



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

**"MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL HONGO  
*Lentinula edodes*"**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**SELENE SEGURA MOCTEZUMA**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Hermilo Leal Lara
Vocal	Prof. Agustín Reyo Herrera
Secretario	Profra. Rebeca Ramírez Carrillo
1er. Suplente	Profra. Maricarmen Quirasco Baruch
2do. Suplente	Prof. Jorge Arturo Aburto Anell

Sito donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología.  
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema: \_\_\_\_\_  
M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo

Sustentante: \_\_\_\_\_  
Selene Segura Moctezuma

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por permitirme realizar mis estudios en las aulas y los laboratorios de una gran escuela: la Facultad de Química.

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la Sección 024 de las AAPAUNAM por el apoyo otorgado a través de la cátedra "Jacobo Gómez Lara".

A la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo por haber tenido siempre la mejor disposición para dirigirme y resolver mis dudas. Por darme la confianza de expresarle mis inquietudes y ayudarme a encontrar siempre la solución de las dificultades que surgieron (incluso ajenas a este trabajo de tesis). Gracias por todo lo que me enseñó.

Al Dr. Hermilo Leal Lara por haber revisado y corregido este trabajo. Gracias, no sólo por ayudarme a mejorar el contenido del trabajo, sino también por comprender mi necesidad de agilizar la culminación del mismo.

Al Prof. Agustín Reyo Herrera por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y a la discusión de su contenido, por darme su punto de vista y permitirme expresar mis comentarios. Gracias, porque sus observaciones contribuyeron a mejorar este trabajo.

A Robert Johnson Bundy y a los profesores involucrados en el programa "Profesores Pro-Alumnos" por el apoyo brindado durante varios semestres.

*Dedicatoria*

*A dos personas que han dado todo por mí  
permitiéndome así alcanzar las metas que me he trazado:*

*Mis queridos padres*

# INDICE

Página

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Taxonomía.....	5
2.2. Morfología.....	6
2.3. Nutrición.....	7
2.4. Reproducción de los hongos (basidiomicetos).....	8
2.5. Patrones de sexualidad: homotalismo y heterotalismo.....	10
2.6. El hongo comestible <i>Lentinula edodes</i> .....	11
2.7. Propiedades nutricionales.....	12
2.8. Propiedades medicinales.....	14
2.9. Técnicas de cultivo.....	15
2.9.1. Cultivo tradicional sobre troncos.....	15
2.9.2. Cultivo en bolsas de aserrín.....	16
2.10. Mejoramiento genético.....	17
2.10.1. Recolección de la progenie meiótica.....	18
2.10.2. Desdicariorización.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1. Objetivos generales.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
5. HIPÓTESIS.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Preparación de medios de cultivo.....	26
6.1.1. Medio de extracto de malta.....	26
6.1.2. Solución desdicariorizadora.....	26
6.1.3. Medio sólido desdicariorizante.....	27
6.2. Preparación del inóculo para la solución desdicariorizadora.....	27
6.3. Fragmentación y desdicariorización de las cepas.....	27
6.4. Determinación de la desdicariorización de las cepas.....	28
6.5. Identificación de los dos tipos de neohaplontes.....	28
6.6. Producción de nuevas cepas dicarioróticas.....	29
6.7. Reconstitución de cepas mediante cruces dicariorión-monocariorión.....	29

