



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Mejoramiento genético de *Lentinula*

T E S I S

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

P R E S E N T A

REBECA RAMÍREZ CARRILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. HERMILO LEAL LARA.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: Dr. DANIEL MARTÍNEZ CARRERA
Dr. JOSÉ GUILLERMO AGUILAR OSORIO

MÉXICO, D. F.

Enero, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/006/11

ASUNTO: Asignación de Jurado

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

At'n: LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA.

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) M. EN B. REBECA RAMÍREZ CARRILLO, el jurado para presentar Examen de Grado de **DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**.

PRESIDENTE	DR.	TEÓFILO HERRERA SUÁREZ
PRIMER VOCAL	DR.	JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
SEGUNDO VOCAL	DR.	HERMILO LEAL LARA
TERCER VOCAL	DR.	DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA
SECRETARIO	DR.	JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO
SUPLENTE	DRA.	HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
SUPLENTE	DR.	SIGFRIDO SIERRA GALVÁN

El trabajo aprobado como tesis es:

"Mejoramiento genético de Lentinula"

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., 17 de enero del 2011
COORDINADORA DEL PROGRAMA

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

MCAAIASR\lpp



AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS:

**AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNAM.
POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SUPERARME PROFESIONALMENTE.**

**AL APOYO OTORGADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO
(DGAPA) DE LA UNAM A TRAVÉS DEL PROYECTO IN208798.**

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. HERMILO LEAL LARA

DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

DR. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

POR SU INVALUABLE APOYO DURANTE EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

DR. TEÓFILO HERRERA SUÁREZ

DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO

DR. HERMILO LEAL LARA

DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

DR. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS

DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN

**POR EL TIEMPO DEDICADO AL ENRIQUECIMIENTO DE ESTE MANUSCRITO, CON SUS MUY ACERTADAS
CRÍTICAS Y OBSERVACIONES.**

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

- ★ *A mis muy queridos, amados y siempre bien recordados padres: Francisco Ramírez y Antonia Carrillo.
Gracias por darme la vida, su amor, pero sobre todo por ser un gran ejemplo de vida.*
- ★ *A mi querida abuela Rafa.
Gracias por tu comprensión, amor, pero sobre todo por tu ejemplo de vida y fortaleza.*
- ★ *A mis muy queridas y amadas hermanas: Bety y Paty.
Gracias Bety por compartir momentos bellos y especiales de tu vida (tu maternidad), también agradezco tu forma de ser, pero sobre todo por apoyarme para alcanzar mis sueños.
De manera muy especial para mi ángel Paty llamado hermana, quien en los momentos de enfermedad y desolación, siempre estuvo presente. Gracias porque sin tu apoyo difícilmente hubiera sobrevivido al monstruo llamado quimioterapia.*
- ★ *A mi querido sobrino: Beto.
Gracias por llegar a nuestras vidas para ser luz y alegría. Te deseo de todo corazón que éste gran logro en mi formación académica se convierta en un reto para ti, durante tu formación profesional.*
- ★ *A mi muy querido y amado Grupo Reto INCAN.
Un especial agradecimiento a todas esas guerreras que con su ejemplo me enseñaron que el Ca de mama es un monstruo fácil de vencer. Gracias a todas por sus palabras de aliento, tiempo, fortaleza, capacidad de escucha, pero sobre todo por su gran sentido del humor. A mis despechadas amigas: Toni, Naty, Jose, Juanita, Gina, Las Rosis, Teresita, Lulú, Lilia, Silvia y a la memoria de Blanquita.*
- ★ *Al equipo de médicos, enfermeras y todo el personal que me atendió en el hospital de Cancerología.
Sus conocimientos y trato afable me permitieron ver un nuevo amanecer.*
- ★ *A todas y todos nuestros estudiantes que han pasado por el laboratorio 324, de la Facultad de Química de la UNAM.
Cada uno de Uds ha dejado una huella imborrable en mi corazón. Gracias por ser también maestros en nuestro caminar.*

- ☆ A todas y todos mis grandes amigos, desde compañeros de la escuela, amigos de la familia, compañeros de trabajo, vecinos, familiares, estudiantes y trabajadores. Gracias por han estado a mi lado tanto en mis grandes éxitos como éste, como en los momentos de enfermedad y tristeza, donde sólo Uds. tuvieron el tiempo y las palabras precisas para levantarme y ayudarme a sonreír de nuevo.
- ☆ A todos aquellos maestros de la vida y academia que las en diferentes etapas de mis formación académica fueron mis pilares.
- ☆ Al Dr. Hermilo Leal Lara un agradecimiento que no por ser el último deja de ser muy especial. Gracias por tu gran amistad, por ser punta de lanza en mi formación profesional, pero sobre todo por la gran libertad con la que me permites desarrollarme profesionalmente.

ÍNDICE		PÁGINAS
I	RESUMEN (ESPAÑOL E INGLÉS).	1
II	INTRODUCCIÓN.	5
III	ANTECEDENTES:	6
3.1	IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES	6
3.2	POTENCIAL DE LOS PROCESOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE CEPAS PARA SU USO A ESCALA COMERCIAL.	6
3.3	MÉTODOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO UTILIZADOS EN HONGOS COMESTIBLES.	7
3.3.1	RECUPERACIÓN DE PROGENIE MEIÓTICA.	8
3.3.2	DESDICARIOTIZACIÓN.	9
3.3.2.1	EVIDENCIAS DE REPORTES PREVIOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO POR DESDICARIOTIZACIÓN.	10
3.3.3	PRODUCCIÓN DE PROTOPLASTOS	11
IV	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:	12
4.1	JUSTIFICACIÓN	12
4.2	OBJETIVO GENERAL.	12
4.3	OBJETIVOS PARTICULARES	12
V	HIPÓTESIS DE TRABAJO.	12
VI	MATERIALES Y MÉTODOS:	13
6.1	PLANTEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA GLOBAL DEL PROYECTO.	13
6.2	MATERIAL BIOLÓGICO.	14
6.3	DETERMINACIÓN DE TIPOS DE COMPATIBILIDAD.	15
6.4	APAREAMIENTOS ENTRE CEPAS DE <i>P. OSTREATUS</i> Y <i>L. EDODES</i> .	15
6.5	GERMINACIÓN DE ESPORAS PARA LA OBTENCIÓN DE PROGENIES.	15
6.6	CLASIFICACIÓN DE LAS PROGENIES DE LAS CEPAS HÍBRIDAS (<i>PLEUROTUS X LENTINULA</i>) EN LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD.	16
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	17
7.1	RECUPERACIÓN SIMÉTRICA DE LOS COMPONENTES MONOCARIÓTICOS DE <i>LENTINULA EDODES</i> POR DESDICARIOTIZACIÓN.	17
7.2	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE COMPATIBILIDAD DE LOS NEOHAPLONTES DE <i>L. EDODES</i> Y MONOCARIOTES Y/O NEOHAPLONTES DE <i>P. OSTREATUS</i> .	18

7.2.1	APAREAMIENTO DE TODOS LOS NEOHAPLONTES DE LAS CEPAS DE <i>LENTINULA</i> PARA CLASIFICARLOS DE ACUERDO A SU TIPO DE COMPATIBILIDAD	18
7.2.2	APAREAMIENTO DE TODOS LOS NEOHAPLONTES Y/O MONOCARIOTES DE LAS CEPAS DE <i>PLEUROTUS</i> PARA CLASIFICARLOS DE ACUERDO A SU TIPO DE COMPATIBILIDAD.	21
7.3	PRODUCCIÓN DE HÍBRIDOS DE <i>P. OSTREATUS</i> X <i>L. EDODES</i> .	22
7.3.1	APAREAMIENTO DE 27 NEOHAPLONTES DE <i>LENTINULA</i> CON 4 NEOHAPLONTES Y 2 MONOCARIOTES DE <i>PLEUROTUS</i> .	22
7.4	FRUCTIFICACIÓN DE LAS CEPAS HÍBRIDAS DE <i>PLEUROTUS</i> X <i>LENTINULA</i> , Y CEPAS PARENTALES DE <i>PLEUROTUS</i> Y <i>LENTINULA</i> .	25
7.4.1	PRODUCTIVIDAD DE CEPAS HÍBRIDAS DE <i>PLEUROTUS</i> X <i>LENTINULA</i> Y CEPAS PARENTALES DE <i>PLEUROTUS</i> .	25
7.4.2	EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE FRUCTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PARENTALES DE <i>LENTINULA</i> .	26
7.4.3	INTRODUCCIÓN DEL TÉRMINO RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO (RMS).	27
7.5	CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE CONTROL DE COMPATIBILIDAD SEXUAL EN LA PROGENIE DE LOS HÍBRIDOS ÍTER GÉNEROS.	28
7.5.1	CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-1 X P414.	30
7.5.2	CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-2 X P404.	32
7.5.3	CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-2 X P413.	35
7.5.4	FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN DE LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD EN LAS PROGENIES DE LOS TRES HÍBRIDOS ÍTER. GÉNEROS.	37
VIII	ANEXOS:	38
8.1	SYMMETRIC RECOVERY OF MONOKARYOTIC COMPONENTS FROM <i>LENTINULA EDODES</i> USING DEDIKARYOTIZATION.	39
8.2	PRODUCTIVIDAD DE CEPAS HÍBRIDAS DE <i>PLEUROTUS</i> X <i>LENTINULA</i> .	49
8.3	CULTURE CONDITIONS FOR INCREASING YIELDS OF <i>LENTINULA EDODES</i> .	62
8.4	EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE <i>LENTINULA EDODES</i> EN SUSTRATO COMERCIAL DE ASERRÍN.	69
IX	CONCLUSIONES.	74
X	APORTACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.	76
XI	BIBLIOGRAFÍA.	78

I. RESÚMENES

I.1 RESUMEN EN ESPAÑOL

En el cultivo comercial del hongo comestible *Lentinula edodes* el uso de sustratos de difícil degradación y los largos periodos de incubación hace poco eficiente el proceso. Una alternativa para hacer mas rentable su cultivo es obtener cepas mejoradas, mas agresivas y con mayor capacidad para crecer en una amplia variedad de sustratos. Esto podría lograrse combinando el material genético de *Lentinula* con el de otro hongo comestible como *Pleurotus ostreatus* que se caracteriza por su rápido desarrollo en muy diversos sustratos. En este trabajo se planteó realizar un mejoramiento genético de las cepas de *Lentinula edodes* por medio de la producción de híbridos con cepas de *Pleurotus ostreatus*, para tratar de seleccionar cepas con las características fisiológicas de *Pleurotus* y morfológicas de *Lentinula*.

El mejoramiento genético con progenies meióticas tiene la desventaja de la variabilidad genética natural de las esporas, además de que no permite hibridizar cepas de especies diferentes y menos aún si pertenecen a géneros distintos. Como método alternativo de mejoramiento genético, mediante fusión de protoplastos se han logrado producir híbridos interespecies e inter géneros pero con muy poco éxito ya que son muy inestables y generalmente estériles.

La descariotización es un método alternativo que permite obtener los dos componentes monocarióticos de una cepa sin pasar por el proceso de meiosis. De esta manera se evita la diversidad genética de las progenies meióticas, habiendo permitido realizar programas de mejoramiento genético con cepas de una misma especie. Por ello resultaba interesante evaluarlo para la producción de híbridos fértiles de géneros distintos. En una primera etapa 7 cepas de *Lentinula edodes* fueron descariotizadas recuperando para todas las cepas, los dos tipos de compatibilidad. Sin embargo, se observó que el tiempo de maceración del micelio jugó un papel muy importante en la descariotización de las cepas. Así, mientras el micelio de *Pleurotus ostreatus* sobrevive a tiempos de maceración mayores a 2.5 minutos, el de *Lentinula* sólo soportó tiempos de maceración de 5 a 30 segundos como máximo.

Una vez descariotizadas las cepas de *Lentinula edodes*, los neohaplontes se clasificaron en grupos de acuerdo a su tipo de compatibilidad. De 144 neohaplontes de *Lentinula* recuperados, 27 se ubicaron en 4 diferentes grupos de compatibilidad (A_1B_1 , A_2B_2 , A_3B_3 y A_4B_4). Los 6 neohaplontes de *Pleurotus* también se clasificaron en 4 grupos, pero sorprendentemente, todos ellos fueron compatibles con los 4 grupos de compatibilidad de *Lentinula*. Tres de los grupos de compatibilidad de *Pleurotus* mostraron factores de compatibilidad totalmente diferentes a los de *Lentinula* (A_5B_5 , A_6B_6 y A_7B_7), resultando sin embargo, aun mas inesperado que el cuarto grupo de las cepas monocarióticas de *Pleurotus* presentara factores de incompatibilidad idénticos a uno de los tipos de compatibilidad de los neohaplontes de *Lentinula* (A_1B_1), lo que indica una gran semejanza entre estos dos organismos de géneros distintos.

Al hibridizar los neohaplontes de *Lentinula* y *Pleurotus* para la obtención de híbridos, de 149 apareamientos positivos que se esperaban, se obtuvieron 138 híbridos y 11 apareamientos resultaron negativos. Al evaluar el desarrollo micelial y capacidad de fructificación de 34 híbridos en un sustrato formulado con paja de trigo fermentada y pasteurizada, 32 híbridos fructificaron y sólo 2 no invadieron el sustrato. De los híbridos que fructificaron todos

presentaron morfología semejante a *Pleurotus*. Con los valores de EB acumulada se realizó un análisis estadístico para identificar la semana donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo (RMS) y con estos valores fue posible identificar 6 cepas precoces con EB de 98 a 151% en un período de cosecha de 3 a 4 semanas de producción. La eficiencia biológica (EB) de los 11 híbridos más productivos fluctuó entre 103 y 161%.

Al fructificar las cepas parentales de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* se observó en ambos casos la morfología típica de cada especie. Para las cepas parentales de *Pleurotus ostreatus* el RMS se alcanzó entre la 5^{ta} y 7^{ma} semana de cosecha con EB de 55 a 137%, menor a la obtenida para las cepas híbridas. Las cepas parentales de *Lentinula edodes* fueron evaluadas en un sustrato comercial sin someterlo a choque térmico, ni hidratación después de la incubación. La EB al tercer brote fluctuó de 24 a 261%, valores que muy probablemente contribuyeron para que las cepas híbridas también presentaran altos rendimientos.

Los valores de EB de las 7 cepas parentales de *Lentinula edodes* obtenidos en tres brotes también se utilizaron para identificar el brote donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo (RMS). Para las cepas L18 y L21 se obtuvo su RMS en el primer brote, mientras que las cepas L5, L19 y L20 lo alcanzaron al segundo brote y sólo para las cepas L9 y L15 se obtuvo al tercer brote. Con los RMS de las 7 cepas se realizó un análisis estadístico y se observó que la cepa L9 fue la más productiva, seguida de las cepas L15 y L5 con EB al RMS de 216, 170 y 130% respectivamente.

Finalmente se recolectaron y germinaron las esporas de tres híbridos. Con la prueba de χ^2 se encontró ($p = 95\%$) que los 4 tipos de compatibilidad en sus progenies se distribuyen en proporción 1:1:1:1. Esto prueba la fertilidad de los híbridos y confirma que el sistema de compatibilidad heterotálico tetrapolar de las cepas parentales se mantiene y hereda en la progenie de los híbridos. Dada la compatibilidad obtenida entre las cepas, la separación de estos dos organismos en dos géneros y especies morfológicas distintas debería ser analizada. Para ello sería conveniente realizar estudios de los híbridos y las cepas progenitoras de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* con marcadores moleculares para confirmar la obtención de los híbridos y para aclarar las bases que sirven para separar estos 2 organismos en géneros distintos.

Palabras clave: Híbridos ínter géneros, neohaplontes, *Pleurotus*, *Lentinula*, progenie fértil, sexualidad, productividad.

I.2 ABSTRACT

Cultivation of the edible mushroom *Lentinula edodes* is a long lasting process with low efficiency, basically as a result of the difficulty to degrade lignocellulosic substrates that are used and the requirement of long incubation periods. Breeding of improved strains, more aggressive and able to grow on a wide range of substrates, is a promising option to increase productivity of this process. This could be achieved by combination of the genetic material of *Lentinula edodes* with another edible fungus like *Pleurotus ostreatus*, which shows fast growth on a wide range of substrates. Therefore, the aim of this work was to produce hybrid strains from these 2 genera in order to select strains with *Pleurotus* physiology but showing the morphology of *Lentinula*.

Cross matings of monokaryotic progenies is the conventional method for genetic improvement of edible mushrooms. It shows, however, various drawbacks, i.e. the natural genetic variability found among the meiotic progeny (basidiospores) and, additionally, this procedure cannot be used for hybridization of different genus. Interspecies and intergenera hybrids have been produced by fusion of protoplasts, but such hybrids are generally sterile or highly unstable.

Dedikaryotization is an alternative method that allows recovery of the two original monokaryotic components of a strain since the meiosis step, which cannot be avoided when using the monokaryotic progeny from basidiospores, is circumvented with this method. Improved strains have been obtained from a single species with the aid of dedikaryotization and it could prove useful for breeding fertile hybrids from different species. Therefore, in a first stage, 7 strains of *Lentinula edodes* were dedikaryotized. Both monokaryotic components were recovered for all strains and they were classified according to their mating types. From 144 *Lentinula* neohaplonts, 27 were allocated in 4 different incompatibility groups (A_1B_1 , A_2B_2 , A_3B_3 y A_4B_4). The 6 *Pleurotus ostreatus* neohaplonts were classified in 4 groups. Surprisingly, these groups were compatible with those of *Lentinula*, which points out a large similarity of both species. Moreover, one of the 4 incompatibility groups showed identical mating types as one group of *Lentinula* neohaplonts (A_1B_1), while the other 3 groups showed completely different mating types (A_5B_5 , A_6B_6 y A_7B_7).

All *Lentinula* neohaplonts were mated with the monokaryotic *Pleurotus* strains in all possible combinations, 138 hybrids were obtained and only 11 negative pairings were observed. The resulting dikaryons were grown on malt extract agar to evaluate mycelium development. According to these tests and to the ability of the corresponding parental *Lentinula edodes* strains to grow on sterile substrate, 34 hybrids were selected for further production tests on commercial *Pleurotus* substrate. Only 2 hybrids were unable to fruit on this substrate. Of the remaining 32 hybrids, all of them produced fruit bodies with *Pleurotus* morphology. With the biological efficiency values an statistic analysis was made to identified the week where each strain obtained its maximum significant yield (MSY). With these values, 6 quick producing strains were identified with biological efficiencies (BE) of 98 to 151%, obtained in 3 - 4 harvesting weeks. Yields of the 11 higher producing hybrids were 103 - 161% BE.

Parental strains of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* yielded fruit bodies with the typical morphology for each species with biological efficiencies of 55 to 137% in 5 to 7 harvest weeks for *Pleurotus ostreatus* and 24 to 261% for *Lentinula edodes* with a commercial substrate without cold shock or water immersion after incubation period. The high biological

efficiency values of parental strains probably contribute for the high biological efficiency of hybrids strains.

The biological efficiency values of the 7 parental strains of *Lentinula edodes* after 3 flushes were used to identified the flush at which each strain obtained its maximum significant yield (MSY) Strains L18 and L21 reached their MSY at the first flush; strains L5, L19 and L20 at the 2nd flush and only strains L9 and L15 at the 3rd flush. With the MSY of the 7 strains a second statistic analysis was made and strain L9 was identified as the more productive (261%) followed by L15 and L5 with 170 and 130 BE at MSY respectively.

Basidiospores from 3 hybrids were collected and germinated. According to χ^2 test, the 4 mating types were present in the same proportion (1:1:1:1) in each of the 3 progenies ($p = 95\%$). Herewith, fertility of hybrids was confirmed and the tetra polar heterothallic compatibility system of the parental strains was maintained throughout the breeding process. Separation of these organisms into 2 different genera need to be reconsidered considering the high compatibility of *Pleurotus* and *Lentinula* strains used in this study. In this context, it is highly recommended to perform studies using molecular markers of hybrids and parental strains of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* to confirm production of hybrid strains and to elucidate the fundamentals to separate *Pleurotus* and *Lentinula* into 2 different genera.

Key words: Intergenera hybrids, neohaplonts, *Pleurotus*, *Lentinula*, sexuality, productivity, edible mushrooms.

II. INTRODUCCIÓN

En nuestro país los únicos géneros de hongos comestibles que se cultivan a escala comercial son *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilát y *Pleurotus* spp. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler empieza a ser cultivado pero a muy baja escala. Para su cultivo en forma tradicional se utilizan troncos de árboles muertos de maderas duras, por lo cual son necesarios tiempos de incubación muy prolongados. Los estudios realizados a la fecha para este género se han centrado principalmente en sustituir los troncos por aserrines y el estudio de diferentes tipos de maderas como sustrato, más no se ha trabajado en el mejoramiento genético de las cepas. Sin embargo, es una especie que por sus características organolépticas, nutricionales y medicinales, su consumo y producción se ha incrementado considerablemente en los últimos años en todo el mundo.

Los hongos comestibles *Pleurotus* spp. también conocidos como setas ocupan el tercer lugar a nivel mundial dentro de los hongos cultivados comercialmente en términos de su producción. Es un hongo que crecen en una gran variedad de sustratos y su demanda se ha incrementado en todo el mundo. Los sustratos más ampliamente utilizados para su cultivo a escala industrial han sido la paja de trigo o de cebada. Sin embargo, existen numerosos trabajos a nivel de laboratorio donde se ha probado una gran variedad de sustratos para su cultivo como son: pajas de casi todo tipo de cereales (trigo, arroz, sorgo, maíz, avena, mijo, centeno y cebada), rastrojo de frijol, pulpas de café y de cardamomo, mazorcas, rastrojo y zacate de maíz, cáscara de cacao, desechos de algodón, pseudo tallos de plátano, bagazos (caña de azúcar, citronela, maguey, henequén con y sin fermentación), hojarasca de árboles de parques y jardines y pasto. También se han evaluado diferentes mezclas de sustratos como pajas de trigo y maíz, maguey tequilero fermentado con paja de trigo, pulpa de café o cáscara de cacao; bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada (Gaitán-Hernández, 2005 y 2007; Gaitán-Hernández *et al.*, 2002; Mata y Salmones, 2003; Mayett *et al.*, 2006; Pérez-Merlo y Mata, 2005; Salmones *et al.*, 2005; Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002; Vogel y Salmones, 2000).

A pesar de que existe una gran cantidad de estudios relacionados con el género *Pleurotus*, en términos generales existen muy pocos esfuerzos en aspectos relacionados con el mejoramiento genético de las cepas. Los pocos trabajos en esta dirección, se han desarrollado a partir de las progenies meióticas o esporas de cepas silvestres, las cuales una vez clasificadas en los 4 tipos de compatibilidad son utilizadas para obtener híbridos interespecímenes. Los híbridos obtenidos por lo general han sido evaluados en términos de sus rendimientos a baja escala (bolsas de 1 o 2 kg de sustrato húmedo). Este tipo de trabajos ha permitido obtener cepas para uso a nivel local sin tener que depender del empleo de cepas extranjeras. Sin embargo, lo anterior no ha permitido generar un banco de cepas para su uso a escala comercial.

En el presente proyecto se desarrolló un programa de mejoramiento genético por apareamiento de neohaplontes de *Lentinula edodes* con monocariotes y neohaplontes de *Pleurotus ostreatus*, para poder ofrecer a corto plazo, una mayor disponibilidad de cepas para los productores nacionales, dado que esta agro industria representa un gran potencial de crecimiento por las características nutricionales y medicinales que poseen los hongos comestibles cultivados.

III. ANTECEDENTES

3.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES.

Los hongos comestibles producen una estructura en su fase generativa conocida como cuerpo fructífero, esporoma o carpóforo cuyo consumo no provoca ninguna manifestación de toxicidad en el género humano. Algunos de estos hongos comestibles son cultivados artificialmente de tal manera que su ciclo de vida puede completarse de manera artificial bajo condiciones controladas. Declaire (1978), indica que de 2,000 especies de hongos comestibles conocidas, únicamente 25 son consumidas por el hombre en el mundo. Para el mismo año en México Pérez-Silva, reportó que de 48 géneros y 165 especies registradas en el territorio nacional, solamente 39 géneros y 87 especies fueron consumidas como resultado de su recolección y venta en los mercados locales. Actualmente la producción mundial de hongos comestibles cultivados en fresco supera los 7 millones de toneladas métricas anuales, con un valor económico aproximado superior a los treinta billones de dólares (Chang y Miles, 2004). En general se puede apreciar que la industria productora de hongos comestibles ha crecido en los últimos 25 años en forma acelerada, a pesar de ser muy tradicional y rudimentaria en muchos países. El champiñón es la especie más ampliamente cultivada a nivel mundial con una producción superior a los 2 millones de toneladas métricas anuales, seguida por especies de *Pleurotus* y *Lentinula* que contribuyen con cerca de 2.5 millones de toneladas métricas anuales, a la producción global de hongos comestibles. Cabe señalar también la importancia ecológica de esta actividad, que radica en la utilización y reciclaje acelerado de millones de toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales utilizados como sustrato para su cultivo.

3.2. POTENCIAL DE LOS PROCESOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE CEPAS PARA SU USO A ESCALA COMERCIAL.

A la fecha, la mayor parte de los esfuerzos para mejorar el cultivo comercial de los hongos comestibles se han centrado en evaluar diferentes tipos de sustratos, ya sea solos o mezclados o en implementar diferentes métodos de su preparación. En general no se ha explotado el potencial que representa el mejoramiento genético de cepas. Los estudios de mejoramiento genético para los hongos comestibles han sido sumamente escasos, no obstante que para algunos hongos su ciclo de vida es bien conocido y para los de tipo heterotálico, existe la posibilidad de mejorar diferentes características que permitan incrementar la eficiencia y rentabilidad del cultivo.

El mejoramiento genético de cepas de hongos comestibles ha sido un aspecto poco estudiado no obstante el valor económico de la producción de esta industria a escala mundial. Así por ejemplo para el caso del champiñón (el hongo comestible más importante) muy probablemente su naturaleza homotálica ha sido uno de los obstáculos de mayor peso para realizar trabajos de mejoramiento genético. Sin embargo, se sabe que los programas de mejoramiento genético de cepas han superado algunas dificultades aparentemente insalvables, logrado incrementos sustanciales en la viabilidad y rentabilidad de esta industria. Como ejemplo se pueden mencionar los trabajos desarrollados en Holanda, en donde a pesar de la naturaleza homotálica del champiñón (producción de 99% de esporas sexuales multinucleadas) se realizó un programa de mejoramiento genético con técnicas clásicas de aislamiento de esporas uninucleadas (1%) y después de aproximadamente 10 años fue

posible obtener dos cepas altamente productivas, conocidas como U1 y U3, en las cuales se basa más del 80% de la producción comercial del champiñón en el mundo (Fritsche, 1983).

A pesar de que estos programas de mejoramiento genético son relativamente tediosos, lentos y poco eficientes, este gran esfuerzo se justificó debido a la relevante importancia económica de la industria holandesa del champiñón, que exporta un volumen aproximado de 200 000 toneladas por año.

