa y peptona (25, 30, 40 y 60 g/ L) y se disminuyeron los volúmenes de inoculación en AEM a 25 μ L. Como se aprecia en la Tabla 9 se confirmó que las concentraciones más adecuadas para causar un mayor daño micelial son 30 y 40 g/L de glucosa y peptona. El inóculo usado permitió un desarrollo moderado de colonias en AEM, lo que dio la pauta para mantener dicho volumen posteriormente.

En el décimo experimento se retomó incrementar el tiempo de macerado a 240 s y se mantuvieron las condiciones del experimento anterior, con ésto se obtuvieron dos colonias con micelio monocariótico en su mayoría y solo pequeños sectores de tipo dicariótico (Tabla 9). Nuevamente este experimento nos deja ver la resistencia tan amplia de la cepa de *P. eryngii* al daño mecánico.

En el décimo primer experimento (Tabla 10) se incrementó el tiempo de macerando a 300 s y se disminuyeron las concentración de glucosa y peptona en la SD a 25 g/L y el tiempo de homogeneización a 30 s para garantizar la conservación de la cepa, dadas las condiciones tan severas a las que se ha sometido, teniendo como resultado un mayor daño al micelio, reflejado en un incremento en el tiempo de recuperación del mismo (12 días) en comparación con los experimentos previos (3-8 días). En su mayoría se obtuvieron colonias dicarióticas y las primeras tres colonias tentativamente monocarióticas (PeC1, PeC2 y PeC3), las cuales fueron aisladas y observadas al



microscopio, para su posterior confirmación y clasificación (la colonia PeC2 no fue de tipo monocariote, pues presentó fíbulas en el micelio).

Paralelamente se realizó el décimo segundo experimento (12a) con las mismas condiciones que el anterior, incrementando la concentración de la SD a 30 g/L de glucosa y peptona. Apreciando en la Tabla 10 que el daño micelial en este caso fue mayor que en el experimento 11 donde se usó la concentración de 25 g/L de glucosa y peptona. Estas condiciones permitieron el desarrollo moderado de colonias en forma aislada y un incremento en la obtención de monocariotes (PeC4- PeC8) los cuales se aislaron y observaron al microscopio para su posterior clasificación.

En los experimentos siguientes (12b -12e) se modificaron los volúmenes del inóculo en AEM buscando incrementar la recuperación de neohaplontes. El resultado fue el aumento excesivo de colonias en los volúmenes de 50 y 100 μ L de inóculo, dificultando el aislamiento de monocariotes ya que la recuperación de éstos en AEM es mucho más lento que las colonias de tipo dicarióticas (15-18 días).

En la Tabla 11 se observa que las condiciones óptimas para la descariotización de la cepa de *P. eryngii* fueron:

- Tiempo de macerado: 5 minutos.
- Tiempo de homogeneización: 30 segundos.
- Concentración de glucosa: 30 g/L.
- Concentración de peptona: 30 g/L.
- Volumen de inoculación en AEM: 25 μ L (con el cual se obtiene desarrollo micelial moderado, que permite el aislamiento adecuado de monocariotes, Exp. 12d).

Inicialmente se obtuvieron 45 posibles neohaplontes, que al ser verificados para su clasificación, 10 de ellos fueron identificados de tipo dicariótico. Por lo que el total de neohaplontes obtenidos fue de 35. En la Tabla 11 se presenta un resumen de los experimentos en donde fue posible la obtención de neohaplontes.



Tabla 10. Condiciones óptimas de desdicariorización de la cepa comercial de *P. eryngii* (experimentos 11 y 12).

Exp.	Condiciones				Desarrollo micelial												Tipo de micelio en AEM	
	Maceración (s)	SD (g/L)		Inóculo (μL)	Extracto de Malta Líquido (EM)				Solución desdicariorizadora (SD)				Homogeneización (s)	Extracto de Malta Sólido (AEM)				
		Peptona	Glucosa		Tiempo de incubación (días)									Tiempo de incubación (días)				
					5	9	12	15	5	9	12	15		5	9	12		15
11	300	25	25	25	N	E	M	A	N	E	E	M	30	N	N	E	M	Dicariótico y monocariótico
12a	300	30	30	25	N	E	M	M	N	E	E	M	30	N	N	E	E	Dicariótico y monocariótico
12b	300	30	30	25	N	E	M	M	N	E	E	M	30	N	N	E	M	Dicariótico y monocariótico Dicariótico y monocariótico
				50	N	E	M	A	N	E	E	M		N	N	E	M	
12c	300	30	30	25	N	E	M	M	N	E	E	M	30	N	N	E	M	Dicariótico y monocariótico Dicariótico y monocariótico Dicariótico y monocariótico
				50	N	E	M	A	N	E	E	M		N	N	E	M	
				100	N	E	M	A	N	E	E	M		N	E	M	A	
12d	300	30	30	25	N	E	M	M	N	E	E	M	30	N	N	E	M	Dicariótico y monocariótico Dicariótico y monocariótico
				50	N	E	M	A	N	E	E	M		N	N	E	M	
12e	300	30	30	25	N	E	M	M	N	E	E	M	30	N	N	E	M	Dicariótico y monocariótico Dicariótico y monocariótico
				50	N	E	M	A	N	E	E	M		N	N	E	M	

Desarrollo micelial. N: nulo, E: escaso, M: moderado, A: abundante, I: incontable.



Tabla 11. Experimentos y condiciones donde se dio la recuperación de neohaplotentes

Exp.	Condiciones experimentales					Tipo de micelio	Clave de los neohaplotentes obtenidos
	Maceración (s)	Homogeneización (s)	SD: g/L		Inóculo (μL)		
			Peptona	Glucosa			
11	300	30	25	25	25	D>>M	PeC1 PeC3
12a	300	30	30	30	25	D>M	PeC4 PeC5 PeC6 PeC7 PeC8
12b	300	30	30	30	25	D>M	PeC9 PeC11 PeC12 PeC15
					50		PeC17 PeC18 PeC19
12c	300	30	30	30	25	D>M	PeC20 PeC21 PeC23
					50		PeC24 PeC27
					100		PeC29
12d	300	30	30	30	25	D>M	PeC30 PeC32 PeC33 PeC34 PeC35 PeC36
					50		PeC37 PeC38 PeC39
12e	300	30	30	30	25	D>M	PeC40 PeC41 PeC42 PeC43
					50		PeC44 PeC45



8.2 Clasificación de los neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad

Después de la confirmación del carácter monocariótico se realizaron cruza entre los neohaplontes para su clasificación en los dos tipos de compatibilidad. En la Tabla 12 se muestran los cinco neohaplontes seleccionados al azar que fueron cruzados con todos los neohaplontes obtenidos. Como resultado de las cruza se aprecia claramente la clasificación de todos los neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad (nh1 y nh2).

En la Tabla 12 se presentan los neohaplontes clasificados de acuerdo a su tipo de compatibilidad. A estos datos se les realizó la prueba estadística de CHI o JI cuadrada (χ^2). En la Tabla 13 se observa que el valor de χ^2 calculado para una distribución 1:1, es mayor que el valor de χ^2 de tablas ($\alpha= 0.05$) por lo tanto se rechaza la hipótesis de una recuperación igual de ambos tipos. Por otra parte el valor de χ^2 calculado para una distribución 2:1, es menor que el valor de χ^2 de tablas ($\alpha= 0.05$) por lo tanto se acepta la hipótesis y se concluye que la distribución de recuperación entre ambos tipos de neohaplontes fue 2:1.



