



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

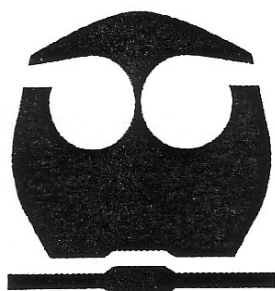
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE DICARIOTES DE CEPAS CON GRANDES
ESPORÓFOROS DEL HONGO COMESTIBLE *Lentinula edodes*
(shiitake)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

VALENTINA IOCASTA ANDRADE CHAVARRÍA



MÉXICO, D. F.

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. El hongo shiitake.	5
2.2. Descripción general.	6
2.3. Habitat.	6
2.4. Ciclo de vida.	7
2.5. Sistemas de compatibilidad sexual	9
2.6. Nutrición.	11
2.7. Propiedades terapéuticas.	12
• Efecto antitumoral.	12
• Efecto antiviral.	13
• Efecto antibacterial.	14
• Efecto hepatoprotectivo.	14
• Efecto cardiovascular.....	14
2.8. Historia del desarrollo del cultivo.	15
2.9. Técnicas de cultivo.	16
• Cultivo en troncos naturales.	16
• Cultivo artificial (aserrín).	17
2.10. Optimización de producción.	18
• Producción de sustratos. 1.....	19
• Control de condiciones ambientales.	19
• Cepas mejoradas.	20
2.11. Panorama mundial	20
2.12. Panorama nacional	22
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	24
3.1. Justificación.	24
3.2. Objetivo general.	26
3.3. Objetivos particulares.	26
4. HIPÓTESIS.	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
5.1. Secuencia experimental.	28
5.2. Material biológico.	28
5.3. Medio de cultivo agar extracto de malta (EMA).	31
5.4. Desarrollo micelial en medio agar extracto de malta (EMA).	31
5.5. Condiciones para producción de esporóforos de <i>Lentinula edodes</i> en sustratos de aserrín.....	31
5.5.1. Preparación de inóculo de grano o spawn (trigo).	31
5.5.2. Preparación del sustrato	32
5.5.3. Inoculación y fructificación	34
5.6. Recuperación de progenies meióticas.	35

5.7.	Clasificación de progenie meiótica en tipos de compatibilidad.	37
5.7.1.	Diferenciación de los grupos parentales y no parentales.	38
5.8.	Fructificación de dicariotes progenie, cepas parentales y reconstituidas.	39
5.8.1.	Determinación de parámetros productivos y análisis estadístico de datos.	39
6.	RESULTADOS.	40
6.1.	Aislamiento y clasificación de la progenie meiótica de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	41
6.2.	Identificación de los grupos parentales y no parentales de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	45
6.3.	Criterios para la selección de los dicariotes a fructificar en las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	48
6.4.	Fructificación de dicariotes progenie, parentales y reconstituidos de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	56
6.4.1.	Rendimiento semanal de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	57
6.4.2.	Producción semanal de esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	58
6.4.3.	Peso unitario de esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	60
6.4.4.	Evaluación estadística de diferentes parámetros de producción de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	63
6.5.	Morfología de los esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> .	67
7.	DISCUSIÓN.	72
7.1.	Progenie meiótica y clasificación.	73
7.2.	Relación de morfología micelial respecto a la producción.	75
7.3.	Parámetros de producción y morfología de esporóforos.	77
8.	CONCLUSIONES.	81
9.	PERSPECTIVAS.	82
10.	GLOSARIO.	84
11.	BIBLIOGRAFÍA.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema general de las partes de un hongo (Cho, 2004).	6
Figura 2.2: Fotografía de shiitake cultivado en tronco (www.essencefunghi.com).	7
Figura 2.3: Ciclo de vida de Lentinula edodes (Curtis & Barnes, 2000).	9
Figura 2.4: Cultivo controlado de Lentinula edodes en troncos (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).	17
Figura 2.5: Cultivo artificial (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).	18
Figura 5.1: Colonias de shiitake en medio agar extracto de malta (EMA).	28
Figura 5.2: Secuencia experimental.	29
Figura 5.3: Inóculo de trigo invadido por el micelio de Lentinula.	32
Figura 5.4: Inoculación de bolsas de sustrato con inóculo de trigo invadido.	34
Figura 5.5: Despunte del micelio durante la incubación de las bolsas inoculadas.	35
Figura 5.6: Esporóforos cosechados de Lentinula edodes.	35
Figura 5.7: Crecimiento de colonias para el aislamiento de monocariotes en el medio EMA.	36
Figura 5.8: Presencia de fíbulas en una muestra de micelio de Lentinula edodes visto al microscopio.	37
Figura 6.1: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L18 de Lentinula edodes.....	50
Figura 6.2: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L19 de Lentinula edodes.....	52
Figura 6.3: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L20 de Lentinula edodes.....	55
Figura 6.4: Esporóforos aberrantes de los dicariotes (L18-2/L18-3) y (L19-50/L19-64).57	
Figura 6.5: Paquete de shiitake comercializado por “Hongos Leben”.	70
Figura 6.6: Comparación entre los esporóforos de la cepa comercial y esporóforos de la cepa nueva del dicariote (L20-62/L20-79).	71
Figura 6.7: Esporóforos de shiitake dicariotes: L18-40/L18-59 (1), L19-16/L19-28 (2), L20-39/L20-42(3) y L20-62/L20-79(4).	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Valor alimenticio de <i>Lentinula edodes</i> en comparación con otros alimentos (g / 100 g peso fresco).	12
Tabla 2.2: Actividad biológica de algunos compuestos encontrados en shiitake.	13
Tabla 2.3: Precios aproximado de Shiitake fresco en diferentes países.	22
Tabla 5.1: Principales características de los dicariotes parentales L18, L19 y L20 de <i>Lentinula edodes</i> (Ramírez & Leal, 2002).	30
Tabla 5.2: Neohaplontes de los dicariotes parentales de <i>Lentinula edodes</i> .	30
Tabla 5.3: Composición en base seca del sustrato para fructificar (g/100g de sustrato).	33
Tabla 6.1: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L18.	42
Tabla 6.2: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L19.	43
Tabla 6.3: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L20.	44
Tabla 6.4: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L18.	46
Tabla 6.5: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L19.	47
Tabla 6.6: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L20.	47
Tabla 6.7: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L18.	48
Tabla 6.8: Características de las colonias dicariotes de la cepa L18.	49
Tabla 6.9: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L19.	51
Tabla 6.10: Características de las colonias dicariotes de la cepa L19.	53
Tabla 6.11: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L20.	53
Tabla 6.12: Características de las colonias dicariotes de la cepa L20.	54
Tabla 6.13: Contenido de humedad de lotes de sustrato.	56
Tabla 6.14: Rendimiento semanal (g esporóforos frescos / 100g sustrato seco).	59
Tabla 6.15: Rendimiento semanal acumulado (g esporóforos frescos / 100g sustrato seco).	59
Tabla 6.16: Producción semanal (esporóforos frescos / 2kg sustrato).	61
Tabla 6.17: Producción semanal acumulada (esporóforos frescos / 2kg sustrato).	61
Tabla 6.18: Peso unitario semanal (g esporóforos / número esporóforos frescos).	64
Tabla 6.19: Peso unitario semanal acumulado (g esporóforos / número esporóforos frescos).	64
Tabla 6.20: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L18 en el rendimiento máximo significativo (RMS).	65
Tabla 6.21: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L19 en el rendimiento máximo significativo (RMS).	66
Tabla 6.22: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L20 en el rendimiento máximo significativo (RMS).	66
Tabla 6.23: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L18.	68
Tabla 6.24: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L19.	69

Tabla 6.25: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L20.	69
Tabla 6.26: Características morfológicas de los cuerpos fructíferos de la cepa comercial.....	70

RESUMEN.

Lentinula edodes (shiitake) es un hongo comestible muy demandado por su potencial nutracéutico. Ha sido incluido en compuestos experimentales contra el cáncer, SIDA y enfermedades cardiovasculares. Nutricionalmente es una buena fuente de proteínas (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).

Pertenece a la división de los Basidiomicetos que se reproducen sexualmente por unión de dos hifas haploides, dando por resultado un micelio dicariótico, que al madurar y encontrar condiciones ambientales adecuadas forma cuerpos fructíferos donde ocurre la meiosis. (Cho, 2004). Al fusionarse los núcleos, acontece la recombinación genética originando de nuevo el estado haploide en las esporas. La recombinación genética promueve la variabilidad genética, ayudando al hongo a adaptarse a cambios en la naturaleza y por ello, puede dar origen a cepas con nuevas características (Valencia, 2002).

En este trabajo se fructificaron tres cepas parentales de *Lentinula edodes* (L18, L19 y L20), así como sus respectivas colonias reconstituidas y dos dicariotes por cepa obtenidos a partir de las progenies meióticas respectivas. Se evaluaron diferentes parámetros de producción y la morfología de los esporóforos debido al interés que representa una cepa para los productores, por su buen rendimiento y características de esporóforos agradables al consumidor.

La progenie meiótica (micelio monocariótico) se recuperó a partir de esporadas frescas obtenidas de los cuerpos fructíferos de las 3 cepas parentales. Por medio de apareamientos, la progenie meiótica se clasificó en los cuatro tipos de compatibilidad (I, II, III y IV), usando los neohaplontes respectivos de cada cepa dicariótica, se identificaron los tipos parentales y no parentales. Se seleccionaron dos dicariotes por cada cepa y se llevaron a fructificar simultáneamente con las cepas parentales y reconstituidas. Con los datos de producción durante 10 semanas de cosecha se compararon parámetros de producción y características morfológicas obtenidas entre los dicariotes parentales, reconstituidos y los dicariotes obtenidos de la progenie meiótica.

Se obtuvieron dicariotes con características diferentes respecto a las cepas parentales, tanto en morfología como en producción. Algunos de los cambios observados fueron en el color de los esporóforos de café oscuro a un tono amarillento o bien un incremento en el número o tamaño de los esporóforos o en el rendimiento.

INTRODUCCIÓN.

La producción mundial de los hongos comestibles cultivados ha aumentado considerablemente en los últimos años. El cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinula edodes*) y setas (*Pleurotus ostreatus*) domina con más del 50% la producción mundial (Chen, 2004). En México existe una situación similar sin embargo la producción y demanda de shiitake no esta tan arraigada como la del champiñón y la seta.

En la ultima década se han incrementado los estudios sobre las propiedades medicinales de los hongos comestibles pertenecientes a la división de los basidiomicetos, evaluando sus efectos “in vivo” e “in vitro” con distintos modelos. Con éstos estudios se han identificado algunas sustancias activas que poseen cualidades farmacológicas estimulantes del sistema inmunológico (Wasser, et al, 2002).

Dentro de los hongos comestibles, *Lentinula edodes* (shiitake) es cada vez más demandado por su potencial nutraceútico. Ha sido incluido en compuestos experimentales contra el cáncer y el SIDA, así como en enfermedades de tipo cardiovascular. Nutricionalmente es una buena fuente de proteínas así como de vitaminas del complejo B, principalmente la B12, que se encuentra comúnmente en productos animales (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).

Introducción

Shiitake (*Lentinula edodes*), pertenece a la división de los basidiomicetos que se reproducen sexualmente. Esto, se realiza por la unión de dos hifas haploides, provenientes de 2 esporas compatibles, dando por resultado un micelio dicariótico. Cuando las condiciones lo permiten y el micelio esta maduro, se fusionan los núcleos e inmediatamente después ocurre la meiosis, proceso en el cual se lleva a cabo la recombinación genética dando origen nuevamente, al estado haploide en las esporas resultantes (Curtis & Barnes, 2000, Cho, 2004).

La recombinación genética promueve la variabilidad, lo que ayuda al hongo a adaptarse a cambios en la naturaleza. Este comportamiento es indeseable en la comercialización de cepas, porque se desea conservar las características de éstas (Cho, 2004). Por otro lado, la recombinación, puede dar origen a cepas con mejores o peores características.

2. ANTECEDENTES.

2.1. El hongo shiitake.

Su nombre científico es *Lentinula edodes*. *Lentinula* viene de “lentis” por la forma convexa de una lente, similar al píleo y *edodes* se refiere a la naturaleza comestible de los hongos de esta especie (Staments & Chilton, 1983).

El nombre mas popular es shiitake, pero también se le conoce como hongo negro japonés u hongo negro chino. El nombre shiitake viene de la asociación del crecimiento de este hongo en el árbol conocido por el nombre de “shiia” (*Castanopsis cuspidata*) y “take” significa “hongo de”. El nombre chino es “xiang-gu” y significa hongo fragante. En Francia es llamado lectin (Chen, 2005).

Shiitake es un hongo comestible de la división de los *basidiomicetos* del reino Fungi. Los hongos de esta rama son organismos pluricelulares, heterótrofos, es decir, obtienen sus alimentos por absorción de nutrientes que no pueden sintetizar. Microscópicamente están constituidos por el talo (cuerpo vegetativo) que en la mayoría de los hongos es filamentoso. Estos filamentos delgados son llamados hifas, las cuales presentan crecimiento apical y en conjunto integran el micelio. El micelio está representado por una masa de apariencia algodonosa y por lo regular blanquecina que se localiza por debajo del mantillo o capas externas del suelo en los bosques (Herrera & Ulloa, 1990).

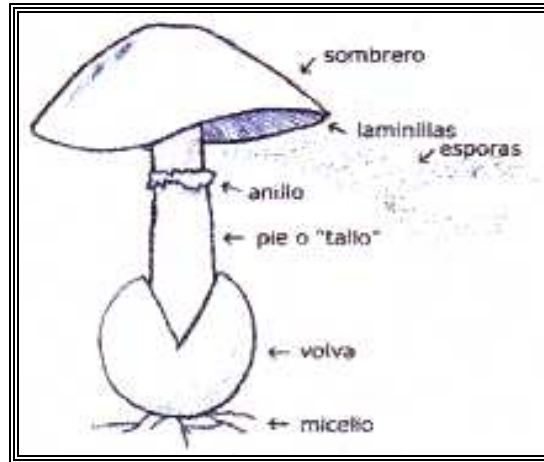


Figura 0.1: Esquema general de las partes de un hongo (Cho, 2004).

2.2. Descripción general.

Es un hongo con píleo o sombrero que va de pálido a oscuro en color café rojizo, de forma convexa volviéndose más amplio con el paso del tiempo, la orilla del píleo se encuentra enrollada cuando es joven. Su consistencia es firme y flexible, se seca y rehidrata con facilidad. Las laminillas son blancas, de cerradas a apretadas, frecuentemente con bordes dentados. El estípite o tallo se encuentra centrado en el píleo, es corto, muy resistente y está adornado con restos fibrosos dispersos del velo parcial. Las esporas son blancas (Staments & Chilton, 1983).

2.3. Habitat.

Lentinula edodes es un degradador de maderas, muy común en la muerte de tejidos de árboles de hojas caducas, sobretodo de la familia *Fagaceae* (roble, shiia, castaños y haya). En la naturaleza se desarrolla perfectamente en el roble y fructifica al degradar el árbol colonizado al inicio del invierno y la primavera. Shiitake es una especie original de la región asiática de Indo-China y Japón, aunque puede desarrollarse en cualquier tipo de clima, siempre que la temperatura no sea menor a cero grados centígrados (Herrera & Ulloa, 1990; Hawksworth, 1997).



Figura 0.2: Fotografía de shiitake cultivado en tronco (www.essencefunghi.com).

2.4. Ciclo de vida.

Los hongos pasan la mayor parte de su vida en forma de micelio, digiriendo, absorbiendo y almacenando nutrientes para la fructificación (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990). Los hongos de la división de los basidiomicetos que se

reproducen sexualmente como shiitake, pasan por tres fases en el desarrollo del micelio:

- (a) El primario, se origina de la germinación de la espora y esta constituido por células monocarióticas o haploides.

- (b) El secundario, se produce por la plasmogamia o fusión de dos células compatibles del micelio primario dando origen a la convivencia de los dos núcleos en un citoplasma común, estadio conocido como fase o micelio dicariótico. La formación de hifas es importante para el establecimiento del micelio dicariótico.

- (c) El terciario surge a partir del micelio secundario y es característico de la fase de reproducción, en donde el micelio se organiza en tejidos especializados para formar los cuerpos fructíferos cuando se cuenta con estímulos del medio ambiente. En esta tercera etapa se lleva a cabo la meiosis o división nuclear en el cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide ($2n$) al haploide ($1n$). Por medio del proceso sexual, ocurre la recombinación genética y la segregación (Valencia, 2002).

La segunda y tercera etapas ocurren casi de manera inmediata en células especializadas, los basidios, que se encuentran en las láminas de los cuerpos

fructíferos. Los núcleos haploides, producto de la meiosis, emigran adentro de una tétrada de basidiosporas en la parte externa del basidio, para finalmente ser liberadas (Valencia, 2002).

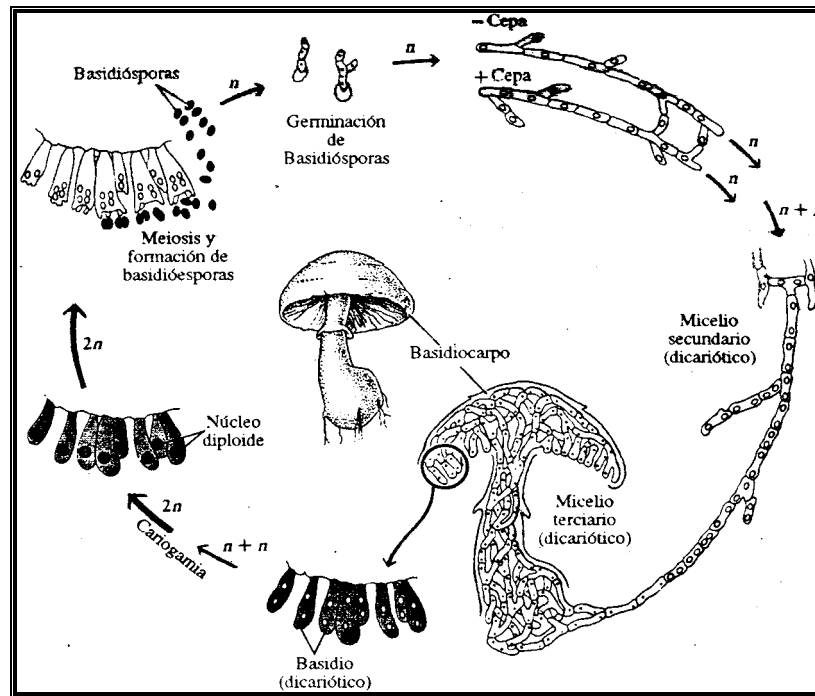


Figura 0.3: Ciclo de vida de *Lentinula edodes* (Curtis & Barnes, 2000).

Si los monocariotes son compatibles ocurre la migración nuclear después de la fusión celular. Cuando los dos núcleos se encuentran dentro de una sola hifa forman el micelio dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos (Valencia, 2002).

2.5. Sistemas de compatibilidad sexual.

Los basidiomicetos pueden presentar reproducción asexual u homotálica (10%) y sexual o heterotálica (90%). Del 90% que presentan reproducción sexual, el 25% tiene compatibilidad bipolar y el resto (65%) es tetrapolar, en este grupo está clasificado *Lentinula edodes* (Valencia, 2002).