Para el caso de *Pleurotus ostreatus* se sabe que por medio de un programa de mejoramiento genético, por mutación de neohaplontes fue posible resolver uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria. Se desarrollaron cepas asporógenas con lo que se contrarrestó la gran cantidad de esporas que se producen durante la fase productiva, causantes de reacciones alérgicas a los trabajadores en las plantas productoras (Leal-Lara, 1980).

Los ejemplos anteriores sirven para resaltar la importancia de los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de cepas con características que permitan satisfacer necesidades específicas para el cultivo comercial de los hongos comestibles.

3.3. MÉTODOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO UTILIZADOS EN 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 géneros *Pleurotus* y *Lentinula* 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 en el material genético. Dentro de las características fenotípicas de importancia que deben considerarse se encuentran el color, tolerancia a ciertos rangos de temperaturas, resistencia a enfermedades, patrones de producción durante la fructificación, número de brotes y período entre éstos, así como 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 múltiples genes. Por tal motivo, la mayoría de los programas de mejoramiento genético para hongos comestibles se basan en el sistema natural de recombinación genética al aparear micelios monocarióticos compatibles. El propósito del entrecruzamiento es combinar las características presentes en distintas cepas mediante cruces 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) desdicariorización (obtención de componentes monocarióticos).

3.3.1 RECUPERACIÓN DE 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; Salmones *et al.*, 2004). Por otra parte, es un método lento debido a que es necesario fructificar las cepas para obtener la esporada y después nuevamente en una etapa posterior para evaluar las características de fructificación de las cepas obtenidas. Otra desventaja de este método es la necesidad de realizar una gran cantidad de apareamientos, 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 basidiosporas 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 cigótico, el cual sufre la meiosis, fase en la cual ocurre 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 dieron origen a la cepa dicariote.

Los trabajos de mejoramiento genético realizados en nuestro país a partir de la progenie meiotica sólo han permitido obtener híbridos entre diferentes cepas de la misma especie. Así en el primer trabajo de mejoramiento genético reportado por Martínez *et al.* (1986), se realizó la obtención y caracterización de híbridos a partir de 3 cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. Las cepas silvestres fueron aisladas de cuerpos fructíferos que crecían sobre pulpa de café en la región de Jalapa, Ver. Cada cepa fue caracterizada considerando las características y desarrollo del micelio. De manera paralela se aislaron monospóricos de cada cepa y se clasificaron de acuerdo a sus tipos de compatibilidad para posteriormente efectuar cruza ínter espécimen para observar la compatibilidad entre la progenie de las 3 cepas y así obtener cepas híbridas. Tanto las cepas parentales como los híbridos se sembraron en medio de cultivo para caracterizar su desarrollo micelial. Además se evaluó la fertilidad de los híbridos, tanto en cajas Petri con medio de agar, como en frasco de vidrio con arroz integral esterilizado, los cuales una vez que la cepa invadió el sustrato se colocaron en cámaras húmedas para favorecer la formación de primordios y posteriormente su desarrollo en cuerpos fructíferos. De los 12 híbridos obtenidos 3 de ellos fueron evaluados a mayor escala (planta de producción) y presentaron eficiencias biológicas de 113, 115 y 118%. Sin embargo, no hacen referencia a los rendimientos de las cepas parentales para determinar en forma cuantitativa el incremento en los rendimientos. Sólo se indica que los híbridos ínter espécimen son más productores que los intra espécimen.

Por otro lado Morales *et al.* en 1995 reportan la caracterización de un híbrido de *P. ostreatus* (CP-50) el cual presenta características que lo hacen muy apto para emplearlo en la producción comercial. Entre las características más sobresalientes destacan: su capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (17-35°C), corto período de incubación (25 días), rendimientos del 65 al 95% de eficiencia biológica, así como buena viabilidad y manejo post-cosecha. Este tipo de trabajos ha permitido obtener cepas para su uso a nivel local, sin tener que depender del uso de cepas extrajeras.

Diez años más tarde Navarro *et al.* (1996) realizaron un estudio comparativo de algunos híbridos de *Pleurotus ostreatus* en Morelos. Para ello utilizaron 3 cepas nativas del estado y 3 cepas extranjeras (2 de EUA y una Europea). Para cada cepa obtuvieron micelios monospóricos y los clasificaron en los 4 tipos de compatibilidad para posteriormente aparearlos y obtener híbridos. A continuación las cepas parentales y los híbridos fueron caracterizados (velocidad de crecimiento y características morfológicas del micelio vegetativo). Finalmente evaluaron la eficiencia biológica de las cepas parentales e híbridas a mayor escala (bolsas con 5 kg de sustrato húmedo). Los resultados indican que las cepas parentales presentaron rendimientos del 20 al 65% de EB, mientras que las cepas híbridas dieron rendimientos del 23 al 76% de E.B., con lo que se puede ver que los rendimientos en las cepas híbridas no se incrementaron de manera significativa.

En este tipo de estudios de mejoramiento genético dado que no se tiene un control sobre las características que se están introduciendo con cada una de las cepas apareadas, resulta poco probable que los híbridos obtenidos realmente correspondan a cepas mejoradas. Para que este tipo de trabajos redunden en la obtención de cepas mejoradas, sería necesario incrementar de manera exponencial la obtención de híbridos y su evaluación a escala de producción para así potenciar la probabilidad de obtener cepas mejoradas.

3.3.2 DESDICARIOTIZACIÓN.

La desdicariotización 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 parentales, 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 desdicariotización puede efectuarse por métodos mecánicos y químicos. La operación microquirúrgica es un método físico de baja reproducibilidad y muy escasa recuperación de neohaplontes. La desdicariotización 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 desdicariotización de *L. edodes* es una sustancia fungistática que desdicariotiza 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 desdicariotizante de las soluciones de glucosa-peptona puede atribuirse a distintos factores, uno podría ser la presencia de algún compuesto tóxico producido durante la esterilización de la solución desdicariotizante, otro podría ser la probable presencia de alguna sustancia tóxica generada durante la producción de la peptona, ya sea que estuviera presente en las materias primas usadas o bien que se produjera durante la hidrólisis de la proteína. De hecho, no se conoce con certeza el mecanismo que provoca la desdicariotización 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.

3.3.2.1 EVIDENCIAS DE REPORTES PREVIOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO POR DESDICARIOTIZACIÓN.

Obtención de cepas acelulolíticas de *Pleurotus*.

Existen una serie de trabajos relacionados con la obtención de cepas acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus* (Mancera *et al.*, 1999). En ese proyecto se planteó la obtención de cepas acelulolíticas, como una alternativa para lograr un aprovechamiento integral de los desperdicios lignocelulósicos. Es decir al desarrollar cepas con tales características se vislumbró la posibilidad de producir hongos para consumo humano y al mismo tiempo utilizar el sustrato residual rico en celulosa para la alimentación de rumiantes.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las diferentes etapas del proceso de mejoramiento genético, en el que se puede observar cómo en cada etapa del mejoramiento genético fue posible incrementar de manera significativa la recuperación de cepas con carácter acelulolítico.

Tabla 1: Frecuencia de recuperación de cepas acelulolíticas en diferentes etapas del proceso de mejoramiento genético (Mancera *et al.*, 1999).

Etapa de mejoramiento genético	Recuperación de cepas acelulolíticas (%)
Mutación de neohaplontes	0.001
Progenie obtenida a partir de: Mutante x monocarionte silvestre	2 - 3.3
Híbridos obtenidos a partir de monocariontes:	
C- x C+	6.15
C+ x C+	6.97
Progenie de 2 monocariontes acelulolíticos	55.00

En etapas posteriores al proceso de mejoramiento genético, se evaluaron los rendimientos a escala comercial de algunas cepas acelulolíticas. Los resultados mostraron que las cepas obtenidas en las últimas etapas presentaron rendimientos semejantes a los obtenidos por algunas cepas comerciales e inclusive, algunas lograron rebasar los rendimientos de las comerciales. Las provenientes de las primeras etapas de mejoramiento genético presentaron un desarrollo micelial muy lento y por lo mismo muy susceptible a las contaminaciones (Mancera *et al.*, 1999). Éste es el único trabajo realizado en México que involucra toda una serie de etapas de mejoramiento genético de un hongo comestible, desarrollado con el objeto de obtener cepas de tipo acelulolítico y al mismo tiempo adecuadas para la producción comercial.

Mejoramiento genético de cepas de *P. ostreatus* a partir de neohaplontes.

En otro reporte de mejoramiento genético de cepas de *P. ostreatus*, donde el objetivo fue obtener híbridos a partir de neohaplontes con potencial para su cultivo a escala comercial (Arias *et al.*, 2000), de un total de 17 cepas, 7 fueron seleccionadas para el proceso de mejoramiento genético. Este se realizó por medio de la desdicarionización de las cepas y sólo para una cepa se obtuvo su progenie meiótica. A partir de los neohaplontes y esporas, por hibridación se obtuvieron y caracterizaron 13 híbridos, de los cuales 6 fueron seleccionados por presentar mejores características que las cepas parentales (máximo rendimiento a los 28 días de fructificación, eficiencias biológicas del 96% y esporóforos más grandes). Sin embargo, las cepas híbridas presentaron algunas desventajas como mayor tiempo para iniciar la fructificación (62 días con respecto a 37 días de las cepas parentales).

Productividad de cepas híbridas coloridas de *Pleurotus* spp.

Finalmente Valencia del Toro *et al.* (2007) reportan la eficiencia biológica (EB) de 4 cepas híbridas coloridas obtenidas por apareamiento entre neohaplontes y 2 cepas control. El análisis estadístico de los resultados indicó diferencias significativas entre las 6 cepas. Las 2 cepas control produjeron las mayores eficiencias biológicas (182 y 148%), seguidas de una de las cepas híbridas de color amarillo (IE201₂xIE202₁) con 109%, mientras que la EB del resto de las cepas híbridas fue de 36 a 58%. En este caso a pesar de que la cepa híbrida más productiva (IE201₂xIE202₁) no logró rebasar la EB de las cepas control, si mostró características atractivas tanto para su cultivo a escala comercial, como para su uso en programas de mejoramiento genético, debido al color amarillo, forma delgada y estípites cortos.

3.3.3 PRODUCCIÓN DE PROTOPLASTOS.

Este método utiliza enzimas líticas para romper la pared celular y los medios de recuperación deber estar osmóticamente regulados. Comparado con los métodos previos presenta algunas ventajas como son:

- Recuperación de ambos núcleos en un 75% de las cepas evaluadas
- Tiempo de recuperación de neohaplontes de tan sólo 7 días
- Reacciones normales de compatibilidad entre los neohaplontes obtenidos.

Por otro lado, se sabe que con este método ha sido posible romper con las barreras de incompatibilidad sexual entre diferentes especies, géneros e incluso diferentes ordenes, permitiendo así la obtención de híbridos. Sin embargo, Fukumasa *et al.* (1994) reportan la desdicarionización de cepas de *Lentinula edodes* con la desventaja de encontrar variaciones en algunas propiedades biológicas de los neohaplontes, las cuales fueron atribuidas a posibles mutaciones ocasionadas por el método de regeneración de protoplastos.

IV. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

4.1 JUSTIFICACIÓN:

Lentinula edodes también conocido como shiitake es un hongo comestible que se cultiva principalmente en Japón y Asia Oriental. Su cultivo se realiza sobre aserrines de maderas duras o en troncos de árboles muertos y por la naturaleza de los sustratos presenta la desventaja de requerir de tiempos de incubación muy prolongados (desde 4 a 5 meses hasta dos años). Sin embargo, con las nuevas técnicas de manipulación genética se vislumbra la posibilidad de obtener híbridos que reteniendo la morfología de *Lentinula*, (mayor precio comercial y apreciables cualidades organolépticas) presenten las ventajosas características fisiológicas de *Pleurotus* (amplio espectro de sustratos para su desarrollo y una elevada velocidad de crecimiento).

4.2 OBJETIVO GENERAL:

Obtener cepas híbridas de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* mediante el apareamiento de neohaplotentes.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

- 4.3.1 **MODIFICAR LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE NEOHAPLONTES UTILIZADA PARA EL GÉNERO *PLEUROTUS* PARA OBTENER NEOHAPLONTES DE DIFERNTES CEPAS DEL GÉNERO *LENTINULA*.**
- 4.3.2 **OBTENER HÍBRIDOS A PARTIR DE APAREAMIENTO DE LOS NEOHAPLONTES DE *LENTINULA* CON NEOHAPLONTES O CEPAS MONOCARIÓTICAS DE *PLEUROTUS*.**
- 4.3.4 **OBSERVAR LAS CARACTERÍSTICAS DE FRUCTICACIÓN DE LOS HÍBRIDO OBTENIDOS Y DE LAS CEPAS PARENTALES DE *LENTINULA* Y *PLEUROTUS*.**
- 4.3.5 **CARACTERIZAR EL SISTEMA QUE CONTROLA LA COMPATIBILIDAD SEXUAL EN LOS HÍBRIDOS ÍTER GÉNERO.**

V. HIPÓTESIS

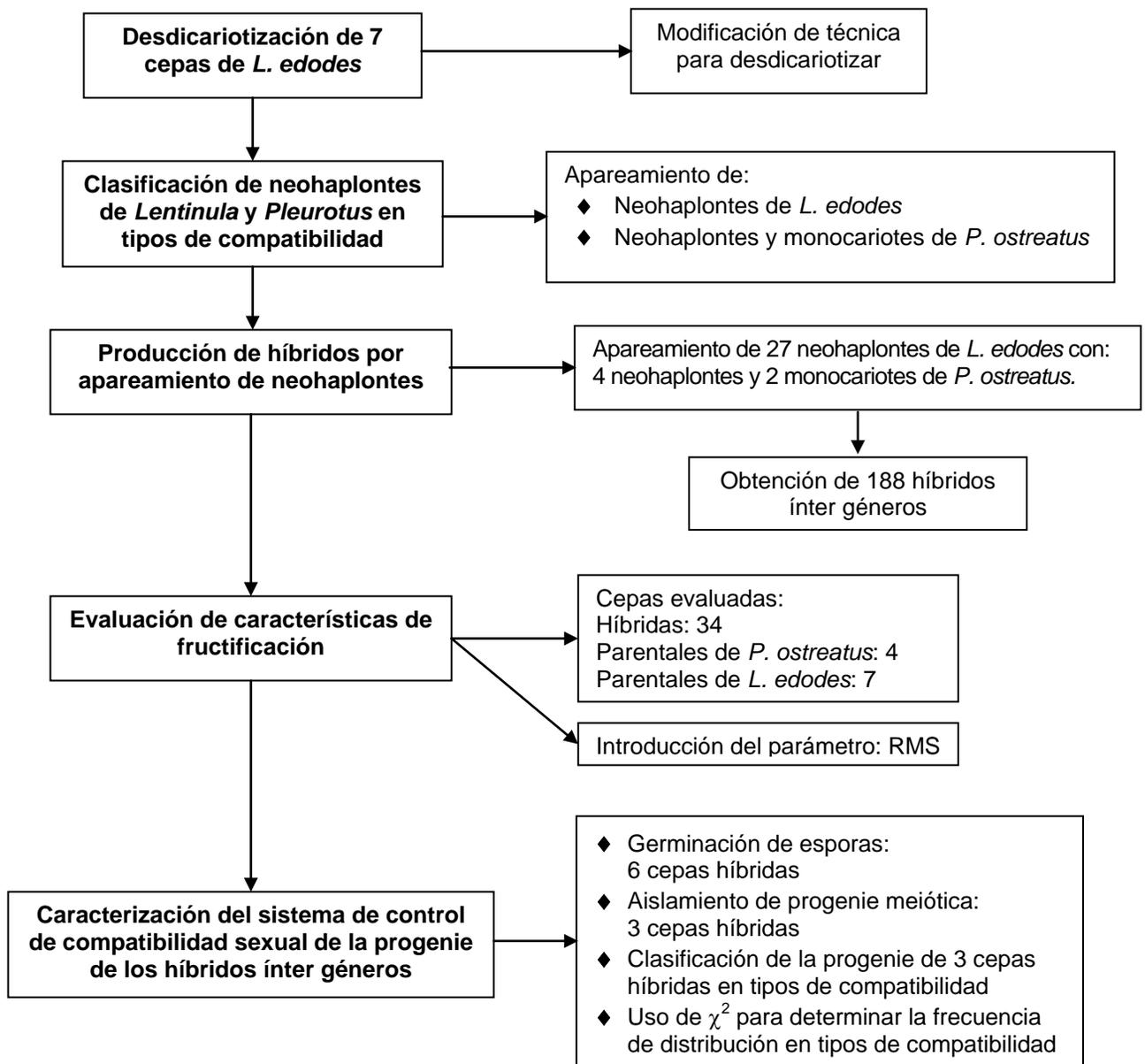
- 5.1 **A LA FECHA NO SE HABÍA MODIFICADO LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE NEOHAPLONTES REPOTADA PARA EL GÉNERO *PLEUROTUS*, LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE HOMOGENEIZACIÓN DEL MICELIO PROBABLEMENTE PERMITA RECUPERAR LOS DOS COMPONENTES MONOCARIÓTICOS DE DIFERNTES CEPAS DE *L. EDODES*.**
- 5.2 **DE MANERA SEMEJANTE A COMO SE REPORTA CON LA TÉCNICA DE FUSIÓN DE PROTOPLASTOS SE OBTENDRAN HÍBRIDOS ÍTER GÉNERO APAREANDO NEOHAPLONTES DE *LENTINULA* CON NEOHAPLONTES Y/O MONOCARIOTES DE *PLEUROTUS* Y SERÁN FÉRTILES LOS HÍBRIDOS OBTENIDOS.**
- 5.3 **DADO QUE LAS DOS CEPAS PARENTALES DE LOS GÉNEROS *LENTINULA* Y *PLEUROTUS* PRESENTAN UN SISTEMA DE COMPATIBILIDAD SEXUAL DE TIPO TETRAPOLAR HETEROTÁLICO, SE ESPERA QUE LAS CEPAS HÍBRIDAS PRESENTARÁN EL MISMO PATRÓN DE SEXUALIDAD DE LAS CEPAS PARENTALES.**

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PLANTEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA GLOBAL DEL PROYECTO.

De acuerdo al objetivo general del proyecto y a los objetivos particulares en la figura 1 se presenta un diagrama que ilustra las principales etapas que se realizaron experimentalmente para lograr el mejoramiento genético de *Lentinula*.

Figura 1: Principales etapas experimentales involucradas durante el desarrollo global del proyecto para obtener híbridos inter géneros



En esta sección se describen las metodologías utilizadas para el desarrollo del proyecto que no fueron descritas en los artículos publicados.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la obtención de híbridos se utilizaron los neohaplontes obtenidos por desdicariorización de 7 cepas de *Lentinula edodes* (procedentes de Canadá, Corea y Estados Unidos). En la Tabla 1 se presentan los neohaplontes de cada cepa que se utilizaron para su clasificación en tipos de compatibilidad.

Tabla 1: Neohaplontes de *Lentinula* utilizados para la obtención de híbridos ínter géneros

Cepas dicarióticas	Neohaplontes utilizados	Total de neohaplontes
L5	L5-1, L5-9, L5-15, L5-23, L5-25, L5-26, L5-30	7
L9	L9-2, L9-3, L9-8, L9-16	4
L15	L15-4, L15-5, L15-8, L15-11	4
L18	L18-1, L18-2	2
L19	L19-1, L19-2	2
L20	L20-6, L20-8	2
L21	L21-1, L21-2, L21-7, L21-20, L21-24, L21-25	6
Total de neohaplontes de <i>Lentinula edodes</i>		27

Las cepas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas en la obtención de híbridos ínter géneros fueron donadas por la Dra. Eger G. (Philipps University, Marburg, Lahn, Alemania Federal). En la Tabla 2 se presentan las claves y características de las cepas monocarióticas de *Pleurotus* utilizadas en primera instancia para su clasificación en tipos de compatibilidad y posteriormente para la obtención de híbridos por apareamiento con los neohaplontes de *Lentinula edodes*.

Tabla 2: Cepas de *Pleurotus ostreatus* de tipo monocariótico (donadas por Dra. Eger, Alemania)

Clave	Características
P403	Neohaplontes
P404	
P413	
P414	
P407	Cepas monocarióticas
P408	

Todas las cepas utilizadas para el desarrollo del proyecto procedían de diferentes regiones del mundo, las de *Pleurotus ostreatus* procedían de Europa y las de *Lentinula edodes* de Canadá, Corea y Estados Unidos, siendo todas las cepas utilizadas para la producción comercial de los éstos 2 géneros. La razón de utilizar cepas de tipo comercial y que fueran locales, fue porque este tipo de cepas asegura que la morfología de sus hongos es normal y producen altas eficiencias biológicas en la etapa de fructificación. Estas características son de suma importancia en la selección de cepas para programas de mejoramiento genético, en donde se desea que las cepas mejoradas se utilicen para la producción comercial de

carpóforos con morfología normal y rendimientos semejantes o superiores a las cepas parentales. Las cepas que se utilizan en el mercado nacional para su explotación comercial por lo general son de tipo silvestre o domesticadas en diferentes centros de investigación pero presentan la desventaja de producir bajas eficiencia biológicas (60 a 80% en el mejor de los casos a escala de laboratorio) y cuando éstas son llevadas para su uso a nivel industrial sus rendimientos puede disminuir de un 10 a 20%. Por esta razón en este proyecto no se utilizaron cepas de origen local.

6.3 DETERMINACIÓN DE TIPOS DE COMPATIBILIDAD.

Para identificar los tipos de compatibilidad de los neohaplontes de *Pleurotus* y *Lentinula* se realizaron apareamientos entre los neohaplontes de cada género en todas las posibles combinaciones en placas con 10 ml de medio de extracto de malta agar. Todos los apareamientos se realizaron por duplicado para confirmar los resultados y también se realizaron las cruza mutuas entre cada neohaplonte como control negativo de la ausencia de fíbulas de cada cepa utilizada. Una vez realizados los apareamientos, las placas fueron incubadas a 24°C. Después de 72 horas las placas fueron revisadas diariamente al microscopio para identificar la formación de fíbulas, características del micelio dicariótico. Para confirmar la obtención de micelio de tipo dicariótico, éste fue resembrado en medio de extracto de malta y cuando el micelio se desarrolló nuevamente fue revisado al microscopio para verificar la presencia de fíbulas.

6.4 APAREAMIENTOS ENTRE CEPAS DE *P. OSTREATUS* Y *L. EDODES*.

Para la obtención de híbridos entre los géneros *Lentinula* y *Pleurotus* se realizaron todos los apareamientos entre los 27 neohaplontes de *Lentinula* con 4 neohaplontes y 2 monocariotes de *Pleurotus* en placas con 10 ml de medio de extracto de malta agar. Todos los apareamientos se realizaron por duplicado para confirmar los resultados. Una vez realizados los apareamientos las placas de agar fueron incubadas a 24°C. Después de 72 horas las placas fueron revisadas diariamente al microscopio para identificar la formación de fíbulas, características del micelio dicariótico. Para confirmar la obtención de micelio de tipo dicariótico, éste fue resembrado en medio de extracto de malta y cuando el micelio se desarrolló, nuevamente fue revisado al microscopio para verificar la presencia de fíbulas.

6.5 GERMINACIÓN DE ESPORAS PARA LA OBTENCIÓN DE PROGENIES.

Las esporas de los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas de *L. edodes* x *P. ostreatus* se colectaron colocando el cuerpo fructífero sobre papel filtro o aluminio y se dejó esporular de 12 a 24 horas. Posteriormente se retiró el cuerpo fructífero y se guardó el papel con las esporas en bolsas de polipapel, las cuales se almacenaron a temperatura de refrigeración.

Para la germinación de esporas se cortó bajo condiciones de esterilidad un pedazo de papel de 1 x 1 cm con las esporas, y se depositó en un frasco vial que contenía 5 ml de agua destilada estéril, se agitó y con la suspensión de esporas resultante se realizaron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Para cada dilución se inocularon con 50 μ l, 2 cajas Petri con 10 ml de agar extracto de malta y se incubaron a 28°C durante 3 días. A partir de ese momento se examinaron diariamente todas las cajas con la ayuda de un microscopio y en caso de encontrar colonias monocarióticas aisladas, éstas fueron recuperadas transfiriéndolas a cajas Petri con medio de agar extracto de malta. Una vez que se observó desarrollo micelial

en las colonias resembradas (4 colonias por caja Petri) se llevó a cabo una segunda revisión microscópica y sólo se resembraron las colonias monocarióticas en cajas individuales con medio agar extracto de malta. En los casos en donde no fue posible aislar monocariotes (por la elevada cantidad de colonias) se preparó nuevamente una suspensión de esporas y sólo se inocularon entre 5 y 10 cajas con las diluciones en donde previamente se observó una baja concentración de esporas viables (20 a 40 colonias por caja). Una vez que se contó con las colonias monocarióticas crecidas, éstas fueron identificadas con una clave como la siguiente: L19-1 x P414-E1, en donde L19-1 corresponde al neohaplonte # 1 aislado para la cepa L19 de *L. edodes*, el símbolo "x" significa la cruce con; el número P414: corresponde al neohaplonte 414 de *P. ostreatus* y finalmente E1: corresponde al número de la espора aislada para este híbrido.

6.6 CLASIFICACIÓN DE LAS PROGENIES DE LAS CEPAS HÍBRIDAS (*PLEUROTUS X LENTINULA*) EN LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD.

Para clasificar la progenie monocariótica de cada híbrido en los 4 tipos de compatibilidad, en una primera etapa todos los cultivos monospóricos (monocariotes progenie) fueron apareados con los dos neohaplontes parentales y después de 3 días de incubación se revisaron diariamente al microscopio para observar la formación de fíbulas. La obtención de fíbulas es el resultado de la compatibilidad entre dos cepas, razón por la cual es posible identificar a los monocariotes con los tipos de compatibilidad I y II.

Los monocariotes que no fueron compatibles con los neohaplontes parentales, significa que pertenecen a alguno de los dos tipos recombinates (III y IV). Para su clasificación en estos dos tipos de compatibilidad se tomaron al azar dos monocariotes del grupo que dio reacciones negativas con los dos neohaplontes parentales (es decir con probable tipo III o IV) y se aparearon con todas los monocariotes sin clasificar. Con resultado de dichos apareamientos se presentaron las siguientes posibilidades:

- 1) Que los dos monocariotes pertenezcan al mismo tipo de compatibilidad con lo cual se obtiene el mismo patrón de apareamiento con todas las cepas, identificando así un solo tipo de compatibilidad (III) y suponer que los monocariotes restantes (que no se aparearon) pertenecen al tipo de compatibilidad contrario (IV). Para confirmar que los monocariotes sin apareamiento positivo realmente pertenecen al tipo IV, éstos se deben aparear con algún monocariote clasificado en el grupo III.
- 2) Que un monocariote pertenezca al tipo III y el otro al tipo IV. Con lo cual se logra la clasificación de todas los monocariotes progenie.
- 3) Que uno de los monocariotes pertenezca al tipo III o IV y el otro no se aparee con ningún de los monocariotes progenie. Con lo cual sólo se identifica un tipo y para confirmar los monocariotes del tipo faltante es necesario aparearlos con un monocariote del tipo de compatibilidad contrario.