Tabla 12. Cruzas de los neohaplontes para su clasificación en tipos de compatibilidad

Neohaplontes totales	Neohaplontes tomados al azar				
	PeC7	PeC9	PeC23	PeC20	PeC24
PeC1	-	-	-	+	+
PeC3	-	-	-	+	+
PeC4	-	-	-	+	+
PeC5	-	-	-	+	+
PeC6	-	-	-	+	+
PeC7	-	-	-	+	+
PeC8	-	-	-	+	+
PeC9	-	-	-	+	+
PeC11	-	-	-	+	+
PeC17	-	-	-	+	+
PeC18	-	-	-	+	+
PeC19	-	-	-	+	+
PeC21	-	-	-	+	+
PeC23	-	-	-	+	+
PeC24	-	-	-	+	+
PeC30	-	-	-	+	+
PeC32	-	-	-	+	+
PeC33	-	-	-	+	+
PeC34	-	-	-	+	+
PeC36	-	-	-	+	+
PeC37	-	-	-	+	+
PeC38	-	-	-	+	+
PeC39	-	-	-	+	+
PeC40	-	-	-	+	+
PeC41	-	-	-	+	+
PeC43	-	-	-	+	+
PeC44	-	-	-	+	+
PeC12	+	+	+	-	-
PeC15	+	+	+	-	-
PeC20	+	+	+	-	-
PeC27	+	+	+	-	-
PeC29	+	+	+	-	-
PeC35	+	+	+	-	-
PeC42	+	+	+	-	-
PeC45	+	+	+	-	-

Tabla 13. Resultados de la prueba de χ^2 para determinar la frecuencia de recuperación entre ambos tipos de neohaplontes (nh1 y nh2)

Neohaplontes totales	Tipos de compatibilidad		Valores calculados de χ^2 para distribución	
	I	II	1:1	2:1
35	27	8	10.31	1.4165

χ^2 de Tablas ($\alpha=0.05$) = 3.841



8.3 Obtención de híbridos

Posterior a la obtención de los neohaplontes de *P. eryngii*, se realizaron diferentes tipos de apareamientos entre éstos y neohaplontes de *L. edodes* y *Pleurotus* spp., así como apareamientos con cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp. y cepas dicarióticas de *P. ostreatus* para la obtención de híbridos de interés comercial.

8.3.1 Apareamientos entre neohaplontes de *P. eryngii* y neohaplontes de *L. edodes*.

En la Tabla 14 se observa que el apareamiento de neohaplontes de *P. eryngii* y *L. edodes*, resultó en la obtención de 11 híbridos. Teniendo así que para los neohaplontes de *P. eryngii* de tipo nh1 (PeC9, PeC23, PeC25, PeC38 y PeC40), sólo el neohaplonte PeC40 se cruzó con 6 diferentes neohaplontes de *L. edodes* (L21-2S, L18-1S, L18-2S, L10-1S, L10-4S, y L10-4S2) dando como resultado la obtención de 6 híbridos. Por otra parte se observó que todos los neohaplontes de tipo nh2 de *P. eryngii* (PeC12, PeC20, PeC27, PeC29 y PeC45) se cruzaron con un mismo neohaplonte de *L. edodes* (L21-3S).

Todos los híbridos obtenidos se llevaron a la etapa de fructificación, evaluándolos tanto en sustrato para *P. eryngii*, como en sustrato para *Lentinula*. Al fructificar las cepas se observó que la morfología de los híbridos obtenidos con el neohaplonte de *P. eryngii* de tipo I (PeC40), fue semejante a *Lentinula* en todos los casos, mientras que para los híbridos obtenidos en las cruces de los 5 neohaplontes de *P. eryngii* de tipo II con el neohaplonte de *Lentinula* L21-3S presentan una morfología semejante a *P. eryngii*.

8.3.1.1 Fructificación de los híbridos de *P. eryngii* x *L. edodes* en sustrato de *Lentinula* con morfología de *Lentinula*.

En la Tabla 15 se presentan los valores de la eficiencia biológica total obtenida en 12 semanas de producción para las 6 cepas híbridas. Se realizó un análisis de varianza (Tabla 27: Anexo 2) en donde se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas híbridas y no se obtuvieron diferencias significativas para las repeticiones (lo cual indica que el número de réplicas fue el adecuado).

La prueba de Duncan nos permitió observar que la cepa más productiva corresponde al grupo f (PeC40/ L21-2S) con una eficiencia biológica de 153% (Tabla 27.1: Anexo 2).



Además en la Tabla 15 se observa que las cepas híbridas que corresponde al grupo e superaron el 100% de EB total (119-124%), las cuales también superaron la EB de las cepas parentales incluyendo a la cepa L9 (control más productiva de *L. edodes*) con EBs totales de 34 – 84%. Sólo el híbrido PeC40 / L18- 2S no rebasó la EB de sus cepas parentales (51%).

Los 4 híbridos más productivos, presentaron las siguientes características morfológicas (Tablas 16 y 16.1).

- PeC40/ L21-2S: Esporóforos de tamaños medianos, grandes y gigantes, color café oscuro con pocas escamas en el píleo, estípite mediano, largo y también con escamas color beige.
- PeC40/ L10-4S: Esporóforos de tamaños grandes y gigantes, color café oscuro con abundantes escamas en el píleo, estípite largo, grueso, con escamas, color beige con manchas cafés.
- PeC40/ L10-4S2: Esporóforos de tamaños chicos, medianos y grandes, color café claro con abundantes escamas en el píleo, estípite mediano, grueso y escamoso color blanquecino.
- PeC40/ L10-1S: Esporóforos de tamaños chicos, medianos, grandes y gigantes, color café claro con escasas escamas en el píleo, estípite largo, delgado, con pocas escamas, color café claro.

8.3.1.2 Fructificación de los híbridos de *P. eryngii* x *L. edodes* en sustrato de *P. eryngii* con morfología de *Lentinula*.

En la Tabla 15 se aprecia que por lo general las eficiencias biológicas para estos híbridos son menores a los reportados en el sustrato de *Lentinula*. Así por ejemplo (Tabla 27.1: Anexo 2) se observa que la cepa más productiva en los dos tipos de sustratos fue la PeC40/ L21-2S, presentando una EB de 153 ± 9 en el sustrato de *Lentinula*, mientras que en el sustrato de *P. eryngii* (Tabla 28.1: Anexo 2) fue de 69 ± 12 . Sólo para la cepa (PeC40/L18-2S) los rendimientos fueron semejantes en ambos sustratos (51 y 44% respectivamente). En general se observa que en el sustrato de *eryngii* las EB de todas las cepas híbridas fructificadas fueron menores que las EB obtenidas en el sustrato tipo *Lentinula*, lo que permite decir que el sustrato más conveniente para fructificar estas cepas es el de *Lentinula*.



Tabla 14. Cruzas de neohaplontes de *Pleurotus eryngii* y *Lentinula edodes*

Neohaplonte de <i>P. eryngii</i>	Neohaplontes de <i>L. edodes</i>							Tipo de micelio control
	L21-2S	L21-3S	L18-1S	L18-2S	L10-4S	L10-1S	L10-4S2	
PeC9	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC23	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC25	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC38	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC40	+	-	+	+	+	+	+	M
PeC12	-	+	-	-	-	-	-	M
PeC20	-	+	-	-	-	-	-	M
PeC27	-	+	-	-	-	-	-	M
PeC29	-	+	-	-	-	-	-	M
PeC45	-	+	-	-	-	-	-	M

(+) Micelio dicariótico (híbrido), (-) micelio monocariótico, (M) monocariótico.

Tabla 15. Eficiencia biológica total de las cepas híbridas con fenotipo de *L. edodes* en sustrato de *Lentinula* y *P. eryngii*

Cepas	Eficiencia biológica total (g hongo fresco / 100 g de sustrato seco)						
	Sustrato de <i>Lentinula</i>			Clasificación por Duncan	Sustrato de <i>P. eryngii</i>		
	\bar{x}	\pm	σ		\bar{x}	\pm	σ
L10	33.82	\pm 9.22		a			
PeC40 / L18 2S	50.63	\pm 16.25		b	44.17	\pm 8.04	a
L21	62.51	\pm 4.21		bc			
L18	67.67	\pm 7.53		c			
L9	84.13	\pm 7.84		d			
PeC40 / L18 1S	91.32	\pm 12.88		d	55.25	\pm 7.06	b
PeC40 / L10 1S	119.44	\pm 15.27		e	53.68	\pm 3.18	ab
PeC40/ L10 4S2	123.64	\pm 6.98		e	61.43	\pm 8.45	bc
PeC40 / L10 4S	123.64	\pm 6.98		e	53.68	\pm 3.18	ab
PeC40/ L21 2S	153.38	\pm 9.32		f	68.60	\pm 11.88	c

Letras diferentes indican diferencias significativamente entre las cepas.



Tabla 16. Características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii* x *L. edodes*) con fenotipo de *L. edodes*.