	<b>Página</b>
6.8. Preparación e incubación del inóculo de grano.....	30
6.9. Preparación e incubación del sustrato.....	30
6.10. Inducción de la fructificación.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Experimentos de desdicarización para las cepas de L. edodes.....	32
7.1.1. Crecimiento micelial de las cepas de L. edodes en SD y EMA.....	32
7.1.1.1. Cepa L5.....	32
7.1.1.2. Cepa L10.....	33
7.1.1.3. Cepa L18.....	33
7.1.1.4. Cepa L21.....	34
7.1.2. Evaluación de las colonias en EMA de las diferentes cepas previamente inoculadas en solución desdicarizadora.....	35
7.1.2.1. Cepa L5.....	35
7.1.2.2. Cepa L10.....	38
7.1.2.3. Cepa L18.....	40
7.1.2.4. Cepa L21.....	41
7.1.3. Evaluación de las colonias en MSD de las diferentes cepas.....	42
7.1.3.1. Cepa L5.....	43
7.1.3.2. Cepa L10.....	44
7.1.3.3. Cepa L18.....	45
7.1.3.4. Cepa L21.....	46
7.2. Clasificación de los neohaplontes obtenidos en los dos tipos de compatibilidad.....	47
7.3. Producción de cepas dicarióticas por apareamiento de neohaplontes.....	48
7.4. Producción de cepas dicarióticas por cruza dicarición-monocarición.....	50
7.5. Fructificación de las cepas dicarióticas obtenidas.....	53
7.5.1. Desarrollo micelial de las cepas dicarióticas en inóculo de grano.....	53
7.5.2. Desarrollo micelial de las cepas dicarióticas en el sustrato.....	54
7.5.3. Inducción de la fructificación y producción de esporóforos.....	59
7.5.4. Características morfológicas de los esporóforos.....	61
7.5.5. Peso unitario de los esporóforos y número de piezas producidas por cada cepa .....	68

	<b>Página</b>
7.5.6. Determinación de los rendimientos en la etapa de producción .....	70
7.6. Discusión general.....	72
8. CONCLUSIONES .....	78
9. BIBLIOGRAFÍA.....	79



## RESUMEN

*Lentinula edodes* (shiitake) es uno de los hongos comestibles de mayor interés económico debido a sus insuperables características organolépticas y sobre todo por sus propiedades medicinales (antitumorales, hipocolesterolémicas y antivirales). Sin embargo, por la naturaleza de los sustratos donde crece requiere largos periodos de incubación (1 a 2 años en el método tradicional ó 4 a 6 meses en el cultivo sintético).

Se realizó un programa de mejoramiento genético con el propósito de obtener nuevas cepas con mejores rendimientos respecto a los de las cepas disponibles. Para ello cuatro cepas de *L. edodes* (L5, L10, L18 y L21), fueron sometidas al efecto de una solución desdicarizadora (glucosa-peptona) para obtener sus componentes monocarióticos y posteriormente entrecruzarlos.

La solución desdicarizadora permitió aislar los dos componentes monocarióticos de la cepa L10 y un componente monocariótico de las cepas L18 y L21. El entrecruzamiento de todos los neohaplontes dió como resultado la obtención de 6 nuevos dicariotes (L10-1S/L18-1S, L10-4S/L18-1S, L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-2S, L10-1S/L21-2S, L10-4S/L21-2S) y un dicariote reconstituido (L10-1S/L10-4S). Además, mediante cruza dicarion-monocarion fue posible obtener 3 nuevos dicariotes (L18/L18-1S, L18-/L18-2S y L21/L21-2S).

Con las cepas obtenidas (parentales, híbridas y reconstituídas) se evaluó el desarrollo micelial en inóculo de grano y sustrato. Una vez que el sustrato fue invadido por el micelio se evaluó la formación de primordios y el pardeamiento de

los bloques de sustrato durante la incubación, así como las características morfológicas (color y tamaño) y de producción de los esporóforos.

El análisis estadístico de los resultados permitió clasificar a las cepas en función de su productividad. Así se observó que la cepa híbrida L10-4S/L21-2S superó en productividad a las 3 cepas parentales. También se identificaron 3 dicariotes híbridos que superaron a una de las cepas parentales involucradas en su obtención (L10-1S/L18-1S, L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S) y 3 dicariotes que dieron rendimientos semejantes a una de las cepas parentales (L10-4S/L18-1S, L10-4S/L18-2S, L10-1S/L18-2S). Estos resultados sugieren que se logró el objetivo principal del programa de mejoramiento genético de las cepas de *L. edodes*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios. Las especies comestibles gozan de especial interés desde tiempos remotos y en la actualidad cobran cada vez mayor importancia por sus características organolépticas (sabor, textura), así como por sus propiedades nutraceuticas.