Finalmente para los monocariotes progenie que no pudieron ser clasificados en alguno de los cuatro tipos de compatibilidad, se tomó un monocariote progenie representante de cada tipo de compatibilidad (monocariotes referenciales) y se aparearon con todas los monocariotes que previamente no fueron clasificados. Este tipo de apareamientos se realizaron en medio de agar agua con el objeto de tener la menor cantidad de nutrientes disponibles en el medio y así forzar el apareamiento entre las cepas.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para lograr el objetivo final de este proyecto, es decir obtener cepas híbridas de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* mediante el apareamiento de neohaplontes, se planteó una estrategia global que consistió de varias etapas. En primer lugar se realizó la obtención de neohaplontes de *Lentinula* para después aparearlos con neohaplontes o cepas monocarióticas de *Pleurotus*. A continuación se fructificaron tanto los híbridos obtenidos, como las cepas parentales de *Lentinula* y *Pleurotus*. Finalmente, por medio de análisis de progenies, se caracterizó el sistema que controla la compatibilidad sexual en los híbridos interespecies.

En este capítulo se describen los experimentos realizados para cada una de las etapas del proyecto, así como los principales resultados obtenidos. Cuando la información reportada ya fue publicada se indica la referencia bibliográfica del artículo y en la sección de Anexos se incluye la versión completa de cada artículo.

7.1 RECUPERACIÓN SIMÉTRICA DE LOS COMPONENTES MONOCARIÓTICOS DE *LENTINULA EDODES* POR DESDICARIOTIZACIÓN.

Inicialmente se intentó recuperar los componentes monocarióticos de 7 cepas de *Lentinula* por desdicariotización utilizando la técnica reportada para los géneros *Pleurotus* y *Coprinus* (Leal, 1980). Con la técnica original, el tiempo de incubación se prolongó demasiado y cuando se observó desarrollo micelial éste siempre fue de tipo dicariótico. Como no se logró la desdicariotización directa con esta técnica, se evaluó el efecto del tiempo de homogeneización y volumen de inoculación sobre la viabilidad del micelio en medio líquido de extracto de malta y en solución desdicariotizadora.

El tiempo de homogeneización influyó marcadamente tanto en la viabilidad del micelio, como en la recuperación de neohaplontes. Estudios previos con la misma técnica de desdicariotización reportaron que las cepas de *Pleurotus* soportaron tiempos de homogeneización mayores de 150 segundos (Leal, 1980; Valencia del Toro y Leal, 2002). Las cepas de *Lentinula* difícilmente sobrevivieron a tiempos de homogeneización mayores a 30 segundos, al evaluar su viabilidad en medio de extracto de malta, la cual disminuyó aun más cuando el micelio homogeneizado fue inoculado en la solución desdicariotizante. La cepa L21, por ejemplo, fue un caso extremo, donde no se observó desarrollo micelial con tiempos de homogeneización mayores a 5 segundos. Para la mayoría de las cepas el tiempo óptimo de homogeneización, en donde sobrevivió el micelio y se recuperaron neohaplontes fluctuó entre 5 y 30 segundos como máximo.

La recuperación de neohaplontes se llevó a cabo en las tres etapas del proceso de desdicariotización: 1) A partir de micelio homogeneizado, 2) Inoculación del micelio homogeneizado en solución desdicariotizadora e incubación a 25°C por 14 días y 3) Homogeneización por 5 segundos de la solución desdicariotizadora después de su incubación por 14 días. Bajo estas condiciones fue posible desdicariotizar las 7 cepas de *Lentinula* estudiadas, lográndose en todos los casos obtener sus dos componentes monocarióticos en una proporción 1:1. Únicamente con una cepa, L19, la recuperación de los componentes monocarióticos no presentó una proporción 1:1.

Con este estudio se confirmó la gran sensibilidad que presenta el micelio de *L. edodes* al daño mecánico, previamente reportado Kawasumi *et al.* (1987) y Arteaga *et al.* (1996), donde los autores observaron que la homogeneización impidió en el primer caso la producción de protoplastos y en el segundo caso la sobrevivencia del micelio. En el presente estudio tal obstáculo fue eliminado reduciendo los tiempos de homogeneización a un rango entre 5 y 30 segundos, con lo cual fue posible recuperar los dos componentes monocarióticos de las 7 cepas de *L. edodes*. La modificación realizada en este estudio sobre la técnica reportada por Arteaga *et al.* (1996) para el género *Lentinula*, resulta de gran importancia para el mejoramiento genético de este género, ya que los resultados obtenidos con la técnica de producción de protoplastos han reportado una gran variabilidad e inestabilidad en los neohaplontes obtenidos (Eichlerová and Homolka, 1999; Eichlerová *et al.*, 2000).

Los resultados de esta etapa del proyecto se reportan en el Anexo 8.1 correspondiente al artículo: Ramírez-Carrillo R., H. Leal Lara, 2002. Symmetric recovery of monokaryotic components from *Lentinula edodes* using dikaryotization. In: *Mushroom biology and mushroom products*, Sánchez *et al.* (eds). UAEM. ISBN: 968-878-105-3), pp 141- 149.

7.2 CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE COMPATIBILIDAD DE LOS NEOHAPLONTES DE *L. EDODES* Y MONOCARIOTES Y/O NEOHAPLONTES DE *P. OSTREATUS*.

7.2.1 APAREAMIENTO DE TODOS LOS NEOHAPLONTES DE LAS CEPAS DE *LENTINULA* PARA CLASIFICARLOS DE ACUERDO A SU TIPO DE COMPATIBILIDAD.

De un total de 144 neohaplontes recuperados para las 7 cepas de *Lentinula*, se seleccionaron 27 neohaplontes de los dos tipos de compatibilidad de cada cepa y se realizaron apareamientos en todas las posibles combinaciones para clasificarlos en tipos de compatibilidad.

En las tablas 3 y 5 se presentan los resultados de todos los apareamientos realizados entre los 27 neohaplontes de *Lentinula*. A pesar de que las 7 cepas dicarióticas de *Lentinula* procedían de diferentes regiones del mundo se observó que, 6 de ellas presentaron los 2 mismos tipos de compatibilidad (A_1B_1 , A_2B_2) y sólo los dos neohaplontes de la cepa L18 se clasificaron en tipos de compatibilidad diferentes (A_3B_3 y A_4B_4). Como se observa en la tabla 3 se realizaron un total de 351 apareamientos y por la clasificación obtenida en 4 tipos de compatibilidad diferentes, se esperaba obtener 207 apareamientos positivos y 144 negativos, de los cuales se obtuvieron 188 apareamientos positivos, lo que representó un 91% de éxito. Estos valores indican que el número de apareamientos negativos entre los neohaplontes de *Lentinula* fue muy bajo (9%). Probablemente esta incapacidad de aparearse de ciertos neohaplontes no haya sido ocasionada por el proceso de desdicarización. Algo similar había sido reportado por Fukumasa *et al.* (1994) en la desdicarización de cepas de *L. edodes* por medio de la producción de protoplastos. Si bien estos autores indican la recuperación de los dos tipos de compatibilidad, al realizar los apareamientos para clasificar los neohaplontes en los dos tipos de compatibilidad correspondientes a la cepa progenitora identificaron un tercer grupo de cepas incompatibles, presentes en una mayor proporción (22%) a la encontrada en el presente estudio (9%). Los resultados semejantes obtenidos en estudios de índole diferente, uno por producción de protoplastos y en otro por desdicarización, sugieren fuertemente la posibilidad de la existencia de factores, a la fecha desconocidos, diferentes de los tipos de compatibilidad pero que también participan en la

regulación de las reacciones de compatibilidad. Estos factores se manifiestan al inducir la separación de la estructura dicariótica, independientemente si es debido a la producción de protoplastos o por desdicarización. No obstante, es de hacer notar, que la presencia de este grupo de neohaplotes incompatibles es en todo caso mucho menor con la desdicarización. Este tipo de comportamiento se observó también al clasificar las progenies meióticas de las cepas híbridas, en donde además de los cuatro tipos de compatibilidad esperados, se obtuvo siempre un quinto grupo de monocariotes progeñe totalmente incompatibles, fortaleciéndose así la hipótesis de la existencia de un factor adicional en el control de las reacciones de compatibilidad. Probablemente este es un fenómeno que se presenta de manera frecuente en los hongos con sexualidad heterotálica

Tabla 3: Clasificación de los neohaplontes de *Lentinula edodes* en tipos de compatibilidad

		Tipos de compatibilidad de los neohaplontes de <i>Lentinula edodes</i>																				
		A ₁ B ₁								A ₂ B ₂									A ₃ B ₃	A ₄ B ₄		
		L5-1 L5-25	L5-15	L5-30	L9-8 L9-16	L15-4 L15-11	L19-1	L20-8	L21-1 L21-20 L21-24	L5-9	L5-23 L5-26	L9-2	L9-3	L15-5	L15-8	L19-2	L20-6	L21-2	L21-7	L21-25	L18-1	L18-2
A ₁ B ₁	L5-1 L5-25	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	
	L5-15	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+	
	L5-30	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	L9-8 L9-16	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	L15-4 L15-11	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	L19-1	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+
	L20-8	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L21-1 L21-20 L21-24	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A ₂ B ₂	L5-9	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L5-23 L5-26	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L9-2	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L9-3	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L15-5	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L15-8	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L19-2	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	
	L20-6	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L21-2	—	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
	L21-7	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
A ₃ B ₃	L18-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	
A ₄ B ₄	L18-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	

+ Apareamiento positivo = formación de micelio dicariótico
 — Apareamiento negativo = incompatibilidad entre las cepas
 (Yellow) Apareamiento negativo que por diferencia en tipos de compatibilidad se esperaba que fuera positivo

tetrapolar pero, que a la fecha ha pasado desapercibido, debido a la forma como se identifican los 4 grupos de compatibilidad de las progenies. Normalmente se seleccionan 1 ó 2 colonias monospóricas para aparearlas con otras 10 o 20 colonias monospóricas; de ahí se identifican 2 o hasta los 4 tipos de compatibilidad y no se le da importancia a las reacciones negativas y por lo general tampoco se realizan apareamientos extensivos entre todas las colonias monospóricas de la progenie.

7.2.2 APAREAMIENTO DE TODOS LOS NEOHAPLONTES Y/O MONOCARIOTES DE LAS CEPAS DE *PLEUROTUS* PARA CLASIFICARLOS DE ACUERDO A SU TIPO DE COMPATIBILIDAD.

En las Tablas 4 y 5 se observa que las 6 cepas monocarióticas de *Pleurotus* se clasificaron en 4 diferentes tipos de compatibilidad (A_5B_5 , A_6B_6 , A_7B_7 y A_8B_8). En este caso no se obtuvo ningún apareamiento negativo entre cepas compatibles.

Este resultado de compatibilidad total entre las cepas monocarióticas de *Pleurotus* era el esperado, ya que las 6 cepas utilizadas en esta etapa del proyecto se agruparon en 4 tipos de compatibilidad totalmente diferentes, que al ser apareadas se presentó la compatibilidad esperada.

Tabla 4: Clasificación de los neohaplontes y monocariotes de *Pleurotus ostreatus* en tipos de compatibilidad

Tipos de compatibilidad de los neohaplontes y monocariotes de <i>Pleurotus ostreatus</i>							
Tipos de compatibilidad	Cepas <i>Pleurotus</i>	A_5B_5		A_6B_6		A_7B_7	A_8B_8
		P403	P413	P404	P414	P407	P408
A_5B_5	P403	—	—	+	+	+	+
	P413	—	—	+	+	+	+
A_6B_6	P404	+	+	—	—	+	+
	P414	+	+	—	—	+	+
A_7B_7	P407	+	+	+	+	—	+
A_8B_8	P408	+	+	+	+	+	—

- + Apareamiento positivo = formación de micelio dicariótico
- Apareamiento negativo = incompatibilidad entre las cepas

Tabla 5: Clasificación en tipos de compatibilidad de los neohaplontes de *Lentinula edodes* y neohaplontes y monocariotes de *Pleurotus ostreatus*

Cepas	Tipo de compatibilidad
<i>Lentinula edodes</i> (dicariotes)	
L5, L9, L15, L19, L20, L21	$A_1B_1 \times A_2B_2$
L18	$A_3B_3 \times A_4B_4$
<i>Pleurotus ostreatus</i> (neohaplontes y monocariotes)	
P403, P413	A_5B_5
P404, P414	A_6B_6
P407	A_7B_7
P408	A_8B_8

7.3 PRODUCCIÓN DE HÍBRIDOS DE *P. OSTREATUS* X *L. EDODES*.

7.3.1 APAREAMIENTO DE 27 NEOHAPLONTES DE *LENTINULA* CON 4 NEOHAPLONTES Y 2 MONOCARIOTES DE *PLEUROTUS*.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de todos los apareamientos realizados entre los 27 neohaplontes de *Lentinula* y las 6 cepas de *Pleurotus* (4 neohaplontes y 2 monocariotes). En la etapa previa donde se clasificaron los 27 neohaplontes de *Lentinula* y las 6 cepas de *Pleurotus* en tipos de compatibilidad, se consideró que como se trataba de dos géneros y especies diferentes era muy probable que los tipos de compatibilidad fueran totalmente diferentes. Por ello para los neohaplontes de *Lentinula* se asignaron 4 tipos de compatibilidad (A_1B_1 , A_2B_2 , A_3B_3 y A_4B_4) y para las cepas de *Pleurotus* se asignaron otros 4 tipos de compatibilidad diferentes (A_5B_5 , A_6B_6 , A_7B_7 y A_8B_8). Sin embargo, al realizar los apareamientos entre los 27 neohaplontes de *Lentinula* con las 6 cepas de *Pleurotus*, se observó que de los 4 tipos de compatibilidad previamente identificados para las 6 cepas monocarióticas de *Pleurotus*, el correspondiente a la cepa P408 clasificado en el último grupo como A_8B_8 (Tabla 4) presentó el mismo patrón de compatibilidad que los neohaplontes de *Lentinula* correspondientes al primer tipo de compatibilidad (A_1B_1). Este comportamiento inesperado de una compatibilidad sexual entre cepas de géneros distintos sugiere que muy probablemente existe una gran similitud en los patrones de compatibilidad sexual de estos dos organismos aparentemente diferentes. Así los estudios de los factores de compatibilidad para cepas de *L. edodes* originarias de Japón revelan la presencia de 40 a 65 alelos para el factor A y entre 63 y 100 alelos para el factor B, lo cual indica que es probable la presencia factores de compatibilidad semejantes entre estos dos organismos (Fox *et al.*, 1994).

Una vez que se comprobó que tanto los neohaplontes de *Lentinula*, como los de *Pleurotus* se clasificaron en 3 tipos de compatibilidad totalmente diferentes y que en ambos casos se compartió un tipo de compatibilidad, se observó como resultado que de 149 apareamientos positivos que se esperaban considerando las diferencias en los tipos de compatibilidad, se obtuvieron 138, es decir el número de apareamientos negativos fue sólo del 7%. Como se observa en la Tabla 7 es probable que la incapacidad de aparearse de ciertos neohaplontes no haya sido ocasionada por el proceso de desdicarización, debido a que este mismo comportamiento fue observado cuando se realizaron los apareamientos entre los neohaplontes de *Lentinula*.

La fusión de protoplastos ha sido un método utilizado para la obtención de híbridos cuando los métodos convencionales de hibridación no permiten el apareamiento entre diferentes especies o incluso entre diferentes géneros. Un ejemplo es el trabajo realizado por Kim *et al.* (2000) donde reportan la obtención de híbridos inter género por medio de la transferencia de material nuclear de *L. edodes* dentro de protoplastos de *Coriolus versicolor*. Sin embargo, los autores observaron que la mayoría de las cepas progenie presentaron menor crecimiento que las cepas parentales. Razón por la cual éste método no ha sido aplicado en programas de mejoramiento genético de cepas de interés comercial.

El trabajo realizado por Dhitaphichit y Pornsuriya (2005) reporta la obtención de fusantes entre *P. ostreatus* y *P. djamor*. En dicho estudio el número de colonias aisladas después de la fusión fue de 412, de las cuales sólo 2 presentaron fíbulas, razón por la cual fueron seleccionadas como fusantes. Con estos resultado los autores concluyen que la técnica de fusión de protoplastos es un método apropiado para la obtención de híbridos inter especies

en hongos comestibles, particularmente para el género *Pleurotus*. Si comparamos los resultados de la técnica de fusión de protoplastos con el método de desdicarionización se puede concluir que este último método resultó mucho más exitoso para la obtención de híbridos, que en nuestro caso fue de tipo ínter género. Así, mientras que Dhitaphichit y Pornsuriya (2005) reportan un 0.004% de éxito en la obtención de fusantes, en este caso nosotros reportamos 93% de éxito.

Por otro lado, Valencia del Toro *et al.* (2007) reportan la eficiencia biológica (EB) de 4 cepas híbridas coloridas obtenidas por apareamiento entre neohaplontes con respecto a 2 cepas control. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre las 6 cepas. Pese a que las 2 cepas control fueron las que produjeron las mayores eficiencias biológicas (182 y 148%), en el siguiente grupo figura una cepa híbrida de color amarillo (IE201₂xIE202₁) con EB de 109%, mientras que el resto de las cepas híbridas produjeron EB muy baja (36 a 58%). En este caso, a pesar de que la cepa híbrida más productiva (IE201₂xIE202₁) no logró rebasar la EB de las cepas control, si mostró características atractivas tanto para su cultivo a escala comercial, como para su uso en programas de mejoramiento genético, debido al color amarillo, forma delgada y estípites cortos. Lo anterior permite concluir que la desdicarionización es un método muy apropiado para la obtención de fusantes tanto de tipo inter especie (Valencia del Toro *et al.*, 2007) como ínter género.

Como ya se mencionó previamente las barreras de incompatibilidad sexual entre diferentes especies, géneros e incluso diferentes ordenes ha sido posible eliminarlas al utilizar métodos como la fusión de protoplastos, que permite la obtención de híbridos. En forma semejante también se sabe que a través de las nuevas tecnologías que hacen uso de la biología molecular es posible transferir material genético de un organismo a otro; y así obtener cepas mejoradas a partir de material genético que anteriormente era prácticamente imposible de pensar en la obtención de un híbrido. Por lo anterior, se plantea que la compatibilidad en estos casos es de tipo somático y existen evidencias que indican que la compatibilidad en términos generales parece estar controlada primariamente por genes nucleares que no están ligados con los genes que regulan la compatibilidad sexual (Worral, 1997).

Dado que en este estudio la obtención de híbridos se logró utilizando como material inicial los neohaplontes obtenidos por desdicarionización, este método puede ser utilizado para la obtención de híbridos ínter especie e ínter género eliminando así las barreras naturales de incompatibilidad sexual entre diferentes especies e incluso como en este caso entre diferentes géneros. Esto permitió lograr resultados similares a los reportados por la técnica de fusión de protoplastos, o incluso por las nuevas técnicas de biología molecular donde se transfiere el material genético de un organismo en otro organismo, redundando en una mayor facilidad y éxito para la obtención de híbridos.

La compatibilidad entre las cepas de *Lentinula* y *Pleurotus* dio como resultado la obtención de 138 cepas híbridas de las cuales un total de 34 híbridos fueron llevados a la etapa de fructificación. Las 34 cepas híbridas fueron seleccionadas considerando que hubiera representantes de los 14 diferentes tipos de neohaplontes correspondientes a las siete cepas parentales de *L. edodes*, así como y de las 6 cepas parentales de *P. ostreatus* (4 neohaplontes y 2 monocariotes).

Tabla 6: Apareamiento de neohaplontes de *L. edodes* con 4 neohaplontes y 2 monocariotes de *P. ostreatus*

Neohaplontes de <i>Lentinula edodes</i>		Cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i>					
		Neohaplontes				Monocariotes	
		A₅B₅		A₆B₆		A₇B₇	A₁B₁
		P403	P413	P404	P414	P407	P408
A₁B₁	L5-1	+	+	+	+	—	—
	L5-25	+	+	+	+	—	—
	L5-15	+	+	+	+	—	—
	L5-30	+	+	+	+	+	—
	L9-8	+	+	+	+	+	—
	L9-16	+	+	+	+	+	—
	L15-4	+	+	+	+	+	—
	L15-11	+	+	+	+	+	—
	L19-1	+	+	+	+	—	—
	L20-8	+	+	+	+	+	—
	L21-1	+	+	+	+	+	—
	L21-20	+	+	+	+	+	—
	L21-24	+	+	+	+	+	—
	A₂B₂	L5-9	+	+	+	+	+
L5-23		+	+	+	+	+	+
L5-26		+	+	+	+	+	+
L9-2		+	+	+	+	—	+
L9-3		+	+	+	+	—	+
L15-5		+	+	+	+	—	+
L15-8		+	+	+	+	—	+
L19-2		+	+	+	+	+	+
L20-6		+	+	+	+	+	+
L21-2		+	+	+	+	—	+
L21-7		+	+	+	+	+	+
L21-25		+	+	+	+	—	+
A₃B₃	L18-1	+	+	+	+	—	+
A₄B₄	L18-2	+	+	+	+	+	+

+ Apareamiento positivo = formación de micelio dicariótico
 — Apareamiento negativo = incompatibilidad entre las cepas
 Apareamiento negativo que por diferencia en tipos de compatibilidad se esperaba que fuera positivo

Tabla 7: Tasa de compatibilidad en los apareamientos entre los neohaplontes de *L. edodes* y las cepas de *P. ostreatus* (4 neohaplontes y 2 monocariotes)

Apareamientos	Compatibilidad				
	Total	Positivos		Negativos	
		No.	%	No.	%
<i>Lentinula x Lentinula</i>	207	188	91	19	9
<i>Lentinula x Pleurotus</i>	149	138	92	11	7
<i>Pleurotus x Pleurotus</i>	13	13	100	0	0

7.4 FRUCTIFICACIÓN DE LAS CEPAS HÍBRIDAS DE *PLEUROTUS X LENTINULA*, Y CEPAS PARENTALES DE *PLEUROTUS* Y *LENTINULA*.

7.4.1 PRODUCTIVIDAD DE CEPAS HÍBRIDAS DE *PLEUROTUS X LENTINULA* Y CEPAS PARENTALES DE *PLEUROTUS*.

Considerando el éxito de la obtención de 138 híbridos en la etapa previa, resultaba entonces de sumo interés observar las características morfológicas de las cepas híbridas. Por ello se seleccionaron 34 cepas híbridas y 4 cepas de *P. ostreatus* como control para evaluar sus características de fructificación y eficiencia biológica. La fructificación se realizó en dos experimentos, registrando el peso fresco de los hongos producidos en seis réplicas durante ocho semanas de corte. Posteriormente se calculó la producción semanal acumulada y la eficiencia biológica (EB = g de hongo fresco/100 g de sustrato seco). Con la EB acumulada se realizó un análisis estadístico para identificar la semana donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo (RMS). Con el valor del RMS fue posible identificar cepas precoces, las cuales representan material importante para estudios de mejoramiento genético.

En el primer experimento solo dos no fructificaron y el RMS se obtuvo a partir de la segunda semana para dos cepas con muy bajos rendimientos, y el resto de las cepas alcanzó dicho valor entre la tercera y séptima semana de corte; mientras que en el segundo experimento sólo una cepa alcanzó su RMS hasta la octava semana de corte. En el primer experimento las cepas control de *P. ostreatus* produjeron EB entre 55 y 57%, mientras que con las cepas híbridas se obtuvieron EB entre 7 y 125%. Para el segundo experimento las cepas control produjeron EB entre 65 y 137% y las cepas híbridas entre 34 y 161%. Al realizar un análisis estadístico de las EB obtenidas para las dos cepas control evaluadas en ambos experimentos, se observó que no se presentaron diferencias significativas, razón por la cual se realizó el análisis estadístico en forma conjunta para todas las cepas evaluadas. Así las 11 cepas más productivas dieron valores de EB mayores al 100% (103 a 161%) y presentaron morfologías adecuadas para la producción comercial (tamaño, forma del estípite y píleo). Solo una cepa presentó estípites largos y píleo en forma de trompeta.

Por otro lado, la evaluación del RMS permitió identificar dentro del grupo de las once cepas más productoras seis cepas precoces, las cuales presentaron altos rendimientos en un período de cosecha de 3 a 4 semanas (L9-2 x P4142, L19-2 x P4041, L9-2 x P4132, L9-8 x P4132, L19-1 x P4131, L15-11 x P4072), razón por la cual representan material importante tanto para la producción comercial como para estudios de mejoramiento genético. Además el RMS también permitió identificar otras cepas precoces aunque con bajos rendimientos, es

decir, su RMS osciló entre 41 y 79% de EB en un período de cosecha de 2 a 4 semanas, lo cual las hace atractivas para estudios de mejoramiento genético. Dentro de estas se encontraron las cepas: L18-1 x P4081, L5-23 x P4072, L19-2 x P4031, L18-1 x P4131, L5-23 x P4082, L9-8 x P4072, L19-1 x P4141.

Los valores de EB obtenidos para las cepas parentales de *P. ostreatus* en general fueron menores a los obtenidos para las cepas híbridas. Sin embargo al comparar dichos valores con los reportados en la literatura se puede decir que están dentro del rango esperado (Upadhyay *et al.*, 2002; Lahmann y Rinker, 1995). Así por ejemplo Zervakis y Balis (1992) reportan EB para cepas de *P. ostreatus* entre 72 y 94%, que al ser comparados con las EB de 55±22 hasta 137 ±17 obtenidos con las cepas parentales en este estudio, las ubican dentro del rango esperado. De igual forma Martínez Carrera *et al.* (1990), reportan valores de EB entre 14 y 96 al utilizar como sustratos bagazo de caña solo y en mezclas con paja de cebada y pulpa de café. Estos resultados indican que la selección de cepas parentales del género *Pleurotus* para la producción de híbridos fue adecuada.

Considerando que las cepas parentales presentaron valores de EB dentro del rango reportado en la literatura se puede decir que las 11 cepas híbridas más productiva al presentar EB por arriba del 100% y morfología adecuadas para la producción comercial son aptas para su uso a mayor escala.

Finalmente, a partir de la definición convencional de «híbrido» (Font Quer, 1977), se puede decir que los aquí obtenidos son de tipo íter genérico, ya que implicó la unión sexual de individuos pertenecientes a géneros distintos, y al mismo tiempo se les puede considerar como falsos híbridos o híbridos goneoclino por presentar una preponderante influencia fenotípica de uno de los progenitores (*P. ostreatus*), que hace que los caracteres del otro progenitor (*L. edodes*) pasen inadvertidos.

Los resultados de esta etapa del proyecto se reportan en el Anexo 8.2 correspondiente al artículo: Ramírez Carrillo R., O. Hernández Vargas, F. Galván Pallach, H. Leal Lara, 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, Tapachula México. ISBN: 978-970-9712-40-7. pp 55-64.

7.4.2 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE FRUCTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PARENTALES DE *L. LENTINULA*.