Cepa	Descripción morfológica
<p data-bbox="411 396 609 432">PeC40/L21-2S</p> 	<p data-bbox="890 456 1295 763">Esporóforos de tamaños medianos, grandes y gigantes, color café oscuro con pocas escamas en píleo, estípite mediano, largo y también con escamas, color beige.</p>
<p data-bbox="411 855 609 891">PeC40/L10-4S2</p> 	<p data-bbox="890 936 1295 1285">Esporóforos de tamaños chicos, medianos y grandes, color café claro con abundantes escamas en el píleo, estípite mediano, grueso y escamoso de color blanquecino.</p>
<p data-bbox="411 1393 609 1429">PeC40/ L10-4S</p> 	<p data-bbox="890 1451 1295 1800">Esporóforos de tamaños grandes y gigantes, color café oscuro con abundantes escamas en el píleo, estípite largo, grueso, con escamas, color beige con manchas cafés.</p>



Tabla 16.1 Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii* x *L. edodes*) con fenotipo de *L. edodes*

Cepa	Descripción morfológica a
PeC40/ L10-1S	
	<p>Esporóforos de tamaños chicos, medianos, grandes y gigantes, color café claro con escasas escamas en el píleo, estípite largo, delgado, con pocas escamas, color café claro.</p>
PeC40/ L18-1S	
	<p>Esporóforos de tamaños medianos, grandes y gigantes, color café oscuro con pocas escamas en el píleo con forma acampanada, estípite mediano, grueso, color café oscuro con pocas escamas.</p>
PeC40/L18-2S	
	<p>Esporóforos de tamaño medianos y grandes, color café oscuro con pocas escamas en el píleo, forma marcadamente acampanada, estípite mediano, grueso en la base y color beige con escamas.</p>



8.3.1.3 Fructificación de los híbridos de *P. eryngii* x *L. edodes* en sustrato de *Lentinula* con morfología de *P. eryngii*.

En la Tabla 17 se presentan las EB de los 5 híbridos con fenotipo semejante a *P. eryngii*. Como resultado del análisis de varianza de los resultados se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas y no se obtuvieron diferencias significativas para las repeticiones, lo cual indica que el número de replicas fue el adecuado (Tabla 30: Anexo 2).

La prueba de Duncan (Tabla 30.1: Anexo 2) nos permitió observar que la cepa más productiva en este sustrato correspondió al grupo **d** (PeC45/L21-3S) con una eficiencia biológica de 112 ± 18 , siendo esta la única cepa que rebasó el 100% de EB. El resto de las cepas presentaron EB de 14 a 56%.

El híbrido más productivo, presentó las siguientes características morfológicas (Tabla 18).

- Pec45/L21-3S: Esporóforos de tamaño grandes y gigantes, píleo color café claro pardeado con bordes ondulados, estípites largo y grueso color blanco.

8.3.1.4 Fructificación de los híbridos de *P. eryngii* x *L. edodes* en sustrato de *P. eryngii* con morfología de *P. eryngii*

En la tabla 18 se presentan las EB de los 5 híbridos con fenotipo semejante a *P. eryngii*. Como resultado del análisis de varianza (Tabla 29: Anexo 2) se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas y no se obtuvieron diferencias significativas para las repeticiones (lo cual indica que el número de replicas fue el adecuado). La prueba de Duncan (Tabla 29.1: Anexo 2) nos permitió observar que ninguno de los híbridos superó la producción de la cepa parental de *P. eryngii*, con EB de 13 a 67% con respecto a 151% de la cepa parental.

En resumen se observa que los rendimientos de las cepas con morfología semejante *P. eryngii* en sustrato de *eryngii* fueron bajos (13-67%) y en ninguno de los casos superó el 100% de EB. Además se observó que dos cepas (PeC20/ L21-3S y PeC29/ L21-3S) produjeron mayores rendimientos en sustrato de *eryngii* lo que hace suponer que probablemente los requerimientos nutrimentales de estas cepas son semejantes a la cepa parental de *P. eryngii*.



Por otro lado en el sustrato de *Lentinula* las cepas PeC12/L21-3S y PeC45/L21-3S produjeron mayores rendimientos en este sustrato y esta última logró rebasar el 100% de EB. Razón por la cual es probable que dichas cepas hayan heredado los requerimientos nutrimentales del género *Lentinula*.

Tabla 17. Eficiencia biológica de cepas híbridas con fenotipo de *P. eryngii* en sustrato de *Lentinula* y *P. eryngii*

Cepa	EB total (g hongo fresco / 100 g de sustrato seco)							
	Sustrato de <i>Lentinula</i>			Sustrato de <i>P. eryngii</i>				
	\bar{x}	\pm	σ	Clasificación por Duncan	\bar{x}	\pm	σ	Clasificación por Duncan
PeC20/L21-3S	14.12	\pm 1.94		a	43.61	\pm 7.02		b
PeC29/L21-3S	21.42	\pm 5.94		ab	61.25	\pm 8.63		cd
PeC12/L21-3S	33.47	\pm 3.61		b	13.16	\pm 1.91		a
PeC27/L21-3S	56.38	\pm 8.27		c	67.44	\pm 10.96		d
PeC45/L21-3S	111.79	\pm 17.55		d	56.13	\pm 6.00		c
<i>P. eryngii</i>					151.42	\pm 11.49		e

Letras diferentes indican diferencias significativamente entre las cepas.



Tabla 18. Características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii* x *L. edodes*) con fenotipo de *P. eryngii*.




Cepa	Descripción morfológica
<p data-bbox="411 349 608 383">PeC45/ L21-3S</p> 	<p data-bbox="890 398 1294 640">Esporóforos de tamaño grandes y gigantes, píleo color café claro pardeado con bordes ondulados, estípote largo y grueso color blanco.</p>
<p data-bbox="411 763 608 797">PeC12/L21-3S</p> 	<p data-bbox="890 813 1294 1111">Esporóforos de tamaño chicos, medianos y grandes, píleo color café claro con bordes regulares, estípote mediano, delgado a grueso, color blanco.</p>
<p data-bbox="411 1234 608 1267">PeC27/L21-3S</p> 	<p data-bbox="890 1283 1294 1536">Esporóforos de tamaño chicos y medianos, píleo color arena con bordes ondulados, estípote mediano, delgado a grueso, color blanco.</p>



Tabla 18.1 Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii* x *L. edodes*) con fenotipo de *P. eryngii*.

Cepa	Descripción morfológica
PeC20/L21-3S	<p data-bbox="890 477 1294 775">Esporóforos de tamaño chicos y medianos, píleo color arena con bordes regulares, estípite mediano y grueso, estriado en la parte superior y color blanco.</p>
	
PeC29/L21-3S	<p data-bbox="890 931 1294 1229">Esporóforos de tamaño chicos y medianos, píleo color café claro con bordes regulares, estípite mediano y grueso, color blanco con manchas color arena.</p>
	



8.3.2 Apareamientos entre neohaplontes de *P. eryngii* y cepas monocarióticas y neohaplontes de *Pleurotus* spp.

Con este tipo de apareamiento se buscó la obtención de híbridos entre *P. eryngii* y *Pleurotus* spp. para obtener cepas de este género con características organolépticas y morfológicas novedosas, así como EB de interés comercial. Se realizaron 70 apareamientos entre los neohaplontes de *P. eryngii* con los monocariotes y neohaplontes de *Pleurotus* spp. donados por ECOSUR y UPIBI respectivamente. En ningún caso fue posible la obtención de híbridos.

Por otra parte se realizaron 690 apareamientos entre 12 de los neohaplontes obtenidos (6 del tipo nh1 y 6 del tipo nh2) con cada una de las cepas que se muestran en la Tabla 2, estas cepas corresponden a monocariotes silvestres y comerciales de *Pleurotus* spp. En este caso posiblemente se presentaron algunos factores de incompatibilidad genética que impidieron la obtención de híbridos.

8.3.3 Apareamientos de tipo di-mono (dicarición–monocarición) entre cepas dicarióticas de tipo comercial de *Pleurotus* spp. y los neohaplontes obtenidos de *P. eryngii*

Debido a la posible incompatibilidad genética observada entre los neohaplontes obtenidos de *P. eryngii* y neohaplontes y cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp. se buscó producir híbridos con cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. y neohaplontes de *P. eryngii* por medio de apareamientos de tipo di-mono.

En la Tabla 19 se presentan los 28 híbridos obtenidos a partir de cruces de tipo dicarición–monocarición. Del total de híbridos obtenidos, 10 correspondieron a neohaplontes de tipo nh1 y 18 al tipo nh2 y de ellos sólo 19 se llevaron a la etapa de fructificación. Los criterios de selección para la etapa de fructificación consideraron una clasificación de los híbridos en tres categorías:

- 1) Crecimiento micelial del híbrido mayor a las cepas parentales.
- 2) Crecimiento micelial del híbrido semejante a una de las cepas parentales.
- 3) Crecimiento micelial del híbrido menor a una de las cepas parentales.



Se consideró que de esta forma se contaría con cepas con diferentes características que al ser evaluadas en la etapa de fructificación posiblemente se obtuviera una gran gama de características morfológicas y fisiológicas entre las cepas evaluadas.