Shiitake presenta un sistema de compatibilidad conocido como heterotálico tetrapolar. El heterotalismo consiste en el apareamiento entre dos micelios homocarióticos diferentes para completar el ciclo sexual, el comportamiento tetrapolar quiere decir que hay 4 diferentes tipos de compatibilidad en las esporas de la progenie meiótica, los cuales son compatibles entre sí sólo en ciertas combinaciones.

La compatibilidad tetrapolar depende de dos factores, que se denominan A y B, y se encuentran situados en los pares de cromosomas homólogos,. Cada núcleo del micelio dicariótico contiene un par de genes alelos, que controlan el mismo tipo de carácter. De esta manera, los genes que determinan la compatibilidad, se presentan en posición idéntica con respecto a su cromosoma homólogo formándose así parejas de genes ($A_m A_n$ y $B_o B_p$) en dichos cromosomas. En el sistema de compatibilidad tetrapolar, sólo es fértil la unión sexual en la que se reúnen cuatro alelos diferentes para formar un micelio heterocigoto, por ejemplo:

$A_1A_2B_1B_2$ (Herrera & Ulloa, 1990). En la meiosis, los núcleos se fusionan y partiendo de los genotipos parentales A_1B_1 y A_2B_2 , es posible obtener esporas:

- a) Con 4 diferentes tipos de factores A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 .
- b) O con solo 2 tipos de factores:
 - i. A_1B_1 , A_2B_2 , A_2B_2 y A_1B_1 o
 - ii. A_1B_2 , A_2B_1 , A_2B_1 y A_1B_2 .

Lo anterior se debe a que el arreglo de caracteres depende del arreglo cromosómico durante la meiosis y de que ocurra entrecruzamiento de un par o de ambos pares de cromosomas (Alexopoulos & Mims, 1985).

En la fusión de los núcleos con genotipos A_1B_1 y A_2B_2 , después del proceso de meiosis la segregación de la compatibilidad se encuentra en una relación 1:1:1:1, en donde se obtienen A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 , al aparear estos tipos en todas las combinaciones posibles, únicamente el 20% de los híbridos serán fértiles, es decir producirán cuerpos fructíferos y basidiosporas (Carlile & Walkins, 1997; Valencia, 2002).

2.6. Nutrición.

Los hongos comestibles se han convertido, en alternativas nutricionales debido a su porcentaje de proteínas, respecto a los vegetales, cantidad de fibra (~1%) y bajo contenido de grasas como puede observarse en la **Tabla 2.1** (Quimio, 2004; Kwon & Hobbs, 2005; Lee, 2006).

Posee un porcentaje de proteína casi igual al del maíz, leche y legumbres pero más bajo que la carne y huevo. Contiene todos los aminoácidos esenciales principalmente lisina y arginina, es deficiente en metionina y fenilalanina. (Bisko, et al, 2002; Cho, 2004).

Tabla 2.1: Valor alimenticio de *Lentinula edodes* en comparación con otros alimentos (g / 100 g peso fresco).

Alimentos	<i>Lentinula edodes</i>	Papa	Leche	Pescado	Huevo	Carne	Zanahoria
Proteína	7.5	2	3.5	14-20	13	21	1.2
Carbohidratos	6.5	9.1	4.9	2-3	2	-	9.3
Grasas	0.93	0	3.9	1-2	13.3	3.6	0.3
Calcio	3	11	118	15	68	8.3	39
Niacina	7.6	0.04	0.17	1.2	0.27	29	0.06
Hierro	1.9	0.7	0.1	1.5	1-15	2.52	0.8

Fuente: Mushroom Growers. Handbook 1: Oyster mushroom cultivation

Shiitake posee varias vitaminas pero es deficiente en vitaminas A y C. Sobresale en su contenido de niacina (B3) comparable con el de la carne de puerco. Contiene también cianocobalamina (B12) que se encuentra comúnmente en productos de origen animal y es sintetizada por las bacterias del tracto digestivo. Los minerales presentes en mayor proporción son hierro, potasio, aunque también es fuente de calcio y sodio. (Kwon & Hobbs, 2005).

2.7. Propiedades terapéuticas.

En los últimos 20 años ha aumentado el interés en los aspectos medicinales de los hongos. Los científicos han aislado e identificado compuestos específicos

que pueden destruir o debilitar el cáncer, enfermedades cardiovasculares y el SIDA (Quimio, 2004), los compuestos más estudiados se resumen en la **Tabla 2.2**.

- **Efecto antitumoral.**

Lentinan es un compuesto aislado de shiitake que estimula las células T, importantes para el funcionamiento del sistema inmunológico. Cuando se administró lentinan a pacientes con cáncer en tratamiento con quimioterapia, se observó que disminuía el tamaño de los tumores y en los que no recibían quimioterapia prolongaba su vida (Jong, 2001; Yap, 2004; Kwon & Hobbs, 2005; Lee, 2006).

Tabla 2.2: Actividad biológica de algunos compuestos encontrados en shiitake.

Compuesto	Efecto	Tipo de compuesto	Actividad
Lentinan	Antitumoral, antiviral, antibacterial	Cadena de glucosas unidas por enlaces β -(1,3)-D-glucano	Estimula el sistema inmunológico
Eritadenina	Antiviral y reductor de colesterol	Derivado de la adenina	Acelera el metabolismo y excreción del colesterol
KS-2	Antitumoral	Complejo α -manano péptido	Inhibe el crecimiento tumoral
LEM (Extracto de micelio de <i>L. edodes</i>)	Hepatoprotectivo	Proteínas, azúcares, pectinas, vitaminas y derivados de ácidos nucleicos	Inactiva al virus
JLS y JLS-18	Antiviral	Lignina, polisacáridos y proteínas	Inhibe virus (Herpes)
EPS y EPS4	Antiviral	Ligninas solubles	Inhibe la replicación de virus

Fuente: Shiitake growers handbook.

- ***Efecto antiviral.***

En el tratamiento contra el SIDA, se ha observado que la lentinan activa las células T y potencia el efecto del medicamento administrado (AZT), que actúa sobre la replicación del virus (Jong, 2001; Yap, 2004; Kwon & Hobbs, 2005). Respecto al virus del Herpes simplex, se ha visto que varios compuestos de shiitake actúan sobre él bloqueando la infección, entre ellos se encuentra el JLS, JLS-18, EPS y EPS 4. Los 2 últimos también son efectivos para el tratamiento de la encefalitis equina, polio, sarampión, paperas y SIDA (Kwon & Hobbs, 2005; Lee, 2006).

- ***Efecto antibacterial.***

Cuando se administró lentinan en 3 pacientes con tuberculosis pulmonar que presentaban *Mycobacterium tuberculosis* resistente, se observó que después del tratamiento cesó la excreción de éste (Jong, 2001; Kwon & Hobbs, 2005).

- ***Efecto hepatoprotectivo.***

En un estudio realizado a 40 personas con hepatitis crónica, se administró por vía oral 6 gramos de LEM diariamente durante cuatro meses. Los síntomas de la hepatitis B se aliviaron y el virus se inactivó (Jong, 2001; Kwon & Hobbs, 2005).

- ***Efecto cardiovascular.***

La eritadenina demostró disminuir los niveles de colesterol en 7%, en un estudio practicado a mujeres jóvenes japonesas cuando éstas incluían en su dieta el consumo de 9 gramos de shiitake fresco durante 7 días. En otro grupo se incluyó el consumo de 90 gramos de shiitake fresco durante 7 días, los niveles de

disminución del colesterol aumentaron a 14%. Por otra parte otro estudio en personas de 60 años o más demostró que el nivel de colesterol decrecía al 9% al incluir el shiitake en la dieta diaria ya fuese seco o fresco (Jong, 2001; Kwon & Hobbs, 2005; Lee, 2006).

2.8. Historia del desarrollo del cultivo.

El shiitake tiene su origen en los países orientales, el primer vestigio de su existencia data del 199 A. D. en Japón, donde se brindaba al emperador Chuai por los nativos de Kyushu, que lo recolectaban en su estado silvestre. El cultivo controlado se originó en China en la Dinastía Sung (960 – 1127) por Wu San Kang, en 1100 A. D., quien buscaba y colectaba los hongos silvestres para alimentarse. Observó que crecían en los troncos de los árboles quebrados y si los golpeaba provocaba que más hongos brotaran (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).

En 1936, en Japón, Kitayama practicó el uso de cultivos puros de micelio en la inoculación de los troncos, basándose en las publicaciones del micólogo japonés Shozaburo Mimora quien desarrollo dicha técnica entre el período de 1904 a 1915. Esta técnica permitió tener el control en la producción de shiitake (Chen, 2005).

La producción de shiitake sufrió un cambio drástico con el uso de aserrín como sustrato de cultivo. El primer lugar donde se empezó a utilizar fue en Shangai en

1974. En China fué donde se propuso ocupar bolsas de plástico en forma de cilindros (1983). La técnica fué evolucionando, los estadounidenses, en 1989, utilizaron bolsas de polipropileno resistentes al tratamiento térmico, con un filtro de microporo que permite el intercambio de gases sin que se contamine el sustrato. En Europa se utilizaron bolsas grandes y alargadas con capacidad para 15 kg de sustrato. Esta técnica comúnmente es llamada cultivo en troncos artificiales, tiene como ventaja que es mucho más rápida y produce mayores rendimientos que el cultivo en troncos naturales (Chen, 2005).

2.9. Técnicas de cultivo.

Debido a la naturaleza saprófita de shiitake, se cultiva en maderas duras de la familia *Fagaceae* (roble, shiia, castaños y haya) así como en encino, abedul, álamo o sauce. Las técnicas de cultivo han cambiado a lo largo del tiempo, conservándose el cultivo en troncos y la siembra sobre aserrín (López & Mireles, 2005).

- ***Cultivo en troncos naturales.***

Es el método tradicional, consiste en sembrar micelio puro de shiitake en troncos de árboles recién cortados (Chen, 2001). El tronco es cortado cuando el árbol se encuentra en estado latente, porque posee mayor contenido de azúcares y se espera de dos a tres meses antes de inocular. La inoculación se hace insertando en el tronco tapones de aserrín invadidos por micelio puro de la cepa a inocular.

Los troncos son sometidos a condiciones ambientales propicias (naturales o controladas) para estimular el desarrollo del micelio, este proceso puede durar de 6 a 18 meses dependiendo de la cepa y de las condiciones. Cuando el tronco se ha colonizado con el micelio, se induce la fructificación aumentando la irrigación de agua en el cultivo. Los ciclos en el cultivo en troncos naturales toman aproximadamente 6 años con una eficiencia biológica de 33% (Royse, 2001).

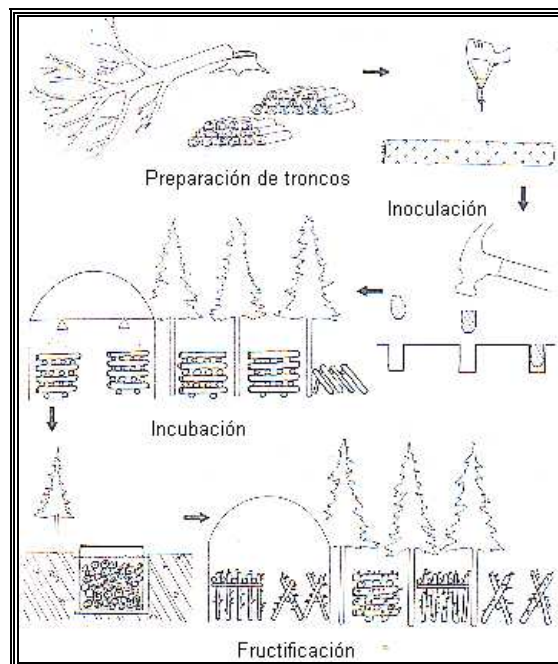


Figura 0.4: Cultivo controlado de *Lentinula edodes* en troncos (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).

- **Cultivo artificial (aserrín).**

El sustrato de cultivo se prepara mezclando aserrín y otros materiales ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, dado que son la principal fuente de nutrición del hongo. Es frecuente la utilización de paja, granos, salvado entre otras fuentes de carbono y nitrógeno. La mezcla se coloca en bolsas de plástico resistentes al

tratamiento térmico (autoclave 121° C /45 min) necesario para eliminar posibles competidores. Antes de que las bolsas se enfríen completamente, se inoculan con el micelio y se incuban de 30 a 180 días. Para inducir la fructificación, las bolsas con sustrato totalmente invadido con micelio se colocan en cuartos con humedad, luz y temperatura controlada (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990). La producción de un ciclo productivo, usando este método, toma de 3 a 6 meses desde la inoculación hasta la cosecha con una eficiencia biológica de 75 a 125% (Royse, 2001).

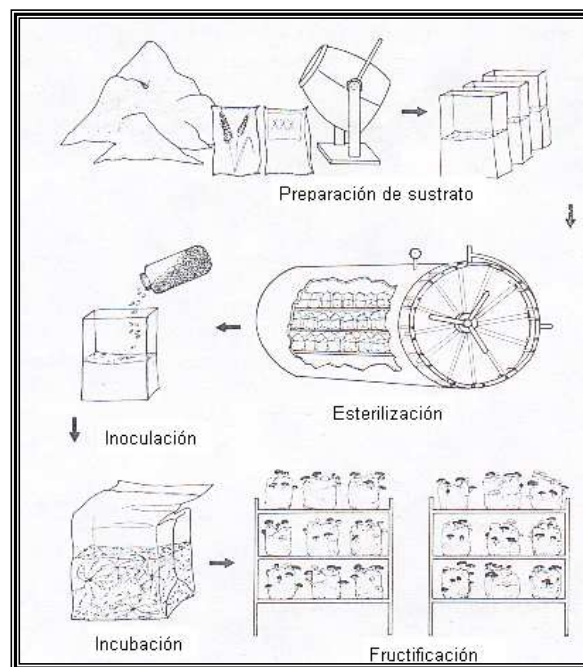


Figura 0.5: Cultivo artificial (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990).

2.10. Optimización de producción.

En el cultivo de hongos comestibles como en cualquier otro cultivo hortícola, se ha buscado optimizar la rentabilidad de la actividad siguiendo esencialmente dos

enfoques, por un lado mejorando los rendimientos en la producción y por otro produciendo cepas mejoradas donde se modifiquen las capacidades fisiológicas y morfológicas de la cepa. Con tales modificaciones podrían obtenerse mejores características que promuevan el consumo de los esporóforos producidos.

- ***Producción de sustratos.***

Nuevos sustratos han sido desarrollados permitiendo una mejor eficiencia en la producción de shiitake. Adicionalmente a los componentes básicos como maderas duras de diferentes tipos (abedul, castaño, encino, sauce y roble), se han utilizado otros materiales lignocelulósicos frescos o poco degradados como desechos agrícolas de cáscaras de semillas de algodón, residuos de la planta del maíz, bagazo de la caña, paja, borra de café, etc. (Zhang, et al, 1996; Kirchhoff, 1999; Chen 2001; Quimio; 2004, Fung, et al, 2005; López & Mireles, 2005). De esta manera, agregando estos suplementos, se ha enriquecido el medio para que el hongo aproveche los nutrientes y esto se traduzca en un mayor rendimiento.

- ***Control de condiciones ambientales.***

Controlando principalmente la humedad y temperatura en las naves de cultivo, es posible obtener hongos con características específicas. Un ejemplo de este método es la obtención de la flor del shiitake o “huangu”. Esto se logra cultivando el hongo inicialmente a bajas temperaturas y aire seco para elevar la temperatura una vez que el hongo alcanza un cierto tamaño, lo que propicia que el hongo desarrolle una superficie protectora seca en el píleo que cuando va

creciendo se cuartea produciendo grietas similares a una flor (Chen, 2001, Chen, 2004). Esta técnica también permite obtener mejores rendimientos en la producción de *Lentinula edodes* (Kuo, 2005; Li, 2005).

- **Cepas mejoradas.**

En la naturaleza, el ciclo de vida del *Lentinula edodes* pasa por una fase de reproducción sexual, en donde ocurre la meiosis, proceso necesario para la supervivencia de muchas especies (Tortora, 1993). En la meiosis, se presenta un proceso natural de intercambio de genes entre dos moléculas de ADN para formar nuevas combinaciones en un cromosoma (recombinación genética). A pesar de que la combinación de genes en los productos de la meiosis es de naturaleza azarosa, la recuperación y posterior apareamiento de los productos de la meiosis es el procedimiento más usado a la fecha para el mejoramiento de cepas.

Actualmente la biología molecular moderna ha permitido obtener “mejoras” en cultivos diversos como el maíz, algodón o arroz. En hongos comestibles se esta promoviendo el uso de marcadores moleculares de ADN para la identificación de variedades de hongos y en el trazado de mapas de acoplamiento genético. El empleo de estas herramientas probablemente permitirá en un futuro la producción de nuevas variedades de hongos comestibles con alta calidad, altos rendimientos y resistencia a las enfermedades (Miles, 1996; Wu, et al, 2005; Royse, et al, 1993)

2.11. Panorama mundial

Los hongos comestibles que se cultivan en el mundo son: champiñones (*Agaricus bisporus*) con el 31.8% de la producción total, shiitake (*Lentinus edodes*) 25.4%; hongo ostra o seta (*Pleorutus s.p.p*) 14.2%; hongo oreja de la madera (*Auricularia s.p.p*) 7.9%; hongo de la paja (*Volvariella volvacea*), 2.9%; pata de terciopelo (*Flammulina velutipes*) y otras especies, 3%. La producción mundial de hongos cultivados fue cercana a 6.2 millones de toneladas en peso fresco (Chen, 2004).

La producción mundial de hongos empieza a ser dominada por especies comestibles con propiedades terapéuticas. Shiitake es el principal, valorándose ampliamente no solo en el mercado oriental, sino en los mercados europeos y estadounidenses. La producción mundial de este hongo ha crecido un 398%, considerando que en el año 1986 era de 314,000 toneladas, incrementándose en 1997 a 1,684,000 toneladas (Chen, 2005).

Los principales productores de shiitake son China, Japón, Corea y Taiwán, no es casualidad que sean los principales consumidores (Donoghue & Pryzbylowicz, 1990). En 1983 Japón participaba con el 82% en la producción mundial, mientras que China con el 9.4%. Para 1991 China ocupó el primer lugar con el 60.5% de la producción, cifra que se ha ido incrementando con el paso del tiempo. En el 2002 la producción fue estimada en 2 millones de toneladas, de las

cuales 45,000 toneladas fueron exportadas a otros países (Chang, 2002). La producción de shiitake en Latinoamérica se ha incrementado. En el 2002 Brasil cosechó un total de 800 toneladas, que representa aproximadamente el 90% de la producción total de Latinoamérica (Chen, 2005).

El precio de shiitake varia en los diferentes países como se aprecia en la **Tabla 2.3**, sin embargo debe considerarse que según su tamaño y calidad será el precio, por ejemplo la flor del shiitake o “huangu” puede alcanzar el doble del precio que un shiitake normal.

Tabla 2.3: Precios aproximado de Shiitake fresco en diferentes países.

País	Precio (USD/kg)
EUA (Nueva York)	17.62
Japón (Tokio)	60.49
Francia (París)	9.31
Canadá (Toronto)	10.79

Fuente: Shiitake growers handbook.