Para corroborar las características morfológicas de las cepas de *Lentinula* se evaluaron los rendimientos de las 7 cepas parentales de *Lentinula* (utilizadas para su descicariotización) en un sustrato comercial, sin someterlo a un choque térmico y/o hidratación del sustrato después de la incubación. El inóculo se preparó con grano de trigo esterilizado (2 horas), inoculado e incubado por 21 días. Para evaluar los rendimientos se inocularon al 5%, 3 bolsas de 2 kg de sustrato húmedo (54% de humedad) por cada cepa y se incubaron a 24°C por 70 días (invasión total del sustrato y formación de primordios, sin la formación de la cubierta oscura indicativa de su maduración). La fructificación se indujo incrementando la humedad con 3 riegos de 20 minutos por día y ventilando con aire húmedo (1 hora después de cada riego por 2 horas). Una semana después de la inducción inició la cosecha de los primeros cuerpos fructíferos. En el primer brote la eficiencia biológica (EB = g de hongos frescos /100 g de sustrato seco) fluctuó de 4 a 138%; en el segundo de 17 a 176% y en el

tercero de 24 a 261%. También se observó que las cepas se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de sus rendimientos y la humedad necesaria para su desarrollo. En un grupo se identificaron a las cepas L5, L9 y L15 que requieren elevados niveles de humedad para el desarrollo de los hongos y presentan alta EB (143 a 261), mientras que las cepas L18, L19, L20 y L21 requieren menores niveles de humedad y su EB fue baja (24 a 83%).

En la literatura se reportan eficiencias biológicas entre 60 y 80% para la producción comercial de *L. edodes* (Royse, 2001; Shen *et al.*, 2008; Bruhn y Mihail, 2009; Brunh *et al.*, 2009; Peralta Márquez y Frutis Molina, 2010). Rendimientos semejantes fueron obtenidos en este estudio para las cepas menos productivas (63 – 83%). Previo a este estudio los mayores rendimientos reportados a nivel laboratorio fluctúan en un rango de 107 a 121% (Royse y Sánchez, 2000). En este trabajo se observa que las cepas evaluadas presentaron rendimientos muy superiores a los reportados en la literatura (143, 170 y 261%). Así los valores de EB obtenidos para las cepas parentales de *L. edodes* en este trabajo sólo son superados por los resultados reportados por Hiromoto (1991), quien describe la obtención de altas EB ($325\% \pm 100$), pero con la desventaja de no indicar detalles de composición del sustrato o condiciones de crecimiento debido a la protección de toda la información por una patente. Sin embargo, los resultados obtenidos con las cepas parentales de *Lentinula* en este trabajo son mucho mayores a los reportados previamente en la literatura y muy probablemente la selección de estas cepas como parentales de los híbridos fue lo que contribuyó para que las cepas híbridas también presentaran altos rendimientos.

Los resultados de esta etapa del proyecto se reportan en el Anexo 8.3 correspondiente al artículo: Ramírez Carrillo R., H. Leal Lara, 2002. Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes* In: *Mushroom biology and mushroom products*, Sánchez *et al.* (eds). UAEM. ISBN: 968-878-105-3), pp 289- 294.

7.4.3 INTRODUCCIÓN DEL TÉRMINO RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO (RMS).

Los valores de eficiencia biológica obtenidos para las 7 cepas parentales de *Lentinula* en tres brotes de producción se utilizaron para identificar el brote donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo (RMS). Para ello se realizaron en todos los casos 2 análisis de varianza con los valores de producción de cada cepa, por un lado un análisis univariable en donde se consideró únicamente a los brotes como variable independiente, y también un análisis multivariable, en donde se consideraron como variables independientes a los brotes y las repeticiones. La interpretación para cada caso se realizó de acuerdo con el análisis de varianza donde se obtuvieron los valores más altos de $F_{calculada}$ para el factor brotes, dado que ésta es la variable de interés para determinar el RMS.

Con el análisis univariable se obtuvo un valor mayor de $F_{calculada}$ para las cepas L5, L9, L15 y L21. Por otro lado, con el análisis multivariable se obtuvo un mayor valor de $F_{calculada}$ para las cepas L18, L19 y L20 y sólo para la cepa L20 se observó una diferencia altamente significativa entre las repeticiones, lo que sugiere que el número de repeticiones no fue suficiente y en experimentos posteriores se debe incrementar.

Para las cepas L18 y L21 el análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas entre los tres brotes, es decir el rendimiento máximo se obtuvo en el primer brote. Para el resto de las cepas se observaron diferencias significativas entre los tres brotes. Por medio de la

prueba de Duncan se determinó que las cepas L5, L19 y L20 alcanzaron su rendimiento máximo significativo al segundo brote y sólo las cepas L9 y L15 alcanzaron su rendimiento máximo al tercer brote, ya que se observaron incrementos significativos en los rendimientos de cada brote.

Una vez determinado el brote donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo, se identificaron las cepas mas productivas. Para ello con los valores de RMS se realizaron nuevamente dos análisis de varianza, uno de tipo univariable (donde las cepas fueron consideradas con la variable independiente) y otro de tipo multivariable (donde las variables independientes fueron cepas y repeticiones). El análisis multivariable fue el que presentó el mayor valor de $F_{calculada}$ para la variable "cepas" e indicó nuevamente diferencias altamente significativas para las repeticiones. Por medio de la prueba de Duncan se identificó a la cepa L9 como la más productiva (grupo f) seguida de las cepas L15 (e) y L5 (d), L20 (c) y L21 (b), siendo las cepas L18 y L19 las menos productivas (grupo a).

Al comparar la clasificación de las cepas usando la prueba de Duncan, en función de la eficiencia biológica total y el rendimiento máximo significativo se observaron diferencias importantes. Para la eficiencia biológica total sólo se obtienen 5 grupos, mientras que de acuerdo al RMS se obtienen 6 grupos. Es decir, el rendimiento máximo significativo permitió una mejor separación de las cepas en grupos estadísticamente diferentes y como ventaja adicional permitió conocer el brote donde cada cepa alcanza su rendimiento máximo significativo o tiempo óptimo de cosecha.

El parámetro del rendimiento máximo significativo es muy valioso para la producción comercial, no únicamente de *Lentinula*, sino de todos los hongos comestibles cultivados. Por medio del conocimiento de este parámetro se puede incrementar la productividad de la capacidad instalada ya que la duración de los ciclos de cultivo se reduce al número mínimo de semanas de producción que se requieren para alcanzar la máxima producción de hongos. Así se puede optimizar el uso de las instalaciones y reducir los costos de operación en una planta productora de hongos.

Los resultados de esta etapa del proyecto se reportan en el Anexo 8.4 correspondiente al artículo: Ramírez Carrillo R., H. Leal Lara, 2001-2003. El rendimiento máximo significativo para el análisis estadístico de la producción de *Lentinula edodes* en sustrato comercial de aserrín. *Rev. Mex. Mic.* 17: 7-10.

7.5 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE CONTROL DE COMPATIBILIDAD SEXUAL EN LA PROGENIE DE LOS HÍBRIDOS ÍTER GÉNEROS.

Para evaluar la fertilidad de los híbridos se recolectaron y germinaron las esporas correspondientes a seis híbridos que fueron fructificados en el primer experimento. En la tabla 8 se presentan los resultados de la germinación de esporas de las 6 cepas híbridas de *Lentinula x Pleurotus*. Cabe aclarar que la recolección de esporas se realizó bajo condiciones poco controladas. Es decir no se llevó a cabo en papel filtro previamente esterilizado y el manejo no fue posible realizarlo bajo condiciones controladas de asepsia (dado que esta etapa se realizó durante el período de la huelga en la UNAM). Por ello durante la germinación de las primeras esporadas se observaron muy bajos niveles de viabilidad, a pesar de la alta concentración de esporas en la solución. Como se puede observar en la primera esporada tomada para cada cepa, sólo fue posible recuperar

progenie monocariótica para 2 de las 6 cepas híbridas (L19-1 x P414 y L19-2 x P404). En una segunda esporada (seleccionadas entre las más recientes) ya fue posible recuperar progenie monocariótica para 3 cepas híbridas en la 2 y 3a dilución y para dos cepas sólo a partir de la solución concentrada. Considerando lo anterior y además los tipos de compatibilidad de las cepas híbridas, sólo fueron seleccionadas 3 cepas híbridas para caracterizar el sistema de compatibilidad sexual en su progenie.

Tabla 8: Germinación de esporas de cepas híbridas de *Lentinula x Pleurotus*

Cepas híbridas/ tipo de compatibilidad	Diluciones	Germinación a partir de diferentes esporadas		Cepas seleccionadas
		1	2	
L19-1 x P404 (A ₁ B ₁ x A ₆ B ₆)	10 ⁰	-	+	No
	10 ⁻¹	-	+	
	10 ⁻²	-	+	
	10 ⁻³	-	-	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	
L19-1 x P413 (A ₁ B ₁ x A ₅ B ₅)	10 ⁰	-	-	No
	10 ⁻¹	-	-	
	10 ⁻²	-	-	
	10 ⁻³	-	-	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	
L19-1 x P414 (A ₁ B ₁ x A ₆ B ₆)	10 ⁰	+	+	SI
	10 ⁻¹	+	+	
	10 ⁻²	-	+	
	10 ⁻³	-	-	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	
L19-2 x P404 (A ₂ B ₂ x A ₆ B ₆)	10 ⁰	+	+	SI
	10 ⁻¹	+	+	
	10 ⁻²	+	+	
	10 ⁻³	-	+	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	
L19-2 x P413 (A ₂ B ₂ x A ₅ B ₅)	10 ⁰	-	+	SI
	10 ⁻¹	-	-	
	10 ⁻²	-	-	
	10 ⁻³	-	-	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	
L19-2 x P414 (A ₂ B ₂ x A ₆ B ₆)	10 ⁰	-	+	No
	10 ⁻¹	-	-	
	10 ⁻²	-	-	
	10 ⁻³	-	-	
	10 ⁻⁴	-	-	
	10 ⁻⁵	-	-	

7.5.1 CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-1 x P414.

Para clasificar la progenie, una vez aislados los monocariotes y confirmada la ausencia de fíbulas en cada colonia se procedió en una primera etapa a identificar las colonias con los tipos de compatibilidad de las 2 cepas parentales (L19-1 y P414). En este caso se aislaron 30 monocariotes progenie y se identificaron con números consecutivos del 1 al 30. Todos los monocariotes progenie se aparearon con los dos neohaplontes parentales. Al revisar los apareamientos al microscopio fue posible identificar 3 monocariotes del tipo L19-1 y 6 del tipo P414 (Tabla 9).

Para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante se tomaron los monocariotes E1 y E4 (con probables tipo de compatibilidad III o IV) y se aparearon con los 21 monocariotes que no habían sido clasificadas. En este caso sólo con el monocariote E4 fue posible identificar 7 monocariotes con el tipo III y por lo tanto se suponía que los 14 monocariotes restantes pertenecían al tipo IV (Tabla 10). Para confirmar este resultado en la tercera etapa se tomaron los monocariotes E6 y E7 (previamente clasificados como tipo III) y se aparearon con los 14 monocariotes con probable tipo IV. Como resultado 7 monocariotes dieron una reacción positiva con ambos monocariotes clasificándose así en el tipo IV (Tabla 11). Finalmente los 7 monocariotes sin clasificar se aparearon con los 4 monocariotes representantes de cada tipo de compatibilidad (E33, E3, E4 y E6) De esta forma 4 monocariotes fueron clasificados en el tipo I, y sólo 3 monocariotes permanecieron sin clasificar (Tabla 12).

En la Tabla 13 se presenta la clasificación de la progenie monocariótica del híbrido L19-1 x P414 en los 4 tipos de compatibilidad. También se observa que 10% de la progenie monocariótica no fue posible clasificarla en ninguno de los 4 tipos de compatibilidad.

Tabla 9: Monocariotes progenie que dieron apareamientos positivos con los dos neohaplontes parentales (L19-1 y P414).

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad L19-1			Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad P414		
Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales		Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales	
	L19-1	P414		L19-1	P414
E23	-	+	E 3	+	-
E33	-	+	E 5	+	-
E59	-	+	E12	+	-
Total = 3			E13	+	-
			E20	+	-
			E22	+	-
			Total = 6		

Tabla 10: Identificación de monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (III y IV) por apareamiento con los monocariotes progenie E1 y E4 (seleccionados al azar)

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad III		
Cepas	E1	E4
E 6	-	+
E 7	-	+
E 9	-	+
E10	-	+
E19	-	+
E24	-	+
E53	-	+
Total = 7		

Monocariotes progenie con probable tipo de compatibilidad IV		
Cepas	E1	E4
E 1	-	-
E 2	-	-
E 4	-	-
E 8	-	-
E11	-	-
E14	-	-
E15	-	-
E16	-	-
E17	-	-
E18	-	-
E21	-	-
E37	-	-
E39	-	-
E49	-	-
Total = 14		

Tablas 11: Confirmación de monocariotes con tipo de compatibilidad IV por apareamientos con los monocariotes E6 y E7 (tipo III)

Monocariotes progenie tipo IV		
Cepas	Monocariotes tipo III	
	E6	E7
E 4	+	+
E14	+	+
E15	+	+
E17	+	+
E37	+	+
E39	+	+
E49	+	+
Total = 7		

Monocariotes progenie sin clasificar		
Cepas	Monocariotes tipo III	
	E6	E7
E 1	-	-
E 2	-	-
E 8	-	-
E11	-	-
E16	-	-
E18	-	-
E21	-	-
Total = 7		

Tabla 12 Apareamiento de monocariotes sin clasificar con los 4 monocariotes referenciales en medio agar agua

Monocariotes progenie sin clasificar	Apareamientos con monocariotes referenciales				Tipo de compatibilidad
	I (L19-1) E33	II (P414) E3	III E6	IV E4	
E 1	–	+	–	–	I
E 2	–	+	–	–	I
E 8	–	–	–	–	Sin clasificar
E11	–	+	–	–	I
E16	–	–	–	–	Sin clasificar
E18	–	–	–	–	Sin clasificar
E21	–	+	–	–	I

Tabla 13: Clasificación de la progenie del híbrido L19-1 x P414 en los 4 tipos de compatibilidad

Tipos de compatibilidad				Monocariotes sin clasificar
Parental		Recombinante		
I (L19-1)	II (P414)	III	IV	
E 1	E 3	E 6	E 4	E 8 E16 E18
E 2	E 5	E 7	E14	
E11	E12	E 9	E15	
E21	E13	E10	E17	
E23	E20	E19	E37	
E33	E22	E24	E39	
E59		E53	E49	
7	6	7	7	

7.5.2 CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-2 x P404.

En este caso se aislaron 42 monocariotes progenie y al aparearlos con los dos neohaplontes parentales se obtuvieron 9 monocariotes del tipo L19-2 y 11 del tipo P404 (Tabla 14). En la segunda etapa para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (III y IV) se tomaron los monocariotes E7 y E17 (con probable tipo III o IV) y se aparearon con los 22 monocariotes que no habían sido clasificados. Como se observa en la tabla 15 sólo con el monocariote E17 fue posible identificar 9 monocariotes del tipo III y por lo tanto se suponía que los 13 monocariotes restantes pertenecían al tipo IV. Para confirmar este resultado en la tercera etapa se tomaron los monocariotes E2 y E4 (previamente clasificadas como tipo III) y se aparearon con los 14 monocariotes con probable tipo IV. Como resultado 7 monocariotes dieron reacción positiva con ambos monocariotes clasificándose así en el tipo IV (Tabla 16). Finalmente los 6 monocariotes sin clasificar se aparearon con los 4 monocariotes representantes de cada tipo de compatibilidad (E12, E1, E2 y E17). De esta forma 3 monocariotes fueron clasificados en el tipo III, 1 en el tipo I y sólo 2 monocariotes permanecieron sin clasificar (Tabla 17). En la tabla 18 se presenta la clasificación de la progenie monocariótica del híbrido L19-2 x P404 en los 4 tipos de compatibilidad. También se observa que 5% de la progenie monocariótica no fue posible clasificarla en ninguno de los 4 tipos de compatibilidad.

Tabla 14: Monocariotes progenie que dieron apareamientos positivos con los dos neohaplontes parentales (L19-2 y P404)

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad L19-2		
Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales	
	L19-2	P404
E5	-	+
E9	-	+
E12	-	+
E13	-	+
E29	-	+
E32	-	+
E34	-	+
E36	-	+
E40	-	+
Total = 9		

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad P404		
Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales	
	L19-2	P404
E 1	+	-
E 6	+	-
E 8	+	-
E14	+	-
E16	+	-
E21	+	-
E25	+	-
E26	+	-
E31	+	-
E41	+	-
E42	+	-
Total = 11		

Tabla 15: Identificación de monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (III y IV) por apareamiento con los monocariotes E7 y E17 (seleccionados al azar)

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad III		
Cepas	E7	E17
E 2	-	+
E 4	-	+
E10	-	+
E15	-	+
E18	-	+
E22	-	+
E30	-	+
E35	-	+
E38	-	+
Total = 9		

Monocariotes progenie con probable tipo de compatibilidad IV		
Cepas	E7	E17
E 3	-	-
E 7	-	-
E11	-	-
E17	-	-
E19	-	-
E20	-	-
E23	-	-
E24	-	-
E27	-	-
E28	-	-
E33	-	-
E37	-	-
E39	-	-
Total = 13		

Tabla 16: Confirmación de monocariotes con tipo de compatibilidad IV por apareamiento con los monocariotes E2 y E4 (tipo III)

Monocariotes progenie tipo IV			Monocariotes progenie sin clasificar		
Cepas	Monocariotes tipo III		Cepas	Monocariotes tipo III	
	E2	E4		E2	E4
E3	+	+	E7	-	-
E17	+	+	E11	-	-
E19	+	+	E27	-	-
E20	+	+	E33	-	-
E23	+	+	E37	-	-
E24	+	+	E39	-	-
E28	+	+	Total = 6		
Total = 7					

Tabla 17: Apareamiento de los monocariotes sin clasificar con los 4 monocariotes referenciales en medio agar agua

Monocariotes progenie sin clasificar	Apareamientos con monocariotes referenciales				Tipo de compatibilidad
	I (L19-2) E12	II (P404) E1	III E2	IV E17	
E7	-	-	-	+	III
E11	-	-	-	+	III
E27	-	-	-	-	Sin clasificar
E33	-	-	-	+	III
E37	-	-	-	-	Sin clasificar
E39	-	+	-	-	I

Tabla 18: Clasificación de la progenie del híbrido L19-2 x P404 en los 4 tipos de compatibilidad

Tipos de compatibilidad				Monocariotes progenie sin clasificar	
Parental		Recombinante			
I (L19-2)	II (P404)	III	IV		
E 5	E 1	E 2	E 3	E27 E37	
E 9	E 6	E 4	E17		
E12	E 8	E 7	E19		
E13	E14	E10	E20		
E29	E16	E11	E23		
E32	E21	E15	E24		
E34	E25	E18	E28		
E36	E26	E22			
E39	E31	E30			
E40	E41	E33			
	E42	E35			
		E38			
10	11	12	7		2 (4.8%)

7.5.3 CLASIFICACIÓN DE LA PROGENIE DEL HÍBRIDO L19-2 X P413.

En este caso se aislaron 30 monocariotes progenie y al aparearlos con los dos neohaplontes parentales se obtuvieron 8 monocariotes del tipo L19-2 y 6 del tipo P413 (Tabla 19). En la segunda etapa para identificar los monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (III y IV) se tomaron los monocariotes E2 y E20 (con probable tipo III o IV) y se aparearon con los 16 monocariotes que no habían sido clasificados. Como se observa en la tabla 20 con el monocariote E2 se identificaron 11 monocariotes de tipo III y con el monocariote E20 se identificaron 4 monocariotes de tipo IV. Finalmente el único monocariote sin clasificar se apareó con los 4 monocariotes representantes de cada tipo de compatibilidad (E3, E1, E20 y E2) y al no dar ningún apareamiento positivo, este monocariote permaneció sin clasificar (Tabla 21).

En la tabla 22 se presenta la clasificación de la progenie monocariótica del híbrido L19-2 x P413 en los 4 tipos de compatibilidad. También se observa que 3% de la progenie monocariótica no fue posible clasificarla en ninguno de los 4 tipos de compatibilidad.

Tabla 19: Monocariotes progenie que dieron apareamientos positivos con los dos neohaplontes parentales (L19-2 y P413)

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad L19-2		
Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales	
	L19-2	P413
E3	–	+
E10	–	+
E11	–	+
E18	–	+
E21	–	+
E23	–	+
E24	–	+
E27	–	+
Total = 8		

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad P413		
Cepas	Apareamientos con neohaplontes parentales	
	L19-2	P413
E 1	+	–
E13	+	–
E15	+	–
E19	+	–
E29	+	–
E30	+	–
Total = 6		

Tabla 20: Identificación de monocariotes con tipo de compatibilidad recombinante (III y IV) por apareamiento con los monocariotes E2 y E20 (seleccionados al azar)

Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad III			Monocariotes progenie con tipo de compatibilidad IV		
Cepas	E2	E20	Cepas	E2	E20
E4	+	-	E 2	-	+
E6	+	-	E 7	-	+
E8	+	-	E14	-	+
E9	+	-	E25	-	+
E12	+	-	Total = 4		
E16	+	-			
E17	+	-			
E20	+	-			
E22	+	-			
E26	+	-			
E28	+	-			
Total = 11					

Tabla 21: Apareamiento del monocariote sin clasificar con 4 los monocariotes referenciales en medio agar agua

Monocariotes sin clasificar	Apareamientos con monocariotes referenciales				Tipo de compatibilidad
	I (L19-2) E3	II (P413) E1	III E20	IV E2	
E5	-	-	-	-	Sin clasificar

Tabla 22: Clasificación de la progenie del híbrido L19-2 x P413 en los 4 tipos de compatibilidad

Tipos de compatibilidad				Monocariotes sin clasificar	
Parental		Recombinante			
I (L19-2)	II (P413)	III	IV		
E3	E 1	E4	E 2	E5	
E10	E13	E6	E 7		
E11	E15	E8	E14		
E18	E19	E9	E25		
E21	E29	E12			
E23	E30	E16			
E24		E17			
E27		E20			
		E22			
		E26			
		E28			
8	6	11	4		1 (3.3%)

7.5.4 FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN DE LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD EN LAS PROGENIES DE LOS TRES HÍBRIDOS ÍTER. GÉNEROS.

Una vez clasificada la progenie monocariótica de cada híbrido en los cuatro tipos de compatibilidad se utilizó la prueba de χ^2 para determinar si la distribución en los 4 tipos de compatibilidad fue 1:1:1:1. Los valores de χ^2 obtenidos para la progenie de los 3 híbridos fue menor a 7.81 con lo cual se confirma con una probabilidad del 95% que la distribución en los 4 tipos de compatibilidad fue 1:1:1:1. Estos resultados permitieron comprobar la fertilidad de los híbridos obtenidos y confirma que el sistema de compatibilidad heterotático tetrapolar de las cepas parentales se mantiene y hereda en la progenie de los híbridos (Tabla 23). Este tipo de comportamiento en la progenie de los híbridos era el esperado, ya que se partió de dos organismos de tipo tetrapolar heterotático en donde la segregación de los cuatro tipos de compatibilidad se ha reportado que presenta una distribución 1:1:1:1 (Chiu *et al.*, 1998; Tokimoto *et al.*, 1973).

Con respecto a los monocariotes sin clasificar se observó que éstos estuvieron presentes en las progenies de las tres cepas híbridas analizadas en una proporción del 3 al 10%. Es posible que este tipo de monocariotes siempre se encuentre presente en una cierta proporción en las progenies monocarióticas, sin embargo por la forma en que en este caso se identificaron los monocariotes del tipo IV fue posible detectar su presencia en las tres progenies analizadas. Es decir por lo general los tipos de compatibilidad III y IV se identifican tomando uno de los monocariotes de cualquiera de estos dos grupos y se realizan cruza con todos los monocariotes de estos dos grupos, como resultado se obtiene apareamientos positivos y negativos. Así los monocariotes que dan apareamientos positivos se clasifican en un grupo y el resto en el otro grupo, sin llevar a cabo la confirmación de los monocariotes pertenecientes al IV grupo. Es por ello que en este caso al confirmar el tipo de compatibilidad de los monocariotes de tipo IV, al mismo tiempo nos permitió identificar algunos monocariotes que no presentaron compatibilidad con ninguna de las cepas representantes de cada tipo de compatibilidad. Este tipo de monocariotes posiblemente son el resultado de una alteración durante el proceso de la meiosis (Larraya *et al.*, 1999).

Tabla 23: Distribución de la progenie monocariótica de tres híbridos de *Lentinula x Pleurotus* en los 4 tipos de compatibilidad.

Híbridos parentales	Progenie monocariótica				Valores de χ^2 para distribución 1:1:1:1
	Tipos de compatibilidad				
	I	II	III	IV	
L19-1 x P414	7	6	7	7	0.14
L19-2 x P404	10	11	12	7	1.40
L19-2 x P413	8	6	11	4	3.85

χ^2 de Tablas ($\alpha = 0.05$) = 7.815

χ^2 de Tablas ($\alpha = 0.01$) = 11.345

VIII ANEXOS

8.1 SYMMETRIC RECOVERY OF MONOKARYOTIC COMPONENTS FROM *LENTINULA EDODES* USING DEDIKARYOTIZATION

SYMMETRIC RECOVERY OF MONOKARYOTIC COMPONENTS FROM *LENTINULA EDODES* USING DEDIKARYOTIZATION

R. Ramírez-Carrillo and H. Leal Lara

Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, National University of Mexico (UNAM), Cd. Universitaria, 04510 México D.F. <rebecarc@servidor.unam.mx>

ABSTRACT

The dedikaryotization method proposed for *Pleurotus* spp. and other basidiomycetes by Leal-Lara and Eger-Hummel in 1982 was modified in order to recover the monokaryotic components of seven *Lentinula edodes* strains. By decreasing the time that agar culture were blended, mycelial death was reduced and more neohaplonts were recovered. If agar culture homogenates were plated on malt extract agar, *L. edodes* strains barely survived 30 seconds blending. Agar cultures of *L. edodes* blended for more than 5 seconds did not yield viable mycelium when agar cultures homogenates were inoculated in dedikaryotization liquid media. Optimum blending time of agar cultures was determined for each strain. An attempt was made to recover neohaplont types at different stages of the dedikaryotization procedure either directly from agar culture homogenates or from dedikaryotization media inoculated with such homogenates and incubated for 14 days at 24°C or from homogenates incubated for fourteen days in dedikaryotization media. All seven *L. edodes* strains were successfully dedikaryotized. In all cases, both monokaryotic components were recovered and in six cases, they were isolated in a 1:1 ratio.

INTRODUCTION

Lentinula edodes is an edible fungus which is not easy to cultivate, because it is grown in substrates difficult to degrade and long incubation periods are required. Therefore, selection of *L. edodes* strains able to grow rapidly on a wide range of substrates and produce high yields is of utmost importance. However, breeding of improved strains by conventional methods is a labor intensive and time consuming procedure (Eichlerová and Homolka 1999). Dedikaryotization represents an interesting alternative, since it allows recovery of the two monokaryotic components (also known as neohaplonts) of selected dikaryotic strains. By pairing neohaplonts from selected stocks, new strains can be easily produced, in which the desired characteristics of the original stocks are combined. The deleterious side effects which are frequently produced by mutation are thus avoided. This straight-forward method shows potential for producing commercial strains with defined characteristics, and may be superior to the conventional breeding method, which randomly pairs monokaryons from meiotic offsprings.