En el anexo 1 (análisis estadístico), se presenta un ejemplo de cada una de estas categorías. Así las cepas seleccionadas para la etapa de fructificación fueron:

Cepas con crecimiento micelial del híbrido mayor a las cepas parentales:

- PeC9/CP50
- PeC12 / P401
- PeC12 / *P. djamur*
- PeC20 / *P. djamur*
- PeC20 / IE 200
- PeC35 / *P. djamur*
- PeC35 / HK 3539
- PeC38 / *P. djamur*
- PeC38 / P 401
- PeC38 / ASP 14
- PeC44 / *P. djamur*
- PeC44 / P 401

Cepas con crecimiento micelial del híbrido semejante a una de las cepas parentales:

- PeC11 /CP50
- PeC35/ *P. ostreatus* blanco
- PeC35 /P401
- PeC44 / CP 253

Cepa con crecimiento micelial del híbrido menor a una de las cepas parentales:

- PeC12 / CP 253
- PeC20 / ASP 14
- PeC20 / IE 201

8.3.3.1 Fructificación de los híbridos de *P. eryngii* x *Pleurotus* spp. en sustrato de *P. eryngii*

En la Tabla 20 se presentan las EB de los 19 híbridos con fenotipo semejante a *Pleurotus*. Como resultado del análisis estadístico (Tabla 31: Anexo 2) se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas y no se obtuvieron diferencias significativas para las repeticiones (lo cual indica que el número de réplicas fue el adecuado).

La prueba de Duncan (Tabla 31.1: Anexo 2) nos permitió observar que la cepa más productiva PeC11/CP50 corresponde al grupo k con una eficiencia biológica total de 323%. A continuación se describen las cepas híbridas con mayor rendimiento para cada neohaplonte.



Así para el neohaplonte PeC9 su híbrido más productivo (PeC9/CP50) presentó una EB total de 271% (grupo **j**). Para el neohaplonte PeC12 el híbrido PeC12/P401 (grupo **i**) produjo una EB total de 207%.

La cepa más productiva del neohaplonte PeC35 fue PeC35/*P. ostreatus* blanco produjo una EB total de 177% (grupo **h**). En conjunto todas las cepas anteriores superaron en EB total a sus correspondientes cepas parentales incluyendo a *P. eryngii* la cual presentó una EB total de 151%.

Para el neohaplonte PeC20 la mejor EB total se obtuvo con el híbrido PeC20/*P. djamur* (123%), el cual superó a la cepa parental de *P. djamur* (92% EB) pero no la cepa de *P. eryngii* (grupo **g**).

Por otra parte para el neohaplonte PeC38 dos de sus híbridos PeC38/ASP14 y PeC38/P401) presentaron una EB total muy semejante (mismo grupo: **def**) con EB de 114%.

Para el neohaplonte PeC44 la mejor EB (111%) se obtuvo con el híbrido PeC44/CP253.

En la Tabla 20 se observa que sólo tres híbridos (PeC20/IE201, PeC44/*P. djamur* y PeC38/*P. djamur*) presentaron rendimientos inferiores al 100% de EB (grupos **bcde**). Sin embargo, a pesar de sus relativamente bajos rendimientos (76-99%) éstos son superiores a sus respectivas cepas dicarióticas parentales.

En general las características morfológicas de todos los híbridos son interesantes dado que se obtuvieron cepas con estípites medianos y largos de diferentes gruesos, al mismo tiempo que las nuevas cepas adquirieron una gran diversidad en píleo, ya sea en forma, color y/o textura. Estas diferencias se pueden apreciar en las Tablas 22-23.4.

En la Tabla 21 se presenta un resumen del total de híbridos obtenidos, en el presente trabajo de mejoramiento genético, tanto por apareamiento entre neohaplontes, como por cruza dicarión - monocarión.



Tabla 19. Cruzas Di- mono

Neohaplontes <i>P. eryngii</i>	Cepas dicarióticas												
	IE201	<i>P. djamur</i>	CP253	IE200	Asp14	P401	<i>P. ostreatus</i> blanco	nhFI	HK35-39	P411	PM12	CP50	control
PeC9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	M
PeC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	M
PeC38	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	M
PeC40	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC44	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	M
PeC12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	M
PeC20	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	M
PeC29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M
PeC35	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	M
PeC45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M

(+) Micelio dicariótico (híbrido), (-) micelio monocariótico, (M) monocariótico.

Tabla 20. Eficiencia biológica de las cepas híbridas con fenotipo de *Pleurotus* en sustrato de *P. eryngii*

Cepa	EB total (g de hongo fresco / 100 g de sustrato en base seca)		Clasificación por Duncan
	\bar{x}	$\pm \sigma$	
IE201	26.58	± 3.98	a
CP253	35.05	± 2.98	a
IE200	40.67	± 8.73	a
CP50	43.47	± 9.74	a
PeC20/IE201	75.91	± 11.82	b
PeC44/ <i>P. djamur</i>	78.27	± 3.84	b
<i>P. ostreatus</i> blanco	78.66	± 17.56	b
P401	85.70	± 8.86	bc
<i>P. djamur</i>	92.11	± 8.75	bcd
PeC38/ <i>P. djamur</i>	99.54	± 2.15	bcde
PeC12/CP253	104.90	± 14.50	cdef
PeC44/P401	107.64	± 3.64	cdef
PeC35/P401	108.03	± 3.95	cdef
PeC20/IE200	108.44	± 12.80	cdef
PeC44/CP253	111.38	± 11.22	cdef
PeC20/ASp14	113.27	± 14.01	def
PeC38/ASP14	114.54	± 2.49	def
PeC38/P401	114.85	± 5.80	def
PeC12/ <i>P. djamur</i>	119.83	± 21.84	ef
PeC20/ <i>P. djamur</i>	122.87	± 10.52	ef
PeC35/ <i>P. djamur</i>	127.86	± 9.81	f
<i>P. eryngii</i>	151.42	± 11.49	g
PeC35/HK35-39	156.40	± 6.67	gh
PeC35/ <i>P. ostratus</i> b	177.20	± 42.92	h
PeC12/P401	207.02	± 34.98	i
PeC9/CP50	271.39	± 43.84	j
PeC11/CP50	323.02	± 29.46	k

Letras diferentes indican diferencias significativamente entre las cepas.



Tabla 21. Total de híbridos obtenidos

Neohaplonte y/o cepa		Híbrido	Tipo de apareamiento
PeC9	CP50	PeC9 /CP50	Di-mono
PeC11	CP50	PeC11/CP50	Di-mono
PeC12	<i>P. djamur</i>	PeC12/ <i>P. djamur</i>	Di-mono
	CP253	PeC12/CP253	Di-mono
	IE200	PeC12/IE200	Di-mono
	Asp14	PeC12/Asp14	Di-mono
	P401	PeC12/P401	Di-mono
	L21-3S	PeC12/L21-3S	Monocariote
PeC20	<i>P. djamur</i>	PeC20/ <i>P. djamur</i>	Di-mono
	CP253	PeC20/CP253	Di-mono
	IE200	PeC20/IE200	Di-mono
	IE201	PeC20/IE201	Di-mono
	Asp14	PeC12/Asp14	Di-mono
	P401	PeC12/P401	Di-mono
	L21-3S	PeC20/L21-3S	Monocariote
PeC27	L21-3S	PeC27/L21-3S	Monocariote
PeC29	L21-3S	PeC29/L21-3S	Monocariote
PeC35	<i>P. ostreatus blanco</i>	PeC35/ <i>P. ostreatus</i>	Di-mono
	<i>P. djamur</i>	PeC35/ <i>P. djamur</i>	Di-mono
	CP253	PeC35/CP253	Di-mono
	IE200	PeC35/IE200	Di-mono
	Asp14	PeC35/Asp14	Di-mono
	P401	PeC35/P401	Di-mono
	HK35-39	PeC35/HK35-39	Di-mono
PeC38	<i>P. djamur</i>	PeC38/ <i>P. djamur</i>	Di-mono
	Asp14	PeC38/Asp14	Di-mono
	P401	PeC38/P401	Di-mono
PeC40	CP253	PeC40/CP253	Di-mono
	L21-2S	PeC40/L21-2S	Monocariote
	L18-1S	PeC40/L18-1S	Monocariote
	L18-2S	PeC40/L18-2S	Monocariote
	L10-4S	PeC40/L10-4S	Monocariote
	L10-1S	PeC40/L10-1S	Monocariote
	L10-4S2	PeC40/L10-4S2	Monocariote
PeC44	<i>P. djamur</i>	PeC44/ <i>P. djamur</i>	Di-mono
	CP253	PeC44/CP253	Di-mono
	Asp14	PeC44/Asp14	Di-mono
	P401	PeC44/P401	Di-mono
PeC45	L21-3S	PeC44/L21-3S	Monocariote

Tabla 22. Cepas parentales de *P. eryngii* y *Pleurotus* spp.