2.12. Panorama nacional

Referente a México sólo tres géneros de hongos se cultivan comercialmente, estos son *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (setas) y *Lentinula edodes* (shiitake) adicionalmente a la amplia gama de hongos silvestres consumidos (Zamudio, 1999).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, “la demanda de los hongos en nuestro país está en constante crecimiento y en el mercado sólo participan siete grandes empresas productoras”. En 1990, el consumo per cápita anual de hongos era de 113 gramos en México. En el año 2000 esa cifra ya se ubicaba en 490 gramos por habitante al año, con una producción de unas 40 mil toneladas anuales, donde shiitake participa con 30 toneladas del total de la producción.

El shiitake fresco puede comprarse a 60 pesos el kilo, mientras que por una bolsa de cinco libras (2.3 Kg aproximadamente) de shiitake deshidratado importado se paga de 400 a 500 pesos en tiendas de autoservicio, aunque el precio se estima según la calidad del hongo. Comúnmente, se comercializa deshidratado y al rehidratarse adquiere una estructura semejante a la que tenía originalmente.

Dada la importancia del consumo de hongos en México, a nivel investigación se está trabajando en la domesticación de especies con importancia socioeconómica entre la población rural, tal es el caso de *Laetiporus sulphureus*, *Calvatia*, sp, *Lycoperdon* sp, *Sparassis crispa*, *Volvariella volvacea* y *Ustilago maydis* (cuitlacoche) entre otros (Zamudio 1999).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

3.1. Justificación.

El consumo de hongos es una opción nutricional y comercial desaprovechada a pesar de sus cualidades nutraceuticas que los ubican como uno de los alimentos más importantes para las culturas prehispánicas y asiáticas. En México, la producción de hongos comestibles no supera las 2 mil toneladas anuales cifra muy por debajo de los grandes productores del orbe, como China, con un poco más de 4 millones de toneladas al año (Poy, 2005).

El cultivo comercial de hongos comestibles en México se concentra en tres especies: champiñón (*Agaricus bisporus*), que presenta la mayor contribución en la producción, setas (*Pleurotus ostreatus*) y shiitake (*Lentinula edodes*) que contribuyen con una proporción mínima. Por sus diversas propiedades, shiitake es cada vez más demandado. La producción nacional en el 2002 fue de 30 toneladas (Chen, 2005) por lo que resulta interesante trabajar en los distintos aspectos que implica el cultivo comercial de este hongo.

Shiitake representa una alternativa atractiva dado que posee una alta cantidad de fibra, vitaminas y minerales, así mismo por su contenido de proteínas superior a la mayoría de frutas y verduras. Su valor nutritivo lo hace un alimento completo y bajo en grasa que puede complementar una alimentación sana (Kwon & Hobbs, 2005). Sus cualidades medicinales incluyen propiedades anticancerígenas,

inmunológicas, antidepresivas y dietéticas. Comercialmente la producción de este hongo es una buena opción, por que es posible producir grandes cantidades con la aplicación de técnicas no muy complejas, a bajo costo y en periodos cortos, empleando residuos agroindustriales como sustrato para su cultivo (Poy, 2005). También el cultivo puede contribuir a la creación de nuevos empleos; por ejemplo, en Japón, más de 20,000 personas se encuentran contratadas en esta industria (Chen, 2004).

En la comercialización y producción de hongos, existen aspectos importantes que pueden ayudar al productor a mejorar costos, uno de estos aspectos es la optimización de los rendimientos y otro la morfología de los esporóforos. Al conocer el rendimiento máximo significativo, se optimiza el uso de las naves de cultivo al desechar los bloques de sustrato que ya no producirán una cantidad adicional de esporóforos significativamente mayor. También disminuirá el empleo de personal para la recolección de los mismos. Por otra parte, existen características morfológicas de los esporóforos que son mas apreciadas por los consumidores, por lo cual los hongos pueden alcanzar mayor valor comercial.

El presente estudio planteó evaluar las diferencias obtenidas en los esporóforos producidos por tres cepas de *Lentinula edodes* aprovechando la recombinación genética ocurrida en la meiosis, para buscar cepas con parámetros de producción y morfología de interés para su comercialización. Las 3 cepas usadas, tienen características en común tales como: tamaño de esporóforos grande, abundancia de cuerpos fructíferos baja y color de píleo café oscuro.

3.2. Objetivo general.

Seleccionar nuevas cepas a partir de apareamientos de las progenies meióticas de 3 cepas de *Lentinula edodes* (L18, L19 y L20), productoras de esporóforos grandes, para evaluar las características de crecimiento, producción y morfología de sus esporóforos.

3.3. Objetivos particulares.

- ◆ Fructificar los 3 dicariotes parentales de *Lentinula edodes* para obtener sus progenies meióticas.
- ◆ Clasificar las progenies meióticas de acuerdo a los tipos de compatibilidad sexual y obtener dicariotes progenie por apareamiento de monocariotes compatibles.
- ◆ Reconstituir los 3 dicariotes parentales a partir de sus neohaplontes.
- ◆ Fructificar los dicariotes parentales, dicariotes progenie y dicariotes reconstituidos para evaluar diferencias en las características de los esporóforos producidos.

4. HIPÓTESIS.

Con la meiosis, los hongos producen progenies monocarióticas en donde se combinan de manera aleatoria las características genéticas del dicariote parental. Apareando monocariotes de una progenie meiótica será posible obtener dicariotes con nuevas características de crecimiento, producción y morfología.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Secuencia experimental.

Para seleccionar nuevos dicariotes a partir de las progenies meióticas de las cepas de *Lentinula edodes* estudiadas (L18, L19 y L20), se requirió llevar a fructificarlas para obtener esporas frescas. Posteriormente se aisló una cantidad representativa de la progenie meiótica de cada cepa. Se aparearon los monocariotes entre sí, así como con los neohaplontes correspondientes para clasificar cada progenie en sus 4 tipos de compatibilidad y en grupos parentales y no parentales. Se seleccionó un dicariote perteneciente a cada grupo y se llevo a fructificarlos en un sustrato lignocelulósico (aserrín) suplementado recolectándose los esporóforos producidos a lo largo de 10 semanas (**Figura 5.2**).

5.2. Material biológico.

Considerando los objetivos planteados en este trabajo se utilizaron tres cepas de *Lentinula edodes*: L18, L19 y L20 (dicariotes parentales) obtenidas del cepario del laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química.



Figura 5.1: Colonias de shiitake en medio agar extracto de malta (EMA).

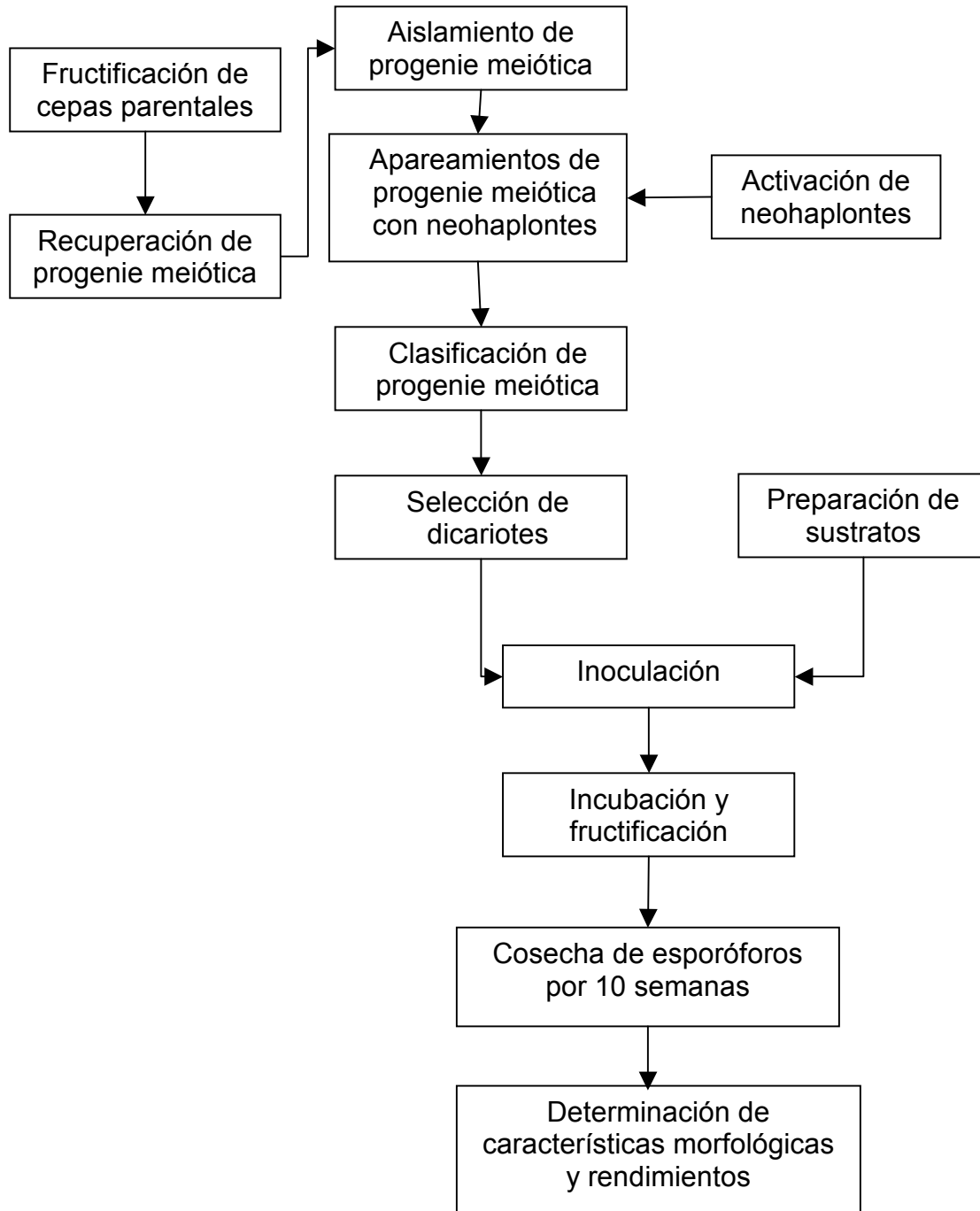


Figura 5.2. Secuencia experimental.

Estos dicariotes parentales se encontraban almacenados a temperatura de refrigeración en medio sólido de agar extracto de malta (EMA). En la **Tabla 5.1** se presentan sus principales características.

Tabla 5.1: Principales características de los dicariotes parentales L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes* (Ramírez & Leal, 2002).

Dicariotes parentales	Eficiencia biológica (g esporóforo fresco / 100g sustrato seco)	Velocidad de producción*	Abundancia de esporóforos	Tamaño de esporóforo	Color café
L18	63.6 ± 17 ^b	0.55 ± 0.17 ^b	Baja	Grande	Muy oscuro
L19	24.0 ± 10 ^a	0.22 ± 0.06 ^a	Baja	Grande	Muy oscuro
L20	83.5 ± 34 ^b	0.72 ± 0.27 ^b	Baja	Grande	Muy oscuro

*Unidades: [(g de esporóforos frescos/100 g de sustrato seco)/ tiempo de cultivo en días] al RMS.

Nota: Letras diferentes en las columnas de eficiencia biológica y velocidad de producción indican diferencias significativas entre los dicariotes parentales.

Se utilizaron también los neohaplontes correspondientes a cada uno de los dicariotes parentales L18, L19 y L20. Los neohaplontes son colonias monocariotes obtenidas por un proceso artificial que consiste en la división de núcleos de un dicariote parental. Este material biológico también se encontraba almacenado en el cepario bajo las mismas condiciones que las cepas parentales (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2: Neohaplontes de los dicariotes parentales de *Lentinula edodes*.

Dicariotes parentales	Neohaplontes	
	Tipo 1	Tipo 2
L18	nh ₁	nh ₂
L19	nh ₁	nh ₄ nh ₆
L20	nh ₆	nh ₈

5.3. Medio de cultivo agar extracto de malta (EMA).

Se pesaron 15 g de extracto de malta y 18 g de agar bacteriológico, se hidrataron hasta disolver en 1000 ml de agua destilada. Después se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 45 minutos. Del medio estéril se colocaron, con la ayuda de una jeringa de llenado continuo, 10 ml en cajas Petri desechables. Una vez que el medio solidificó se incubaron la cajas a 24°C por 24 horas para asegurar la esterilidad del medio.

5.4. Desarrollo micelial en medio agar extracto de malta (EMA).

Cuando el medio EMA en las cajas Petri estuvo listo, se resembraron las cepas de interés colocando cuatro pequeños cuadros de agar con crecimiento micelial. Las cajas resembradas se incubaron a 24°C por 7 días o hasta que el micelio invadió completamente el agar de la caja Petri.

5.5. Producción de esporóforos de *Lentinula edodes* en sustratos de aserrín.

Para fructificar los dicariotes es necesario llevar a cabo varios pasos, se debe preparar el inóculo con el que se sembrara las bolsas de sustrato y proveer de condiciones necesarias a las bolsas inoculadas.

5.5.1. Preparación de inóculo de grano o spawn (trigo).

Para inocular los sustratos (bolsa de 2 kg) no es suficiente utilizar cajas de medio EMA invadidas por la cepa, es necesaria una mayor cantidad de micelio

por lo que se utilizó un medio adecuado para una mayor propagación, dicho medio es conocido como inóculo de grano o semilla (spawn).

El material que se preparó para inocular el sustrato de aserrín fue trigo estéril. Los granos se limpiaron, lavaron y cocieron durante 50 minutos. Se drenó el exceso de agua caliente y enfrió con agua de la llave, drenando nuevamente el exceso de agua fría. El grano, ya frío, fue pesado y mezclado con CaSO_4 al 1.3% y CaCO_3 al 0.3% en base húmeda. Después se colocaron 500 g de trigo en bolsas de polipapel y se esterilizó en autoclave (2 h a 121°C y 15 lb/in^2). Un día después de la esterilización, el grano estaba ya frío y se inoculó con el micelio propagado en medio EMA para cada uno de los dicariotes. El grano inoculado se incubó en oscuridad a 28°C hasta que el micelio invadió el grano por completo.

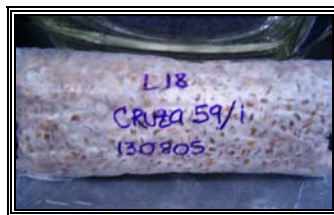


Figura 5.3: Inóculo de trigo invadido por el micelio de *Lentinula*.

5.5.2. Preparación del sustrato

De acuerdo al estudio realizado por López y Mireles (2005), se determinó utilizar el sustrato cuya composición se muestra en la **Tabla 5.3**, debido a que éste mostró los mejores rendimientos con las 2 cepas utilizadas en dicho trabajo.

Tabla 5.3: Composición en base seca del sustrato para fructificar (g/100g de sustrato).

Composición	g/100 g base seca
Aserrín	60
Mijo	15
Salvado de trigo	10
Sorgo molido	14
Sulfato de amonio	0.5
Ácido cítrico	0.5
Benlate	0.095

La preparación del sustrato se hizo por lotes considerando elaborar el sustrato necesario para una determinada cantidad de bolsas. Para este propósito se pesaron todos los componentes del sustrato según la cantidad requerida. El aserrín y el mijo se dejaron remojar durante 24 horas en exceso de agua. Al día siguiente el aserrín y el mijo, ya saturados de agua, se mezclaron con el resto de los componentes secos para lograr un material homogéneo. Se agregó después la cantidad adicional de agua necesaria para que el salvado y el sorgo también se saturaran y el sustrato alcanzara una humedad promedio del 60%. Con 2 kg de este material se llenaron bolsas de propileno etileno (32 cm de ancho x 49 cm de largo, con filtro de microporo) que se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión por 2 horas.

5.5.2.1. Determinación de humedad del sustrato.

Para reportar datos de eficiencia biológica, es necesario determinar la humedad del sustrato final. Se tomaron y pesaron 3 diferentes muestras de diferentes bolsas del sustrato al salir del autoclave y se colocaron en charolas de papel

aluminio en el horno a 60°C hasta que alcanzaron un peso constante. Se aplicó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ humedad} = ((\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}) * 100$$

5.5.3. Inoculación y fructificación

Al día siguiente, cuando los sustratos se encontraban fríos se inocularon con el 5% de inóculo de grano del dicariote respectivo y se incubaron en oscuridad a 24°C por aproximadamente 30 días.



Figura 5.4: Inoculación de bolsas de sustrato con inóculo de trigo invadido.

Cuando el micelio invadió las bolsas de sustrato por completo y se observó la aparición de primordios, se transfirieron al cuarto de fructificación.



Figura 5.5: Despunte del micelio durante la incubación de las bolsas inoculadas.

La fructificación se indujo con riegos regulares (3 veces al día por 20 minutos), ventilación con aire húmedo (2 horas después de cada riego) e iluminación las 24 horas al día. Se procuró que el cuarto de fructificación mantuviera una temperatura aproximada de 15°C y una humedad del 70 al 90%. Los esporóforos maduros, se cosecharon antes de que el borde del sombrero se abriera por completo.



Figura 5.6: Esporóforos cosechados de *Lentinula edodes*.

5.6. Recuperación de progenies meióticas.

Para la clasificación de las cepas en sus tipos de compatibilidad, así como para la obtención de los dicariotes que serían llevados a fructificar fue necesario trabajar con la progenie meiótica. Se requirió obtener micelio monocariótico procedente de las esporas del cuerpo fructífero.

Las esporas se colectaron colocando el esporóforo sobre papel filtro estéril entre 12 y 24 horas, posteriormente, se retiró el cuerpo fructífero. El papel con las esporas se guardó en una bolsa de plástico con sílica con indicador de humedad y se almacenó en refrigeración.

Para recuperar las progenies meióticas, se cortó un cuadro de 0.5×0.5 cm de papel filtro que contenía esporas. Bajo condiciones de esterilidad, se depositó en un frasco vial con 5 ml de agua estéril y se agitó vigorosamente; de la suspensión de esporas resultantes se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . De cada dilución se inocularon de dos a tres cajas con medio de EMA, con 200 μ l de la suspensión de esporas y se agregaron 300 μ l de agua estéril para facilitar la dispersión en el medio de cultivo. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 6 días.



Figura 5.7: Crecimiento de colonias para el aislamiento de monocariotes en el medio EMA.

Diariamente se examinaron las cajas con el microscopio y a simple vista, las colonias monocarióticas encontradas, se transfirieron a cajas con EMA colocando 5 colonias diferentes en cada placa, cuando las colonias mostraron desarrollo micelial se revisaron nuevamente al microscopio. Cada colonia monocariótica se resembró individualmente en placas con medio EMA. En los casos en los que no fue posible aislar monocariotes (por la elevada cantidad de colonias en cada caja) se preparó nuevamente la suspensión de esporas y se realizó una dilución mayor antes de inocular las placas de EMA.

5.7. Clasificación de progenie meiótica en tipos de compatibilidad.

Para clasificar la progenie meiótica de cada dicariote parental (L18, L19 y L20) se usaron 2 monocariotes escogidos al azar y éstos se aparearon con la totalidad de monocariotes de la progenie. En un período de 7 a 12 días de incubación se revisaron los apareamientos al microscopio para observar la formación de fíbulas (resultado de la compatibilidad entre dos cepas) lo que permitió identificar a los monocariotes correspondientes a los dos primeros tipos de compatibilidad (Tipo I y II), si no se observaban fíbulas se elegía al azar otras colonias apareándolas de igual forma.



Figura 5.8: Presencia de fíbulas en una muestra de micelio de *Lentinula edodes* visto al microscopio.