Dedikaryotization was initially attempted with *Schizophyllum commune* (Harder 1927) using a micro-surgery approach for a mechanical separation of the two nuclei of a terminal cell. Two cells, each one containing one nucleus, were recovered by cutting the clamp cell from the terminal cell, at the moment when one nucleus has migrated into the clamp connection. However, environmental factors, such as temperature, humidity and type of nutrients, favored a low recovery of neohaplonts (20%). Fries and Aschan (1952) confirmed that *Pholiota mutabilis*, *S. commune*, *Polyporus abietinus* and *Collybia velutipes* neohaplonts were difficult to recover by this procedure. Ginterová (1973) suggested a second approach for mechanical dedikaryotization the application of shearing forces during homogenization at high speed. However, dedikaryotization was again unsymmetrical, since the most sensitive nucleus was selectively eliminated and only one nucleus was recovered.

Milles and Raper (1956) introduced chemical dedikaryotization with toxic substances producing selective inactivation of one nuclear type, and causing asymmetrical splitting of the dikaryon. Using sodium taurocholate (0.15%) or colic acid (0.12%) success was attained with stocks which produced monokaryotic oidia or with strains of *Favolus alveolaris*, *Pleurotus ostreatus*, *P. betulinus* and *P. versicolor*. However, these already showed a high level of natural dedikaryotization (60%). Other derivatives of cholic acid, such as sodium cholate or ox-gall produced dedikaryotization of *C. velutipes*, *Coprinus macrorhizus*, *L. edodes* and *Pholiota nameko* (Takemaru 1964). However, each species required a specific concentration for its dedikaryotization and only one nuclear type was recovered in all cases. Additionally, morphological mutants were frequently observed and the serious inhibition of mycelium growth produced by toxicants, resulted in long incubation periods to achieve dedikaryotization (6 to 16 weeks). In large trails with stocks of 24 species of wood pathogenic basidiomycetes (Kerruish and DaCosta 1963), toxic chemicals like sodium arsenate, copper sulphate, sodium dichromate, sodium pentachlorophenate, zinc sulphate and boric acid were not able to dedikaryotize any strain. Sodium taurocholate did not prove to be an effective dedikaryotizing agent. It split only one stock of *Coriolus sanguineus* and only one nuclear type was recovered. Similarly, Nishibori and Kinugawa (1978) were able to recover only one nuclear type of various strains of *L. edodes* by using sodium taurocholate. A method for symmetrical dedikaryotization was reported by Leal-Lara and Eger-Hummel (1982) to be effective with *Kuehneromyces mutabilis*, *Flammulina velutipes* and strains of various *Pleurotus* species (*P. ostreatus*, *P. cornucopiae* and *P. eryngii*). Dedikaryotization occurred in a medium made of glucose and peptone. Mycelium growth was promoted and dedikaryotization inhibited if the medium was filter sterilized instead of autoclaving and when mineral salts or organic nutrients were added. However, when Arteaga et al. (1996) used this technique for dedikaryotization of *Lentinus* spp. strains, only one neohaplont type was recovered.

Production of protoplasts have been used recently for dedikaryotization of the edible fungus. Fukumasa *et al.* (1994) used it for dedikaryotization of *L. edodes*. After just seven days incubation, both nuclear types were recovered from 75% of all tested strains. Though neohaplonts showed normal compatibility reactions, considerable variations in other biological characteristics were observed. These variations were attributed to mutation, since similar variations were found among protoclones derived from the parental monokaryotic strains. In later studies, however, the two monokaryotic components were recovered only in certain cases and the proportion of each monokaryotic component among neohaplonts was not always reported. In a study carried out with *L. lepideus*, various factors affecting regeneration and isolation of protoplasts were reported: culture media, lytic enzymes, osmotic regulators for production and regeneration of protoplasts, and optimal pH and incubation time to obtain protoplasts (Kim *et al.* 2000).

Dedikaryotization of commercial strains of *L. edodes* is of great importance and a dedikaryotization method for symmetric recovery of neohaplonts is urgently required. However, most existing methods for dedikaryotization present serious drawbacks. They are time consuming, produce in most cases an unsymmetrical splitting of the dikaryon and they yield neohaplonts showing considerable deviations from the parental types. In spite of the failure reported for dedikaryotization of *L. edodes* in peptone-glucose solutions, this is a very promising alternative since it avoids the previously-mentioned drawbacks. With *L. edodes* strains of different origins, the effect of modifications in the various stages of the procedure have yet to be tested.

MATERIALS Y METHODS

Biological material.

Seven strains of *L. edodes* were used: strain L5 from Dr. Ian Reid (National Research Council of Canada), strains L9 and L15 from Dr. Tai-Soo Lee (Forest Research Institute of Korea), strains L18, L19 and L20 from Dr. Rosa L. Andrade (Instituto Tecnológico Querétaro, México) and strain L21 from Amycel (strain 4005). All strains were stored in the culture collection of the Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, UNAM.

Culture Media

Malt extract agar (MEA) was prepared dissolving malt extract (15%) and agar (2%) in distilled water. It was sterilized in autoclave at 121°C for 30 minutes, and 10 ml sterile medium were poured into sterile Petri dishes. Plates with solidified medium were wrapped in plastic bags and incubated at 24°C for 2 days to check sterility and then used for storage of strains and propagation of mycelium. Liquid malt extract medium (ME) was prepared dissolving 1.5% malt extract in distilled water, fifty ml ME was poured in 125 ml Erlenmeyer flasks, which were sterilized in an autoclave at 121°C for 30 minutes.

Dedikaryotization solution

Using the dedikaryotization method recommended for *Pleurotus* spp. & *Coprinus* spp., a basic dedikaryotization solution was prepared in distilled water with 2% glucose and 2% peptone P (Oxoid) (Leal-Lara and Eger-Hummel 1982). Fifty ml of this solution were poured into 125 ml Erlenmeyer flasks and sterilized at 121°C for 30 minutes.

Blending of mycelial cultures

Four agar cubes (ca. 0.5 cm) were cut from the edge of a growing colony and distributed on each MEA plate to produce mycelial cultures. After four days incubation at 24°C, colonies reached ca. 4 cm diameter. Fifty ml sterile cold water was poured into a sterile jar of a laboratory blender, and the four colonies were cut and added into the jar. Agar cultures and water were blended at high speed for 5 to 150 seconds. Neohaplonts were recovered from MEA plates and from dedikaryotization solutions inoculated with suspensions of blended agar cultures.

Recovery of neohaplonts from dedikaryotization solution

Flasks with dedikaryotization solution were inoculated with 20 or 50 µl suspension of blended agar cultures and incubated at 24°C. When mycelium growth was visible, 100 or 200 µl solution were taken to inoculate MEA plates. The solution in the flask was poured into the sterile jar of the blender and then homogenized for five seconds at high speed. MEA plates were inoculated with 20 or 50 µl homogenate and then incubated at 24°C until mycelium growth was noticeable. Mycelium without clamp connections, (monokaryotic type), was identified under the microscope (160x). Each colony was repeatedly cultivated in MEA to verify the absence of clamp connections.

Identification of the two types of neohaplonts

To identify the two component monokaryotic types of a dedikaryotized strain, two neohaplonts were randomly selected and paired in MEA plates with all recovered neohaplonts from this strain. Plates were incubated at 24°C. After 72 hours, plates were regularly inspected under the microscope

to identify dikaryotic mycelium. To confirm a correct identification of all neohaplonts, two new neohaplonts were selected and paired again with all available neohaplonts.

RESULTS

In previous work in our laboratory, the dedikaryotization method proposed by Leal-Lara and Eger-Hummel (1982) could not be successfully applied to *L. edodes* strains. Only three of nine strains were dedikaryotized and in all cases only one monokaryotic component was recovered (Arteaga *et al.* 1996).

Seven new *L. edodes* strains were processed according to the same method and inoculated in dedikaryotization solutions and MEA plates. After 30 days of incubation, growth was absent in all flasks with dedikaryotization solution and, surprisingly, in all MEA plates as well. This indicated that mycelia of the *L. edodes* strains tested did not survived the first stage of the dedikaryotization method when agar cultures were blended for 150 seconds. Such extreme sensitivity to mechanical damage was confirmed when strain L19 was blended for 120, 90, 60 and 30 seconds, since mycelium growth was again absent in all dedikaryotization solutions. However, in spite of the lack of colonies on MEA plates inoculated with homogenates blended for 120 and 90 seconds, an increased number of colonies were produced on plates from the 60- and 30- seconds homogenates (Table 1). This sensitivity to blending was confirmed with strains L18 and L19, which showed a considerable increase in mycelial survival upon further reduction of blending time, i.e. 25, 20, 15, 10 and 5 seconds. However, mycelium growth in dedikaryotization solutions was insignificant, even when flasks were inoculated with 5-second homogenates.

Table 1. Effect of blending time of two agar cultures on mycelial development of *Lentinula edodes* strains.

Strain	Blending of agar cultures (s)	Mycelium development Dedikaryotization solution*	MEA (CFU)
Incubation time = 30 days			
	120	N	1
	90	N	1
	60	N	18
	30	N	36
L19	Incubation time = 10 days		
	25	N	66
	20	N	55
	15	S	47
	10	S	50
	5	S	43
	25	N	59
	20	N	18
L18	15	S	53
	10	S	34
	5	S	52

* Mycelium development: N = None, S = Scarce

Inoculum volume 20 µl.

The effect of blending time on mycelium survival was evaluated with four additional *L. edodes* strains (Table 2). Strains L5, L9 and L15 proved to be more resistant to blending. However, strains L20 and L21 were able to survive only after short blending times of 5 to 25 seconds. For dedikaryotization of very sensitive strains like L21, a larger inoculation volume, e.g. 50 µl, should be used to increase the number of viable mycelia. However, the number of colonies obtained with the two inoculation volumes are not proportional. Probably, it is not possible to obtain particles of similar size with such blending times and reproducibility is limited by the rather small inoculation volumes.

Table 2. Effect of blending time of agar cultures on viability of *Lentinula edodes* strains in MEA inoculated with 20 and 50 μ l

Blending of agar cultures (seconds)	CFU in MEA (14 days incubation)									
	Inoculation volume (μ l)									
	20					50				
	Strains									
	L5	L9	L15	L20	L21	L5	L9	L15	L20	L21
5	30	10	14	17	1	39	46	62	58	5
10	34	10	31	39	3	20	12	39	67	5
15	8	6	18	3	1	43	8	22	18	7
20	13	0	11	0	0	19	0	26	1	2
25	3	5	8	0	1	18	11	29	2	3
30	14	1	7	0	0	13	3	19	0	2
60	3	1	2	0	0	5	0	7	3	0
90	0	0	2	0	0	1	2	5	2	0
120	0	1	3	0	0	0	0	3	0	1
150	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Lentinula edodes strains (L5, L9, L15, L20 y L21) were blended 5, 30, 90 y 150 seconds and inoculated either in dedikaryotization solution or in liquid malt extract medium to evaluate whether the composition or type of media, or even mechanical damage affected the ability of *L. edodes* strains to grow. Mycelial death due to mechanical damage by blending was again observed. After 90 seconds blending no growth was found on either liquid media. *L. edodes* mycelium was not able to grow in the rather poor dedikaryotization solution (Table 3). With short blending times, most strains showed a poor mycelium development in dedikaryotization solutions while abundant growth was encountered in ME solutions.

Recovery of neohaplonts had to be attempted by alternative methods, since mycelium growth of *L. edodes* strains in dedikaryotization solutions was hindered by the mortality rate produced when agar cultures were blended. MEA plates were directly inoculated with agar cultures homogenates from various blending times (5 to 150 seconds). Dedikaryotization solutions were also inoculated with five-second homogenates. Once mycelium growth became evident, it was used to inoculate MEA plates. Thereafter, the remaining solution was homogenized for five seconds, and then used to inoculate MEA plates.

From all strains, neohaplonts were recovered after each stage (blending, dedikaryotization solution before and after homogenization). They were classified according to the two monokaryotic components (Type I and II), a third group of a non-compatible type (Table 4). Blending time proved to be crucial for recovery of neohaplonts. Recovery was favored when agar cultures were blended for more than twenty seconds, since dicaryotic mycelium predominated with shorter times (data not shown). Neohaplonts were recovered from blended agar cultures in four of five strains tested. Furthermore, dedikaryotization of strain L20 was achieved only by this method, since it always produced dicaryotic mycelium when inoculated in dedikaryotization solution. For certain strains, recovery of neohaplonts in non-homogenized dedikaryotization solutions was slightly better, and for strain L19, it was the only condition required for recovery of both monokaryotic components. With four strains, a meager recovery of neohaplonts was attained from homogenized dedikaryotization solutions, and no neohaplonts at all were recovered from the remaining three strains.

Table 3. Effect of blending time of agar cultures on mycelium development of five strains of *Lentinula edodes* in liquid media.

Strains	Blending times-seconds	Mycelium development in liquid media	
		ME	Dedikaryotization solution
L5	5	A	S
	30	-	N
	90	S	N
	150	-	N
L9	5	A	S
	30	-	S
	90	N	N
	150	-	N
L15	5	A	S
	30	-	N
	90	S	N
	150	-	N
L20	5	S	S
	30	-	N
	90	N	N
	150	-	N
L21	5	S	S
	30	-	S
	90	N	N
	150	-	N

* Mycelium development: N = None, S = Scarce A = Abundant

Media were inoculated with 50 µl agar culture homogenates and incubated 14 days

In order to evaluate if the various strains were symmetrically dedicaryotized, χ^2 values were calculated for the proportion of the two neohaplont types recovered for each strain at the three stages in the dedicaryotization method (Table 5). By comparison to the reference value, symmetric recovery of both neohaplont types was achieved in all cases with exception of strain L19. Neohaplonts from strain L19 were recovered only from non-homogenized dedicaryotization solution; Type I neohaplonts predominated over those of Type II.

Table 4: Recovery of both neohaplont types at each stage of the dedikaryotization process.

Strains	Stages in the dedikaryotization process						Recovered neohaplonts			
	Blending of agar cultures		Dedikaryotization solution				Total	Non compatible	Types	
			Without homogenization		With homogenization				I	II
	I	II	I	II	I	II				
L5	4	2	7	4	5	4	27	1	16	10
L9	2	6	1	7	0	0	17	1	3	13
L15	0	0	8	8	1	1	21	3	9	9
L18	NT	NT	1	1	0	1	3	0	1	2
L19	NT	NT	15	3	0	0	18	0	15	3
L20	7	15	0	0	0	0	24	2	7	15
L21	4	2	11	6	9	2	34	0	24	10
Total	42		72		23		144	7	75	62

NT: Not tested

Table 5: Evaluation of symmetric recovery (1:1) of neohaplonts at each stage of the dedikaryotization process.

Strains	χ^2 values for symmetric recovery (1:1)*				All recovered neohaplonts
	Stages of the dedikaryotization process			Blending of agar cultures	
	Dedikaryotization solution		Homogenization		
Without homogenization		Homogenization			
L5	0.66	0.83	0.20	1.38	
L9	2.00	4.50	*	6.25	
L15	*	0.00	0.00	0.00	
L18	NT	0.00	*	0.50	
L19	NT	8.00	*	8.00	
L20	2.90	*	*	2.90	
L21	0.66	1.44	4.16	5.76	

χ^2 values less than 6.63 ($\alpha=0.01$) indicate a 1:1 ratio for 2 neohaplont types

NT: Not tested

* No recovered neohaplonts

DISCUSSION

This study confirmed the great sensitivity to mechanical damage of *L. edodes* mycelium previously reported by Kawasumi *et al.* (1987). He could not prepare inoculant mycelia of *L. edodes* for protoplast production by fragmentation with a blender, homogenizer or glass beads. It was necessary to cut mycelial cultures into very minute fragments with a thin razor. A combination of

fragmentation by razor cutting followed by filtration with a nylon mesh was recommended not only for *L. edodes* but also for other basidiomycetes comparatively difficult to grow in liquid medium. Table 1 shows that homogenization times usually employed for blending of *Pleurotus* spp. mycelium (more than 150 seconds) resulted in an extensive death of *L. edodes* mycelium. However, sensitivity to mechanical forces is not similar for all strains (Table 2). Some were extremely sensitive, like strain L21 which barely survived five seconds blending. No strains of *L. edodes* tested in this study, were able to survive blending for more than 30 seconds.

After blending of agar cultures, mycelium damage was so extensive that growth in the peptone-glucose dikaryotization solution was dramatically diminished (Table 3). The very short times used in this study for blending and homogenization of agar and liquid cultures reduced mycelial damage. Therefore, monokaryotic mycelium of both nuclear types had more chances for survival. This is particularly important when dealing with slow growing or sensitive monokaryons and probably favors recovery of both nuclear types in equal proportions (1:1).

Any of the factors previously mentioned could explain the failure of previous attempts to dikaryotize *L. edodes* strains with this method (Arteaga *et al.* 1996). It was also impossible to recover nuclear types by dikaryotization using toxic chemicals either with *L. edodes* (Takemaru 1964, Nishibori and Kinugawa 1978) or with the other tested species of basidiomycetes. Before this study, successful dikaryotization of *L. edodes* had been achieved only by Fukumasa *et al.* (1994) with the aid of protoplast production. Both nuclear types were recovered in twelve of the sixteen tested strains; however, they were present in equal proportions in only six of these strains. Such low efficiency (i.e. 37% of all strains) may be the result of the production and regeneration of protoplasts, steps representing stressing situations that affect the component nuclei of the dikaryon to a different extent. Both nuclear types were recovered from all tested strains but symmetrical recovery (1:1) was achieved in only 85% of the cases. Nevertheless, it should be noted that considerable variations in different biological characteristics were observed among the recovered neohaplonts. A third group of non-compatible neohaplonts was present in four of the seven *L. edodes* strains dikaryotized in this study. Nevertheless, such non-compatible monokaryotic strains have also been recovered in our laboratory from meiotic progenies of various species with tetrapolar incompatibility systems (unpublished data). However, non-compatible neohaplonts were present with a low frequency varying according to the strains. Recovery of monokaryotic strains unable to mate probably resulted from unknown factors already present in the parental dikaryons and were not necessarily induced by the dikaryotization method.

The dikaryotization procedure utilized in this study is therefore suitable for obtaining the component monokaryons from highly producing *L. edodes* strains. This approach is of great relevance in view of the large variability in the characteristics found among protoplasts populations as well as in basidiospore derived monokaryons (Eichlerová and Homolka 1999, Eichlerová *et al.*, 2000).

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Arteaga-Santillan E.S., K. De Lachica-Giles, R. Ramírez-Carrillo and H. Leal-Lara. 1996. Desdicariorización excéntrica de *Lentinus* spp. *Rev. Mex. Mic.* 12: 15-21.
- Eichlerová I., K. Ruel, L. Homolka, J.P. Joseleau and F. Nerud. 2000. Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokaryotic protoplast derivative P19. *Can. J. Microbiol.* 46: 1153-1158.
- Eichlerová I. and L. Homolka. 1999. Preparation and crossing of basidiospore-derived monokaryons a useful tool for obtaining laccase and other ligninolytic enzyme higher-producing dikaryotic strains of *Pleurotus ostreatus*. *Antonie Leeuwenhoek* 75: 321-327.
- Fries N. and K. Aschan. 1952. The physiological heterogeneity of the dicaryotic mycelium of *Polyporus abietinus* investigated with the aid of micrurgical technique. *Svensk Bot. Tidskr.* 45: 429-445.
- Fukumasa-Nakai Y., T. Matsumoto and M. Komatsu. 1994. Dedikaryotization of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 551-562.
- Ginterová A. 1973. Dedikaryotization of higher fungi in submerged culture. *Folia microbiol.* 18: 277-280.
- Harder R. 1927. Über mikrochirurgische Operationen an Hymenomyzeten Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Tech 44: 173-192.
- Homolka L., L. Volaková and F. Nerud. 1995. Variability of enzymatic activities in lignolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus tigrinus* after protoplasting and UV-mutagenization. *Biotechnol. Techniques* 9: 157-162.
- Kawasumi T., N. Kiuchi, Y. Futatsugi, K. Ohba and S.O. Yanagi. 1987. High yield preparation of *Lentinus edodes* ("Shiitake") protoplasts with regeneration capacity and mating type stability. *Agric. Biol. Chem.* 51 (6): 1649-1656.
- Kerruish R.M. and E.W. DaCosta. 1963. Monokaryotization of cultures of *Lenzites trabea* (Pers.)Fr. and other wood destroying Basidiomycetes by chemical agents. *Ann. Bot.* 27: 653-669.
- Kim B.K., J.H. Kang, M. Jin, H.W. Kim, M.J. Shim and E.C. Choi. 2000. Mycelial Protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. *Life Sciences* 66 (14): 1359-1367.
- Leal-Lara H. and G. Eger-Hummel. 1982. A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rotting Basidiomycetes. *Theor. and Appl. Genetics* 61: 65-68.
- Miles P.G. and J.R. Raper. 1956. Recovery of the component strains from dicaryotic mycelia. *Micologia* 48: 484-494.
- Nishibori K. and K. Kinugawa. 1978. Eccentric recovery of parental monokaryons in the chemical dedikaryotization of *Lentinus edodes*. *Mushroom. Science* 10 (1): 201-210.
- Takemaru T. 1964. Monokaryotization studies in the Basidiomycetes I. Chemical induction. Rep. Tottori Myc. Inst. (Japan) 4: 35-38.

8.2 PRODUCTIVIDAD DE CEPAS HÍBRIDAS DE *PLEUROTUS* X *LENTINULA*

El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México

Contenido

	Pag
I Introducción	
1.1 Investigación básica, aplicada y socioeconómica sobre el cultivo de setas <i>Pleurotus</i> spp en México. Víctor M. Mora y Daniel Martínez-Carrera	7
II Recursos genéticos y producción de semilla	
2.1 El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Mercedes Sobal, Porfirio Morales, M. Bonilla, Graciela Huerta y Daniel Martínez-Carrera	27
2.2 Aportaciones del sector académico en la producción de inóculo de <i>Pleurotus</i> spp. Dulce Salmones, Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán-Hernández	41
2.3 Productividad de cepas híbridas coloridas del género <i>Pleurotus</i> . Gustavo Valencia del Toro, Miguel A. Tepechco, Rebeca Ramírez y Hermilo Leal	45
2.4 Productividad de cepas híbridas de <i>Pleurotus</i> x <i>Lentinula</i> . Rebeca Ramírez Carrillo, Olivia Hernández Vargas, Fernando Galván Pallach y Hermilo Leal Lara	55
2.5 Comparación de dos inóculos comerciales de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el estado de México. Oralia Jacinto Esteban y Cristina Burrola Aguilar	65
2.6 Cómo llegar a la certificación de la calidad del inóculo para la producción de <i>Pleurotus</i> spp. Rigoberto Gaitán Hernández, Gerardo Mata y Dulce salmones	73
III Experiencias locales	
3.1 Factores que influyen en la producción de sustratos selectivos para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Vladimir Teodoro Castañeda-de León y Hermilo Leal-Lara.	81
3.2 El desarrollo del cultivo de setas en Jalisco. Conrado Soto Velazco	91
3.3 Transferencia de tecnología del cultivo de <i>Pleurotus</i> spp como alternativa de beneficio social y económico en el Estado de Veracruz. Rigoberto Gaitán-Hernández	101
3.4 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>P. djamor</i> sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero. Maricela Cayetano Catarino, Gerardo Mata, Teodoro Bernabé-González	113
3.5 Producción rústica de <i>Pleurotus ostreatus</i> en una comunidad indígena de Morelos. Daniel Portugal Portugal, Luis López Eustaquio, Víctor M. Mora Pérez y Elizur Montiel Arcos	123
3.6 Cultivo de <i>Pleurotus djamor</i> y <i>P. ostreatus</i> en Yucatán. Ligia Ancona Méndez , Gloria Cetz Zapata, Roberto Belmar Casso, Carlos Sandoval Castro	131
3.7 El cultivo rústico de <i>Pleurotus ostreatus</i> en Chiapas, México. José A. Sántiz de la Cruz	143
3.8 El Centro de Vinculación con el Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles (CVINHCO) del Colegio de Postgraduados Porfirio Morales, Mercedes Sobal, Myrna Bonilla, Wilfredo Martínez y Daniel Martínez Carrera.	149
IV Comercialización, rentabilidad y calidad	
4.1 Rentabilidad en la producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> en un módulo rústico. Francisco A Medrano-Vega, Ma. de Lourdes Acosta-Urdapilleta, Nestor I. Bautista García y Noé Bautista Ramos	161
4.2 Experiencias en la comercialización de setas. Javier Múgica Amaya y Gabriela Sánchez de la Rosa	173
4.3 Cultivo de <i>Pleurotus</i> spp y las buenas prácticas de manejo para la producción de cuerpos fructíferos inocuos. Ruth De León	177
	50

V	Potencial de las especies de <i>Pleurotus</i> en procesos de bioremediación	185
5.1	El género <i>Pleurotus</i> y su capacidad para crecer en medios de cultivo y suelo con diferentes concentraciones de petróleo. Ronald Ferrera-Cerrato, María Encarnación Lara Hernández y José E. Sánchez Vázquez	191
5.2	Evaluación de la actividades enzimáticas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia de bifenilos policlorados. Martha Gayosso Canales, Fernando Esparza García, Elvira Ríos Leal y Refugio Rodríguez Vázquez	199
5.3	<i>Pleurotus</i> spp para la degradación del insecticida endosulfán. José E. Sánchez Vázquez, Gabriela M. Orozco, Daniel Hernández Rodríguez, María G. Nieto López y Facundo J. Márquez Rocha	209
VI	Perspectivas	
6.1	México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. Daniel Martínez Carrera, Porfirio Morales, Mercedes Sobal, M. Bonilla y W. Martínez	225
VII	Consideraciones finales	235
	Índice temático	

2.4 PRODUCTIVIDAD DE CEPAS HÍBRIDAS DE *PLEUROTUS* X *LENTINULA*

Rebeca Ramírez Carrillo, Olivia Hernández Vargas, Fernando Galván Pallach y Hermilo Leal Lara
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
Tel: 56225314, Fax: 56225309, <rebecarc@servidor.unam.mx>

RESUMEN

El cultivo de setas en México se ha incrementado en los últimos años, especialmente por pequeños productores con cepas extranjeras o silvestres. Dado que la producción y la comercialización de este hongo en el país puede alentarse seleccionando cepas precoces y vigorosas, se evaluó la eficiencia biológica de 34 cepas híbridas de los géneros *Pleurotus* x *Lentinula* que previamente habíamos desarrollado en nuestro laboratorio. Se utilizaron cuatro cepas de *P. ostreatus* como control.

La fructificación se realizó en dos experimentos, registrando el peso fresco de los hongos producidos en seis réplicas durante ocho semanas de corte. Posteriormente se calculó la producción semanal acumulada y la eficiencia biológica (EB = g de hongo fresco/100 g de sustrato seco). Con la EB acumulada se realizó un análisis estadístico para identificar la semana donde cada cepa alcanzó su máximo rendimiento significativo (MRS). De los híbridos evaluados, solo dos no fructificaron y los restantes once produjeron valores de EB mayores a 100% (103 a 161%). Las cepas más productivas presentaron morfologías adecuadas para la producción comercial (tamaño, forma del estípite y píleo). Solo una cepa presentó estípites largos y píleo en forma de trompeta. Con el valor del MRS fue posible identificar cepas precoces, las cuales representan material importante para estudios de mejoramiento genético.