Cepa	Descripción morfológica
<i>P. eryngii</i>	 <p>Esporóforos de tamaño grande; píleo color café grisáceo con bordes regulares; estípites largo, grueso, color blanco.</p>
<i>P. djamur</i>	
ASP14	 <p>Esporóforos de tamaño grandes; píleo color arena intenso con bordes ondulados; estípites corto, correoso, color beige.</p>
CP50	

Tabla 22.1 Cepas parentales de *Pleurotus* spp.


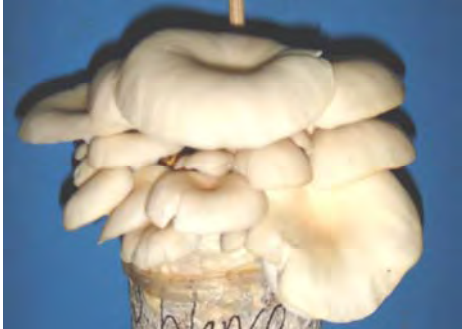
Cepa	Descripción morfológica
CP253	 <p>Esporóforos de tamaños chicos y medianos; píleo color hueso con bordes ondulados; estípite corto, correoso, color blanco.</p>
IE200	
IE201	 <p>Esporóforos de tamaño chicos y medianos; píleo color hueso con bordes ondulados (forma de estrella); estípite corto, correoso, color blanco.</p>
<i>P. ostreatus</i> blanco	
<i>P. ostreatus</i> blanco	 <p>Esporóforos de tamaños medianos y grandes; píleo color blanco con bordes regulares; estípite mediano, color blanco.</p>



Tabla 22.2 Cepas parentales de *Pleurotus* spp y *Lentinula edodes*.



Cepa	Descripción morfológica
<p data-bbox="469 344 536 376">P401</p> 	<p data-bbox="879 405 1294 645">Esporóforos de tamaños medianos y grandes; píleo color café claro con bordes regulares; estípites medianos, color beige.</p>
<p data-bbox="437 730 568 761"><i>L. edodes</i></p> 	<p data-bbox="879 757 1294 1055">Esporóforos de tamaños chicos, medianos y grandes; píleo color café oscuro con escamas en la periferia, bordes regulares; estípites medianos, color beige con escamas.</p>



Tabla 23. Características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii*/*Pleurotus* spp.) con fenotipo de *Pleurotus*.




Cepa	Descripción morfológica
PeC11/ CP50	 <p>Esporóforos de tamaño chicos, medianos y grandes, píleo color café claro con bordes regulares, estípite mediano en forma de corneta, delgado, color blanco.</p>
PeC9/CP50	
PeC12/P401	 <p>Esporóforos de tamaño grandes, píleo color café claro, con bordes ondulados, estípite largo, delgado, color blanco.</p>
PeC35/ <i>P. ostreatus</i> blanco	 <p>Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color café claro con bordes regulares, con forma de trompeta, estípite largo, delgado a grueso, color blanco.</p>



Tabla 23.1 Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii*/*Pleurotus* spp.) con fenotipo de *Pleurotus*.

Cepa	Descripción morfológica
PeC35/HK35-39	 <p>Esporóforos de tamaño grandes y gigantes, píleo color café claro con bordes regulares, estípite mediano a largo, grueso, color beige.</p>
PeC35/ <i>P.djamur</i>	
 <p>PeC35/ <i>P.djamur</i></p>	Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color blanco con el centro color arena con bordes ondulados, estípite mediano, delgado, color blanco.
PeC20/ <i>P. djamur</i>	 <p>PeC20/ <i>P. djamur</i></p>
 <p>PeC12/ <i>P. djamur</i></p>	
PeC12/ <i>P. djamur</i>	Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color hueso con bordes ondulados, estípite corto, grueso, color blanco.



Tabla 23.2 Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii*/*Pleurotus* spp.) con fenotipo de *Pleurotus*.




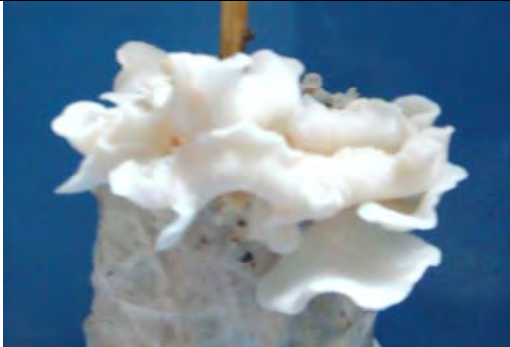
Cepa	Descripción morfológica
PeC38/ P401	 <p>Esporóforos de tamaño grandes, píleo color café claro, con bordes ligeramente ondulados, estípite largo, delgado, color beige.</p>
PeC38/ASP14	
PeC20/Asp14	 <p>Esporóforos de tamaño grandes, píleo color café claro con bordes ligeramente ondulados, estípite mediano, grueso, color beige.</p>
PeC20/Asp14	
PeC44/CP253	 <p>Esporóforos de tamaños grandes, píleo color café grisáceo con bordes ligeramente ondulados, estípite largo, delgado, color blanco.</p>
PeC44/CP253	
PeC44/CP253	 <p>Esporóforos de tamaños chicos y medianos, píleo color blanco con bordes ondulados, estípite corto, grueso, color blanco.</p>
PeC44/CP253	



Tabla 23.3 Continuación de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii*/*Pleurotus* spp.) con fenotipo de *Pleurotus*.








Cepa	Descripción morfológica
PeC20/IE200	 <p>Esporóforos de tamaño grandes y gigantes, píleo color café claro con pigmentación concéntrica café oscuro, con bordes regulares, estípite largo, grueso, color beige.</p>
PeC35/P401	
PeC35/P401	 <p>Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color café claro con bordes regulares, estípite largo, delgado, color beige.</p>
PeC44/ P401	
PeC44/ P401	 <p>Esporóforos de tamaño grandes y gigantes, píleo color café claro con bordes café oscuro regulares, estípite largo, grueso, color beige.</p>
PeC12/CP253	
PeC12/CP253	 <p>Esporóforos de tamaño chicos y medianos, píleo color blanco con el borde grisáceo y ondulado, estípite corto, delgado, color blanco.</p>



Tabla 23.4 Quinta parte de características morfológicas de las cepas híbridas (*P. eryngii* / *Pleurotus* spp.) con fenotipo de *Pleurotus*.

Cepa	
PeC38/ <i>P. djamur</i>	Descripción morfológica
	Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color hueso con el centro color beige, con bordes ondulados, estípite mediano, delgado, color blanco.
PeC44/ <i>P. djamur</i>	
	Esporóforos de tamaño mediano y grande, píleo color hueso, forma enroscada, con bordes ondulados, estípite mediano, delgado, color blanco.
PeC20/ IE201	
	Esporóforos de tamaño medianos y grandes, píleo color café claro con bordes regulares, estípite largo, delgado, color beige.



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Desdicariorización de la cepa de *P. eryngii* y clasificación de neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad.

En los estudios previos de desdicariorización realizados a las cepas de *Pleurotus* spp., se reportan tiempos de maceración de 30 a 150 segundos (Leal-Lara, 1980) y concentraciones de la solución desdicariorizadora de 20 g/L de glucosa anhidra y peptona (Leal-Lara, 1999; Valencia del Toro, 2002), recuperando con dichas condiciones ambos neohaplontes (nh1 y nh2). Para *Pleurotus eryngii* no hay antecedentes de trabajos de desdicariorización de esta especie. En este estudio al realizar dicho procedimiento para una cepa comercial de *P. eryngii*, se encontró una marcada resistencia tanto a las altas concentraciones de glucosa y peptona, como al efecto mecánico de la maceración, como se observa en las tablas de resultados (Tablas 6-10). En general en los trabajos de desdicariorización realizados se ha observado que las cepas del género *Pleurotus* presentan una alta resistencia al efecto mecánico, es decir toleran mayores tiempos de maceración y altas concentraciones de peptona y glucosa como se describe en los resultados de Valencia del Toro (2002). Por otro lado con otros géneros como *Lentinula*, los tiempos de maceración se reducen a rangos que van entre 5 y 30 segundos (Ramírez y Leal, 2002), esta tolerancia puede ser probablemente debido a la morfología y composición de la pared celular de *P. eryngii*.