Los monocariotes que no fueron compatibles, probablemente, pertenecen a alguno de los 2 tipos restantes (grupos III y IV). Para su clasificación, se tomaron al azar, dos monocariotes del grupo que mostró reacciones negativas con los de los primeros apareamientos (es decir con probable tipo I y II), y se aparearon con el resto de los monocariotes no clasificados. Como resultado de dichos apareamientos se presentó lo siguiente:

- Dos monocariotes seleccionados pueden pertenecer al mismo tipo de compatibilidad por ejemplo tipo IV con el cual los apareamientos positivos identificarán a los monocariotes del tipo opuesto (III) y los monocariotes restantes con apareamientos negativos pertenecerán al mismo tipo (IV). Para confirmar que realmente pertenecen al tipo (IV) será necesario cruzar esos monocariotes con alguno del tipo contrario (III) y la formación de fibulas confirmara su clasificación en el tipo IV.
- Un monocariote pertenece al tipo III y otro al tipo IV, con lo cual se lograra la clasificación en una forma inequívoca de todos los monocariotes en la primera serie de apareamientos (Valencia, 2002).

Los dicariotes obtenidos al clasificar la progenie, se sembraron y almacenaron en condiciones de refrigeración, para tener representantes de las cepas que serían llevados a fructificar.

5.7.1. Diferenciación de los grupos parentales y no parentales.

La progenie meiótica que se clasifico en los cuatro tipos de compatibilidad sexual fue apareada con los dos neohaplontes respectivos de cada cepa, lo que permitió identificar los monocariotes de tipo parental y los de tipo no parental. La progenie meiótica identificada como parental fue aquella que produjo apareamientos positivos con los neohaplontes, mientras que el resto de la

progenie que no produjo apareamientos con las colonias neohaplontes se identifico como no parental.

5.8. Fructificación de dicariotes progenie, cepas parentales y reconstituidas.

Se seleccionó un dicariote de tipo parental y otro no parental, para fructificarlos en forma paralela con los dicariotes parentales y reconstituidos de los neohaplontes. La fructificación de todas las cepas se realizó como se indica en el apartado 5.5.

5.8.1. Determinación de parámetros productivos y análisis estadístico de datos.

En la etapa de fructificación se realizaron revisiones diarias para cosechar los cuerpos fructíferos maduros. Se registró el peso, tamaño, número de esporóforos y sus características morfológicas durante 10 semanas de cosecha. Con esos datos se determinó la eficiencia biológica, la velocidad de producción, el peso unitario y las piezas producidas por bolsa de 2 kg de sustrato.

Para determinar diferencias significativas en los diferentes parámetros productivos se realizó un análisis de varianza. En el caso de encontrar diferencias significativas, se llevó a cabo una prueba de rango múltiple de Duncan para clasificar las cepas de acuerdo a sus capacidades de producción.

6. RESULTADOS.

Lentinula edodes es un hongo eucarionte de la división de los basidiomicetos, que presenta reproducción sexual, heterotálica y tetrapolar, lo que quiere decir que para la reproducción se necesitan dos diferentes micelios o talos y que la progenie meiótica del hongo se puede clasificar en cuatro diferentes tipos de compatibilidad.

Las diferencias entre la progenie meiótica radican en los factores genéticos que determinan el tipo de compatibilidad. Estos factores se encuentran contenidos en cada micelio y de ellos dependerá si éstos se aparean. Dependiendo de los factores genéticos que aporte cada uno de los monocariotes que se aparee para formar el dicariote, se tendrán diferentes características que se expresarán en el fenotipo del esporóforo producido por el dicariote resultante.

La recombinación genética ocurrida en la meiosis es la vía general para el mejoramiento de cepas de hongos comestibles. Este método consiste en utilizar los apareamientos entre la progenie meiótica para la obtención de dicariotes que produzcan esporóforos con características diferentes en cuanto a la producción y morfología de los esporóforos, características apreciadas particularmente por los productores. Se caracteriza por ser un método accesible y productor de una gran cantidad de dicariotes que pueden ser evaluados.

6.1. Aislamiento y clasificación de la progenie meiótica de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Se aisló una cantidad suficiente de monocariotes, aproximadamente 30 por cada dicariote parental; se observaron cuidadosamente al microscopio para constatar que éstos no presentaban fíbulas en su estructura, y así, confirmar su condición de monocariote. Cada colonia de la progenie fue marcada con una clave de acuerdo a la siguiente nomenclatura:

L (no. de cepa) – no. de monocariote

Todos los monocariotes recuperados de las esporas de cada cepa parental fueron apareados con 4 monocariotes escogidos al azar de la misma progenie. Al mismo tiempo se resembraron como control para confirmar que fueran monocariotes al momento de realizar la cruce. Se evaluó microscópicamente la presencia de fíbulas en todos los casos, ya que indican apareamientos positivos o presencia de dicariotes. Los apareamientos de la progenie que produjeron apareamientos positivos se identificaron como compatibles entre sí. Los monocariotes del resto de la progenie pertenecían en consecuencia al otro grupo compatible, sin embargo se realizaron nuevamente los apareamientos entre ellos para verificar los resultados positivos, debido a que existen monocariotes que no pueden ser clasificados.

Al realizar diferentes apareamientos con varios monocariotes, se encontraron los 4 tipos de compatibilidad para cada una de las cepas. Algunas progenies resultaron más difíciles de clasificar que otras, por lo cual fue necesario aislar una mayor cantidad de monocariotes. En las **Tablas 6.1, 6.2 y 6.3** se muestran las

clasificaciones de las progenies meióticas de cada una de las cepas; se resaltaron las colonias que se utilizaron para la identificación posterior de los grupos parentales y no parentales. Así mismo, se identificaron también las colonias infértiles dentro de la progenie de cada cepa, es decir, los monocariotes que no presentaron apareamientos positivos con ninguna colonia.

Tabla 6.1: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L18.

Tipos de compatibilidad					Sin clasificar
I	II		III	IV	
L18-2	L18-3	L18-35	L18-1	L18-59	L18-9
L18-5	L18-4	L18-38	L18-6		L18-10
L18-60	L18-11	L18-44	L18-7		L18-20
	L18-12	L18-45	L18-8		L18-29
	L18-13	L18-47	L18-14		L18-36
	L18-18	L18-48	L18-15		L18-42
	L18-19	L18-49	L18-16		L18-53
	L18-21	L18-50	L18-17		L18-62
	L18-22	L18-51	L18-31		L18-64
	L18-23	L18-52	L18-37		
	L18-24	L18-54	L18-39		
	L18-25	L18-55	L18-40		
	L18-27	L18-56	L18-41		
	L18-28	L18-57	L18-43		
	L18-30		L18-46		
	L18-32		L18-58		
	L18-33		L18-61		
	L18-34		L18-63		
Total de monocariotes por tipo de compatibilidad					
3	32		18	1	9
Porcentaje de proporción por cada grupo (%)					
4.76	50.79		28.57	1.58	14.2
Total de colonias (100%)					
63					

L18-1 a L18-64 indican el número de aislamiento monosporico recuperado de la cepa. El tipo de compatibilidad I muestra apareamientos positivos con el tipo de compatibilidad II, así mismo el grupo de compatibilidad III con el IV. Monocariotes resaltados son representantes para la identificación de tipos parental y no parental

Tabla 6.2: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L19.

Tipos de compatibilidad					Sin clasificar
I	II	III	IV		
L19-2	L19-48	L19-16	L19-1	L19-64	L19-8
L19-3	L19-49	L19-25	L19-5	L19-115	L19-10
L19-4	L19-51	L19-59	L19-12		L19-13
L19-6	L19-53	L19-80	L19-14		L19-23
L19-7	L19-54	L19-94	L19-22		L19-38
L19-9	L19-55	L19-95	L19-29		L19-60
L19-11	L19-57	L19-101	L19-41		L19-71
L19-15	L19-58	L19-104	L19-42		L19-76
L19-17	L19-61	L19-105	L19-43		L19-79
L19-18	L19-62	L19-112	L19-50		L19-84
L19-19	L19-65		L19-52		L19-85
L19-20	L19-67		L19-56		L19-87
L19-21	L19-70		L19-63		L19-92
L19-24	L19-72		L19-66		L19-96
L19-26	L19-73		L19-68		L19-98
L19-27	L19-74		L19-69		L19-109
L19-28	L19-75		L19-82		L19-111
L19-30	L19-77		L19-83		L19-116
L19-31	L19-78		L19-89		L19-117
L19-32	L19-81		L19-91		
L19-33	L19-86		L19-93		
L19-34	L19-88		L19-99		
L19-35	L19-90		L19-100		
L19-36	L19-97		L19-103		
L19-37	L19-102				
L19-39	L19-106				
L19-40	L19-107				
L19-44	L19-108				
L19-45	L19-110				
L19-46	L19-113				
L19-47	L19-114				
Total de monocariotes por tipo de compatibilidad					
62	10	24	2	19	
Porcentaje de proporción por cada grupo (%)					
52.99	8.54	20.51	1.70	16.23	
Total de colonias (100%)					
117					

L19-1 a L18-117 indican el número de aislamiento monosporico recuperado de la cepa. El tipo de compatibilidad I muestra apareamientos positivos con el tipo de compatibilidad II, así mismo el grupo de compatibilidad III con el IV. Monocariotes resaltados son representantes para la identificación de tipos parental y no parental.

Tabla 6.3: Clasificación en tipos de compatibilidad de la progenie meiótica de la cepa L20.

Tipos de compatibilidad					Sin clasificar	
I	II	III	IV			
L20-1	L20-49	L20-15	L20-5	L20-61	L20-79	L20-46
L20-2	L20-52	L20-42	L20-7	L20-62		L20-51
L20-3	L20-53	L20-48	L20-9	L20-63		L20-88
L20-4	L20-54	L20-55	L20-10	L20-64		L20-87
L20-6	L20-56		L20-14	L20-65		L20-93
L20-8	L20-57		L20-16	L20-68		L20-96
L20-11	L20-58		L20-17	L20-69		
L20-12	L20-60		L20-20	L20-72		
L20-13	L20-66		L20-21	L20-74		
L20-18	L20-67		L20-22	L20-75		
L20-19	L20-70		L20-23	L20-78		
L20-25	L20-71		L20-24	L20-80		
L20-26	L20-73		L20-27	L20-81		
L20-28	L20-76		L20-31	L20-82		
L20-29	L20-77		L20-32	L20-84		
L20-30	L20-83		L20-33	L20-85		
L20-36			L20-34	L20-86		
L20-38			L20-35	L20-89		
L20-39			L20-37	L20-90		
L20-40			L20-44	L20-91		
L20-41			L20-45	L20-92		
L20-43			L20-50	L20-94		
L20-47			L20-59	L20-95		
Total de monocariotes por tipo de compatibilidad						
39	4	46	1	6		
Porcentaje de proporción por cada grupo (%)						
40.62	4.16	47.91	1.04	6.25		
Total de colonias (100%)						
96						

L20-1 a L18-96 indican el número de aislamiento monospórico recuperado de la cepa. El tipo de compatibilidad I muestra apareamientos positivos con el tipo de compatibilidad II, así mismo el grupo de compatibilidad III con el IV. Monocariotes resaltados son representantes para la identificación de tipos parental y no parental.

En las tres cepas se observó una tendencia similar respecto a las proporciones de los tipos de compatibilidad (I, II, III, IV). En dos de ellos se agrupa la mayor cantidad de monocariotes de la progenie, en el primero se concentra aproximadamente el 50% y en el otro varía del 20 al 40% del total de la progenie

meiótica. En los dos grupos restantes se observa una menor proporción de monocariotes, un grupo siempre presentó un porcentaje por debajo del 10% y en el otro mostró el 1% del total de la progenie. Se observó que los monocariotes del grupo con la menor proporción de la progenie (1%) son muy susceptibles a la contaminación y pierden viabilidad.

6.2. Identificación de los grupos parentales y no parentales de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Para la identificación de los grupos se emplearon los neohaplontes de cepas parentales correspondientes (L18, L19 y L20). Los neohaplontes se obtuvieron por dicariorización que es un proceso que consiste en separar los núcleos de un dicariote por medios artificiales, ya sean físicos (microcirugía), químicos (crecimiento con sustancias químicas) o biológicos (regeneración de protoplastos) (Valencia, 2002). Los neohaplontes empleados contienen los tipos de compatibilidad parentales debido a que se obtuvieron del dicariote parental de cada cepa, por consiguiente al aparearlas con la progenie meiótica de la cepa respectiva permite identificar los grupos:

- (a) Parental, en dado caso que los apareamientos fueran positivos, ó
- (b) No parental, donde las colonias no muestren apareamientos.

En las **Tablas 6.4, 6.5 y 6.6** se muestran los apareamientos confirmativos para los representantes de los 4 tipos de compatibilidad sexual, obtenidos por el

apareamiento de la progenie meiótica en cada cepa; así como la clasificación de la progenie en tipo parental y no parental por apareamientos con los neohaplontes. Para obtener tales clasificaciones fue necesario realizar muchos apareamientos con diferentes monocariotes, y ya generalmente toda la progenie meiótica muestra el mismo comportamiento, se consideró que no era necesario incluir los apareamientos individuales de cada monocariote con las respectivas colonias.

Tabla 6.4: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L18.

	Tipos de compatibilidad				Neohaplontes		Control*
	Grupos parentales		Grupos no parentales		L18-nh-1	L18-nh-2	
	L18-2	L18-3	L18-40	L18-59			
L18-2	-	+	-	-	-	-	-
L18-3	+	-	-	-	-	+	-
L18-40	-	-	-	+	-	-	-
L18-59	-	-	+	-	-	-	-
L18-nh-1	-	-	-	-	-	+	-
L18-nh-2	-	+	-	-	+	-	-

*Cepas control son resiembras sin apareamientos.
Se indica la presencia de micelio: monocariótico (-) o dicariótico (+).

En las cepas L18 (Tabla 6.4) y L19 (Tabla y 6.5) se identificaron los grupos parentales y no parentales, lo cual no fue posible con la cepa L20 (Tabla 6.6). Cuando algunas colonias se someten al proceso de dedicariotización sufren algunas alteraciones por lo cual no es coincidencia que la cepa L20 no presente apareamientos con las colonias neohaplontes.

Tabla 6.5: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L19.

	Tipos de compatibilidad				Neohaplontes		Control
	Grupos parentales		Grupos no parentales		L19-nh-1	L19-nh-2	
	L19-16	L19-28	L19-50	L19-64			
L19-16	-	+	-	-	-	-	-
L19-28	+	-	-	-	+	-	-
L19-50	-	-	-	+	-	-	-
L19-64	-	-	+	-	-	-	-
L19-nh-1	-	+	-	-	-	+	-
L19-nh-2	-	-	-	-	+	-	-

*Cepas control son resiembras sin apareamientos.

Se indica la presencia de micelio: monocariótico (-) o dicariótico (+).

La dedicariotización puede producir alteraciones de la información genética del hongo. Estas alteraciones podrían provocar modificaciones en el fenotipo, por esta razón se decidió llevar a fructificar el dicariote obtenido del apareamiento de los neohaplontes, que se nombró reconstituido.

Tabla 6.6: Apareamientos confirmativos de la progenie meiótica de la cepa L20.

	Tipos de compatibilidad				Neohaplontes		Control
	Grupos 1		Grupos 2		L20-nh-6	L20-nh-8	
	L20-39	L20-42	L20-62	L20-79			
L20-39	-	+	-	-	-	-	-
L20-42	+	-	-	-	-	-	-
L20-62	-	-	-	+	-	-	-
L20-79	-	-	+	-	-	-	-
L20-nh -6	-	-	-	-	-	+	-
L20-nh -8	-	-	-	-	+	-	-

*Cepas control son resiembras sin apareamientos.

Se indica la presencia de micelio: monocariótico (-) o dicariótico (+).

6.3. Criterios para la selección de los dicariotes a fructificar en las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Una vez que se clasificó la progenie meiótica de cada cepa, se seleccionaron los dicariotes que se llevarían a fructificar tomando en cuenta las características morfológicas del micelio dicariótico como el monocariótico que le dió origen (**Figuras 6.1, 6.2 y 6.3**). Además de las características morfológicas se tomaron en consideración parámetros como el tiempo de colonización de cada caja Petri con la siembra de la colonia y otras características del micelio como densidad, apariencia, forma (**Tablas 6.7, 6.8, 6.9, 6.10, 6.11 y 6.12**).

Tabla 6.7: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L18.

Características	Neohaplonte		Progenie meiótica			
	nh-1	nh-2	Grupos parentales		Grupos no parentales	
			L18-2	L18-3	L18-40	L18-59
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	18	24	21	19	21	20
Tipo de Micelio	Aéreo abundante, algodonoso	Superficial abundante, liso	Aéreo escaso, superficial semi algodonoso	Aéreo semi abundante, algodonoso	Aéreo escaso, algodonoso	Aéreo escaso, algodonoso
Densidad (abundancia de micelio)	Semi denso	Muy denso y apretado	Ligeramente denso	Denso	Denso	Poco denso
Forma de la colonia	Circular homogéneo	Elipsoide homogéneo	Circular homogéneo	Circular homogéneo	Circular homogéneo	Circular homogéneo
Otras	Forma un hueco al centro	Bordes amarillentos	Mayor densidad al centro	Más poblado en el centro y periferia	Más poblado en el centro	-

En todos los casos se observó crecimiento micelial homogéneo.
- No se observó ninguna característica especial que reportar.

Tabla 6.8: Características de las colonias dicariotes de la cepa L18.

Características	Parental	Reconstituido*	Dicariotes de progenie meiótica	
			Grupos parentales (L18-2/L18-3)*	Grupos no parentales (L18-40/L18-59)
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	20	25	21	18
Tipo de micelio	Superficial, liso	Aéreo, algodonoso	Superficial liso y aéreo escaso	Aéreo y superficial, semi algodonoso
Densidad (abundancia de micelio)	Media	Alta	Media	Media / Alta
Forma	Circular homogéneo	Irregular ondeado	Circular homogéneo	Circular homogéneo
Apariencia	Normal	Raquítica	Normal	Vigorosa
Otras	Densidad homogénea	El crecimiento no es homogéneo, va por sectores	Presencia de un halo de mayor densidad en la colonia	Crecimiento muy homogéneo

*Presencia de nodos / erupciones, después de varios días de almacenamiento

El tiempo de crecimiento del micelio en la caja Petri, se consideró una característica importante porque quizá podríamos encontrar una relación entre la colonización de ésta y la propagación del micelio en cualquier otro medio (trigo, sustrato).

En todas las cepas se observó que el tiempo de colonización de la caja Petri es más lento para los monocariotes que para los dicariotes. Por tal motivo, el monocariote fue propagado en la caja en cinco puntos distribuidos en el 3,6,9,12, según la disposición de los números en el reloj, y en el centro de la caja, mientras que el dicariote, se evaluó únicamente en el centro de la caja.