Palabras clave: híbridos ínter especie, hongos comestibles, neohaplontes, mejoramiento genético, eficiencia biológica.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país los únicos géneros de hongos comestibles que se cultivan a escala comercial son: *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula*. El champiñón *Agaricus bisporus* es la especie más cultivada; no obstante, las especies de *Pleurotus* y de *Lentinula* contribuyen en forma significativa a la producción mundial y representan también un interés en el país (Chang 1996, Royse 1997, Martínez Carrera 2000). El cultivo de setas (*Pleurotus* spp) en México se ha incrementado en los últimos años por pequeños productores con cepas silvestres o extranjeras. Una alternativa para incrementar la rentabilidad del proceso es utilizar cepas mejoradas genéticamente, las cuales puedan satisfacer tanto necesidades del productor como del consumidor. Para la producción de esporóforos en el cultivo comercial de setas se emplean cepas dicarióticas, producto de la hibridación de dos cepas monocarióticas compatibles. La fructificación es la culminación del ciclo reproductivo de estos organismos, en el cual los dos núcleos haploides presentes en el dicarionte se reproducen por meiosis en el basidio para dar origen a cuatro núcleos haploides, que serán repartidos en cuatro esporas sexuales. Los métodos tradicionales de mejoramiento genético parten de este material uninucleado y por medio de entrecruzamientos entre cepas compatibles se obtienen nuevos híbridos; según el Diccionario de botánica (Font Quer 1977) un híbrido implica la unión sexual de individuos que presentan en su genotipo uno o varios pares de diferencias genéticas. Sin embargo, bajo estas condiciones no es posible fusionar cepas de diferentes especies y mucho menos de diferentes géneros.

En 1980 Peberdy desarrolló una metodología para obtener protoplastos a través de la cual fue posible fusionar cepas que por medio de las técnicas tradicionales no podían fusionarse. Sin embargo, al utilizar dicha metodología para la obtención de híbridos de hongos comestibles, por lo general resultaban

híbridos estériles o con una gran inestabilidad. Este hecho ha limitado hasta ahora su utilización como material inicial para un programa de mejoramiento genético (Toyomasu et al. 1986, Young Bok et al. 1986 y 1989, Kawasumi *et al.* 1987, Ohmasa *et al.* 1987).

La descariotización es un método alternativo que permite obtener los dos componentes monocarióticos de una cepa sin que hayan pasado por el proceso de meiosis. De esta manera se evita la diversidad genética de las progenies meióticas. Esta situación ha permitido realizar programas de mejoramiento genético con cepas de una misma especie, y resultaba interesante evaluarlo para la producción de híbridos fértiles de especies distintas (Leal Lara y Eger 1982, Arteaga Santillán *et al.* 1996). Por ello, en una primera etapa siete cepas de *Lentinula edodes* fueron descariotizadas, recuperando para todas las cepas los dos tipos de compatibilidad (Ramírez Carrillo y Leal Lara 2002a). Una vez descariotizadas las cepas de *L. edodes* se clasificaron en grupos de acuerdo con su tipo de compatibilidad. Los catorce neohaplontes de *L. edodes* se ubicaron en cuatro diferentes grupos de compatibilidad (A1B1, A2B2, A3B3 y A4B4). Por otro lado, seis cepas monocarióticas de *P. ostreatus* (cuatro neohaplontes y dos monocariontes progenie) se clasificaron de igual manera en cuatro grupos de compatibilidad (A5B5, A6B6, A7B7 y A1B1). Al realizar los apareamientos entre los neohaplontes de *L. edodes* y las cepas monocarióticas de *P. ostreatus* y observar a través de revisiones microscópicas la formación de fibulas, indicativas del apareamiento exitoso, y la formación de dicariontes, se obtuvo un total de 137 híbridos; lo cual indicó una gran compatibilidad entre las dos especies. Resultaba entonces de sumo interés observar las características morfológicas de las cepas híbridas, por lo que se seleccionaron algunas de ellas para evaluar sus características de fructificación y eficiencia biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para este trabajo se utilizaron 34 cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*, obtenidas por apareamiento de progenie monocariótica o neohaplontes de *Pleurotus ostreatus* con neohaplontes de *Lentinula edodes*. Como control se utilizaron cuatro cepas de *P. ostreatus* (tres procedentes de Alemania y una mexicana) y siete cepas de *L. edodes* (de Canadá, Corea y Estados Unidos), las cuales fueron previamente descariotizadas (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas control de *P. ostreatus* y *L. edodes*

Cepas de <i>P. ostreatus</i> (donadas por G. Eger, Alemania)			Cepas dicarióticas de <i>L. edodes</i>		
Clave	Tipo de cepa	Clave del dicarionte	Clave	Donador	País
P403	Neohaplontes	8x3	L5	Reid	Canadá
P404			L9	Lee	Corea
P413		P413 x P414	L15		
P414			L18		
P407	Monocariontes progenie	P407 x P408	L19	Andrade (ITEM Querétaro)	EU, Virginia
P408			L20		
IAP	Dicarionte (México)		L21	Amycel	EU, California

Medio de cultivo

Se disolvió extracto de malta (1.5%) y agar (2%) en agua destilada y una vez hidratado el agar se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.05 kg/cm² por 30 minutos, luego se vertieron 10 ml del medio estéril en cajas Petri desechables estériles. Las cajas Petri con el medio sólido se guardaron en bolsas de plástico

y se incubaron a 24°C por 2 días para verificar la esterilidad del medio. El medio estéril se utilizó tanto para la resiembra de las cepas como para su propagación.

Producción del inóculo de grano

Se le conoce como semilla al grano portador de micelio, el cual puede ser trigo, mijo, centeno, etc., y se utiliza para propagar la cepa deseada en el sustrato. En este caso para preparar la semilla de grano se utilizó trigo, al cual se le dio una cocción en agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavó con agua corriente para enfriarlo y eliminar los residuos de almidón. Se drenó el exceso de agua y a continuación se adicionó, en base húmeda, 1.3% CaSO₄ y 0.3% CaCO₃. De la mezcla anterior se colocaron 0.5 kg en bolsas de polipapel. Posteriormente se esterilizó a 121°C y 1.05 kg/cm² de presión durante 2 horas, una vez frío el grano se inoculó cada bolsa con el micelio desarrollado en las cajas resembradas una semana antes. Las cajas con crecimiento de micelio se cuadrícularon cortando cuadros de aproximadamente 1 cm² y se inocularon en bolsas de semilla de grano de trigo preparado con anterioridad. Las bolsas ya inoculadas se incubaron a 24°C hasta la invasión total del grano con el micelio (dos semanas) en condiciones de oscuridad.

Fructificación de las cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula* y cepas control de *P. ostreatus*

La paja de trigo pasteurizada fue donada por la empresa Hongos de México. El contenido de humedad del sustrato fue 80%, para cada cepa se inocularon a 5% 6 bolsas con 2 kg de sustrato. El sustrato inoculado fue incubado a 24°C por un período de 16 a 25 días (hasta total invasión). Una vez invadido el sustrato con el micelio proveniente de cada cepa, las bolsas fueron transferidas a un cuarto a 18-20°C, donde se indujo la fructificación con la ayuda de riegos regulares (3-5 veces al día por 5 minutos y 1 vez en la noche por 20 minutos), 2 h de ventilación con aire húmedo después de cada riego y un período de 12 h de iluminación al día.

Fructificación de las cepas control de *L. edodes*

El sustrato, proporcionado por la empresa Hongos Leben y con un contenido de humedad de 54%, fue empacado en bolsas de polietileno de 32 cm x 49 cm con un filtro microporo de 4 x 4 cm. Para cada cepa se inocularon 3 bolsas con 2 kg de cada sustrato previamente esterilizado por 2 h a 121°C y 1.05 kg/cm². Cada bolsa fue inoculada a 5% con semilla de trigo ya invadida y fue incubada en oscuridad a 24°C por 70 días. Transcurrido el tiempo de incubación las bolsas fueron transferidas al cuarto de fructificación (18- 20°C), sin ningún otro tratamiento (choque térmico o inmersión). Para inducir la fructificación se incrementó la humedad con 3 riegos de 20 minutos por día ventilando con aire húmedo (1 hora después de cada riego por 2 horas) y un período de 12 h de iluminación al día. Una semana después de la inducción de la fructificación inició la cosecha de carpóforos, procurando antes que el borde del píleo se abriera por completo. Cabe aclarar que las condiciones de fructificación de las cepas de *Lentinula* y los resultados obtenidos fueron publicados anteriormente por los autores (Ramírez Carrillo y Leal Lara 2002b), y se publican en este artículo con permiso de los editores.

Análisis de datos

Para cada cepa se registró el peso fresco de los hongos producidos. Con los resultados obtenidos se calculó la producción por brote, la producción acumulada por brote, y su eficiencia biológica (EB = g de hongo fresco/100 g de sustrato seco). Una vez obtenidos los valores de EB acumulada se realizó un análisis estadístico para identificar el brote donde cada cepa alcanzó su máximo rendimiento significativo (MRS). Finalmente, con los valores MRS para cada cepa se realizó un segundo análisis de varianza, y por medio de la clasificación obtenida a partir de la Prueba de Duncan se identificaron las cepas más productoras.

RESULTADOS

Evaluación de la eficiencia biológica

Cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*

Se realizaron dos experimentos de fructificación para evaluar la eficiencia biológica de 34 cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*, con respecto a cuatro cepas control de *P. ostreatus*. Para cada cepa se registró el peso fresco de los hongos producidos en seis réplicas durante ocho semanas de corte. Del total de cepas evaluadas solo dos no fructificaron. Para las restantes se presentan en las Tablas 2 y 3 los valores de eficiencia biológica acumulada y se indica la semana donde cada cepa alcanzó su MRS. El MRS se obtuvo a partir de la segunda semana para dos cepas con muy bajos rendimientos, y el resto de las cepas alcanzó dicho valor entre la tercera y séptima semana de corte; mientras que en el segundo experimento solo una cepa alcanzó su MRS hasta la octava semana de corte. En el primer experimento las cepas control de *P. ostreatus* produjeron EB entre 55 y 57%, mientras que con las cepas híbridas se obtuvieron EB entre 7 y 125%. Para el segundo experimento las cepas control produjeron EB entre 65 y 137% y las cepas híbridas entre 34 y 161%. Al realizar un análisis estadístico de las EB obtenidas para las dos cepas control evaluadas en ambos experimentos, se observó que no se presentaron diferencias significativas, razón por la cual se realizó el análisis estadístico en forma conjunta para todas las cepas evaluadas (Tabla 4).

Como resultado del análisis estadístico se observa que once cepas produjeron valores de EB mayores a 100% (103 a 161%). Para dichas cepas el MRS se obtuvo a partir de la tercera semana de corte. El análisis estadístico también permitió identificar dos cepas híbridas como las más productivas (L15-11 x P407₂ y L15-11 x P414₂) con EB entre 151 y 161%, de las cuales la cepa L15-11 x P414₂ presentó morfología adecuada para la producción comercial (tamaño, forma del estípite y píleo), mientras que la cepa L15-11 x P407₂, a pesar de presentar alta EB, no se recomienda para la producción comercial por tener estípites largos y píleo en forma de trompeta (Figura 1).

Por otro lado, la evaluación del MRS permitió identificar dentro del grupo de las once cepas más productoras seis cepas precoces, las cuales presentaron altos rendimientos en un período de cosecha de 3 a 4 semanas (L9-2 x P414₂, L19-2 x P404₁, L9-2 x P413₂, L9-8 x P413₂, L19-1 x P413₁, L15-11 x P407₂), razón por la cual representan material importante tanto para la producción comercial como para estudios de mejoramiento genético. Por otro lado, con dicho parámetro también fue posible identificar otras cepas precoces aunque con bajos rendimientos, es decir, su MRS osciló entre 41 y 79% de EB en un período de cosecha de 2 a 4 semanas, lo cual las hace atractivas para estudios de mejoramiento genético. Dentro de estas se encontraron las cepas: L18-1 x P408₁, L5-23 x P407₂, L19-2 x P403₁, L18-1 x P413₁, L5-23 x P408₂, L9-8 x P407₂, L19-1 x P414₁.

Finalmente, dada la definición de «híbrido» en el Diccionario de botánica (Font Quer, 1977), se puede decir que los aquí obtenidos son de tipo íter genérico, ya que implicó la unión sexual de individuos pertenecientes a géneros distintos, y al mismo tiempo se les puede considerar como falsos híbridos o híbridos goneoclino por presentar una preponderante influencia fenotípica de uno de los progenitores (*P. ostreatus*), que hace que los caracteres del otro progenitor (*L. edodes*) pasen inadvertidos.

Tabla 2: Eficiencia biológica acumulada de cepas híbridas de *Pleurotus* x *Lentinula* y cepas control de *P. ostreatus* (Experimento 1).

Cepas	Eficiencia biológica acumulada (g de hongo fresco /100 g de sustrato seco)							
	Semanas de producción							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control de <i>Pleurotus</i>								
P407 x P408	0 ± 0	14 ± 28	14 ± 28	38 ± 27	48 ± 11	55 ± 22	69 ± 24	74 ± 16
8 x 3	4 ± 9	24 ± 17	24 ± 17	35 ± 24	38 ± 20	49 ± 13	56 ± 8	67 ± 10
Híbridos de <i>Pleurotus</i> x <i>Lentinula</i>								
L18-1 x P403	0 ± 0	7 ± 15	7 ± 15	7 ± 15	11 ± 23	11 ± 23	11 ± 23	13 ± 28
L18-2 x P413	26 ± 21	34 ± 12	34 ± 12	34 ± 12	39 ± 12	41 ± 11	41 ± 11	41 ± 11
L18-1 x P408	4 ± 8	21 ± 7	21 ± 7	41 ± 16	41 ± 16	44 ± 12	44 ± 12	45 ± 10
L19-2 x P403	9 ± 15	41 ± 7	43 ± 9	65 ± 12	69 ± 13	73 ± 16	80 ± 21	80 ± 21
L18-1 x P413	41 ± 11	49 ± 9	49 ± 9	66 ± 6	69 ± 2	71 ± 5	73 ± 4	73 ± 4
L19-1 x P414	6 ± 13	43 ± 34	43 ± 34	79 ± 33	79 ± 33	96 ± 27	104 ± 27	104 ± 27
L19-2 x P404	65 ± 11	70 ± 20	87 ± 24	110 ± 22	110 ± 22	114 ± 21	117 ± 22	120 ± 16
L19-1 x P413	84 ± 11	84 ± 11	102 ± 21	125 ± 15	125 ± 15	132 ± 17	134 ± 15	134 ± 15
L19-2 x P408	0 ± 0	31 ± 5	31 ± 5	68 ± 30	78 ± 16	78 ± 16	82 ± 17	89 ± 19
L18-1 x P404	32 ± 37	57 ± 12	62 ± 20	78 ± 25	92 ± 17	101 ± 22	101 ± 22	101 ± 22
L19-1 x P404	35 ± 30	67 ± 14	67 ± 14	87 ± 20	96 ± 18	109 ± 11	110 ± 13	110 ± 13
L18-2 x P408	0 ± 0	0 ± 0	6 ± 13	13 ± 15	15 ± 18	47 ± 14	47 ± 14	53 ± 12
L18-1 x P414	34 ± 24	44 ± 8	46 ± 11	56 ± 16	56 ± 16	64 ± 7	65 ± 8	76 ± 11
L18-2 x P403	0 ± 0	36 ± 24	39 ± 27	53 ± 8	60 ± 14	83 ± 6	83 ± 6	87 ± 5
L19-2 x P413	57 ± 16	59 ± 14	59 ± 14	76 ± 28	77 ± 27	88 ± 20	88 ± 20	92 ± 24
L19-1 x P403	47 ± 8	56 ± 5	59 ± 4	83 ± 9	84 ± 8	92 ± 13	94 ± 12	99 ± 8
L19-2 x P414	24 ± 27	38 ± 36	63 ± 26	75 ± 17	79 ± 24	98 ± 20	98 ± 20	104 ± 25

Semana de producción donde cada cepa alcanza su máximo rendimiento significativo

Cepas parentales de *L. edodes*

De forma paralela también se realizó la fructificación de las siete cepas parentales pertenecientes a *L. edodes*, con el objeto de comparar la morfología y eficiencia biológica de las cepas híbridas con sus respectivas cepas parentales (tanto del género *Pleurotus* como del género *Lentinula*). En este caso se utilizó para la fructificación de las cepas el sustrato que es empleado para la producción comercial de este hongo (shiitake) por un productor local (Hongos Leben).

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la EB acumulada para las siete cepas de *L. edodes*. Como se puede observar la productividad de las distintas cepas mostró diferencias importantes. En el primer brote la eficiencia biológica (EB = g de hongos frescos /100 g de sustrato seco) fluctuó entre 4 y 138% para las cepas L19 y L9, respectivamente. En el segundo brote los valores correspondientes a estas dos cepas fueron de 17 y 176%, y en el tercero 24 y 261%. El tiempo en días para la obtención de cada brote, a partir del momento en que las bolsas se colocaron en el cuarto de producción, fue de 9 a 16 días para el primero; 22 a 40 días para el segundo brote y 38 a 60 para el último. A partir del valor MRS obtenido para cada cepa, al realizar un segundo análisis estadístico, se observa en la Tabla 6 que las cepas se clasificaron en

seis grupos, siendo la cepa L9 la más productiva con una EB de 216%, en segundo lugar aparece la cepa L15 con EB de 170%, y le sigue L5 con una EB de 131%. Las cepas con menor EB fueron L19 y L18 con 19 y 30%. Por otro lado, la morfología de las cepas de *L. edodes* fue la típica para esta especie. En particular, si bien la cepa L9 se caracterizó por presentar eficiencia biológica muy alta, presentó la desventaja de producir hongos pequeños, mientras que las cepas L15 y L5 produjeron hongos de mayor tamaño; las que presentaron los hongos más grandes fueron L18, L19, L20 y L21 (Figura 1).

Tabla 3: Eficiencia biológica acumulada de cepas híbridas de *Pleurotus* x *Lentinula* y cepas control de *P. ostreatus* (Experimento 2).

Cepas	Eficiencia biológica acumulada (g hongo fresco/100 g de sustrato seco)						
	Semanas de producción						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Control de Pleurotus</i>							
P407 x P408	0 ± 0	25 ± 14	43 ± 15	49 ± 50	68 ± 7	71 ± 8	74 ± 8
P413 x P414	13 ± 35	88 ± 43	103 ± 19	107 ± 24	137 ± 17	141 ± 13	141 ± 13
8x3	0 ± 0	8 ± 18	30 ± 7	50 ± 6	50 ± 6	65 ± 9	65 ± 9
IAP	50 ± 12	103 ± 9	107 ± 15	122 ± 11	128 ± 7	136 ± 11	139 ± 14
<i>Híbridos de Pleurotus x Lentinula</i>							
L9-8 x P407	54 ± 12	74 ± 13	77 ± 13	82 ± 17	83 ± 15	83 ± 15	84 ± 16
L5-23 x P407	26 ± 28	46 ± 9	50 ± 7	66 ± 9	73 ± 8	75 ± 9	75 ± 9
L9-2 x P413	15 ± 28	82 ± 18	112 ± 13	121 ± 11	129 ± 7	131 ± 8	131 ± 8
L9-2 x P414	33 ± 27	53 ± 13	76 ± 7	98 ± 7	104 ± 10	109 ± 5	114 ± 10
L9-8 x P413	27 ± 32	52 ± 7	74 ± 4	112 ± 9	112 ± 9	114 ± 6	120 ± 9
L15-11 x P407	90 ± 26	125 ± 22	141 ± 9	152 ± 9	158 ± 9	161 ± 7	163 ± 7
L15-5 x P408	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 5	25 ± 15	34 ± 3	35 ± 4	37 ± 5
L9-2 x P408	16 ± 7	16 ± 7	46 ± 6	75 ± 9	89 ± 3	95 ± 4	95 ± 4
L5-23 x P414	10 ± 22	33 ± 12	62 ± 22	75 ± 29	103 ± 13	113 ± 6	119 ± 9
L15-5 x P413	32 ± 31	57 ± 12	60 ± 7	86 ± 15	109 ± 8	114 ± 12	123 ± 9
L15-11 x P414	77 ± 22	110 ± 22	130 ± 15	152 ± 10	161 ± 12	167 ± 10	176 ± 13
L5-23 x P408	0 ± 0	0 ± 0	14 ± 12	44 ± 11	58 ± 7	66 ± 5	68 ± 6
L15-5 x P414	35 ± 9	40 ± 2	83 ± 4	114 ± 7	119 ± 15	127 ± 10	132 ± 14
L5-23 x P413	49 ± 19	103 ± 17	103 ± 17	117 ± 14	130 ± 15	138 ± 11	143 ± 10
L9-8 x P414	48 ± 12	53 ± 5	73 ± 13	105 ± 11	115 ± 11	115 ± 11	127 ± 14

Semana de producción donde cada cepa alcanza su máximo rendimiento significativo

Tabla 4: Clasificación de las cepas de acuerdo a la Prueba de Duncan considerando el máximo rendimiento significativo (Experimentos 1 y 2)

Cepas	Máximo rendimiento significativo			
	x	±	σ	Prueba de Duncan* Semana
<i>P. ostreatus</i> (control)				
P407 x P408 ₁	55	±	22	cde 6
8 x 3 ₁	57	±	8	cdef 7
8 x 3 ₂	65	±	9	defg 6
P407 x P408 ₂	68	±	7	defghi 5
IAP ₂	136	±	11	pq 6
P413 x P414 ₂	137	±	17	pq 5
Híbridas de <i>Pleurotus</i> x <i>Lentinula</i>				
L18-1 x P403 ₁	7	±	15	a 2
L15-5 x P408 ₂	34	±	3	b 5
L18-2 x P413 ₁	34	±	12	b 2
L18-1 x P408 ₁	41	±	16	bc 4
L18-2 x P408 ₁	47	±	14	bcd 6
L5-23 x P407 ₂	50	±	7	bcd 3
L18-1 x P414 ₁	64	±	7	defg 6
L19-2 x P403 ₁	65	±	12	defg 4
L18-1 x P413 ₁	66	±	6	defgh 4
L5-23 x P408 ₂	66	±	5	defgh 3
L9-8 x P407 ₂	74	±	13	efghij 2
L19-2 x P408 ₁	78	±	16	efghijk 5
L19-1 x P414 ₁	79	±	33	ghijk 4
L18-2 x P403 ₁	83	±	6	ghijkl 6
L19-2 x P413 ₁	88	±	20	hijklm 6
L9-2 x P408 ₂	89	±	3	ijklm 5
L19-1 x P403 ₁	92	±	13	klmno 6
L18-1 x P404 ₁	92	±	17	klmno 5
L19-1 x P404 ₁	96	±	18	klmno 5
L9-2 x P414 ₂	98	±	7	klmno 4
L19-2 x P414 ₁	99	±	20	klmno 6
L5-23 x P414 ₂	103	±	13	lmno 5
L15-5 x P413 ₂	109	±	8	mno 5
L19-2 x P404 ₁	110	±	22	mno 4
L9-2 x P413 ₂	112	±	13	no 3
L9-8 x P413 ₂	112	±	9	no 4
L19-1 x P413 ₁	125	±	15	op 4
L15-5 x P414 ₂	127	±	10	op 6
L9-8 x P414 ₂	127	±	14	op 7
L5-23 x P413 ₂	138	±	11	pq 6
L15-11 x P407 ₂	151	±	9	qr 4
L15-11 x P414 ₂	161	±	12	r 5

^{1,2}: Experimento de evaluación

*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

Tabla 5: Eficiencia biológica acumulada de las cepas parentales de *L. edodes*

Cepas	Eficiencia Biológica (EB) (g de hongos frescos /100 g de sustrato seco)		
	Brotos		
	1 ^{ro.}	2 ^{do.}	3 ^{ro.}
L18	29.6 ± 23 ^a	54.8 ± 25 ^a	63.6 ± 17 ^a
L21	53.6 ± 18 ^a	70.5 ± 11 ^a	78.2 ± 8 ^a
L19	4.6 ± 7 ^a	17.1 ± 0 ^b	24.0 ± 10 ^b
L20	44.8 ± 51 ^a	79.2 ± 31 ^b	83.5 ± 34 ^b
L5	83.4 ± 7 ^a	130.5 ± 5 ^b	143.9 ± 11 ^b
L15	102.5 ± 6 ^a	151.2 ± 4 ^b	170.1 ± 10 ^c
L9	138.9 ± 10 ^a	176.8 ± 6 ^b	261.3 ± 7 ^c

Brote donde se obtiene el máximo rendimiento significativo.

Letras diferentes en una misma cepa indican diferencias significativas entre brotes (Prueba de Duncan $\alpha = 0.05$).

Reimpreso de *Proceedings of the fourth Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez *et al.* (eds) 2002, 289-294. Con permiso de los editores.

Tabla 6: Clasificación de las cepas parentales de *L. edodes* de acuerdo a la prueba de Duncan considerando su MRS.

Cepas	Máximo rendimiento significativo		Brote*
	\bar{x}	$\pm \sigma$	
L19	17.1	± 0 ^a	2 ^{do}
L18	29.6	± 23 ^a	1 ^{ro}
L21	53.6	± 18 ^b	1 ^{ro}
L20	79.2	± 31 ^c	2 ^{do}
L5	130.5	± 5 ^d	2 ^{do}
L15	170.1	± 10 ^e	3 ^{ro}
L9	261.3	± 7 ^f	3 ^{ro}

Letras diferentes entre cepas indican diferencias significativas (Prueba de Duncan $\alpha = 0.05$).

* Brote donde se obtiene el máximo rendimiento significativo

Reimpreso de *Proceedings of the fourth Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez *et al.* (eds) 2002, 289-294. Con permiso de los editores.

DISCUSIÓN

Los valores de EB obtenidos para las cepas parentales de *P. ostreatus* en general fueron menores a los obtenidos para las cepas híbridas. Sin embargo al comparar dichos valores con los reportados en la literatura se puede decir que están dentro del rango esperado (Upadhyay *et al.*, 2002; Lahmann, y Rinker, 1995). Así por ejemplo Zervakis y Balis (1992) reportan EB para cepas de *P. ostreatus* entre 72 y 94%, que al ser comparados con nuestros resultados de EB de 55±22 hasta 137 ±17 están dentro del rango esperado. De igual forma Martínez Carrera *et al.* (1990), reportan valores de EB entre 14 y 96 al utilizar como sustratos bagazo de caña solo y en mezclas con paja de cebada y pulpa de café. Estos resultados indican que la selección de cepas parentales para la producción de híbridos fue adecuada.

Los valores de EB obtenidos para las cepas parentales de *L. edodes* resultaron muy variables. Para las cepas L18 y L19 los valores entre 17 y 30% de EB están por debajo de los reportados en la literatura internacional (60 a 80% de EB) pero dentro del rango de los valores reportados en estudios realizados en México (3-60% EB) (Morales y Carrera, 1990; Hiromoto, 1991; Royse y Sánchez, 2000; Royse, 2001). Sin embargo para el resto de las cepas (L21, L20, L15, L5 y L9) los valores obtenidos de EB entre 53 y 261% son semejantes o incluso mayores a los reportados en la literatura. Así por ejemplo Royse y Sánchez (2000) reportan EB entre 107 y 121%. Los altos valores de EB obtenidos para algunas cepas parentales posiblemente influyeron para obtener cepas híbridas que produjeran altos valores de EB. En general se puede decir que valores de EB mayores al 100% representan valores atractivos para la selección de cepas aptas para la producción comercial y, como se indicó en los resultados en este caso de 34 cepas evaluadas 11 presentaron valores de eficiencias biológicas mayores al 100 y de ellas sólo una cepa presentó una morfología poco atractiva para la producción comercial.