9.2 Obtención de híbridos

Este trabajo tenía como objetivo la obtención de nuevas cepas con características morfológicas novedosas y atractivas para el consumidor, así mismo se esperaba de las cepas híbridas un mejoramiento genético que se viera reflejado en mayores eficiencias biológicas que permitieran su competitividad frente a las cepas comerciales.

En trabajos previos de mejoramiento genético, de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula*, se empleó la técnica de desdicariorización y se encontró similitud en los resultados, ya que se observa que las cepas híbridas en general presentan valores de EB mayores que las cepas parentales (Ramírez *et al.*, 2007). Lo anterior confirma que la desdicariorización es un método de mejoramiento genético que permite la obtención de híbridos con mayores rendimientos.



Así, tres de las cepas híbridas obtenidas en este estudio (con morfología de *Lentinula*) presentaron EB atractivas (119-153%), lo cual la hace aptas para su producción a escala comercial. Además dichas cepas presentaron características morfológicas interesantes tales como: píleo con mayor carnosidad y firmeza, así como estípites de mayor tamaño y grosor. Lo anterior hace suponer que se llevó a cabo una aportación de genes de *P. eryngii* que contribuyeron al mejoramiento genético de la morfología del género *Lentinula*. Los mayores rendimientos de estas cepas se obtuvieron en sustrato tipo *Lentinula*, esto debido posiblemente a que los requerimientos nutrimentales de los híbridos fueron heredados del género *Lentinula*.

Una aportación de este trabajo es la preservación del fenotipo de *Lentinula*, ya que uno de los dos tipos de compatibilidad (nh1) de los neohaplontes obtenidos de *P. eryngii*, al ser apareado con distintas cepas de *Lentinula edodes*, permitió que se expresara la morfología del género *Lentinula*, lo cual no se había observado en trabajos previos. Ramírez *et al.* (2007) reportaron la obtención de cepas híbridas entre los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* donde prevalece la morfología de *Pleurotus*. El otro tipo de neohaplonte (nh2) expresó una morfología orientada hacia *P. eryngii*, pero con cierta influencia del género *Lentinula*, tales como píleo de color café más intenso y estípites de menor tamaño y grosor.

Por otra parte, se observó un efecto desfavorable en la dedicariotización de la cepa original de *P. eryngii* ya que este proceso afectó de alguna forma la cepa al ser reconstituida. Así se observó que cuando la cepa reconstituida a partir de los dos neohaplontes obtenidos fue llevada a la etapa de fructificación produjo esporóforos hasta la octava semana después de la inducción. Sin embargo, las cepas híbridas obtenidas entre *P. eryngii* y *Pleurotus* spp. iniciaron la producción de esporóforos desde la cuarta semana de incubación (primordios) y posteriormente al inducir su fructificación la producción de esporóforos se obtuvo en la mayoría de las cepas en las dos primeras semanas posteriores a su inducción.

Es de hacer notar que los híbridos obtenidos del apareamiento de neohaplontes de *P. eryngii* y cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp. llevados a la etapa de fructificación, presentaron el mismo patrón de producir mayores EB que sus respectivas cepas parentales, obteniendo EB de 75 a 3213%.



De los 19 híbridos, 16 de ellos presentaron EB superiores al 100% a las 8 semanas de fructificación. Estas cepas mostraron una gran variedad de características morfológicas tanto en píleo (diversos tamaños, colores y formas), como en su estípite (en su mayoría largo, grueso y carnoso) contribuyendo así a la obtención de cepas con características atractivas para su explotación a escala comercial.

Por otra parte no fue posible la obtención de híbridos entre los neohaplontes de *P. eryngii* y las cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp., lo cual posiblemente fue debido a la presencia de algún tipo incompatibilidad genética entre dichas especies.

Finalmente al comparar nuestros resultados de EB de los híbridos obtenidos a partir de neohaplontes con respecto a los programas de mejoramiento genético a partir de progenies meióticas (Andrade, 2007) se observa que los rendimientos de nuestras cepas híbridas en casi todos los casos rebasan el 100% de EB, mientras que las cepas obtenidas por mejoramiento genético de progenies meióticas del género *Pleurotus* en trabajos previos presentaron EB de 40-73% (Valencia del Toro, 2002). Por otra parte el mejoramiento genético de *Lentinula edodes* realizado por Galván (2008) obtuvo rendimientos de 13-73%, lo que sugiere que el mejoramiento genético a partir de neohaplontes favorece la obtención de híbridos con mayor rendimiento, mientras que por el método a partir de progenies meióticas los híbridos que se obtienen generalmente producen bajos rendimientos.



10. CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas para la obtención de neohaplotes de *P. eryngii* fueron:
 - Tiempo de maceración: 5 minutos.
 - Concentración de glucosa: 30g/L
 - Concentración de peptona: 30g/L.
 - Tiempo de homogeneización: 30 segundos.
 - Volumen de inoculación: 25 μ L

- Como resultado de la desdicarización se recuperaron 35 neohaplotes.
- Entre los neohaplotes obtenidos se recuperaron los dos tipos de compatibilidad (nh1 y nh2).
- Por medio de la prueba de χ^2 se observó que la recuperación de neohaplotes de los dos tipos de compatibilidad no presentó una relación 2:1.
- Se obtuvieron 11 híbridos resultado de los apareamiento de *P. eryngii* y *L. edodes*, de los cuales 6 heredaron la morfología de *Lentinula* y 5 de *P. eryngii*.
- No fue posible la obtención híbridos a partir de apareamientos entre neohaplotes de *P. eryngii* y cepas monocarióticas de *Pleurotus* spp.
- Se obtuvieron 28 híbridos resultado de los apareamientos entre *P. eryngii* y cepas dicarióticas de *Pleurotus* spp., de los cuales sólo 19 se llevaron a la etapa de fructificación.
- La mayoría de las cepas híbridas fueron más productivas que sus respectivas cepas parentales.
- El total de cepas híbridas fructificadas fue de 30, de los cuales el 70% (21 cepas) presentaron rendimientos mayores al 100%.
- Los híbridos cuyos rendimientos fueron superiores al 100%, son cepas potencialmente explotables para su uso a escala comercial.
- La morfología de las cepas híbridas muy probablemente fue el resultado de la acción conjunta de los genes y el medio ambiente en el cual se desarrollaron.



ANEXO 1. Análisis estadístico para la evaluación del crecimiento micelial

A continuación se presenta un ejemplo de los resultados del análisis estadístico realizado al crecimiento micelial de los híbridos de *P. eryngii* x *Pleurotus* spp. para su selección en la etapa de fructificación. Para el análisis estadístico se consideró el crecimiento micelial a los 9 días de incubación de cada cepa híbrida y sus correspondientes cepas parentales. Así por ejemplo para el híbrido PeC9/CP50 las cepas parentales que se incluyeron en el análisis estadístico fueron PeC9 y CP50.

Para el análisis estadístico primero se realizó un análisis de varianza para observar si existían diferencias significativas entre el crecimiento micelial de las 3 cepas (Tabla 26). Cuando se encontraron diferencias significativas o altamente significativas entre las cepas se utilizó la prueba de Duncan para clasificar a las cepas (Tabla 26.1). En la Tabla 26.2 se presenta un resumen de los resultados del análisis estadístico realizado a cada cepa híbrida.

Tabla 24. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC9, CP50 y PeC9/CP50.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	22,75	2	11,38	543,58	3.89- 6.93	**
REP	0,30	2	0,15	7,25	3.89- 6.94	**
MEDIDA	0,04	1	0,04	1,70	4.75- 9.33	NS
ERROR	0,25	12	0,02			
TOTAL	23,34	17				

** Diferencia altamente significativa, NS no existe diferencia significativa

Tabla 24.1 Prueba Duncan para crecimiento micelial del híbrido PeC9/CP50 y sus respectivas cepas parentales.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS				Interpretación
Cepas	EBA			
	Grupos			
	I	II	III	
PeC9	4,68			4,68 ± 0,31 a
CP50		6,93		6,93 ± 0,10 b
PeC9/CP50			7,18	7,18 ± 0,12 c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.



Tabla 24.2 Clasificación de la cepa híbrida y las dos cepas parentales de acuerdo a la prueba de Duncan

Cepa	EB total	Clasificación por Duncan
	$\bar{x} \pm \sigma$	
PeC9	4,68 \pm 0,31	a
CP50	6,93 \pm 0,10	b
PeC9/CP50	7,18 \pm 0,12	c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas

Como resultado del análisis estadístico las cepas híbridas fueron clasificadas en tres categorías:

- 1) Cepas con crecimiento micelial del híbrido mayor a las cepas parentales.
- 2) Cepas con crecimiento micelial del híbrido semejante a una de las cepas parentales.
- 3) Cepa con crecimiento micelial del híbrido menor a una de las cepas parentales.