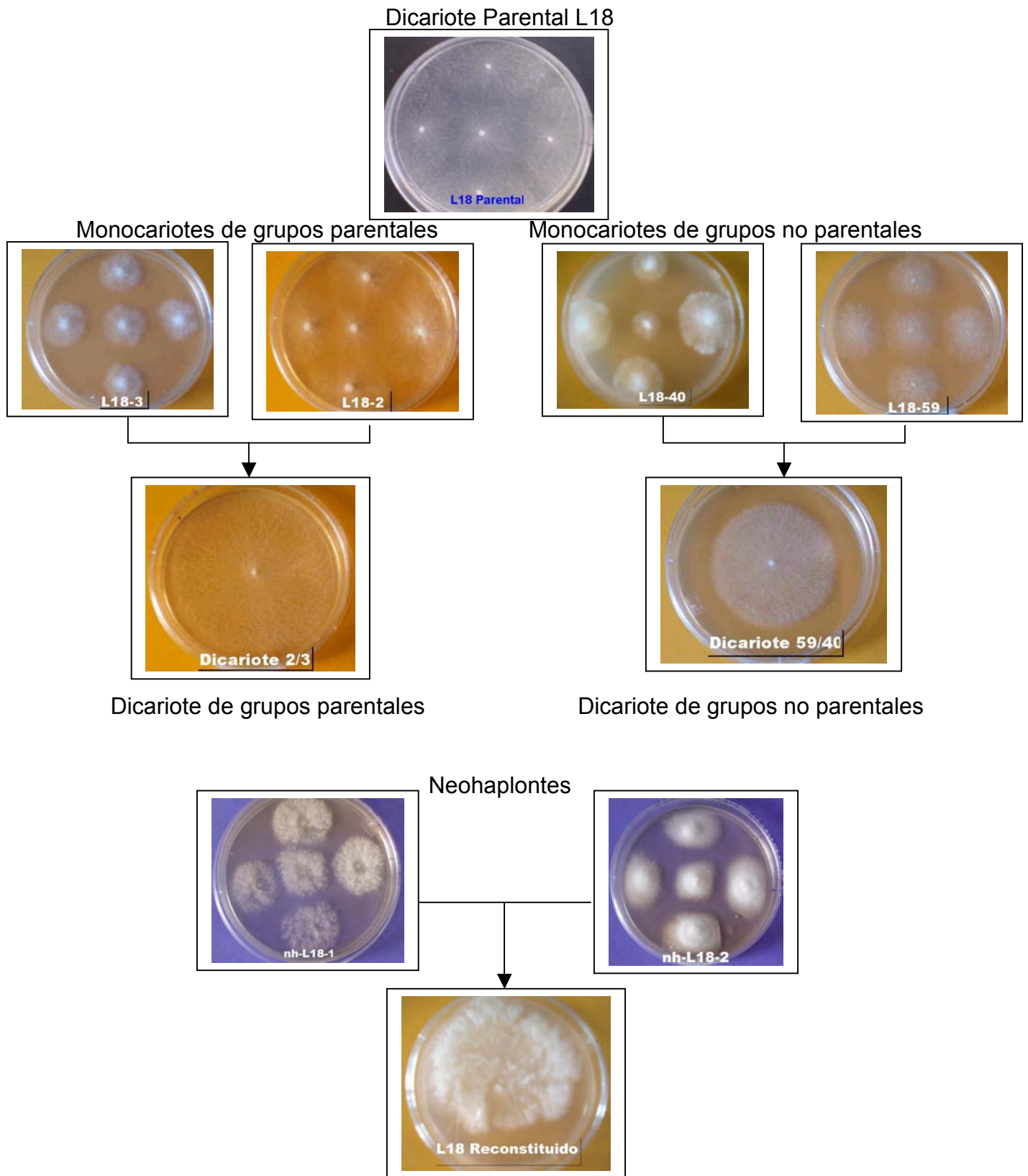


Figura 6.1: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L18 de *Lentinula edodes*.

Se observó que el micelio aéreo y algodonoso de los monocariotes es más denso y tiende a expandirse más rápidamente en la caja Petri que el micelio superficial y liso. Al formarse los dicariotes el tipo de micelio que predomina es el superficial liso, sin embargo se expande rápidamente. Una excepción a este comportamiento fueron las colonias reconstituidas de los neohaplontes, que en el caso de las cepas L18 y L20 mostraron micelio algodonoso con crecimiento rápido aunque en el caso de la cepa L19 el micelio fue liso con un crecimiento muy lento.

Tabla 6.9: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L19.

Características	Neohaplonte		Progenie meiótica			
	nh-1	nh-2	Grupos parentales		Grupos no parentales	
			L19-16	L19-28	L19-50	L19-64
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	17	28	21	20	16	+30
Tipo de Micelio	Aéreo algodonoso	Superficial	Superficial	Superficial y aéreo muy escaso	Superficial y aéreo escaso	Superficial y aéreo escaso
Densidad (abundancia de micelio)	Alta	Baja	Baja	Baja	Normal / Baja	Normal / Baja
Forma de la colonia	Irregular ondeada	Circular homogénea	Circular homogéneo	Irregular ondeada	Circular homogéneo	Irregular ondeado
Otras	Muy esponjosa	Color amarillento	Micelio rosado	Mayor densidad al centro	Halo denso de 1 cm de diámetro	Crecimiento muy lento

En todos los casos se observó crecimiento micelial homogéneo.

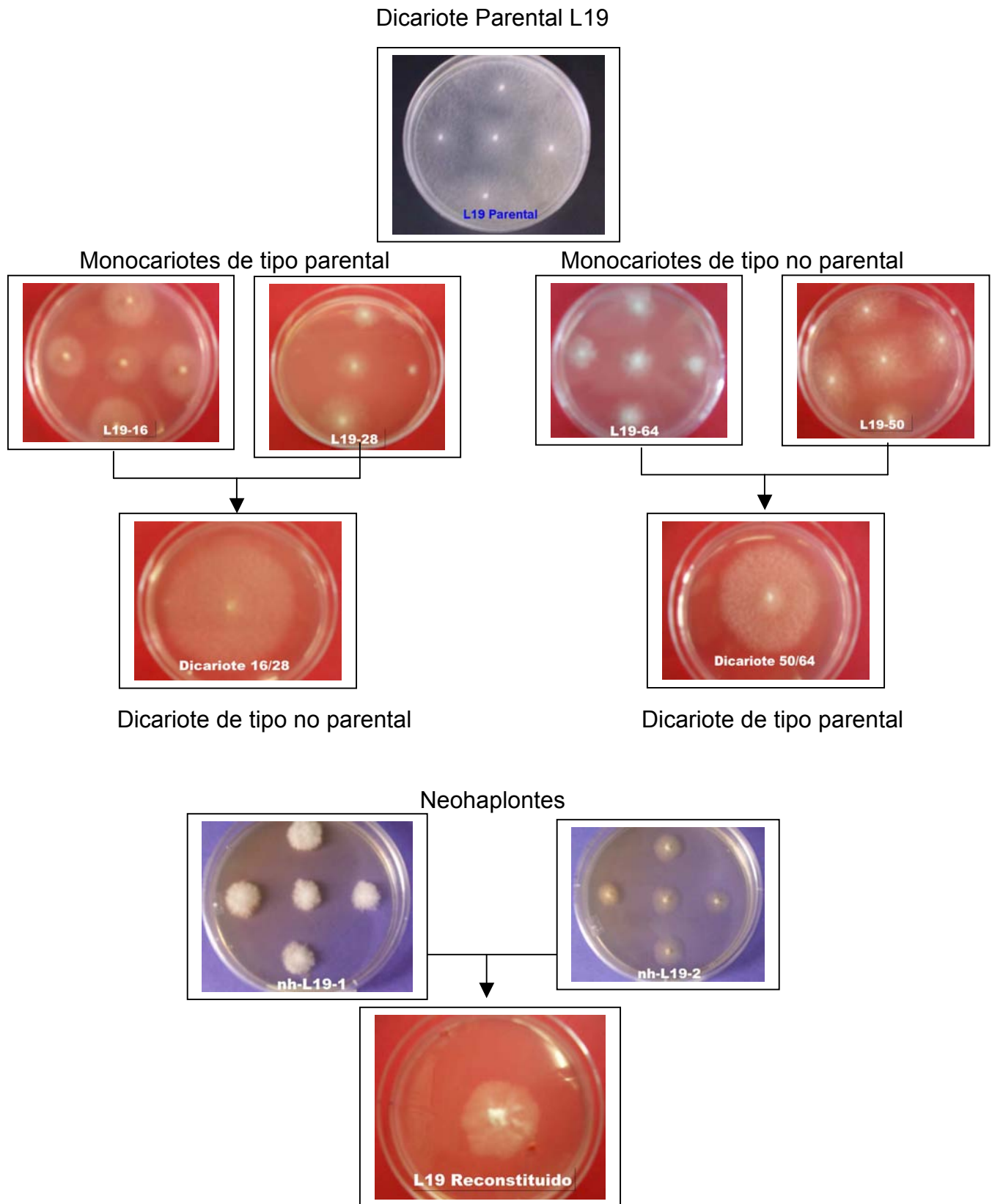


Figura 6.2: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L19 de *Lentinula edodes*.

Tabla 6.10: Características de las colonias dicariotes de la cepa L19.

Características	Parental*	Reconstituido*	Dicariotes de progenie meiótica	
			Grupos parentales (L19-16/L19-28)	Grupos no parentales (L19-50/L19-64)
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	18	+ 30	23	18
Tipo de micelio	Superficial y aéreo escaso	Superficial	Superficial y aéreo	Superficial
Densidad (abundancia de micelio)	Normal	Baja	Normal	Normal
Forma	Circular homogéneo	Irregular ondeado	Circular homogéneo	Circular homogéneo
Apariencia	Normal	Raquítica	Raquítica	Vigorosa
Otras	Densidad homogénea en toda la colonia	Mayor densidad al centro y por sectores	Centro color café y halo menos denso de 3 cm diámetro	Presencia de un halo más denso en el centro de la colonia

*Presencia de nodos/erupciones después de varios días de almacenamiento

Tabla 6.11: Características de los monocariotes de tipo neohaplonte y de la progenie meiótica de L20.

Características	Neohaplonte		Progenie meiótica			
			Grupos 1		Grupos 2	
	nh-6	nh-8	L20-39	L20-42	L20-62	L20-79
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	15	12	16	21	22	24
Tipo de Micelio	Superficial y aéreo	Aéreo algodonoso	Superficial y aéreo muy escaso	Superficial y aéreo escaso	Superficial y aéreo escaso	Superficial y aéreo escaso
Densidad (abundancia de micelio)	Normal	Alta	Normal/Bajo	Normal	Baja	Normal
Forma de la colonia	Irregular ondeada	Irregular ondeada	Circular homogéneo	Irregular ondeado	Circular homogéneo	Circular homogéneo
Otras	Mayor densidad en el centro	Muy esponjosa	Mayor densidad en el centro	Micelio aéreo en toda la colonia	Mayor densidad al centro	Mayor densidad en el centro

En todos los casos se observó crecimiento micelial homogéneo.

Tabla 6.12: Características de las colonias dicariotes de la cepa L20.

Características	Parental*	Reconstituido*	Dicariotes de progenie meiótica	
			Grupos 1 (L20-39/L20-42)*	Grupos 2 (L20-62/L20-79)
Tiempo para colonizar caja Petri (días)	21	13	17	18
Tipo de micelio	Superficial y aéreo muy escaso	Aéreo y superficial	Superficial	Aéreo y superficial
Densidad (abundancia de micelio)	Normal	Alta	Normal	Normal / Alta
Forma de la colonia	Circular homogéneo	Irregular ondeado	Circular homogéneo	Circular homogéneo
Apaciencia	Normal	Muy vigorosa	Vigorosa	Vigorosa
Otras	Densidad homogénea en toda la colonia	Tiene sectores con micelio algodonoso	Formación de halos después de crecer 2 – 2.5 cm de radio	Halo de menor densidad de 1cm de diámetro

*Presencia de nodos / erupciones, después de varios días de almacenamiento.

En la cepa L20 se obtuvieron los dicariotes con menor tiempo de colonización de la caja Petri. Los datos más extremos fueron observados en las colonias reconstituidas. El dicariote obtenido de los neohaplontes en la cepa L19, fue el que registró mayor tiempo para colonizar la caja Petri, mientras que el más rápido fue el dicariote obtenido de la reconstitución de la cepa L20. Las características entre estos dos dicariotes fueron muy contrastantes, el L20 reconstituido se caracterizó por su micelio aéreo, algodonoso y denso, mientras el L19 reconstituido mostró un micelio muy delgado, superficial y liso.

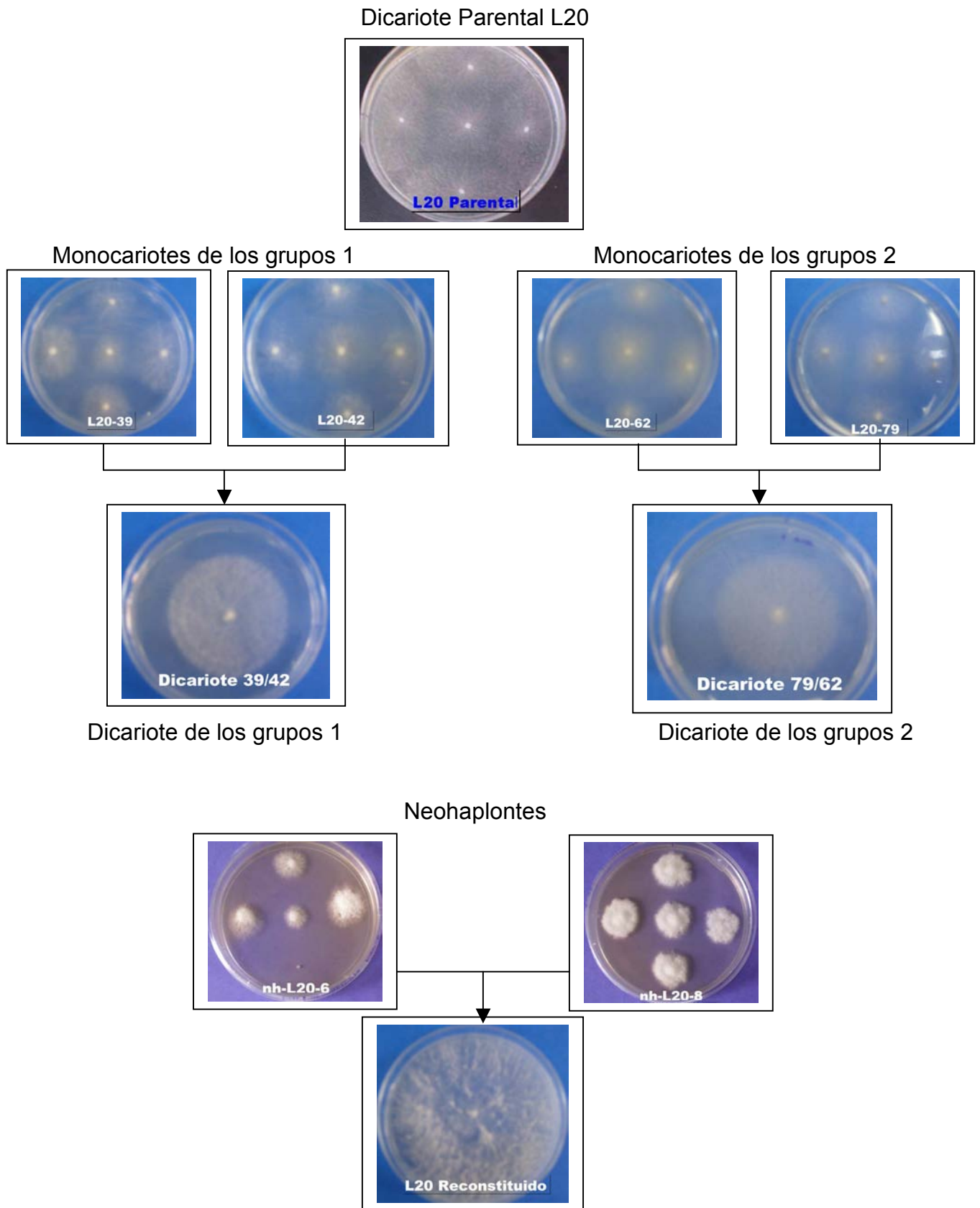


Figura 6.3: Micelios de colonias seleccionadas de la cepa L20 de *Lentinula edodes*.

El micelio superficial fué el más común entre los dicariotes de las colonias seleccionadas para fructificar. Por lo general, se presentó un crecimiento homogéneo entre las colonias y en algunos casos se observó una secreción de color miel al almacenar las colonias por más de un mes y medio.

6.4. Fructificación de dicariotes progenie, parentales y reconstituidos de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Una vez obtenidos los dicariotes progenie, parentales y reconstituidos correspondientes de cada cepa, se llevaron a fructificar. Los resultados que se reportan fueron obtenidos a lo largo de 10 semanas a partir del primer corte de cada bolsa.

El parámetro más útil para reportar el rendimiento es la eficiencia biológica (EB), en la cual se expresa los gramos de esporóforos frescos producidos por 100 gramos de sustrato seco. Para ello se requirió determinar el contenido de humedad de los diferentes lotes del sustrato de cultivo (**Tabla 6.13**).

Tabla 6.13: Contenido de humedad de lotes de sustrato.

	Lote		
	1	2	3
Humedad (g H ₂ O/100g de sustrato fresco)	69.92	47.07	52.82
Dicariotes cultivados en cada lote	L20 Reconstituido	L19 Parental L18 Parental (L20-62/L20-79) (L19-28/ L19-6)	L18 Reconstituido L19 Reconstituido L20 Parental (L20-42/L20-39) (L18-40/L18-59)

Al inspeccionar los cuerpos fructíferos de los diferentes dicaríotes que se llevaron a fructificar, se observó que se presentaron esporóforos en los cuales el píleo no se abrió. Estos cuerpos fructíferos pueden observarse en la **Figura 6.4**, fueron producidos por los dicaríotes progenie (L18-2/L18-3) y (L19-50/L19-64). Los esporóforos con estas características carecen de valor comercial, por esta razón no fueron incluidos en las **Tablas 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18 y 6.19**. El resto de los dicaríotes presentaron esporóforos normales con píleo abierto.



Figura 6.4: Esporóforos aberrantes de los dicaríotes (L18-2/L18-3) y (L19-50/L19-64).

6.4.1. Rendimiento semanal de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

En la **Tabla.6.14** se muestran los datos del rendimiento semanal para las cepas trabajadas a lo largo de las 10 semanas y resaltado en tono oscuro la semana donde se alcanzan los valores máximos de producción semanal. El mayor rendimiento semanal en las cepas L18 y L19 lo presentaron los dicaríotes parentales con el 19% y 17%, respectivamente. En la cepa L20, el mayor rendimiento semanal se observó en el dicaríote (L20-62/L20-79). La mayor parte

de los dicariotes alcanzaron este valor en las primeras semanas, excepto el dicariote parental (L19-28/L19-16) que lo alcanzo hasta la novena semana.

Los datos de rendimiento semanal acumulado son importantes ya que al realizar un análisis de varianza entre las semanas es posible identificar la semana en donde se alcanza el rendimiento máximo significativo (RMS) en la producción, es decir que los incrementos en la producción que se den a partir de dicha semana no son estadísticamente significativos, por lo que implica una perdida de tiempo, recursos y espacio para la producción comercial de hongos

En la **Tabla 6.15** se presentan los datos de rendimiento semanal acumulado y la semana en la que se alcanza el RMS sombreada. Para la cepa L18 se observó un rendimiento de 6 a 23%, el dicariote parental fue el más productor y requirió menor tiempo en alcanzar el RMS. Para los dicariotes de la cepa L19 se obtuvieron rendimientos entre 11 y 34%. El dicariote que mostró el mejor rendimiento fue el reconstituido, requirió de solo 4 semanas para llegar a su RMS. Los mejores rendimientos fueron de la cepa L20, los datos oscilaron entre 34 y 85%.