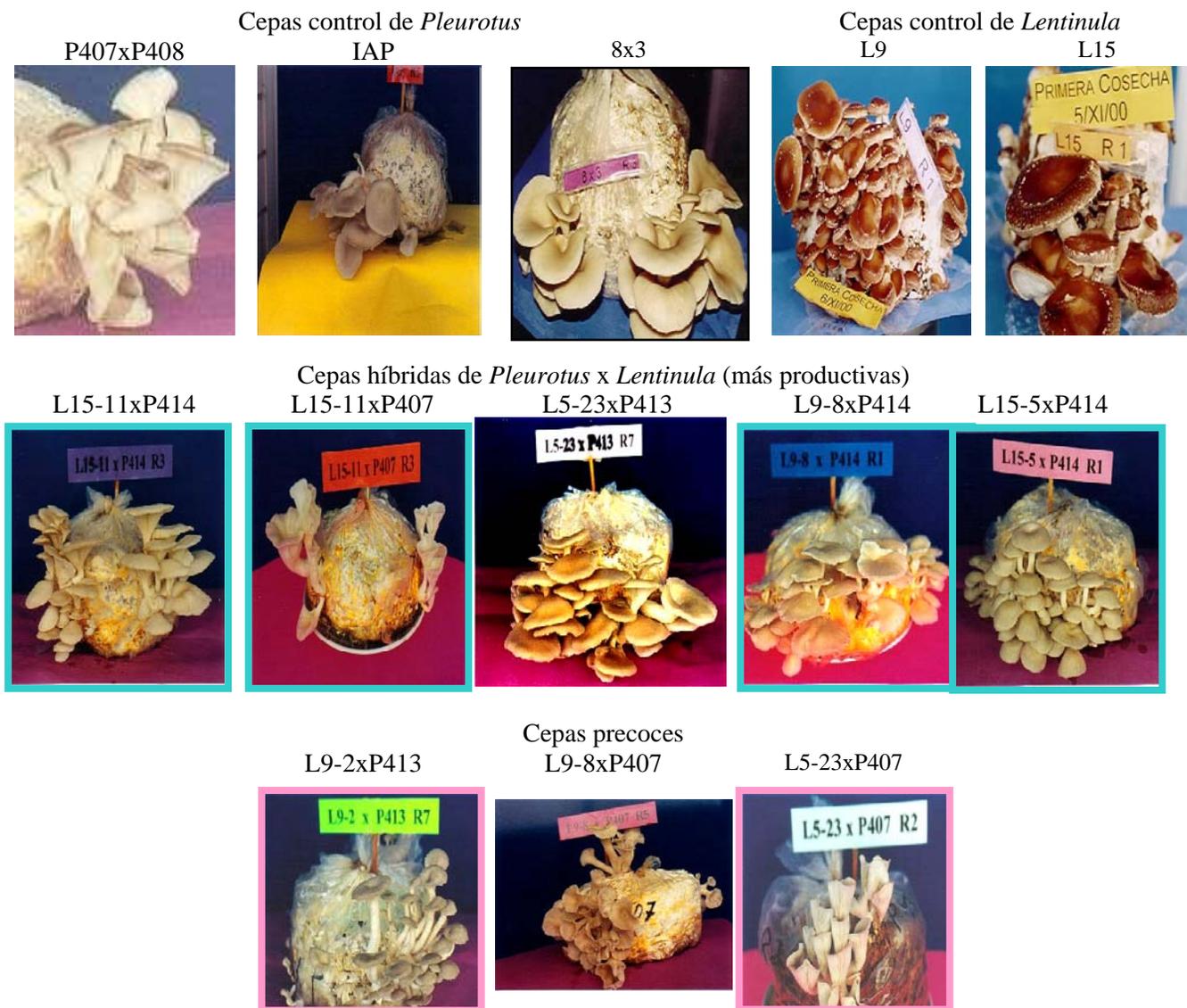


Figura 1: Características morfológicas de las cepas control de *P. ostreatus* y *L. edodes* y de las cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su más profundo agradecimiento a las empresas Hongos de México y Hongos Leben por la gentil donación de los sustratos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

- Arteaga-Santillán, E.S., K. De Lachica-Giles, R. Ramírez-Carrillo y H. Leal-Lara. 1996. Desdicariorización excéntrica de *Lentinus* spp. *Rev Mex. Mic.* 12: 15-21.
- Chang, S.T. 1996. Mushroom research and development equality and mutual benefit. *Mushroom Biol. Mushroom Prod.* 2: 1-10.
- Font Quer, P. 1977. *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor, S.A. Barcelona. 574.575.
- Hiramoto, B.T. 1991. Comparative analysis of Shiitake culture system. In: Maher (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam. 489-496.

- Kawasumi, T., N. Kiuchi, Y. Futatsugi, K. Ohba, S.O. Yanagi. 1987. High yield preparation of *Lentinus edodes* (Shiitake) protoplasts with regeneration capacity and mating type stability. *Agr. Biol. Chem.*, 51:1649-1656.
- Lahmann, O., D.L. Rinker. 1995. Historical development of commercial mushroom production in Central and South America. In: *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Ed. by Elliott, T.J., Balkema, Rotterdam 459-466.
- Leal-Lara, H., G. Eger-Hummel. 1982. A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rotting Basidiomycetes. *Theor. and Appl. Genetics* 61: 65-68.
- Martínez-Carrera, D. 2000. Mushroom biotechnology in tropical America. *Int. J. Mush. Sci.* 3: 9-20.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal. 1990. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o cebada. *Micol. Neotrop. Apl.* 3: 49-52.
- Morales, P., D. Martínez-Carrera. 1990. Cultivation of *Lentinula edodes* in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 3: 13-17.
- Ohmasa, M., Y. Abe, H. Furukana, M. Taniguchi, H. Neda. 1987. Preparation and culture of protoplasts of some Japanese cultivated mushrooms. *Bulletin of Forestry and Forestry Products Research Institute* 343: 55-170.
- Peberdy, J.F. 1980. Protoplast fusion a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 2: 23-29.
- Ramírez-Carrillo, R., H. Leal-Lara. 2002a. Symmetrical recovery of monokaryotic components from *Lentinula edodes* using dikaryotization. In: *Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Sánchez, J.E., G. Huerta and E. Montiel (eds.). 141-149.
- Ramírez-Carrillo, R., H. Leal-Lara. 2002b. Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. In: *Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, J.E. Sánchez, G. Huerta and E. Montiel (eds.), 289-294.
- Royse, D.J. 1997. Specialty mushrooms: consumption, production and cultivation. *Rev. Mex. Mic.* 13: 1-11.
- Royse, D.J. 2001. Cultivation of Shiitake on natural and synthetic logs. Pen State College of Agricultural Science Agricultural Research and Cooperative Extension, Pennsylvania, USA.
- Royse, D.J., J.E. Sánchez-Vázquez. 2000. Influence of wood chip particle size used in substrate on biological efficiency and post-soak log weights of shiitake. In: *Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam. 367-373.
- Toyomasu, T., T. Matsumoto, K. Mori. 1986. Interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus*. *Agr. Biol. Chem.*, 50: 223-225.
- Upadhyay, R.C., R.N. Verna, S.K. Singh, M.C. Yadav. 2002. Effect of organic nitrogen supplementation in *Pleurotus* species. In: *Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (eds.), 225-232.
- Young-Bok, Y., S. Moon-Tae, G. Seung-Joo, Y. Chang-Hyun, C. Dong-Yeul, P. Yong Hwan, C. Kwon-Yawl. 1989. Interorder protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma applanatum*. *Kor. J. Mycol.* 17-3: 119-123.
- Young-Bok, Y., Y. Chang-Hyun, P. Yong Hwan, J.F. Peberdy. 1986. Genetic analysis of the cycle in interspecific hybrids of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 14-1: 9-15.
- Zervakis, G., C. Balis. 1992. Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Micol. Neotrop. Apl.* 5: 39-47.

8.3 CULTURE CONDITIONS FOR INCREASING YIELDS OF *LENTINULA EDODES*

CULTURE CONDITIONS FOR INCREASING YIELDS OF *LENTINULA EDODES*

Rebeca Ramírez-Carrillo and H. Leal-Lara

Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, National University of Mexico (UNAM), Cd. Universitaria, 04510 Mexico D.F. <rebecarc@servidor.unam.mx>

ABSTRACT

The low yields and long cultivation periods associated with the traditional shiitake production on logs have been improved by using sawdust substrates and controlled indoor cultivation. Important parameters to increase yields were identified in this study: strains selection and incubation conditions, which avoid browning, cold shock or water immersion at the end of the incubation period. Seven *Lentinula edodes* strains tested (from USA, Canada and Korea) could be clearly classified in two types of strains. The first group of strains (L5, L9 and L15) are rather high yielding, with biological efficiencies ranging from 143 to 261%. They require high levels of air humidity and produce three flushes of abundant light brown mushrooms in less than 45 days cropping after 70 days incubation at 24°C. A second group of strains (L18, L19, L20 and L21) are lower yielding (B.E. from 24 to 83%) but can fruit at lower air humidity and produce larger and darker mushrooms.

INTRODUCTION

Shiitake production worldwide has increased more than seven-fold from 1983 to 1997 and it is currently the second most cultivated mushroom in the world (Chang 1996, Royse 1997). Most of the increase during this 14 years period occurred in China, where shiitake is widely consumed and exported. Traditionally, shiitake is produced on logs with relatively low yields varying with climatic events, and the whole cycle is very long (three to five years). In the last decades, indoor shiitake production has been introduced in USA and in Europe substituting wood logs by so-called "synthetic media", sawdust being the basic ingredient for substrate formulation (Pryzbylowicz and Donoghe 1998). Very strictly controlled conditions of cultivation are required for both mycelium propagation and fruiting, and therefore very costly investments are required.

The indoor method holds two important advantages over natural logs, cultivation time and efficiency. While the natural log cultivation cycle usually lasts six years, only four to six months are normally required from time of inoculation to cleanout for synthetic medium cultivation. Low biological efficiencies (less than 33%) from natural log cultivation are improved to 45 to 65 % using synthetic substrate cultivation (BE = g of fresh mushrooms/100 g dry substrate) (Delpech and Olivier 1991, Rinker 1991, Levanon *et al.* 1993). Recently even higher yields (75 to 125%), have been reported by Royse (1997). To achieve such high yields, bags are removed to expose the substrate blocks after 20 to 25 days spawn-run in an environment conducive to browning of the exterior substrate blocks. As the browning process nears completion after 4 weeks, primordia begin to form about 2 mm under the surface of the substrate, indicating the onset of mushroom production. According to Royse (1997) the substrate has to be soaked in water for 3 to 12 hours to stimulate the maturation of primordial, as water rapidly displaces carbon dioxide contained in air spaces and provides enough moisture for one flush of mushrooms.

Browning and soaking, however, present various drawbacks. Large quantities of water are used, the processes are labor and cost intensive and the substrate is easily contaminated during these operations. Furthermore, there are contradictory opinions about its usefulness. Extending incubation

time to 13 and 15 weeks has been found to preclude the need for browning and soaking although the risk of *Trichoderma* contamination can be increased (Pryzbylowicz and Donoghe 1998). Such contradictory reports may be explained by a genotype effect, since responses to environmental conditions are highly variable depending on strain (Delpech and Olivier 1991, Rinker 1991, Levanon *et al.*, 1993). Therefore, in this study various commercial *Lentinula edodes* strains were evaluated for their ability to produce mushrooms without browning and soaking.

MATERIALS Y METHODS

Biological material

Seven strains of *L. edodes* were obtained from various sources: strain L5 from Dr. Ian Reid (National Research Council of Canada), strains L9 and L15 from Dr. Tai-Soo Lee (Forest Research Institute of Korea), strains L18, L19 and L20 from Dr. Rosa L. Andrade (Instituto Tecnológico Querétaro, México) and strain L21 from Amycel, Inc. (strain 4005). All strains are stored in the culture collection of the Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, UNAM.

Culture media

Malt extract agar (MEA) was prepared dissolving malt extract (1.5%) and agar (2%) in distilled water. It was sterilized in an autoclave at 121°C at 1.2 kg/cm² for 30 minutes and ten ml of the sterile medium were poured into sterile petri dishes. Once the medium solidified, the plates were wrapped in plastic bags and incubated at 24°C for two days to check sterility and then used for storage of strains and propagation of mycelium.

Spawn

Wheat grains were washed and cooked for 50 min and then washed again to cool. Excess water was drained, CaSO₄ (1.3%) and CaCO₃ (0.3%) were added (w/w), 500 g supplemented grain were packed in polypropylene bags and autoclave sterilized (2 h at 121°C at 1.2 kg/cm²). Bags with this sterile grain were inoculated with mycelium from a seven days agar colony and incubated 21 days at 24°C.

Conditions for substrate incubation and fruiting

Sawdust substrate was provided by a commercial grower (Hongos Leben, Edo. Mexico). It was watered to about 54% water content and 2 kg were packed in polypropylene-ethylene bags (32 cm x 49 cm) with a 4 cm x 4 cm micropore filter 13 cm from the top. The substrate was sterilized in an autoclave for two hours at 121°C at 1.2 kg/cm². Once cooled, three bags for each strain were spawned (5%) and incubated at 24°C for 70 days. Bags were then transferred to the fruiting room without any further treatment (thermal shock or soaking). Fruiting was induced by regular watering (three times a day for 20 min), two hours ventilation with humid air after each watering period and 12 h illumination per day.

RESULTS

After 70 days incubation, the substrate was fully invaded by mycelium but it lacked a brown cover, since it had remained wrapped in the closed bags during the whole incubation period. On most bags, however, the first primordia had already appeared by this time. Bags were then transferred to the

fruiting room and the part of the bags above the substrate was cut off. The conditions in the fruiting room, ie. high humidity, regular ventilation and illumination, promoted formation of addition primordia and their maturation into fruit bodies. Nevertheless, developing primordia had to be monitored closely to prevent their death. In order to obtain fruit bodies, some bags had to be placed in the lower rack, close to the floor, where high humidity conditions prevailed. Other bags preferred upper racks where the humidity was lower. Accumulated BEs of the seven *L. edodes* strains are shown in Table 1. Biological efficiencies ranged as follows: 1st flush: 4-138 %, 2nd flush: 17-176 % and 3rd flush: 24- 261 %.

Table 1. Accumulated biological efficiency of *Lentinula edodes* after three flushes

Strains	Biological efficiency (BE) (g fresh mushrooms/100 g dry substrate)			*
	Flushes			
	1 st	2 nd	3 rd	
L19	4.6 ± 7	17.1 ± 0	24.0 ± 10	a
L18	29.6 ± 23	54.8 ± 25	63.6 ± 17	b
L20	44.8 ± 51	79.2 ± 31	83.5 ± 34	b
L21	53.6 ± 18	70.5 ± 11	78.2 ± 8	b
L5	83.4 ± 7	130.5 ± 5	143.9 ± 11	c
L15	102.5 ± 6	151.2 ± 4	170.1 ± 10	d
L9	138.9 ± 10	176.8 ± 6	261.3 ± 7	e

* Different letters indicate significant differences in BE values at 3rd flush (Duncan's Multiple Range Test p = 0.05 level)

Table 2. Time (days) for completion of each flush after induction of fruiting

Strains	Time for completion of each flush (days)		
	Flushes		
	1 st	2 nd	3 rd
L19	14	32 ± 11	47
L18	15 ± 2	39 ± 1	51 ± 9
L20	16 ± 2	37 ± 1	51 ± 6
L21	15 ± 2	39	50 ± 1
L5	16 ± 2	28 ± 3	48 ± 3
L15	15 ± 2	31 ± 2	48 ± 2
L9	9 ± 0	22 ± 0	38 ± 1

(Values without standard deviation indicate that only one replicate produced mushrooms for this flush).

Variance analysis indicated significant differences in the data of the 3rd flush. Strain L9 showed the highest productivity (261 % BE), followed by L15 and L5 with 170% and 143 % BE, respectively. Strains L18, L20 and L21 formed a lower-producing group and L19 was the least productive. As shown in Table 2, Strain L9 is not only the most productive but also the most promising in regards to precocity since it completed the three flushes in just 38 days. Strains L5 and L15 are also good candidates for commercial production. In addition to being high-producing they completed the three flushes in just ten additional days. It should be stressed that substrate bags were neither soaked in cold water nor subjected to cold shock to accomplish fruiting. Once spawn run was completed, substrate bags were simply transferred to the fruiting room, where humidity was kept high by fine spraying 20 min, three times a day.

Table 3: Production rate* of seven *Lentinula edodes* strains by flush

Strains	Production rate (PR)			Classification by Duncan's test**
	Flushes			
	1 st	2 nd	3 rd	
L19	0.06 ± 0.08	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.06	a
L18	0.35 ± 0.27	0.56 ± 0.25	0.55 ± 0.17	b
L20	0.52 ± 0.58	0.81 ± 0.41	0.72 ± 0.27	b
L21	0.63 ± 0.21	0.75 ± 0.01	0.68 ± 0.10	b
L5	0.97 ± 0.10	1.33 ± 0.07	1.22 ± 0.12	c
L15	1.21 ± 0.08	1.49 ± 0.06	1.44 ± 0.07	c
L9	1.76 ± 0.13	1.92 ± 0.06	2.43 ± 0.09	d

* Production rate (PR) = BE/days for obtaining each flush including incubation time

** Different letters indicate significant differences in PR values at all flushes (Duncan's Multiple Range Test p = 0.05 level)

According to values shown on Table 3, Strain L9 was the most productive, continuously increasing its productivity at each flush. Strains L5 and L15 showed high BE values and production rates above 1.0. Strain L15 reaches almost 1.5 at the second flush but displayed no further increase at the third flush. Production rate for strains L18, L20 and L21, rather low in comparison to the most productive ones, increases up to the second flush. Finally, strain L19, which had the lowest BE, showed the lowest production rate. Like the most productive strain (L9), however its production increased with each flush. Statistical analysis indicated the same significant differences among strains after each flush as shown on Table 3, a classification identical to that reported on Table 1 for biological efficiency.

Table 4: Major characteristics of fruited bodies of *Lentinula* strains

Strains	Quantity			Mushroom size				Brown color		
	low	middle	high	small	medium	large	very large	very light	light	very dark
L19	■					■	■			■
L18	■					■	■			■
L20	■					■	■			■
L21	■					■	■			■
L5		■			■	■			■	
L15		■			■	■			■	
L9			■	■	■			■		

Table 5: Humidity requirements for fruiting of *Lentinula edodes* strains

Strains	Relative humidity	Primordia		Fruiting			
		aborted	normal	null	slow	normal	aborted bodies
L19	Low		■		■		
	Middle		■		■		
	High	■		■			
L18	Low		■		■		
	Middle		■		■		
	High	■		■			
L20	Low		■		■		
	Middle	■		■			
	High	■		■			
L21	Low		■		■		
	Middle	■		■			
	High	■		■			
L5	Low	■		■			
	Middle		■			■	
	High		■			■	
L15	Low		■				■
	Middle		■			■	
	High		■			■	
L9	Low	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Middle		■		■		
	High		■		■		

N.D. Not determined

Although the characteristics of the fruit bodies produced by each strain remained fairly constant throughout the flushes, a wide variation was observed between strains. Two types of strains could be identified (Table 4). Within the first group, Strain L9 produces a large quantity of small, light brown mushrooms. Strains L5 and L15 produced a reduced number of mushrooms, but they were a bit darker in color and of larger size. Fewer mushrooms were produced by strains L18, L19, L20 and L21, but they were larger and dark brown. Such variations in morphology and mushrooms yield were associated with two markedly different humidity levels, required by the respective group of strains (Table 5). Fruiting of the highest-producing strains (L9, L15 and L5) required high relative humidity. At low ambient humidity, their primordia aborted or deformed fruit bodies were produced. The second group of strains (L21, L20, L18 and L19) produced lower yields at low ambient humidity. At high humidity, primordia aborted and no production was obtained. These strains were also slow producers, probably as a result of the low ambient humidity, which they need for fruiting.

DISCUSSION

Maximum BEs of 60 to 80% have been reported for commercial *L. edodes* production on synthetic substrates (Hiromoto, 1991; Royse, 2000). Such yields were produced in this study even by the lowest producing strains (63 to 83% B.E.). Before this study, the highest yields reported for *L. edodes* even under laboratory conditions were in range of 107 to 121% (Royse and Sánchez, 2000) but as Table 1 indicates, the high producing strains in this study showed much higher yields (143%, 170% and 261%). One report by Hiromoto (1991), describes even higher yields (B.E. = $325\% \pm 100$) but does not provide details of either substrate composition or growing conditions, citing patent protection. The yields obtained in this investigation, then, are much above those obtained in previously.

It is generally accepted that yields are influenced by the type of strain, substrate composition and of course, growing conditions. Spawn running time, mycelial maturation by browning and water soaking of the substrate have been considered as critical factors. Incubation periods from 4 to 15 weeks have been tested with contradictory results (Badham 1988, Delpech and Olivier 1991, Rinker 1991). Controversy exists about the necessity of soaking substrates in cold water. Royse (1997) recommended short periods of two to four hours at 12°C but Stamets (1993) indicated that good fruiting is promoted by soaking for larger periods, i.e. 24 to 48 h, and between flushes. After the long incubation period (ten weeks) used in our study, primordia were already developing on substrate. At this time bags were removed and substrate transferred to the fruiting room, where high ambient humidity was maintained. This precluded mycelium maturation (browning) and soaking the substrate. The discontinuation of these procedures represents a potential savings of substantial amounts of water and energy for the grower. Badham (1988) proposed increasing spawn-running time to 13 weeks and then transferring the substrate to the fruiting room for substrate hydration. Although the browning and soaking were eliminated, only one flush was cropped in his investigation due to the high incidence of contamination, and low biological efficiencies were achieved, 42%. In our study, even the low-producing strains produced comparable results after the first flush, and high-producing strains produced yields two or three times greater (83 to 138%).

The results published by Rinker (1991) indicating that daily misting of substrate was not sufficient to optimize production and that soaking substrate in water (12 h immersion) was essential for production may be similarly explained. Yields in that study varied from 25 to 83% and misted sawdust logs did not produce any mushrooms after the second break. However, these results may be related to genotype. In our study, two of the four low-producing strains yielded even lower BE values for the first flush (ca. 5 and 30%), but strains L15 and L9 showed higher values, (102 and 139%). This highlights the influence of the genotype, a factor that has not been adequately

considered up to now. Variations in the individual responses of strains to environmental factors have been clearly shown here, and Tables 4 and 5 indicate that the extreme reactions of strains to environmental conditions are associated with their rather opposite characteristics in regards to fruit body morphology.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Badham, E.R. 1988. Is autoclaving Shiitake substrate necessary? *Mush. J. Tropics* 8:129-136.
- Chang, S.T. 1996. Mushroom research and development equality and mutual benefit. *Mushroom Biol. Mushroom Prod.* 2: 1-10.
- Delpech, P. and J.M. Olivier. 1991. Cultivation of Shiitake on straw based pasteurized substrates *In: M.J. Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi.* Balkema, Rotterdam. 523-528.
- Hiromoto, B.T. 1991. Comparative analysis of Shiitake culture system. *In: M.J. Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi.* Balkema, Rotterdam. 489-496.
- Levanon, D., N. Rothschild, O. Danai and S. Masaphy. 1993. Strain selection for cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) on straw. *Bioresource Technology* 45: 9-12.
- Pryzbylowicz, P. and J. Donoghe. 1998. *Shiitake growers handbook. The art and science of mushroom cultivation.* Kendall/Hunt Publishing Company.
- Rinker, D.L. 1991. The influence of heat treatment, genotype and other cultural practices on the production of Shiitake mushrooms on sawdust. *In: M.J. Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi.* Balkema, Rotterdam. 497-502.
- Royse, D.J. 1997. Specialty mushrooms: consumption, production and cultivation. *Rev. Mex. Mic.* 13: 1-11.
- Royse, D.J. and J.E. Sánchez-Vázquez. 2000. Influence of wood chip particle size used in substrate on biological efficiency and post-soak log weights of shiitake. *In: M.J. Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi.* Balkema, Rotterdam. 367-373.
- Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms.* Ten Speed Press, Berkeley.

8.4 EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE *LENTINULA EDODES* EN SUSTRATO COMERCIAL DE ASERRÍN

EL RENDIMIENTO MÁXIMO SIGNIFICATIVO PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE *LENTINULA EDODES* EN SUSTRATO COMERCIAL DE ASERRÍN

REBECA RAMÍREZ CARRILLO & HERMILO LEAL LARA

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Conjunto E, UNAM.
Cd. Universitaria 04510, México D.F. rebecarc@servidor.unam.mx

ABSTRACT

THE MAXIMUM SIGNIFICANT YIELD FOR STATISTICAL ANALYSIS OF PRODUCTION OF *LENTINULA EDODES* ON COMERCIAL SAWSUST SUBTRATE. Rev. Mex. Mic. 17: 7-10 (2001-2003). Seven strains of *L. edodes* were grown on a commercial sawdust substrate. Data of accumulated biological efficiencies (BE = g fresh mushrooms /100 g dry substrate) were compared with maximum significant yield. To account the effect of replicates, univariable and multivariable analysis of independent variables resulted necessary for a correct interpretation of production data. Statistical analysis was simplified by using the maximum significant yield. Since this parameter allows detection of higher yielding strains and optimum cropping time for each strain, three strains of *L. edodes* with high BE were identified and statistically separated, L9 (261%), L15 (170%) and L5 (130%).

Key words: Statistical analysis, maximum significant yield, mushroom production, *Lentinula edodes*.

RESUMEN

Se cultivaron 7 cepas de *L. edodes* en un sustrato de aserrín comercial y para cada cepa se comparó la eficiencia biológica total (EB = g hongos frescos/100 g sustrato seco) con el rendimiento máximo significativo. Para la interpretación estadística de los resultados se realizaron dos análisis de varianza, uno de tipo univariable y otro multivariable para evaluar el efecto de las repeticiones. El análisis estadístico puede simplificarse y hacerse más eficaz al utilizar el rendimiento máximo significativo, parámetro de gran utilidad ya que además de identificar a las cepas más productivas permite conocer el tiempo óptimo de cosecha para cada cepa. De esta manera se identificaron 3 cepas con eficiencias biológicas elevadas y significativamente distintas, L9 (261%), L15 (170%) y L5 (130%).

Palabras clave: Análisis estadístico, rendimiento máximo significativo, producción de hongos comestibles, *Lentinula edodes*.