1) Cepas con crecimiento micelial del híbrido mayor a las cepas parentales.

Tabla 24. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC9, CP50 y PeC9/CP50.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	22,75	2	11,38	543,58	3.89 - 6.93	**
REP	0,30	2	0,15	7,25	3.89 - 6.93	**
MEDIDA	0,04	1	0,04	1,70	4.75 - 9.33	NS
ERROR	0,25	12	0,02			
TOTAL	23,34	17				

** Diferencia altamente significativa, NS no existe diferencia significativa

Tabla 24.1 Prueba Duncan para el híbrido PeC9/CP50 y sus respectivas cepas parentales en función de su crecimiento micelial.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS				Interpretación
Cepas	EBA			
	Grupos			
	I	II	III	
PeC9	4,68			4,68 \pm 0,31 a
CP50		6,93		6,93 \pm 0,10 b
PeC9/CP50			7,18	7,18 \pm 0,12c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.



2) Cepas con crecimiento micelial del híbrido semejante a una de las cepas parentales.

Tabla 25. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC11, CP50 y PeC11/CP50.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	45,80	2	22,90	1180,34	3.81- 670	**
REP	0,16	2	0,08	4,24	3.81- 670	*
ERROR	0,25	13	0,02			
TOTAL	46.21	17				

**Diferencia altamente significativa, * diferencia significativa.

Tabla 25.1 Prueba Duncan para crecimiento micelial del híbrido PeC11/CP50 y sus respectivas cepas parentales.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS			Interpretación
Cepas	EBA		
	Grupos		
	I	II	
PeC11	3,83		3,83 ± 0,10 a
CP50		7,18	7,18 ± 0,12 b
PeC11 / CP50		7,25	7,25 ± 0,24 b

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.

3) Cepa con crecimiento micelial del híbrido menor a una de las cepas parentales.

Tabla 26. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento micelial de las cepas PeC12, CP253 y PeC12/CP253.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	18,12	2	9,06	22,67	3.68- 6.36	**
ERROR	6,00	15	0,40			
TOTAL	24,12	17				

** Diferencia altamente significativa.



Tabla 26.1 Prueba Duncan para crecimiento micelial del híbrido híbrido PeC12/CP253 y sus respectivas cepas parentales.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS				Interpretación
Cepas	EBA			
	Grupos			
	I	II	III	
PeC12	2,88			2,88 ± 0,24a
PeC12 / CP 253		4,4		4,40 ± 0,47b
CP 253			5,32	5,32 ± 0,96c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.



ANEXO 2. Análisis estadístico de la eficiencia biológica total de las cepas híbridas

Tabla 27. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 6 cepas híbridas y 4 parentales con fenotipo de *L. edodes* en sustrato de *Lentinula*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculada	Tablas		
					0.05	0.01	
CEPA	56617.33	9	6290.81	55.18	2.16	-2.96	**
ERROR	3990.26	35	114.01				
TOTAL	60607.59	44					

**Diferencia altamente significativa

Tabla 27.1 Prueba Duncan para clasificar las 6 cepas híbridas y 4 parentales híbridas (con fenotipo de *L. edodes* en sustrato de *Lentinula*) de acuerdo a su eficiencia biológica total.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS							Interpretación
Cepas	Eficiencia biológica total						
	Grupos						
	I	II	III	IV	V	VI	
L10	33.82						33.82 ± 9.22 a
PeC40 / L18 2S		50.63					50.63 ± 16.25 b
L21		62.51	62.51				62.51 ± 4.21 bc
L18			67.67				67.67 ± 7.53 c
L9				84.12			84.12 ± 7.84 d
PeC40 / L18 1S				91.32			91.32 ± 12.88 d
PeC40 / L10 1S					119.44		119.44 ± 15.27 e
PeC40/ L10 4S2					123.64		123.64 ± 6.98 e
PeC40 / L10 4S					123.64		123.64 ± 6.98 e
PeC40/ L21 2S						153.38	153.38 ± 9.32 f

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas

Tabla 28. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) de 6 cepas híbridas con fenotipo de *L. edodes* en sustrato de *P. eryngii*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F			Interpretación
				Calculada	Tablas		
					0.05	0.01	
CEPA	1534.75	5	306.95	5.91	2.77	4.25	**
REP	504.45	5	100.89	1.94	2.77	4.25	NS
ERROR	934.82	18	51.93				
TOTAL	3149.27	28					

**Diferencia altamente significativa, NS no existe diferencia significativa



Tabla 28.1 Prueba Duncan para clasificar las 6 cepas híbridas (con fenotipo de *L. edodes* en sustrato de *P. eryngii*) de acuerdo a su eficiencia biológica total.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS				Interpretación
Cepas	Eficiencia biológica total			
	grupos			
	I	II	III	
Pec40/L18-2S	44.17			44.17 ± 8.04 a
Pec40/L10-1S	53.68	53.68		56.67 ± 3.18 ab
Pec40/L10-4S	53.68	53.68		53.68 ± 3.18 ab
Pec40/L18-1S		55.27		55.27 ± 7.06 b
Pec40/L10-4S2		61.43	61.43	61.43 ± 8.45 bc
Pec40/L21-2S			68.60	68.60 ± 11.88 c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas

Tabla 29. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 6 cepas híbridas con fenotipo de *P. eryngii* en sustrato de *P. eryngii*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	51829.14	5	10365.83	187.01	2.77 4.25	**
REP	640.27	5	128.05	2.31	2.77 4.25	NS
ERROR	997.70	18	55.43			
TOTAL	62174.85	28				

** Diferencia altamente significativa, NS no existe diferencia significativa

Tabla 29.1 Prueba Duncan para clasificar las 5 cepas híbridas y 1 parental (con fenotipo de *P. eryngii* en sustrato de *P. eryngii*) de acuerdo a su eficiencia biológica total.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS						Interpretación
cepas	Eficiencia biológica total					
	grupos					
	I	II	III	IV	V	
Pec12/L21-3S	13.16					13.16 ± 1.91a
Pec20/L21-3S		43.61				43.61 ± 7.02b
Pec45/L21-3S			56.13			56.13 ± 6.00c
Pec29/L21-3S			61.26	61.26		61.26 ± 8.63cd
Pec27/L21-3S				67.43		67.43 ± 10.96d
<i>P. eryngii</i>					151.42	151.42 ± 11.49e

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.



Tabla 30. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (12 semanas de cosecha) entre 5 cepas híbridas y 1 parental con fenotipo de *P. eryngii* en sustrato de *Lentinula*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	80384.04	5	16076.81	162.81	2.62 - 3.90	**
ERROR	2369.95	24	98.75			
TOTAL	82754.00	29				

** Diferencia altamente significativa

Tabla 30.1 Prueba Duncan para clasificar las 5 cepas híbridas y 1 parental (con fenotipo de *P. eryngii* en sustrato de *Lentinula*) de acuerdo a su eficiencia biológica total.

Clasificación con el paquete estadístico SPSS						Interpretación
cepas	Eficiencia biológica total					
	grupos					
	I	II	III	IV	V	
PeC20/L21-3S	14.12					14.12 ± 1.94a
PeC29/L21-3S	21.42	21.42				21.42 ± 5.94ab
PeC12/L21-3S		33.47				33.47 ± 3.61b
PeC27/L21-3S			56.38			56.38 ± 8.27c
PeC45/L21-3S				111.79		111.79 ± 17.55d
<i>P.eryngii</i>					151.42	151.42 ± 11.49e

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas.

Tabla 31. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la eficiencia biológica total (8 semanas de cosecha) entre 19 cepas híbridas y 8 cepas parentales con fenotipo de *Pleurotus* en sustrato de *P. eryngii*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valores de F		Interpretación
				Calculada	Tablas 0.05 0.01	
CEPA	559418.44	26	21516.09	68.58	1.60- 1.93	**
REP	1828.62	5	365.72	1.17	2.30-3.19	NS
ERROR	33883.82	108	313.74			
TOTAL	596902.61	139				

**Diferencia altamente significativa, NS no existe diferencia significativa.



Tabla 31.1 Prueba Duncan para clasificar las 19 cepas (con fenotipo de *Pleurotus* en sustrato de *P. eryngii*) de acuerdo a su EB total.