6.4.2. Producción semanal de esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Reportar los esporóforos producidos por una cepa es un dato relevante porque a través de éstos podemos saber que cantidad de hongos obtendremos, principalmente en la semana del rendimiento máximo significativo.

Tabla 6.14: Rendimiento semanal (g esporóforos frescos / 100g sustrato seco)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42) (L20-62/L20-79)	
1	1.6 ± 2.7	19.3 ± 11.8	4.8 ± 8.4	16.4 ± 7.9	17.8 ± 1.9	4.5 ± 3.6	30.1 ± 8.3	14.8 ± 2.8	14.4 ± 10.3	55.6 ± 7.2
2	0.0 ± 0.0	4.4 ± 10.7	0.0 ± 0.0	9.4 ± 6.6	0.0 ± 0.0	1.6 ± 3.1	18.8 ± 22.1	2.2 ± 2.5	3.2 ± 6.5	0.0 ± 0.0
3	4.6 ± 4.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.9 ± 3.4	0.0 ± 0.0	1.0 ± 2.0	7.8 ± 9.0	6.5 ± 5.8	5.7 ± 4.6	0.0 ± 0.0
4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.9 ± 2.3	7.0 ± 2.1	0.0 ± 0.0	2.3 ± 4.6	8.6 ± 9.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2
5	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	5.5 ± 5.0	0.8 ± 1.6	0.0 ± 0.0	2.1 ± 4.2	12.9 ± 16.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6		0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.4	2.3 ± 4.4	7.3 ± 12.6	0.0 ± 0.0	7.7 ± 8.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.7 ± 6.1
7	No hubo más producción	1.1 ± 2.8	0.2 ± 0.4		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.3	2.3 ± 3.9
8		0.0 ± 0.0	No hubo más producción	No hubo más producción	1.6 ± 2.7	2.4 ± 3.1	8.1 ± 6.5	0.0 ± 0.0	10.0 ± 15.2	4.6 ± 5.3
9		0.3 ± 0.9			1.4 ± 2.5	8.0 ± 7.6	1.8 ± 3.5	5.1 ± 8.9	2.9 ± 5.5	0.1 ± 0.2
10		3.1 ± 5.0			0.0 ± 0.0	3.1 ± 3.3	0.8 ± 1.4	5.7 ± 7.5	4.1 ± 5.5	0.3 ± 0.7

*Datos resaltados muestran la máxima producción de las 10 semanas.

Tabla 6.15: Rendimiento semanal acumulado (g esporóforos frescos / 100g sustrato seco)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42) (L20-62/L20-79)	
1	1.6 ± 2.7	19.3 ± 11.8	4.9 ± 8.4	16.4 ± 7.9	17.8 ± 1.9	4.5 ± 3.6	30.1 ± 8.3	14.8 ± 2.8	14.4 ± 10.3	55.6 ± 7.2
2	1.6 ± 2.7	23.7 ± 10.2	4.9 ± 8.4	25.7 ± 3.1	17.8 ± 1.9	6.0 ± 5.1	48.9 ± 20.3	17.0 ± 4.4	17.7 ± 11.4	55.6 ± 7.2
3	6.1 ± 1.4	23.7 ± 10.2	4.9 ± 8.4	27.7 ± 1.4	17.8 ± 1.9	7.0 ± 6.7	56.7 ± 16.9	23.5 ± 3.9	23.3 ± 13.2	55.6 ± 7.2
4	6.1 ± 1.4	23.7 ± 10.2	6.8 ± 7.0	34.7 ± 2.5	17.8 ± 1.9	9.3 ± 4.7	65.3 ± 22.8	23.5 ± 3.9	23.3 ± 13.2	55.7 ± 7.3
5	6.5 ± 0.9	23.7 ± 10.2	12.3 ± 2.0	35.5 ± 2.7	17.8 ± 1.9	11.4 ± 6.3	78.2 ± 18.6	23.5 ± 3.9	23.3 ± 13.2	55.7 ± 7.3
6		23.7 ± 10.2	13.6 ± 1.1	37.8 ± 5.9	25.1 ± 13.2	11.4 ± 6.3	85.9 ± 17.9	23.5 ± 3.9	23.3 ± 13.2	61.4 ± 11.8
7	No hubo más producción	24.8 ± 12.1	13.8 ± 1.4		25.1 ± 13.2	11.4 ± 6.3	85.9 ± 17.9	23.5 ± 3.9	24.1 ± 12.6	63.7 ± 12.1
8		24.8 ± 12.1	No hubo más producción	No hubo más producción	26.7 ± 15.9	13.9 ± 8.4	94.0 ± 14.9	23.5 ± 3.9	34.2 ± 14.9	68.2 ± 9.8
9		25.1 ± 12.8			28.1 ± 14.6	21.9 ± 12.0	95.8 ± 16.1	28.6 ± 5.96	37.1 ± 16.9	68.3 ± 9.6
10		28.2 ± 10.7			28.1 ± 14.6	25.1 ± 12.8	96.6 ± 16.2	34.3 ± 13.3	41.2 ± 18.5	68.7 ± 8.9

*Datos resaltados muestran la semana donde se alcanza el Rendimiento Máximo Significativo.

Así mismo, nos ayuda a obtener el peso unitario. En los dicariotes reconstituidos fue donde se observó una producción de esporóforos mayor, el resto de los dicariotes produjeron una menor cantidad.

La **Tabla 6.16** muestra el número de esporóforos producidos por 2 kg de sustrato. Los dicariote obtenidos a partir de la cepa L18 produjeron un bajo número de esporóforos entre 4 y 29. El dicariote reconstituido L19 produjo el mayor número de esporóforos de todos los dicariotes (191 esporóforos) y la cepa parental al igual que el dicariote (L19-16/L19-28) produjeron 2 esporóforos cada uno. En las cepas L20 el rango varió, de 3 a 183 esporóforos. La mayor cantidad de esporóforos se produjo, por lo general en la primera semanas de la cosecha, excepto en los dicariotes (L19-16/L19-28) y (L20-62/L20-79).

La **Tabla 6.17** presenta la producción acumulada de esporóforos con los valores resaltados de la semana en que se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS). La mayor cantidad de esporóforos se registró en los dicariotes reconstituidos de las cepas L19 y L20, mientras que los dicariotes que produjeron una menor cantidad fueron los parentales de las tres cepas.

6.4.3. *Peso unitario de esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.*

En la comercialización de hongos es importante el tamaño, un ejemplo de esto es que cuando se comercializa shiitake seco se requiere de esporóforos grandes

Tabla 6.16: Producción semanal (esporóforos frescos / 2kg sustrato)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42)	Dicariote (L20-62/L20-79)
1	7.0 ± 12.1	4.1 ± 2.9	16.0 ± 27.7	191.3 ± 44.1	2.0 ± 1.0	1.5 ± 1.3	183.5 ± 52.0	3.0 ± 1.0	8.3 ± 7.4	52.8 ± 18.6
2	0.0 ± 0.0	1.1 ± 2.6	0.0 ± 0.0	94.0 ± 84.6	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.0	40.2 ± 44.4	0.7 ± 0.6	2.0 ± 4.0	0.0 ± 0.0
3	29.3 ± 27.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.5 ± 26.5	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	42.2 ± 52.5	2.0 ± 2.0	4.0 ± 3.6	0.0 ± 0.0
4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 4.2	24.8 ± 15.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.5	21.7 ± 26.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5
5	4.0 ± 6.9	0.0 ± 0.0	17.0 ± 14.7	7.0 ± 14.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	13.0 ± 14.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6		0.0 ± 0.0	4.3 ± 5.9	6.0 ± 11.3	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	10.0 ± 7.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.5 ± 9.7
7	No hubo más producción	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.6		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.0	2.0 ± 2.2
8		0.0 ± 0.0	No hubo más producción	No hubo más producción	0.7 ± 1.2	0.5 ± 0.6	8.5 ± 5.5	0.0 ± 0.0	10.8 ± 18.9	2.8 ± 3.2
9		0.6 ± 1.1			0.3 ± 0.6	2.3 ± 2.6	2.5 ± 4.7	0.7 ± 1.2	2.3 ± 3.9	0.3 ± 0.5
10		2.0 ± 4.0			0.0 ± 0.0	2.3 ± 3.2	2.5 ± 4.7	2.3 ± 3.2	2.8 ± 3.4	0.3 ± 0.5

*Datos resaltados muestran la máxima producción de las 10 semanas.

Tabla 6.17: Producción semanal acumulada (esporóforos frescos / 2kg sustrato)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42)	Dicariote (L20-62/L20-79)
1	7.0 ± 12.1	4.1 ± 2.9	16.0 ± 27.7	191.3 ± 44.1	2.0 ± 1.0	1.5 ± 1.3	183.5 ± 52.0	3.0 ± 1.0	8.3 ± 7.4	52.8 ± 18.6
2	7.0 ± 12.1	5.3 ± 2.8	16.0 ± 27.7	285.3 ± 71.5	2.0 ± 1.0	2.0 ± 2.2	223.7 ± 77.4	3.7 ± 1.5	10.3 ± 8.0	52.8 ± 18.6
3	36.3 ± 16.6	5.3 ± 2.8	16.0 ± 27.7	300.8 ± 71.9	2.0 ± 1.0	2.3 ± 2.6	265.8 ± 66.8	5.7 ± 0.6	14.3 ± 9.1	52.8 ± 18.6
4	36.3 ± 16.6	5.3 ± 2.8	19.3 ± 25.0	325.5 ± 86.2	2.0 ± 1.0	3.0 ± 2.2	287.5 ± 75.7	5.7 ± 0.6	14.3 ± 9.1	53.0 ± 18.7
5	40.3 ± 11.8	5.3 ± 2.8	36.3 ± 10.7	332.5 ± 90.7	2.0 ± 1.0	3.3 ± 2.2	300.5 ± 72.5	5.7 ± 0.6	14.3 ± 9.1	53.0 ± 18.7
6		5.3 ± 2.8	40.7 ± 6.4	338.5 ± 96.0	2.7 ± 2.1	3.3 ± 2.2	310.5 ± 70.2	5.7 ± 0.6	14.3 ± 9.1	61.5 ± 24.5
7	No hubo más producción	5.6 ± 3.1	41.0 ± 7.0		2.7 ± 2.1	3.3 ± 2.2	319.0 ± 68.7	5.7 ± 0.6	15 ± 8.2	63.5 ± 25.7
8		5.6 ± 3.1	No hubo más producción	No hubo más producción	3.3 ± 3.2	3.8 ± 2.2	321.5 ± 70.0	5.7 ± 0.6	25.8 ± 15	66.3 ± 22.9
9		6.1 ± 3.2			3.7 ± 2.9	6.0 ± 3.6	324.0 ± 70.9	6.3 ± 0.6	28 ± 15.7	66.5 ± 22.5
10		8.1 ± 3.7			3.7 ± 2.9	8.3 ± 5.6	324.0 ± 70.9	8.7 ± 3.8	30.8 ± 15.3	66.8 ± 22.0

*Datos resaltados muestran la semana donde se alcanza el Rendimiento Máximo Significativo.

para que no pierdan mucho tamaño al deshidratarse. Reportar el peso unitario o promedio es importante porque con él podemos darnos una idea del tamaño de los esporóforos producidos. El peso unitario se obtiene al dividir el peso total de la cosecha fresca entre el número de esporóforos frescos cosechados.

La **Tabla 6.18** muestra la evaluación del peso unitario de los esporóforos conforme avanza el cultivo a lo largo de las 10 semanas. Los datos obtenidos muestran que los esporóforos de mayor tamaño son obtenidos en las primeras semanas de producción, sólo los dicariotes (L19-16/L19-28) y reconstituido de la cepa L20 presentaron esporóforos de mayor tamaño hasta las últimas semanas (semana 9 y 8 respectivamente).

En la **Tabla 6.19** se muestran el peso unitario de los esporóforos acumulados de las cepas usadas. Se resaltó el peso unitario de los esporóforos que logran obtenerse en la semana a la cual se alcanza el rendimiento máximo significativo. El peso unitario de los dicariotes reconstituidos y no parental de la cepa L18 fue de 2 y 5 gramos por esporóforo respectivamente, estos fueron los pesos promedio menores de todos los dicariotes. El dicariote parental produjo esporóforos de un tamaño mayor respecto a los dos dicariotes de su cepa (66 g /esporóforo).

En la cepa L19 se observó que la producción de esporóforos pequeños se presentó en el dicariote reconstituido (13 g /esporóforo) mientras que los dicariotes parental y (L19-16/L19-28) mostraron esporóforos con pesos promedios mayores de 160 y 81 g /esporóforo respectivos para cada uno. Para la cepa L20 el menor

valor de peso promedio lo presentó el dicariote reconstituido (13 g /esporóforo) y el mayor el dicariote parental (137 g /esporóforo). Los dicariotes progenie produjeron esporóforos más semejantes entre sí (51 y 43 g /esporóforo) y mas pequeños que el dicariote parental.

6.4.4. Evaluación estadística de diferentes parámetros de producción de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Para analizar las diferencias entre las cepas considerando el rendimiento máximo significativo (RMS) para los valores de producción acumulada, peso unitario acumulado y número de esporóforos, se realizó un análisis de varianza de tipo aleatorio y otro en bloques (es decir considerando el efecto de las repeticiones) para identificar las diferencias estadísticas. Una vez encontradas las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan para su clasificación y así poder identificar las cepas más productivas.

También se reportó la velocidad de producción, que es el tiempo que requiere cada cepa para llegar al rendimiento máximo significativo desde su incubación en el sustrato. Lo anterior, se obtuvo dividiendo el rendimiento máximo significativo de cada cepa entre los días requeridos para llegar a este valor. La velocidad de producción es un parámetro útil porque indica directamente la precocidad de la cepa y las unidades en las que se expresa son: [(g de esporóforos frescos/100 g de sustrato seco)/ tiempo de cultivo en días] al RMS.

Tabla 6.18: Peso unitario semanal (g esporóforos / número esporóforos frescos)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42)	Dicariote (L20-62/L20-79)
1	0.7 ± 1.3	56.7 ± 18.8	1.0 ± 1.8	0.9 ± 0.3	118.6 ± 53.0	28.8 ± 23.1	1.1 ± 0.3	50.5 ± 10.5	19.3 ± 10.5	13.0 ± 3.8
2	0.0 ± 0.0	10.2 ± 18.5	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.3	0.0 ± 0.0	9.1 ± 18.2	1.6 ± 2.0	21.9 ± 8.0	4.0 ± 8.0	0.0 ± 0.0
3	1.1 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.7	0.0 ± 0.0	11.3 ± 22.7	1.7 ± 2.4	22.3 ± 3.6	15.6 ± 3.6	0.0 ± 0.0
4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 3.4	10.2 ± 16.2	0.0 ± 0.0	8.5 ± 17.1	1.4 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.3 ± 2.7
5	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	23.7 ± 47.4	3.3 ± 4.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6		0.0 ± 0.0	2.7 ± 2.7	1.7 ± 2.0	41.7 ± 72.2	0.0 ± 0.0	3.7 ± 2.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.6 ± 4.7
7	No hubo más producción	0.0 ± 0.0	2.5 ± 4.3		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 6.3	5.0 ± 6.3	12.3 ± 22.5
8		0.0 ± 0.0	No hubo más producción	No hubo más producción	9.1 ± 15.7	27.5 ± 35.0	5.1 ± 3.2	0.0 ± 9.2	6.9 ± 9.2	9.6 ± 11.4
9		3.7 ± 9.9			16.0 ± 27.7	35.1 ± 26.6	2.2 ± 2.8	24.9 ± 6.5	4.6 ± 6.5	1.4 ± 2.7
10		10.5 ± 17.6			0.0 ± 0.0	17.1 ± 13.5	1.3 ± 1.5	17.4 ± 8.3	7.0 ± 8.3	3.8 ± 7.6

*Datos resaltados muestran la máxima producción de las 10 semanas.

Tabla 6.19: Peso unitario semanal acumulado (g esporóforos / número esporóforos frescos)

Cepa	L 18			L 19			L 20			
	Reconstituido	Parental	Dicariote No parental (L18-40/L18-59)	Reconstituido	Parental	Dicariote Parental (L19-16/L19-28)	Reconstituido	Parental	Dicariote (L20-39/L20-42)	Dicariote (L20-62/L20-79)
1	0.7 ± 1.3	56.7 ± 18.8	1.0 ± 1.8	0.9 ± 0.3	118.6 ± 53.0	28.8 ± 23.1	1.1 ± 0.3	50.5 ± 12.6	19.3 ± 10.5	13.0 ± 3.8
2	0.7 ± 1.3	66.8 ± 21.1	1.0 ± 1.8	2.0 ± 1.1	118.6 ± 53.0	37.9 ± 25.7	2.7 ± 1.8	72.4 ± 13.0	23.3 ± 12.4	13.0 ± 3.8
3	1.8 ± 0.4	66.8 ± 21.1	1.0 ± 1.8	2.6 ± 1.7	118.6 ± 53.0	49.2 ± 41.7	4.4 ± 3.8	94.7 ± 17.1	38.9 ± 13.5	13.0 ± 3.8
4	1.8 ± 0.4	66.8 ± 21.1	5.0 ± 1.7	12.8 ± 15.5	118.6 ± 53.0	57.8 ± 30.2	5.8 ± 4.9	94.7 ± 17.1	38.9 ± 13.5	14.4 ± 4.0
5	2.1 ± 0.9	66.8 ± 21.1	7.2 ± 3.6	13.1 ± 15.3	118.6 ± 53.0	81.4 ± 40.8	9.1 ± 3.8	94.7 ± 17.1	38.9 ± 13.5	14.4 ± 4.0
6		66.8 ± 21.1	9.8 ± 5.9	14.9 ± 14.1	160.3 ± 44.7	81.4 ± 40.8	12.8 ± 3.2	94.7 ± 17.1	38.9 ± 13.5	20.9 ± 5.4
7	No hubo más producción	66.8 ± 21.1	12.3 ± 1.7		160.3 ± 44.7	81.4 ± 40.8	12.8 ± 3.2	94.7 ± 17.1	43.9 ± 16.2	33.2 ± 20.3
8		66.8 ± 21.1	No hubo más producción	No hubo más producción	169.3 ± 56.6	108.9 ± 66.3	17.9 ± 2.4	94.7 ± 17.1	50.8 ± 16.6	42.8 ± 30.8
9		70.6 ± 21.8			185.3 ± 65.2	144.0 ± 84.2	20.1 ± 4.9	119.6 ± 36.6	55.4 ± 18.7	44.1 ± 31.0
10		81.1 ± 21.0			185.3 ± 65.2	161.1 ± 72.2	21.4 ± 3.7	137.0 ± 48.1	62.4 ± 20.6	47.9 ± 33.0

*Datos resaltados muestran la semana donde se alcanza el Rendimiento Máximo Significativo.

El rendimiento, peso unitario y velocidad de producción del dicariote reconstituido y el dicariote no parental de la cepa L18 (**Tabla 6.20**), no muestran diferencias significativas, ambos son poco productores, con esporóforos pequeños. Por otro lado el rendimiento, la velocidad de producción y el tamaño de los esporóforos producidos por el dicariote parental L18 fueron significativamente mayores.