Introducción

Por lo general el análisis e interpretación de los resultados de producción de hongos comestibles se realiza considerando el peso de hongos frescos cosechados respecto al peso del sustrato (base húmeda o base seca). Este valor se reporta por brote, semana de producción, o bien al final del ciclo de cultivo. Si bien la eficiencia biológica (EB = g de hongo fresco/100 g de sustrato seco) es el parámetro más utilizado para indicar el rendimiento (Tschierpe & Hartmann, 1977), con frecuencia se reportan también los valores de producción total (g de hongo fresco/unidad de cultivo). No obstante, el uso de estos parámetros para la interpretación estadística de los resultados sólo sirven para identificar las cepas, sustratos o condiciones con las que se logra la mayor producción de hongos (Calvo-Bado et al., 1996; Villa Cruz et al., 1999; Sánchez et al., 2002, Shen &

Royse, 2002). El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de 7 cepas de *L. edodes* durante 3 brotes e introducir para la interpretación estadística de los resultados, el parámetro del rendimiento máximo significativo (rms), el cual esta relacionado con el brote donde una cepa alcanza su máximo rendimiento.

Materiales y métodos

Material biológico. Las 7 cepas de *Lentinula edodes* utilizadas en este estudio se encuentran depositadas en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la facultad de Química, UNAM. En la tabla 1 se indica el origen de cada cepa y sus principales características.

Producción de esporóforos de *Lentinula edodes*. Se evaluaron los rendimientos de 7 cepas de *L. edodes* en un sustrato de aserrín proporcionado por la empresa

Tabla 1: Principales características de las cepas de *Lentinula edodes*

Clave UNAM	Donador	Principales características
L5	I.Reid (Canadá)	Fructifican en medio PDA.
L9	T.S. Lee	Recomendadas por alta
L15	(Corea)	productividad
L18	R.L. Andrade	Comerciales de EUA, Virginia.
L19	(Querétaro)	
L20		
L21	Amycel	Comerciales de EUA, California.

Hongos Leben. Se empacaron 2 Kg de sustrato húmedo (54% de humedad) en bolsas de polipropileno/etileno (32x49 cm), provistas con un filtro de microporo (4x4 cm) ubicado a 13 cm de la orilla superior. Las bolsas con sustrato se esterilizaron en autoclave por 2 h a 121°C y 15 lb/in². El sustrato se enfrió a temperatura ambiente y se inocularon tres bolsas de sustrato para cada cepa, con inóculo de grano al 5%. Posteriormente las bolsas inoculadas fueron incubadas a 24°C durante 70 días. Las bolsas de sustrato invadidas con micelio fueron transferidas al cuarto de fructificación, la cuál se indujo mediante riegos (3 al día de 20 minutos), ventilación por dos horas con aire húmedo (una hora después de cada riego) e iluminación (12 h por día) (Ramírez & Leal, 2002). Con la producción de hongos frescos de cada bolsa se calculó la EB (g hongos frescos/100 g de sustrato seco) por brote y la EB acumulada.

Análisis estadístico. Con el análisis de varianza se detectaron diferencias (significativas o altamente significativas) entre las variables independientes. Cuando se encontraron diferencias se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan para identificar la variable que permitió obtener mayores rendimientos (Montgomery, 1994).

Resultados y discusión

No obstante que únicamente es posible obtener conclusiones válidas por medio del análisis estadístico, existen diferentes maneras de aplicar esta herramienta a los resultados experimentales (Robinson, 2000). La producción de 7 cepas de *L. edodes* (en 3 brotes) se interpretó considerando la eficiencia biológica total y se comparó con el parámetro del rendimiento máximo significativo.

Rendimiento máximo significativo. En la Tabla 2 se presenta la eficiencia biológica acumulada para las 7 cepas de *L. edodes* en 3 brotes de producción. Para identificar el brote donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo significativo (rms) se realizaron 2 análisis de varianza con los valores de producción de cada cepa. El análisis univariable consideró únicamente a los brotes como variable independiente, mientras que para el análisis multivariable, las variables independientes fueron brotes y repeticiones. La interpretación se realizó con el análisis de varianza donde se obtuvieron los valores más altos de $F_{calculada}$ para el factor brotes. El análisis univariable presentó un mayor valor de $F_{calculada}$ para las cepas L5, L9, L15 y L21, mientras que el análisis multivariable dio un mayor valor de $F_{calculada}$ para las cepas L18, L19 y L20 e indicó sólo para la cepa L20 diferencias altamente significativas entre las repeticiones (señalando que con la cepa L20 el número de repeticiones no fue suficiente). Para las cepas L18 y L21 el análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas entre los tres brotes, es decir el rendimiento máximo se obtiene en el primer brote. Para el resto de la cepas donde se observaron diferencias significativas entre los tres brotes, por medio de la prueba de Duncan se determinó que las cepas L5, L19 y L20 alcanzaron su rendimiento máximo al segundo brote y sólo las cepas L9 y L15 alcanzaron su rendimiento máximo al tercer brote, ya que se observaron incrementos significativos en los rendimientos de cada brote.

Una vez identificado el brote donde cada cepa alcanzó su rendimiento máximo, con estos valores fueron realizados nuevamente dos análisis de varianza, uno de tipo univariable (donde ahora las cepas fueron consideradas con la variable independiente) y otro de tipo multivariable (donde las variables independientes fueron cepas y repeticiones). El análisis de varianza multivariable fue el que presentó el mayor valor de $F_{calculada}$ para la variable cepas e indicó diferencias altamente significativas para las repeticiones. Por medio de la prueba de Duncan (Tabla 3), se identificó a la cepa L9 como la más productiva (grupo f) seguida de las cepas L15 (e) y L5 (d), L20 (c) y L21 (b), siendo las cepas L18 y L19 las menos productivas (grupo a).

Eficiencia biológica total. En la Tabla 3 también se presentan los valores correspondientes a la eficiencia biológica total (al tercer brote). Para su interpretación estadística se realizó nuevamente un análisis de tipo univariable, el cual consideró a las cepas como la

Tabla 2. Determinación del rendimiento máximo significativo de cada cepa de *L. edodes*.

Cepas	Eficiencia Biológica (EB) (g de hongos frescos /100 g de sustrato seco)		
	Brotos		
	1 ^{ro} .	2 ^{do} .	3 ^{ro} .
L18	29.6 ± 23 ^a	54.8 ± 25 ^a	63.6 ± 17 ^a
L21	53.6 ± 18 ^a	70.5 ± 11 ^a	78.2 ± 8 ^a
L19	4.6 ± 7 ^a	17.1 ± 0 ^b	24.0 ± 10 ^b
L20	44.8 ± 51 ^a	79.2 ± 31 ^b	83.5 ± 34 ^b
L 5	83.4 ± 7 ^a	130.5 ± 5 ^b	143.9 ± 11 ^b
L15	102.5 ± 6 ^a	151.2 ± 4 ^b	170.1 ± 10 ^c
L 9	138.9 ± 10 ^a	176.8 ± 6 ^b	261.3 ± 7 ^c

Brote con el rendimiento máximo estadísticamente significativo. Letras diferentes en una misma cepa indican diferencias significativas entre brotes de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

variable independiente y otro de tipo multivariable, donde las variables independientes fueron cepas y repeticiones. La interpretación se realizó con el análisis multivariable, el cual indicó que ambas variables presentaron un efecto altamente significativo. En experimentos futuros deberá por lo tanto incrementarse el número de réplicas. Con la prueba de rango múltiple de Duncan se identificó a la cepa L9 como la más productiva (grupo E), seguida de las cepas L15 (D) y L5 (C), mientras que las cepas L18, L20 y L21 se ubicaron en un solo grupo (B) y la cepa L19 fue la menos productiva (grupo A).

Tabla 3. Comparación de la producción de 7 cepas de *L. edodes* de acuerdo a la EB total y el rendimiento máximo significativo (g de hongos frescos /100 g de sustrato seco)

Cepas	Eficiencia biológica total		Rendimiento máximo significativo		Brote *
	\bar{x}	$\pm \sigma$	\bar{x}	$\pm \sigma$	
L19	24.0	± 10	17.1	± 0	^a 2 ^{do}
L18	63.6	± 17	54.8	± 25	^a 2 ^{do}
L21	78.2	± 8	53.6	± 18	^b 1 ^{ro}
L20	83.5	± 34	79.2	± 31	^c 2 ^{do}
L 5	143.9	± 11	130.5	± 5	^d 2 ^{do}
L15	170.1	± 10	170.1	± 10	^e 3 ^{ro}
L 9	261.3	± 7	261.3	± 7	^f 3 ^{ro}

Letras diferentes en cada parámetro indican diferencias significativas entre cepas de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

*Brote con el rendimiento máximo estadísticamente significativo

En la Tabla 3 también se presenta una comparación de la clasificación de las cepas usando la prueba de

Duncan, en función de la eficiencia biológica total y el rendimiento máximo significativo. Como se puede observar la clasificación de las cepas utilizando la eficiencia biológica total y el rendimiento máximo significativo es diferente, ya que con el primer parámetro sólo se obtienen 5 grupos y con el segundo parámetro 6 grupos. Es decir el rendimiento máximo significativo permite una mejor separación de las cepas en grupos estadísticamente diferentes y como ventaja adicional permite conocer el brote donde cada cepa alcanza su rendimiento máximo o tiempo óptimo de cosecha.

El parámetro del rendimiento máximo significativo es muy valioso para la producción comercial, no únicamente de *Lentinula*, sino de todos los hongos comestibles cultivados. Aumenta la productividad de la capacidad instalada ya que la duración de los ciclos de cultivo se reduce al mínimo número de semanas producción que se requieren para alcanzar la máxima producción de hongos. Se optimiza así el uso de las instalaciones y se reducen los costos de operación.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto IN208798) de la DGAPA, UNAM, asimismo agradecen a la empresa Hongos Leben, su apoyo en facilitar los sustratos y materiales necesarios para las evaluaciones realizadas.

Literatura citada

- Calvo-Bado, L.A, J.E. Sánchez-Vazquez, G. Huerta-Palacios, 1996. Cultivo de *Auricularia fuscusuccinea* (Mont.) Farlow sobre sustratos agrícolas en el Soconusco, Chiapas, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 9: 95-106.
- Montgomery, D.C., 1991. *Design and Analysis of Experiments*. 2nd ed. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Ramírez-Carrillo, R., H. Leal-Lara, 2002. Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. In: J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (eds.) *Proceedings of the IVth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Cuernavaca, México, 289-294.
- Robinson, G.K., 2000. *Practical Strategies for Experimenting*. Wiley. New York.
- Sánchez, J.E., D.J. Royse, G. Hernández, 2002. Development of non-composted substrates for production of *Agaricus bisporus*. In: J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (eds.), *Proceedings of the IVth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Cuernavaca, México, 265-270.
- Shen, Q., D.J. Royse, 2002. Crop cycle time, yield and quality of maitake *Grifola frondosa* as influenced by nutrient supplements. In: J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (eds.) *Proceedings of the IVth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Cuernavaca, México, 233-238.
- Tschierpe, H.J., K. Hartmann, 1977. A comparison of different growing methods. *Mushroom J.* 60: 404-416.

Villa Cruz, V., G. Huerta-Palacios, J.E. Sánchez-Vázquez, 1999.
Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the
cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* 12: 67-74.

Recibido: 10 de septiembre, 2002. Aceptado: 21 de mayo, 2003.
Solicitud de sobretiros: Rebeca Ramírez Carrillo.

IX CONCLUSIONES

DESDICARIOTIZACIÓN

- ◆ Las modificaciones realizadas a la técnica de desdicariorización que permitieron recuperar los dos componentes monocarióticos de las 7 cepas de *L. edodes* fueron la disminución del tiempo de maceración (150 segundos a de 5 - 30 segundos) y recuperación de neohaplontes en las tres etapas del proceso de desdicariorización.
- ◆ Para seis de las siete cepas evaluadas fue posible recuperar los dos monocarióticos en una proporción 1:1.

CLASIFICACIÓN DE LOS NEOHAPLONTES DE LAS CEPAS DE *LENTINULA* Y *PLEUROTUS* EN TIPOS DE COMPATIBILIDAD.

- ◆ A pesar de que las 7 cepas dicarióticas de *Lentinula* procedían de diferentes regiones del mundo, 6 de ellas presentaron dos tipos de compatibilidad idénticos (A_1B_1 y A_2B_2) y sólo los neohaplontes de la cepa L18 se clasificaron en tipos de compatibilidad diferentes (A_3B_3 y A_4B_4).
- ◆ La gran similitud en los tipos de compatibilidad en 6 de las cepas de *L. edodes*, no necesariamente indica que existe poca variabilidad genética en este género.
- ◆ Las 6 cepas monocarióticas de *Pleurotus* presentaron mayor variabilidad genética en su sistema de compatibilidad, debido a que fueron clasificadas en 4 diferentes tipos de compatibilidad.

APAREAMIENTO DE NEOHAPLONTES DE *LENTINULA* CON NEOHAPLONTES Y MONOCARIOTES DE *PLEUROTUS*.

- ◆ La similitud observada al obtener un tipo de compatibilidad idéntico entre los neohaplontes de *Lentinula* y las cepas monocarióticas de *Pleurotus* sugiere que muy probablemente existe una gran semejanza en su sistema de compatibilidad entre estos dos organismos pertenecientes a géneros distintos.
- ◆ El apareamiento de neohaplontes de *Lentinula* con neohaplontes y monocariotes de *Pleurotus* permitió la obtención de híbridos de tipo íter géneros, siendo así la desdicariorización un método muy apropiado para la obtención de híbridos entre diferentes géneros.
- ◆ El hallazgo observado de la compatibilidad de los neohaplontes de *Lentinula* con los monocariotes de *Pleurotus*, aunado al hecho de que se presentara un tipo de compatibilidad idéntico en ambos géneros, refuerza la idea de la existencia de una barrera adicional a los tipos de compatibilidad que es la que evita que en la naturaleza ocurran apareamientos exitosos al encontrarse fortuitamente micelios monocarióticos de *Lentinula* y *Pleurotus*

FRUCTIFICACIÓN DE LAS CEPAS HÍBRIDAS DE *PLEUROTUS* X *LENTINULA*, Y CEPAS PARENTALES DE *PLEUROTUS* Y *LENTINULA*

- ◆ De los 34 híbridos que fueron fructificados; 11 híbridos produjeron eficiencias biológicas mayores al 100% (103 a 161) y presentaron morfologías adecuadas para su producción comercial.
- ◆ La introducción del término de máximo rendimiento significativo (MRS) permitió identificar dentro del grupo de los once híbridos más productivos a seis híbridos precoces, los cuales presentaron altos rendimientos en un período de cosecha de 3 a 4 semanas.
- ◆ Los híbridos precoces representan material importante tanto para la producción comercial como para estudios de mejoramiento genético posteriores.
- ◆ La selección de cepas parentales de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* con altas eficiencias biológicas fue probablemente un factor de gran relevancia para la obtención de híbridos altamente productivos.

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE CONTROL DE COMPATIBILIDAD SEXUAL EN LA PROGENIE DE LOS HÍBRIDOS ÍTER GÉNEROS.

- ◆ La recuperación de los 4 tipos de compatibilidad en las progenies de tres híbridos en una distribución 1:1:1:1 confirma la fertilidad de los híbridos.
- ◆ Estos resultados también permiten confirmar que el sistema de compatibilidad heterotálico tetrapolar de las cepas parentales se mantiene y hereda en la progenie de los híbridos.

X APORTACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.

La modificación realizada en este trabajo a la técnica de desdicariorización permitió obtener los dos componentes monocarióticos de las siete cepas de *L. edodes*. Previo a esta investigación en el reporte de Arteaga-Santillán *et al.* (1996), el tiempo de homogeneización no fue modificado y como resultado sólo fue posible la desdicariorización de 3 de 9 cepas de *L. edodes* y para las 3 cepas desdicariorizadas en ese trabajo, sólo se recuperó un tipo de neohaplonte. Así la reducción del tiempo de maceración de 150 segundos a un intervalo entre 5 y 30 segundos permitió en este caso la desdicariorización de las 7 cepas de *L. edodes* y la recuperación de los dos componentes monocarióticos de todas las cepas evaluadas. El avance obtenido con la modificación de la técnica de desdicariorización permitirá realizar investigaciones relacionadas con el mejoramiento genético tanto del género *Lentinula*, como de otros hongos comestibles por medio de la desdicariorización de cepas que presenten características de interés para su uso en programas de mejoramiento genético.

La importancia de la desdicariorización de cepas de interés comercial de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* radica en que no sólo puede ser utilizada como un método para obtener sus componentes monocarióticos para emplearlos en programas de mejoramiento genético, sino que también los neohaplontes obtenidos pueden servir para la preservación de sus características genéticas intrínsecas. Para ello sería necesario evaluar tanto la eficiencia biológica, como el fenotipo de los dicariorotes regenerados a partir del apareamiento de los neohaplontes y si al compararlo con las cepas parentales no se encuentra diferencia significativa entre los dos tipos de dicariorotes, este método puede ser muy útil para la preservación de cepas de interés comercial. En la actualidad el método más común de preservación de cepas de interés comercial es la crío génesis (almacenamiento a bajas temperaturas por medio del uso de nitrógeno líquido), en donde se corre el riesgo de perder el vigor de las cepas (Salmones *et al.*, 2007).

El apareamiento de los neohaplontes de *L. edodes* con neohaplontes y monocariorotes de *P. ostreatus* dio como resultado la obtención de híbridos ínter géneros que por métodos clásicos de mejoramiento genético no ha sido reportado para los hongos comestibles. Esta técnica la hemos utilizado para la obtención de híbridos ínter especie de manera exitosa (Valencia del Toro *et al.*, 2007). Sin embargo, este es el primer reporte donde es posible obtener híbridos de tipo ínter géneros, lo cual abre la posibilidad de realizar programas de mejoramiento genético para obtener cepas con características novedosas y de interés para la industria productora de hongos comestibles.

Los resultados de eficiencia biológica obtenidos para las cepas parentales de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y las cepas híbridas fueron utilizados para encontrar un parámetro que permitiera identificar con métodos estadísticos el tiempo óptimo de cosecha para cada cepa evaluada. Así el máximo rendimiento significativo (MRS) nos permitió conocer la semana de cosecha en donde se obtiene el máximo rendimiento. Este valor es de gran utilidad para los productores, ya que nos indica el tiempo óptimo de cosecha para cada cepa, con lo cual se evitará prolongar la etapa de cosecha sin redundar en un beneficio económico para el productor. Como se sabe la producción de hongos comestibles es una actividad que requiere de altas inversiones de capital sobre todo en las áreas relacionadas con la fase productiva por lo que un uso ineficiente de

estas áreas resulta en bajas muy cuantiosas en la rentabilidad de la operación, por ello la importancia de identificar para cada cepa el tiempo óptimo de cosecha (MRS). A nivel de investigación el MRS también nos permite identificar cepas precoces, es decir que producen altos rendimientos en cortos periodos de producción (3 a 5 semanas), las cuales se pueden utilizar en programas de mejoramiento genético. El RMS fue un parámetro que se aplicó a todas las cepas evaluadas en la etapa de producción y que previamente no había sido reportado para la producción de hongos comestibles.

Finalmente, si bien las cepas híbridas obtenidas cumplieron con el objetivo general del proyecto, no fue posible obtener cepas con las características morfológicas del género *Lentinula* y fisiológicas del género *Pleurotus*. Sin embargo, el material obtenido representa una nueva fuente de cepas para los productores de género *Pleurotus*, con algunas características novedosas como son: estípites menos correosos, con un ligero aroma y sabor del género *Lentinula*; faltaría por estudiar si los híbridos inter género heredaron algunas de las propiedades medicinales del género *Lentinula*.

XI BIBLIOGRAFÍA

- Arias A., R. Ramírez, H. Leal. 2000. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* hybrids resistant to 2DG obtained by pairings of neohaplonts from selected dikaryons *Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*, Van Griensven (Ed.), 1: 305 -309.
- Bruhn, J.N., J.D. Mihail. 2009. Forest farming of shiitake mushrooms: Aspects of forced fruiting *Bioresource Technology* 100 (23): 5973-5978.
- Bruhn, J.N., J.D. Mihail, J.B. Pickens. 2009. Forest farming of shiitake mushrooms: An integrated evaluation of management practices. *Bioresour Technology*; 100 (24): 6472-6480.
- Chang, S.T. 2000. *Edible Mushroom and their cultivation*. CRC Press. 1a ed United States. 205-215.
- Chang, S.T., P.G. Miles. 2004. *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*. CRC Press, Boca Raton, 451.
- Chiu, S. W., Wang, Z. W., Yip, M. L., Leung, T. M., Lin, F. C. & Moore, D. 1998. Genetic diversity in a natural population of shiitake (*Lentinula edodes*) in China. In: *6th International Mycological Congress*, Jerusalem, Israel. Abstract, 34.
- Declaire, J.R. 1978. In: *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Ed. Chang S.T. & W. A. Hayes, Academic Press, Nueva York.
- Dhitaphichit, P., C. Pornsuriya. 2005. Protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *P. djamor Songklanakar* *J. Sci. Technol.*, 27(5): 975-982.
- Fox, H. M., J. Burden, S. T. Chang, J. F. Peberdy. 1994. Mating tape incompatibility between commercial strains of *Lentinula edodes*. *Experimental Mycology*, 18 (2): 95-102.
- Fritsche, G. 1983. Breeding *Agaricus bisporus* at the Mushroom Experimental Station. *Horst Mushroom J.* 122: 49-54.
- 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-Hernández, R. 2005. Evaluación *in vitro* del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología* 21: 77-84.
- Gaitán-Hernández, R. 2007. Transferencia de tecnología de cultivo de *Pleurotus* spp. como alternativa de beneficio social y económico en el estado de Veracruz. En : *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. J.E. Sánchez Vázquez, D. Martínez Carrera, G. Mata, H. Leal. (eds). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula. México. ISBN: 978-970-9712-40-7, 101-112.
- Gaitán-Hernández, R., D. Salmones, R. Pérez-Merlo, G. Mata. 2002. Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, Xalapa. 56 pp.
- Kim, C., E.C. Choi, B.K. Kim, 2000. Generation of nuclear hybrids overcoming the natural barrier of incompatibility: Transfer of nuclei from *Lentinula edodes* into protoplasts of *Coriolus versicolor*. *Archives of Pharmacal Research*, 23 (1): 79-86.
- Larraya, L., M.M. Peñas, S.P.G. Cruz, E. Titter, G.A. Pisabarro, L. Ramírez. 1999. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to a incompatibility locus in white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 34: 486-493.
- Leal-Lara, H. 1980. Sporelessness in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. A genetical study by means of a new dikaryotization method. *Tesis doctoral*. Universidad de Phillips, Alemania.
- Mancera, A. E., R. Ramírez, H. Leal. 1999. Selección de híbridos acelulolíticos de *Pleurotus ostreatus* de alto potencial para el cultivo comercial. *Memoria del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, M. Quirarte. 1986. Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Mex. Mic.* 2: 227-238.
- Mata, G., D. Salmones. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 15: 23-29.

- Mayett, Y., D. Martínez Carrera, M. Sánchez, A. Macías, S. Mora, A. Estrada. 2006 Consumption trends of edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing* 18: 151-176.
- Navarro, M., M. Sobal, L. Acosta-Urdapilleta. 1996. Estudio comparativo de algunos híbridos de *Pleurotus ostreatus* en Morelos, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 9: 117-124.
- Peralta Márquez, H., I. Frutis Molina. 2010. Cultivo de *Lentinula edodes* utilizando paja de trigo pasteurizada y suplementada. En: *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. Martínez Carrera, D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, V.M. Mora (eds).. Red Latinoamericana de hongos comestibles y medicinales: producción, desarrollo y consumo: 169-174.
- Pérez-Merlo, R., G. Mata. 2005. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. *Revista Mexicana de Micología* 20: 53-59.
- Pérez-Silva, E. 1978. Les champignons comestibles du Mexique. *Mushroom Science* 10: 589-596.
- Ramírez Carrillo R., H. Leal Lara, 2001-2003. El rendimiento máximo significativo para el análisis estadístico de la producción de *Lentinula edodes* en sustrato comercial de aserrín. *Rev. Mex. Mic.* 17: 7-10.
- Ramírez Carrillo, R., H. Leal Lara, 2002. Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. In: *Mushroom biology and mushroom products*, Sánchez et al. (eds). UAEM. ISBN: 968-878-105-3, 289-294.
- Ramírez Carrillo, R., O. Hernández Vargas, F. Galván Pallach, H. Leal Lara, 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, Tapachula México. ISBN: 978-970-9712-40-7, 55-64.
- Ramírez-Carrillo, R., H. Leal Lara, 2002. Symmetric recovery of monokaryotic components from *Lentinula edodes* using dedikaryotization. In: *Mushroom biology and mushroom products*, Sánchez et al. (eds). UAEM. ISBN: 968-878-105-3, 141- 149.
- Royse, D.J. 2001 *Cultivation of Shiitake on natural and synthetic logs*. Pen State College of Agricultural Science Agricultural Research and Cooperative Extension , Pennsylvania, USA.
- Royse, D.J., J.E. Sánchez-Vázquez. 2000. Influence of wood chip particle size used in substrate on biological efficiency and post-soak log weights of shiitake. In: *Maher (ed.). Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam, 367-373.
- Salmones, 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.
- Salmones, D., G. Mata, K. Waliszewski. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate degradation. *Bioresource Technology* 96: 537-544.
- Salmones, D., G. Mata, R. Gaitán. 2007. Aportaciones del sector académico en la producción de inóculo de *Pleurotus* spp. En: *El cultivo de setas Pleurotus spp en México*, Sánchez et al. (eds). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula México. ISBN: 978-970-9712-40-7. 41-44.
- Shen, Q., P. Liu, X. Wang, D. J. Royse. 2008. Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosity on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Bioresource Technology* 99: 8212-8216.
- Silva, E.M., A. Machuca, M. Milagres. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry* 40; 161-164.
- Sonnenberg, A.S.M, J.P Baars, P.M Hendrickx, R.W. Kerrigan. 2005. Breeding mushroom: state of the art. In: Tal et al., (eds). *Fifth Conference on mushroom biology and mushroom products. Acta Edulis Fungi*. Vol 12, Shangai Xinhua Printing Co., Ltd., 163-173.
- Tokimoto, K., M. Komatsu, T. Takemaru. 1973. Incompatibility factors in the natural population of *Lentinus edodes* in Japan. *Rep Tottori Mycol. Inst. (Japan)* 10, 371-376
- Tokimoto, K., K. Hsebe, M. Komasuto. 1978. Studies on dedikaryotization of *Lentinus edodes* (berk.) sing. I. Induction of dedikaryotization by fall powder. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 16: 66-72.

- Valencia del Toro, G., H. Leal-Lara. 2002. Fruit body color in *Pleurotus ostreatus* spp. hybrid strains obtained by matings of compatible neohaplonts. In: *Mushroom biology and mushroom products*, Sánchez *et al.* (eds). UAEM. ISBN: 968-878-105-3), 151- 159.
- Valencia del Toro, G., M. Tepechco, R. Ramírez, H. Leal. 2007. Productividad de cepas híbridas coloridas del género *Pleurotus*. En: *El cultivo de setas Pleurotus spp en México*, Sánchez *et al.* (eds). El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula México. ISBN: 978-970-9712-40-7. 45-53.
- Velázquez-Cedeño, M.A., G. Mata, J.M. Savoie. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 201-207.
- Volgel, F., D. Salmenes. 2000. Análisis comparativo de la producción de cepas de *Pleurotus* cultivadas en una planta comercial. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 138-141.
- Worrall, J.J. 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* 89 (1): 24-36.