Cepas	Clasificación con el paquete estadístico SPSS											INTERPRETACIÓN (Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas)
	Eficiencia biológica total (grupos)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
IE201	26.58											26.58 ± 3.98 a
CP253	35.05											35.05 ± 2.98 a
IE200	40.67											40.67 ± 8.73a
CP50	43.47											43.47 ± 9.74a
PeC20/IE201		75.91										75.91 ± 11.82b
PeC44/ <i>P. djamur</i>		78.27										78.27 ± 3.84b
<i>P. ostreatus</i> blanco		78.66										78.66 ± 17.56b
P401		85.70	85.70									85.70 ± 8.86bc
<i>P. djamur</i>		92.11	92.11	92.11								92.11 ± 8.75bcd
PeC38/ <i>P. djamur</i>		99.54	99.54	99.54	99.54							99.54 ± 2.15bcde
PeC12/CP253			104.90	104.90	104.90	104.90						104.90 ± 14.50cdef
PeC44/P401			107.64	107.64	107.64	107.64						107.64 ± 3.64cdef
PeC35/P401			108.03	108.03	108.03	108.03						108.03 ± 3.95cdef
PeC20/IE200			108.44	108.44	108.44	108.44						108.44 ± 12.80cdef
PeC44/CP253			111.38	111.38	111.38	111.38						111.38 ± 11.22cdef
PeC20/ASp14				113.27	113.27	113.27						113.27 ± 14.01def
PeC38/ASP14				114.54	114.54	114.54						114.54 ± 2.49def
PeC38/P401				114.85	114.85	114.85						114.85 ± 5.80def
PeC12/ <i>P. djamur</i>					119.83	119.83						119.83 ± 21.84ef
PeC20/ <i>P. djamur</i>					122.87	122.87						122.87 ± 10.52ef
PeC35/ <i>P. djamur</i>						127.86						127.86 ± 9.81f
<i>P. eryngii</i>							151.42					151.42 ± 11.49g
PeC35/HK35-39							156.40	156.40				156.40 ± 6.67hg
PeC35/ <i>P. ostreatus</i>								177.20				177.20 ± 42.92h
PeC12/P401									207.016			207.016 ± 34.98i
PeC9/CP50										271.392		271.392 ± 43.8j
PeC11/CP50											323.016	323.016 ± 29.46k



11. REFERENCIAS

- ✓ Arteaga, E., K. De Lachica, R. Ramírez, H. Leal. 1996. **Desdicariotización excéntrica de *Lentinus* spp.** *Rev. Mex. Mic.*, 12: 15-21.
- ✓ Andrade, V. 2007. **Características de dicariotes de cepas con grandes esporóforos del hongo comestible *Lentinula edodes* (shiitake).** Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México. Pags 73-81.
- ✓ Bull, A. T., A. C. Ward, M. Goodfellow. 2000. **Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 573-606.
- ✓ Chang, S.T. 2000. **Edible Mushroom and their cultivation.** CRC Press. 1a ed United States, pags. 205-215.
- ✓ Chang, S.T. y P.G. Milles. 2004. **Mushrooms: Cultivation, Nutricional value, Medicinal effect and Enviromental impact.** CRC Press, Boca Raton, pag 451.
- ✓ Deacon, J. 1988. **Introducción a la micología moderna.** Ed. Limusa. 1ªed. México, D.F, págs. 11-13.
- ✓ Gaitán, R., 2000. **Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto.** *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: 20- 24.
- ✓ Gaitán, R., D. Salmones, G. Mata, R. Pérez. 2004. **Manual práctico del cultivo de setas, aislamiento, siembra y producción,** Xalapa, Veracruz, México, pág 1-7, 31 -34.
- ✓ García, M. 1998. **Cultivo de setas y trufas.** Ediciones Mundi. 3ªed. España, Barcelona, págs. 17-22, 143-145.
- ✓ Good, C.S., A. Smania, R. Curi, S. Salvador. 2007. **Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organics solvents and supercritical fluids.** *J. Food Eng.*, 80: 631-638.
- ✓ Guzmán, G., G. Mata. D. Salmones, C. Soto, L. Guzmán. 2002. **El cultivo de los hongos comestibles.** IPN. 1ªed. México, D.F, pág. 5-25.
- ✓ Guzmán, G., G. Mata. D. Salmones, C. Soto, L. Guzmán. 1993. **El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en Esquilmos Agrícolas y residuos agroindustriales.** IPN/CECODES, México, D.F, pág. 15-19.



- ✓ Herrera, T., M. Ulloa. 1990. **El reino de los hongos**. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México, Págs. 115-118.
- ✓ Honda, Y., T. Matsuyama, T. Irie, M. Watanabe, T. Kuwahara. 2000. **Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus***. *Curr. Genet.* 37: 209-212.
- ✓ Kues, U., Y. Liu. 2000. **Fructing body production in basidiomycetes**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- ✓ Leal Lara H. 1980. **Sporelessness in the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dikaryotization method**. *Tesis doctoral, Universidad de Philipps*, República Federal de Alemania, pág. 20-25, 31-37.
- ✓ Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra. 1990. **Biotechnología en la producción de los hongos comestibles**. *Ciencia y Desarrollo* (CONACYT) 95; 53-65.
- ✓ Martínez-Carrera, D. 2002. **Current development of mushroom biotechnology in Latin America**. *Micol. Apl. Int.* 14, 61-74.
- ✓ Martínez, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez. 2006. **México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles**. *In: El cultivo de Pleurotus en México*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D.F.
- ✓ Martínez, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez. 2007. **México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestibles**. *En: El Cultivo de setas Pleurotus spp en México*. Sánchez et al., (eds) El Colegio de la Frontera Sur, 209-224.
- ✓ Milles, P.G., J.R. Raper, 1956. **Recovery of the component strain from dikaryotic mycelia**. *Mycologia.* 48; 484-494.
- ✓ Mikosch, T. S. P., Lavrijsen, A. S. M. Sonnenberg, L. J. L. D. van Griensven. 2000. ***Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Agaricus bisporus***. *Mushroom Science* 15: 173-179.
- ✓ Ramírez, R., H. Leal. 2002. **Symmetrical recovery of monokaryotic components from *Lentinula edodes* using dikaryotization**. *In: Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al., (eds), UAEM, 141-149.
- ✓ Ramírez, R., O. Hernández, F. Galván, H. Leal. 2007. **Productividad de cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula***. *En: El Cultivo de setas*



- Pleurotus spp en México*. Sánchez et al., (eds) El Colegio de la Frontera Sur, 55-64.
- ✓ Salmenes, D., L. Mestizo, R. Gaitán. 2004. **Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn**. *Rev. Mex. Mic.*, 18: 21-26.
 - ✓ Sato, T., K. Yaegashi, S. Ishii, T. Hiramio, S. Kajiwara, K. Shishido, H. Enei. 1998. **Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA**. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 2646-2650.
 - ✓ Schmidt, O. 2006. **Wood and tree fungi. Biology, damage, protection and use**. Ed. Springer, 1ªed, Alemania, pág. 4-22, 65-75, 239-243.
 - ✓ Silva, E.M., A. Machuca, M. Milagres. 2005. **Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains**. *Process Biochemistry* 40; 161-164.
 - ✓ Starr, C. 2008. **Biología: La unidad y diversidad de la vida** Cengage Learning Editores, 11ªed, Barcelona Pág. 367.
 - ✓ Sonnenberg, A.S.M, J.P Baars, P.M Hendrickx, R.W. Kerrigan. 2005. **Breeding Mushroom: State of the art**. In *Fifth Conference on mushroom Biology and Mushroom Products. Acta Edulis Fungi*. Vol 12 Tal et al., (eds), Shangai Xinhua Printing Co., Ltd, pages 163-173.
 - ✓ Tokimoto, K., K. Hsebe, M. Komamoto, 1978. **Studies on dikaryotization of *Lentinus edodes* (berk.) sing. I. Induction of dikaryotization by fall powder**. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 16; 66-72.
 - ✓ Valencia del Toro, G., H. Leal Lara. 1999. **Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus spp* con cuerpos fructíferos de diversos colores** *Rev.Mex.Mic.* 15: 65-71.
 - ✓ Valencia del Toro, G. 2002 **Estudio sobre la expresión del color de esporóforos en *Pleurotus spp* por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas**, *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias, UNAM, México. Pags 4-25.
 - ✓ Valencia del Toro, G., M. Tepechco, R. Ramírez, H. Leal. 2007. **Productividad de cepas híbridas coloridas del género *Pleurotus***. In: *El cultivo de pleurotus en México*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D.F.
 - ✓ Wainwright, M. 1992. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Ed. Acribia, 1ªed, España, Zaragoza, págs.10-11.



Páginas de Internet consultadas

- ✓ <http://www.gardencenterejea.com/index.php>
- ✓ <http://www.kalipedia.com/ciencias-vida/tema/graficos-esquema-seta-genero>.
- ✓ http://es.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_eryngii