Tabla 6.20: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L18 en el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tipo De dicariote	Rendimiento (g esporóforo fresco / 100g sustrato seco)	Peso unitario (g esp./no. esp. fresco)	Velocidad de producción °	Número de esporóforos frescos/ 2 kg sustrato
Reconstituido	6.1 ± 1.4 ^a	1.8 ± 0.4 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	36.3 ± 16.6 ^b
No parental (L18-59/L18-40)	6.8 ± 7.0 ^a	5.0 ± 1.7 ^a	0.2 ± 0.2 ^a	19.3 ± 25.0 ^{ab}
Parental	23.7 ± 10.2 ^b	66.8 ± 21.1 ^b	1.7 ± 0.7 ^b	5.3 ± 2.8 ^a
Parental (L18-2/L18-3)	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.

° Unidades: [(g de esporóforos frescos/100 g de sustrato seco)/ tiempo de cultivo en días] al RMS.

*Letras diferentes entre cepas indican diferencias significativas entre los valores de rendimiento, número de esporóforos frescos y peso unitario al utilizar la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$ de significancia).

N. A. El dicariote parental (L18-2/L18-3) no produjo esporóforos normales.

En la cepa L19 (**Tabla 6.21**), se observaron diferencias significativas en el rendimiento entre el dicariote reconstituido y el dicariote parental. El dicariote reconstituido fue el que presentó mayor rendimiento pero produce esporóforos más pequeños que el parental y el (L19-28/L19-16). Es de hacer notar que el dicariote reconstituido mostró la mayor velocidad de producción.

Tabla 6.21: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L19 en el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tipo de dicariote	Rendimiento (g esporóforo fresco / 100g sustrato seco)	Peso unitario (g esp./no. esp. fresco)	Velocidad de producción °	Número de esporóforos frescos/ 2 kg sustrato
Reconstituido	34.7 ± 2.5 ^b	12.8 ± 15.5 ^a	1.2 ± 0.1 ^b	325.5 ± 86.2 ^b
Parental (L19-28/L19-16)	11.4 ± 6.3 ^a	81.4 ± 40.8 ^b	0.3 ± 0.2 ^a	3.3 ± 2.2 ^a
Parental	25.1 ± 13.2 ^{ab}	160.3 ± 44.7 ^c	0.6 ± 0.3 ^a	2.7 ± 2.1 ^a
No parental (L19-50/L19-64)	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.

° Unidades: [(g de esporóforos frescos/100 g de sustrato seco)/ tiempo de cultivo en días] al RMS.

*Letras diferentes entre cepas indican diferencias significativas entre los valores de rendimiento, número de esporóforos frescos y peso unitario al utilizar la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$ de significancia).

N. A. El dicariote no parental (L19-50/L19-64) no produjo esporóforos.

Para la cepa L20 (Tabla 6.22), se observó que el dicariote (L20 -62/L20-79) y el reconstituido muestran rendimientos similares y significativamente mayores que los producidos por el dicariote parental y dicariote (L20-39/L20-42).

Tabla 6.22: Comparación de los parámetros de producción de dicariotes de la cepa L20 en el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tipo de dicariote	Rendimiento (g esporóforo fresco / 100g sustrato seco)	Peso unitario (g esp./no. esp. fresco)	Velocidad de producción °	Número de esporóforos frescos/ 2 kg sustrato
Reconstituido	85.9 ± 17.9 ^b	12.8 ± 3.2 ^a	2 ± 0.4 ^c	310.5 ± 70.1 ^c
(L20-42/L20-39)	34.2 ± 14.9 ^a	50.8 ± 16.6 ^a	0.6 ± 0.3 ^a	25.8 ± 15.0 ^a
(L20-62/L20-79)	68.2 ± 9.3 ^b	42.8 ± 30.8 ^a	1.2 ± 0.2 ^b	66.3 ± 22.9 ^b
Parental	34.3 ± 13.3 ^a	137.0 ± 48.1 ^b	0.5 ± 0.2 ^a	8.7 ± 3.8 ^a

° Unidades: [(g de esporóforos frescos/100 g de sustrato seco)/ tiempo de cultivo en días] al RMS.

*Letras diferentes entre cepas indican diferencias significativas entre los valores de rendimiento, número de esporóforos frescos y peso unitario al utilizar la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0.05$ de significancia).

No se pudieron identificar los tipos parentales y no parentales.

La cepa parental produjo los esporóforos de mayor tamaño. El dicariote más precoz fue el reconstituido seguido por el dicariote (L20-62/L20-79).



6.5. Morfología de los esporóforos de las cepas L18, L19 y L20 de *Lentinula edodes*.

Los parámetros de producción y morfología de los dicariotes son importantes porque el valor de una cepa comercial depende en buena parte de ellas. En general en el mercado mundial, los esporóforos de shiitake de mayor calidad y más apreciados son los que tienen forma redondeada, con borde enrollado hacia abajo antes de que el sombrero o píleo se extienda totalmente y tallo o estípite central. La textura debe ser carnosa, espesa y firme. Así mismo, deben ser frescos, libres de contaminaciones e impurezas. La mayor parte de estas características son fáciles de controlar si la cosecha se lleva a cabo a tiempo y en forma adecuada (Chen, 2004).

El tamaño, color, sabor y olor son característicos de cada cepa y dependiendo de las preferencias del consumidor será su comercialización. Cuando el shiitake se comercializa seco, se prefieren esporóforos de tamaño grande, porque con el secado pierden volumen. En la comercialización de shiitake fresco no se sigue el mismo patrón, en un paquete comercial es posible encontrar esporóforos de diferentes tamaños con un peso promedio de 30 g / esporóforo.

En las Tabla 6.23, 6.24 y 6.25 se muestran resumidas las características sobresalientes de los esporóforos producidos por los dicariotes de las cepas L18, L19 y L20.

Tabla 6.23: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L18.

Características	Dicariotes			
	Parental	Reconstituido	Progenie	
			Tipo parental (L18-2/L18-3)	Tipo no parental (L18-40/L18-59)
Tamaño*	Grande / Mediano	Medianos	Chicos	Pequeños
Cantidad de esporóforos	Escaso	Escaso	Muy escaso	Abundante
Color	Café oscuro intenso	Crema medio amarillento	Café oscuro	Café muy claro con escamas escasas
Olor característico a shiitake	Intenso	Ligero	Ligero	Intenso
Humedad	Normal, (intermedia)	Baja (secos)	Normal	Alta (húmedos)
Otras	Estípites gruesos y cortos	Tipo <i>Pleurotus</i> (cornetas) separados y en ramilletes	Píleos sin abrir y pequeños	Mayoría de esporóforos son similares
Imagen				





*Grande (>5 cm), Mediano (5 - 2.5 cm), Pequeños (<2.5 cm)

Tabla 6.24: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L19.

Características	Dicariotes			
	Parental	Reconstituido	Progenie	
			Tipo parental (L19-16/L19-28)	Tipo no parental (L19-50/ L19-64)
Tamaño*	Grandes	Chicos y Medianos	Mediano	Medianos
Cantidad de esporóforos	Escaso	Abundante	Escaso	Abundante
Color	Café oscuro	Crema	Café oscuro	Café oscuro
Olor característico a shiitake	Normal	Distinto a shiitake, fuerte a "pescado"	Muy ligero	Ligero
Humedad	Normal	Media	Baja (secos)	Media
Otras	Algunos no expanden completamente el píleo	Tipo <i>Pleurotus</i> . Al inicio muy pequeños. Píleos largos y estípites reseco	Producción muy pobre y esporóforos "heterogéneos"	Píleos sin abrir, algunos abren por arriba. Algunos estípites cafés
Imagen				

*Grande (>5 cm), Mediano (5 – 2.5 cm), Pequeños (<2.5 cm)

Tabla 6.25: Morfología de esporóforos de dicariotes de la cepa L20.

Características	Dicariotes			
	Parental	Reconstituido	Progenie	
			Tipo 1 (L20-39/L20-42)	Tipo 2 (L20-62/L20-79)
Tamaño*	Grandes	Pequeños	Medianos	Medianos
Cantidad de esporóforos	Escaso	Abundante	Semi abundante	Abundante, muy juntos
Color	Café muy oscuro con escamas blancas en las orillas	Crema homogéneo	Color café oscuro con escamas blancas	Café oscuro con escamas color crema
Olor característico a shiitake	Ligero	Distinto a shiitake, ligero a "pescado"	Ligero	Normal
Humedad	Baja(secos)	Alta	Baja (secos)	Baja (secos)
Otras	Esporóforos similares en color y tamaño	Tipo <i>Pleurotus</i> . Pequeños y en gran número	Ligeros	Ciertos esporóforos parecen fusionados con otros
Imagen				

*Grande (>5 cm), Mediano (5 - 2.5 cm), Pequeños (<2.5 cm)

A pesar de ser difícil de encontrar, se consiguió shiitake fresco en un supermercado, comercializado por “Hogon Leben,” (**Figura 6.5**). Las características de estos esporóforos comerciales fueron interesantes para compararlos con los nuestros, por lo cual se evaluaron algunas características que se muestran en la **Tabla 6.26**.



Figura 6.5: Paquete de shiitake comercializado por “Hongos Leben”.

Tabla 6.26: Características morfológicas de los cuerpos fructíferos de la cepa comercial.

Características morfológicas	Cepa comercial
Tamaño*	Mediano
Color	Café oscuro con escamas crema
Olor característico a shiitake	Con poco aroma
Contenido de Humedad	Baja (semi seco)
Otras	Tamaño muy variado

*Grande (>5 cm), Mediano (5 - 2.5 cm), Pequeños (<2.5 cm)

Al comparar las características morfológicas de los dicaríotes de la progenie obtenidos en las cepas L19 y L20 contra los hongos comerciales, puede apreciarse que son similares respecto al color y tamaño. En la **Figura 6.6** se muestra una comparación entre los esporóforos producidos por el dicaríote L20-62/L20-79 y la cepa comercial.



Figura 6.6: Comparación entre los esporóforos de la cepa comercial y esporóforos de la cepa nueva del dicariote (L20-62/L20-79).

El dicariote no parental (L18-40/L18-59) que produjo esporóforos de la cepa L18, mostró características muy diferentes respecto a los esporóforos producidos por los dicariotes progenie de las otras cepas y de la cepa comercial (**Figura 6.7**).

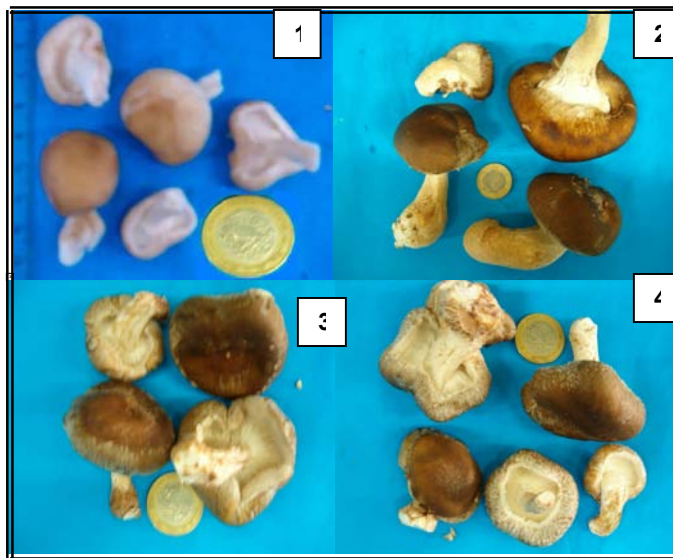


Figura 6.7: Esporóforos de shiitake dicariotes: L18-40/L18-59 (1), L19-16/L19-28 (2), L20-39/L20-42(3) y L20-62/L20-79(4).

7. DISCUSIÓN.

Al inicio del cultivo controlado de shiitake, las cepas fueron aisladas de la naturaleza. En la actualidad existe una gran variedad debido a que en la naturaleza shiitake se reproduce sexualmente y con meiosis donde ocurre la recombinación genética. Las cepas L18, L19 y L20 tienen características en común como son el producir esporóforos de gran tamaño, de color café oscuro y tener la desventaja de poseer bajos rendimientos (24-83%), **Tabla 5.1**, en comparación con otras cepas de shiitake las cuales pueden llegar a rendimientos superiores del 100% como las cepas L5, L9 o L15. (Ramírez & Leal, 2002).

Para que una cepa sea atractiva a los productores, debe poseer un rendimiento alto y esporóforos con características agradables al consumidor. Las características morfológicas ideales de un hongo no pueden generalizarse, debido a que siempre habrá mercado para los diferentes gustos. Un ejemplo de esto es el champiñón blanco y el hongo “portobello”, son de la misma familia pero el último es de color café y tamaño más grande, así mismo el hongo “crimini”, es el “portobello” cuando está pequeño.

Respecto a las características de calidad, los esporóforos de shiitake deben tener forma redondeada, borde enrollado hacia abajo antes de extenderse y tallo

central, la textura debe ser carnosa, espesa y firme, también deben ser frescos, libres de contaminaciones e impurezas (Chen, 2004).

La mayor parte de las cepas comerciales de shiitake disponibles actualmente, han sido aisladas de la naturaleza y poco se ha trabajado en el desarrollo de nuevas cepas que posean tanto mejores parámetros de producción, como morfológicas. Este trabajo se realizó utilizando la progenie meiótica de los esporóforos de las cepas. Ésta vía es útil porque a partir de la progenie meiótica es posible obtener una gran cantidad de dicariotes que pueden llevarse a fructificar para hacer pruebas tanto de rendimiento como de morfología. Sin embargo este procedimiento de obtención y clasificación de progenie meiótica es largo y laborioso.

7.1. Progenie meiótica y clasificación.

En la clasificación de las progenes meióticas de las tres cepas se observó la formación de 5 conjuntos: cuatro de los tipos de compatibilidad sexual y un quinto conjunto donde se clasificó a la progenie meiótica infértil. Se nombró como infértil debido a que ninguna colonia de este grupo se apareó con el resto de la progenie. En los grupos de tipo parental de las cepas L18 y L19 se observó que se clasificaba más del 50% del total de la progenie meiótica, mientras que en los grupos de tipo no parental se clasificó un aproximado del 20% de la progenie. En la clasificación de la cepa L20 los grupos tuvieron una proporción

mas equilibrada. Se advirtió también que en las tres cepas el tipo de compatibilidad IV presentaba una baja densidad de monocariotes, aproximadamente del 1% (**Tablas 6.1, 6.2 y 6.3**). Así mismo, éste grupo mostró una gran susceptibilidad a la contaminación y pérdida de vigor del micelio durante el almacenamiento.

El comportamiento observado en las proporciones de los respectivos grupos y tipos de compatibilidad podría estar relacionado con los mecanismos de regulación de shiitake. En este caso podríamos sugerir la producción de esporas muy sensibles, que no germinan fácilmente, y de llegar a hacerlo producen micelio que pierde viabilidad rápidamente o que genera complicaciones a la hora de aparearlo, por lo cual las colonias se pierden antes de ser apareadas o simplemente no son identificadas.

Los problemas que se presentaron para identificar los grupos parentales y no parentales de la cepa L20 tienen que ver probablemente con la naturaleza de las colonias neohaplontes. Se sabe que al recuperar los componentes monocarióticos usando la dedicariotización se observan por lo general reacciones de compatibilidad normales entre los neohaplontes. Sin embargo se han observado también en ocasiones variaciones en las reacciones de apareamiento así como en la recuperación de los componentes monocariotes, cuya causa no ha sido investigada a la fecha (Ramírez & Leal, 2002). Por lo anterior, es posible considerar que en el proceso de dedicariotización ocurren

algunas alteraciones en las colonias de neohaplontes, razón que explicaría la ausencia de apareamientos positivos en los monocariotes de la cepa L20 y que en el caso de las cepas L18 y L19 se obtuvieran apareamientos positivos con sólo algunos integrantes de las progenies correspondientes (**Tablas 6.4, 6.5y 6.6**).

Podría considerarse que los tipos III y IV de la cepa L20 son de tipo no parental si existiera una relación entre el número de progenie clasificada y el tipo de compatibilidad sexual. Tanto en la cepa L18 como la L19, el tipo de compatibilidad con menor cantidad de progenie meiótica se identificó como no parental, pero no es posible asegurarlo, por lo cual necesitaríamos obtener nuevamente colonias de neohaplontes de la cepa L20 y realizar los apareamientos correspondientes.

7.2. Relación de morfología micelial respecto a la producción.

Al elegir los monocariotes representantes de cada tipo de compatibilidad, se trató de seleccionar aquellos que mostraran características singulares tanto en la morfología del micelio dicariótico como en ambos monocariotes que le dieron origen. Al llevar a propagar el micelio dicariótico en inóculo de trigo, se observaron algunos casos donde el micelio era muy frágil y susceptible a la contaminación por lo cual se descartaron las colonias que se escogieron desde un principio y se llevaron aquellas que mostraran mayor vitalidad para colonizar

completamente el grano. La cepa en la que se presentó con mayor frecuencia este comportamiento, fue la L18 en los dicariotes de tipo parental.

La mayor parte de las colonias monocarióticas seleccionadas tomaron aproximadamente 22 días en colonizar la caja Petri. Las cepas reconstituidas por lo general mostraron mayor rapidez, requiriendo en promedio 19 días para colonizarla.

Al hacer los respectivos apareamientos, se observó que el menor tiempo para colonizar la caja Petri con medio extracto de malta (EMA), lo mostró la cepa L20 reconstituida, fue muy vigorosa y presentó la mayor velocidad de producción (**Tabla 6.21**). La cepa L19 reconstituida (**Tabla 6.20**) requirió más de 30 días en colonizar la caja Petri, a pesar de esto, la peor velocidad de producción se observó en el dicariote no parental de la cepa L18 (**Tabla 6.19**).

No se encontró relación entre la producción con respecto a el vigor del crecimiento en medio agar extracto de malta (EMA) y el tiempo de colonización en las cajas Petri. Sólo se observó que el dicariote que presentó mayor rendimiento (L20 reconstituido) fue el que requirió menor tiempo en colonizar la caja Petri con medio EMA. Los dicariotes reconstituidos L18 y L19 fueron los que tuvieron rendimientos menores junto con el dicariote no parental (L18-59/L18-40).

Las características morfológicas más semejantes en cuanto al micelio y esporóforos fueron observadas en los dicariones parentales, que mostraron también rendimientos muy semejantes (24 a 35%). **Tablas 6.20 y 6.21.** Los dicariones de la cepa L20 fueron los más productores respecto a los dicariones de las cepas L18 y L19.

No se encontró alguna característica morfológica en el micelio de los dicariones que no produjeron esporóforos que pudiera relacionarse con la incapacidad de fructificar. Los dos dicariones presentan micelio muy vigoroso y sus características morfológicas son casi opuestas. **(Tabla 6.8 y 6.10).**

7.3. *Parámetros de producción y morfología de esporóforos.*

En los dicariones de la cepa L18 no se obtuvo ninguna mejoría respecto al rendimiento y la velocidad de producción. Morfológicamente, el dicarione no parental (L18-40/L18-59) produjo esporóforos con características muy opuestas a la cepa parental, la cual produce esporóforos grandes de color café oscuro. Los esporóforos producidos por el dicarione no parental (L18-40 /L18-59) son de un tamaño pequeño y color café amarillento sumamente claro **(Tabla 6.23)**. Si se comparan con esporóforos producidos por otras cepas características de esporóforos pequeños y de tonos café claro (L5, L9 y L15) presentan aún un tamaño menor y color café más claro (Ramírez & Leal, 2002, 2001).

Para la cepa L19 se logró obtener dicariotes similares estadísticamente al parental en cuanto al rendimiento y velocidad de producción, aunque existen diferencias significativas entre ellos respecto al peso unitario. Así mismo, la cepa parental produjo los esporóforos de mayor tamaño del doble del tamaño que el dicariote parental y diez veces más grandes que el reconstituido.

Tanto el dicariote parental (L18-2/L18-3) de la cepa L18 y el dicariote no parental (L19-50/L19-64) de la cepa L19, produjeron cuerpos fructíferos aberrantes, sin píleo abierto, ni basidiosporas. Conservaron las características del color y en el caso del dicariote no parental L19, la producción fue abundante, sin embargo no se reportaron los datos de los parámetros de producción debido a que carecen de valor comercial.

Los dicariotes obtenidos de la progenie de la cepa L20 produjeron esporóforos que respecto al rendimiento se dividieron en dos grupos. El reconstituido fue el más productor sin diferencia estadística significativa con el dicariote (L20-62/L20-79) que presentó un rendimiento aceptable. El dicariote (L20-42/L20-39) mostró el rendimiento más bajo en la cepa, estadísticamente similar al parental. Los dicariotes de la progenie presentaron un peso unitario similar, que fue menor que el peso reportado para el parental, el cual produjo los esporóforos de mayor tamaño. En velocidad de producción el reconstituido y los dicariotes obtenidos de la progenie tuvieron un mejor desempeño que el parental, el dicariote más precoz fue el reconstituido. Morfológicamente los esporóforos de los dicariotes

(L20-62/L20-79) y (L20-42/L20-39) fueron muy semejantes en color al parental y éste fue casi del doble del tamaño de los dicariotes progenie (**Tabla 6.25**).

Los tres dicariotes reconstituidos presentaron una morfología tipo *Pleurotus*, esporóforos pequeños (2 - 12 g/esporóforo) y en mayor número que la parental y dicariotes de la progenie meiótica. El comportamiento de las cepas reconstituidas podría deberse a las alteraciones que ocurren al someter las cepas parentales al proceso de dedicariotización.

Se obtuvieron dicariotes con características interesantes en cuanto a la velocidad de producción, cantidad de esporóforos y peso unitario. Sin embargo no se obtuvieron mejoras en los dicariotes obtenidos de la progenie meiótica respecto al rendimiento de producción en las cepas parentales L18 y L19. Solo en la cepa L20 se obtuvo un dicariote con mayor rendimiento (68.2%) que el parental (34.3%) aunque debe mencionarse que el rendimiento obtenido por la cepa parental fue menor que el reportado en estudios anteriores (83.5%) (**Tablas 6.20, 6.21 y 6.22**).

Debido a que la clasificación de los tipos de compatibilidad sexual en las tres cepas fue muy lenta, el trabajo fue realizado en varias etapas o lotes, mientras se completaba la totalidad de los dicariotes a inocular. Por este motivo, las cepas se fructificaron en diferentes temporadas del año. A pesar de que el cuarto de fructificación cuenta con sistema de ventilación y riego, se observó que

el ambiente podía influir en el control de las condiciones ambientales, esencialmente para mantener una alta humedad (cerca del 90%). Estas variaciones de las condiciones ambientales durante la fructificación del hongo, podrían explicar las diferencias en los rendimientos de las cepas parentales que se obtuvieron en este estudio, que fueron nuevas a las reportadas con anterioridad, por ejemplo 23.7% contra 63.6% para la cepa L18 y contra 34.3% contra 83.5% para la cepa L20 (**Tablas 5.1, 6.20 y 6.22**).

Además de las variaciones en las condiciones ambientales en la fructificación del hongo, debe considerarse que el envejecimiento de las cepas por resiembra podría haber perjudicado de cierta forma el rendimiento de éstas, así como el tiempo de incubación de las bolsas antes de sacarlas al cuarto de fructificación. En estudios anteriores (Lopez & Mireles, 2005) se mantuvo un periodo de incubación de 10 semanas, mientras que en el presente trabajo solo se espero a que las bolsas se invadieran por completo del micelio para sacarlas a fructificar por lo que el periodo de incubación fue menor.

8. CONCLUSIONES.

- Fue posible identificar los 4 tipos de compatibilidad sexual de las cepas L18, L19 y L20 del hongo comestible *Lentinula edodes*, aunque solo se identificaron los grupos parentales y no parentales en las cepas L18 y L19
- No se encontró una relación entre las características morfológicas del micelio de los monocariotes y dicariotes con respecto a las parámetros de producción y morfología de los esporóforos.
- Los dicariotes reconstituidos a partir de los neohaplontes mostraron esporóforos de tipo *Pleurotus* con los rendimientos más altos en las cepas L19 y L20, sin embargo su peso unitario fue el menor en las 3 cepas.
- Uno de los dicariotes obtenidos de las 3 cepas (dicariote no parental L18) mostró esporóforos muy diferentes morfológicamente (pequeños y muy claros) de los producidos por las cepas parentales (grandes y muy oscuros).
- Dos dicariotes que se llevaron a fructificar, el dicariote parental (L18-2/L18-3) y el dicariote no parental (L19-50/L19-64), produjeron cuerpos fructíferos aberrantes (el píleo no se abrió y sin producción de basidiosporas).

- En general, en los dicariotes obtenidos por dedicariotización presentaron mejores rendimientos que los obtenidos a partir de la progenie meiótica, así mismo muestran mejores velocidades de producción.
- La variabilidad en los parámetros de producción de las cepas sugiere la necesidad de extender el mejoramiento de cepas a partir de progenies meióticas.

9. PERSPECTIVAS.

Al comparar los parámetros de producción y morfología de los esporóforos, de los diferentes dicariotes que se llevaron a fructificar, se piensa que los dicariotes L18-40/L18-59 y L20-62/L20-79 son una buena opción para llevar a fructificarlos comercialmente. El primero mostró características morfológicas que no se observaron en las cepas trabajadas (hongos pequeños y de color crema), sin embargo tiene rendimientos muy bajos por lo cual sería necesario evaluar el posible efecto de las condiciones ambientales y el sustrato para determinar la estabilidad de las modificaciones. De los dicariotes progenie fructificados, L20-62/L20-79 presentó el mayor rendimiento y peso unitario promedio y buena velocidad de producción. La morfología de sus esporóforos fue aceptable, en algunas ocasiones se cosecharon esporóforos que parecía se habían fusionado.

Las 3 cepas mostraron en estudios anteriores rendimientos bajos y esporóforos grandes, sin embargo en este estudio los rendimientos de los dicariotes

Conclusiones y Perspectivas

derivados de estas cepas parentales resultaron más bajos mientras que sus esporóforos fueron por lo general más pequeños y más abundantes. Resulta entonces necesario un programa de mejoramiento genético donde se plantee un trabajo más extenso, por ejemplo:

- Llevar a fructificar una mayor cantidad de dicariotes procedentes de la progenie meiótica dado que se cuenta con una gran disponibilidad de ellos.
- Mantener un control homogéneo de las condiciones de las naves de cultivo o procurar llevar a fructificar a todos los dicariotes en un mismo lote.
- Realizar cruzas entre los neohaplontes y la progenie meiótica clasificada.
- Recuperar una mayor cantidad de progenie meiótica de los grupos no parentales de las cepas L18 y L19, así como de los grupos 2 de la L20.
- Identificar grupos parentales y no parentales en la progenie meiótica de la cepa L20.

10. GLOSARIO.

Basidiomicetes. Equivalente de Basidiomycotina, el cual es una subdivisión taxonómica perteneciente a la división Eumycota, que a su vez pertenece al reino Fungi.

Basidio. Célula especial, característica de los basidiomicetes, sobre la que se forman las basidiosporas.

Basidiospora. Espora formada sobre la parte externa de un basidio, resultado de un proceso de reproducción sexual formada en el interior del basidio.

Bipolar. Se dice de la sexualidad en la que los factores de compatibilidad son solamente de dos clases (A1 y A2).

Cepas. Organismos que tienen rasgos característicos de una clase. Raza, casta, origen.

Parental. Se refiere a uno o a ambos progenitores: herencia genética parental.

Cuerpos fructíferos. Ver esporóforo.

Dedicarización. Procedimiento que consiste en separar los núcleos de un micelio dicariote por medios artificiales, ya sean físicos (microcirugía), químicos (uso de compuestos químicos con alta toxicidad) o biológicos (uso de enzimas para la producción de protoplastos)

Dicariote. Célula que tiene un dicarion, es decir, dos núcleos genéticamente compatibles.

Diploide. Se dice del organismo o de cualquiera de sus fases de crecimiento que tiene doble dotación de cromosomas.

Eficiencia biológica o rendimiento. Son los gramos de esporóforos frescos por 100 gramos de sustrato seco.

Esporadas. Conjunto o masa de esporas de un hongo desprendidas del esporóforo.

Esporas. Pequeña unidad de propagación, unicelular o pluricelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que funciona como una semilla, aunque diferente de esta última porque una espora no tiene un embrión preformado.

Esporóforos. Cualquier estructura portadora de esporas, ya sean asexuales o sexuales. También se denomina fructificación o cuerpo fructífero.

Estípite. Pie que sostiene el píleo de un esporóforo.

Eucarionte. Organismo cuyas células poseen un núcleo verdadero (rodeados de una doble membrana perforada), mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas y ribosomas entre otras características; es decir con un grado de organización celular más complejo que el de un organismo procariótico.

Fenotipo. En un organismo, manifestación externa de un conjunto de caracteres hereditarios que dependen tanto de los genes, como del ambiente.

Fíbula. También denominada conexión en grapa o gancho: es una conexión hifal a manera de puente, característica del micelio secundario o dicariótico de muchos basidiomicetes.

Genes alelos. Cada una de las formas alternativas de un gen que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos.

Genotipo. Conjunto de genes característicos de cada especie vegetal o animal.

Haploide. Organismo, o fase de su ciclo de vida cuyas células tienen el número de cromosomas reducido a una serie.

Heterocigoto. Organismo o individuo que procede de la unión de gametos de diferentes características genéticas. Híbrido

Heterotálico. Especie que requiere de la unión de dos talos compatibles para llevar a cabo la reproducción sexual, sin considerar la posible presencia de órganos masculinos o femeninos en el mismo individuo. Heterotalismo es la condición que presentan las especies heterotálicas.

Heterótrofos. Organismo incapaz de elaborar su propia sustancia orgánica de sustancias inorgánicas.

Híbrido. Se dice del animal o vegetal obtenido del cruce de dos individuos de distinta especie. Se aplica en general a lo que está formado por elementos de distinta naturaleza. Heterocigótico.

Hifa. Filamento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos.

Homotálico. Hongos en el que la reproducción sexual se realiza en un sólo talo, que es por tanto autocompatible; el homotalismo es la condición que se presenta en las especies homotálicas.

Latente. Se dice de lo que existe, pero oculto y escondido.

Meiosis. Una serie de dos divisiones nucleares que pueden ser consecutivas o no, pero siempre sucesivas, en las que el número de cromosomas se reduce a la mitad. Corresponde a la última fase de la reproducción sexual.

Micelio. Conjunto o masa de hifas que constituye el cuerpo o talo de un hongo.

Monocariote. Organismo cuyas células contienen un solo núcleo cada una.

Neohaplontes. Colonias monocarióticas obtenidas a partir de un proceso artificial llamado dedicariotización, que consiste en la separación de los dos núcleos de una cepa dicariótica.

Píleo. Parte superior dilatada de ciertos tipos de esporóforos, en la que se forma el himenio o parte fértil, generadora de esporas.

Primordios. Estado inicial del desarrollo de cualquier estructura, como los primordios o botones de los hongos cultivados.

Progenie meiótica. Descendencia obtenida de la meiosis.

Procariote. Organismo o célula que carece de núcleo verdadero al no tener membrana que separe el material genético del citoplasma: los procariotes tienen un único cromosoma formado por una cadena de ADN.

Recombinación genética. Proceso que lleva a la obtención de un nuevo genotipo a través del intercambio de material genético entre secuencias homólogas de DNA de dos orígenes diferentes. La información genética de dos genotipos puede ser agrupada en un nuevo genotipo mediante recombinación genética. Por lo tanto la recombinación genética es una forma efectiva de aumentar la variabilidad genética de una población.

Saprófito. Se dice de las plantas y microorganismos que se alimentan de materias orgánicas en descomposición.

Talo. Cuerpo vegetativo de un hongo. Puede ser unicelular, pluricelular o dimorfito, según la especie o las fases de su ciclo de vida y las condiciones del medio en que se desarrolle.

Tetrapolar. Se dice de la compatibilidad sexual de los basidiomicetes, que tiene los factores del sexo en cuatro grupos (A_1 , A_2 , B_1 , B_2). Las fusiones entre micelios monospóricos sólo son posibles cuando dichos micelios llevan los pares complementarios de estos factores.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Alexopoulos, C. J. & C. W. Mims. (1985). **Introducción a la Micología**. Ediciones Omega S. A. España. 421-433.
- Bisko, N. A., V. G. Babitskay, V. T. Bilay & N. Y. Mitopolskaya. (2002). Biologically Active Substances from *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products 4**: (383-389)
- Carlile, M.J. & S. C. Walkins. (1997). **The Fungi**. Academic Press. Great Britain. 52-58, 209.
- Chang, S. T. (2002). Past and Present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia edit. In: **Proceedings of the 4th International Conference in Mushroom Biology and Mushroom Products**:1-8. Sánchez, *et al.* (eds).
- Chen, A. W. (2004). **Growing Shiitake Mushrooms**. In: Mushworld- Heinheart Inc. (eds) Oyster Mushroom Cultivation. Korea. 256-268.
- Chen, A. W. (2005). **What is shiitake?** In: Mushworld- Heinheart Inc. (eds) Shiitake Cultivation. Korea.1-11.
- Chen, A. W. (2001). Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs. **Mushroom Growers' Newsletter: 10 (4)**, 3-9.
- Cho, S. B. (2004). **What is mushroom?** In: Mushworld- Heinheart Inc. (eds) Oyster Mushroom Cultivation. Korea.1-3.
- Curtis, H. & N.S. Barnes. (2000). **Biología**. Editorial Médica Panamericana S. A. España. 501-503.
- Donoghue, J. & P. Pryzbylowicz. (1998). **Shiitake growers handbook. The art and science of mushroom cultivation**. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa, USA. 3-17, 183-188,
- Fung, Y. W, T. W. Fung & M. Franco. (2005). Evaluation of different Colombian agroindustrial wastes as substrates for the growth and production of *Lentinula edodes*. Berk. Pegler (shiitake). In: **Proceedings of the Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products**. Tan, *et al.* (eds), **12**: 285-290.
- Hawksworth, L. D. (1997). The critical role of fungi in the conservation of biodiversity. In: **VI Congreso Nacional de Micología (memorias) y IX Jornadas Científicas**. UNACH Sociedad Mexicana de Micología Tapachula, Chiapas, 5-6.

- Jong, H. K. (2001). Nature's answer to modern disease: Shiitake In: **Mushworld.com**.
(http://www.mushworld.com/medicine/view.asp?cata_id=6500&vid=511)
- Kirchhoff, B. (1999). Mould protection in shiitake *Lentinula edodes*, Berk.Pegler) intensive cultivation for nutraceutical production. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products 3**.
- Kuo, C. Y., S. Y.Chou & C. T. Huang. (2005). New technology of variegated *Lentinula* mushroom production on Biyang county of China Fungal Institute of Biyang County, Biyang 463700, Henan Province, China; 2 Dept. of Bioengineering, Henan College of Science and Technology, Xinxiang 453003, China.
- Kwon, H. & C. Hobbs. (2005). **Nutricional and Medicinal values of shiitake**. In: Mushworld- Heinheart Inc. (eds) Shiitake Cultivation. Korea. 12-21.
- Lee, J. Y. (2006). Constituents and medicinal effects of cultivated Shiitake. Website: **Mushworld.com**. http://www.mushworld.com/medicine/view.asp?cata_id=6500&vid=7468,2/XI/2006.
- Li, Y. (2005). High yield cultivation techniques for year-round production of *Lentinula edodes* in a solar greenhouse. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products 12 (1)**: 299-305.
- López, E. & C. Mireles. (2005). Evaluación de la producción del hongo comestible *Lentinula edodes* (shiitake) en sustratos de aserrín con suplementos **Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM**.
- Miles, P. G. (1996). Genetics and breeding of mushrooms – from Bensaude and Kniep to molecular genetics. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products 2**.
- Poy, L. (2005). Los hongos, opción nutricional y comercial desaprovechada. **La Jornada**, 24 /XII/2005. (disponible en <http://www.jornada.unam.mx/2005/12/24/035n1soc.php>)
- Quimio, T. C. (2004). **Why grow mushrooms?** In: Mushworld- Heinheart Inc. (eds) Oyster Mushroom Cultivation. Korea. 4-12.
- Ramírez, R. & H. Leal. (2002). Culture condition for increasing yields of *Lentinula edodes*. In:**Mushroom Biology and Mushroom Products 4**: 289-294.
- Ramírez, R. & H. Leal. (2002). Symmetrical recovery of monokariotic components from *Lentinula edodes* using dedikariotization. In:**Mushroom Biology and Mushroom Products 4**: 141-150.

- Royse D. J. (2001). **Cultivation of Shiitake on synthetic and natural logs**. College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, 12.
- Royse D. J., B. Bunyard, M. Nicholson & B. A. Britt. (1993). **Molecular genetic analysis of diversity in populations of edible mushrooms**. Department of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, U.S.A.
- Staments, P. & J. S. Chilton. (1983). **The mushroom cultivator: A practical guide to growing mushrooms at home**. Agarikon press. USA. 177-179.
- Tortora, G. (1993). **Introducción a la microbiología**. Editorial Acribia. España.
- Ulloa, M. & T. Herrera. (1990). **El reino de los hongos**. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. México.
- Valencia, G. (2002). Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos en *Pleurotus spp.* por apareamientos de neohaplontes compatibles y progenies monosporicas. **Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM**
- Wasser, S., S. Reshetnikov & K. Kheng. (2002). Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review). **In: International Journal of Medicinal Mushrooms 3 (4):361.**
- Wu, X., H. Li, , H. Wei, L. Fu & Q. Wu. (2005). **Applications and Prospects of DNA molecular markers in edible mushroom research**. Biotechnology Research Institute, Zhejiang Forestry Academy, Hangzhou, Zhejiang 310023, China.
- Yap, A. T. (1999). Partially purified Lentinam from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) still Retain Antitumour Activity. **In: Mushroom Biology and Mushroom Products 3.**
- Yoo, B.Y. , W. S. Kong, S. J. Oh, C. S. Jhune, B. G. Kim & G. H. Kim. (2005). Gene transfer in edible mushrooms. **In: Proceedings of the Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Tan, et al. (eds), 12: 204-213.**
- Zamudio, A. (1999). **SEMARNAT**. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca Centro de Investigación y Docencia Económicas A. C.
- Zhang, C.K., Y.L. Chen, H.M. Qin & Y. Liang. (1996). Identification and mushroom production test of the fusants from protoplast of different *Lentinula edodes* strains. **In: Mushroom Biology and Mushroom Products 2.**