Actualmente es posible encontrar en el mercado dos categorías de hongos comestibles, por un lado el champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y por otro lado una nueva categoría, los denominados "Hongos exóticos". Estos hongos presentan colores atractivos y formas que van desde la figura de un hongo con sombrero y tallo, hasta formas coralinas (Medina, 2007). Algunas de estas especies son *Auricularia* spp., *Flamulina velutipes* (enokitake), *Grifola frondosa* (maitake), *Hypsizygus marmoreus*, *Pleurotus eryngii*, *Pholiota nameko*, *Tremella fuciformis*, *Volvariella* spp. y *Lentinula edodes* (shiitake). En este grupo el hongo *L. edodes* también conocido como shiitake, es uno de los de mayor interés económico debido a sus características organolépticas y sobre todo por sus propiedades medicinales (antitumorales, hipocolesterolémicas y antivirales)(Good *et al.*, 2007; Chang, 2000).

El hongo shiitake ha sido cultivado desde hace siglos en las regiones montañosas de Asia, especialmente en China, Japón y Corea, haciendo uso de troncos de maderas duras que se inoculan con esporas del hongo, o bien mediante un inóculo del micelio (que se introduce en los troncos perforados). Los troncos inoculados son apilados en el bosque o en invernaderos y después de 8 a 12 meses de incubación se induce la fructificación para obtener el primer brote de hongos.

A este método se le conoce como tradicional y todo el ciclo de cultivo puede durar alrededor de 5 años (Schmidt, 2006). Este tipo de cultivo tiene la ventaja de ser de bajo costo de implementación. Sin embargo, la producción es de tipo estacional (otoño y primavera) y la duración del ciclo de cultivo como ya se había mencionado es muy larga.

El método de cultivo sintético o en bolsas utiliza una gran variedad de desechos agroforestales como sustratos. Por lo general se utilizan para su formulación virutas y aserrines de diferentes árboles de maderas duras, así como una gran variedad de subproductos agrícolas (salvado de trigo, arroz, avena, cebada, cáscara de cacahuate, mijo, trigo, sorgo, etc) (Bernabé, *et al.*, 2006; Mireles & López, 2005). Este método ha permitido reducir los tiempos de incubación, tener mayor producción y en forma continua. Sin embargo, tanto los costos de inversión inicial, como el consumo de energía son muy elevados (Kalberer, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2000; Ramírez & Leal, 2002; Royse *et al.*, 2002).

Es clara la necesidad de continuar en la búsqueda de modificaciones a este cultivo tendientes a aumentar las productividades y reducir los tiempos de producción. Sin embargo, los esfuerzos por lograrlo han estado encaminados principalmente a la búsqueda de mejores sustratos u optimización de las etapas del proceso que permitan cumplir tales objetivos. Pocos esfuerzos se han realizado en términos de la selección de cepas con características favorables para su cultivo en diversos sustratos, aunque es una etapa fundamental en el cultivo de hongos comestibles. Cepas mejoradas podrían obtenerse a partir de las ya existentes a través de un programa de mejoramiento genético que permitiera hacer más rentable el cultivo tan promisorio de este hongo.

## **2. ANTECEDENTES**

Los hongos son organismos eucariotas, no poseen clorofila, son típicamente filamentosos y se reproducen por esporas. La pared celular de la mayoría de las especies está compuesta de quitina combinada con otros glúcidos complejos, entre los que se encuentra en ocasiones la celulosa. Como tales son incapaces de sintetizar su alimento y por consiguiente, llevan una vida saprófita (viven sobre materia orgánica muerta) o parásita (provocan enfermedades en plantas, animales y el hombre).

### **2.1. Taxonomía**

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

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

## 2.2. Morfología

La mayoría de las especies de hongos están constituidas por filamentos largos y delgados llamadas hifas, las cuales se ramifican y entrelazan formando una estructura filamentosa denominada micelio.

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

Un hongo macroscópico esta formado por un pie o estípite, que sostiene al píleo o sombrero, y que algunas veces emerge de una cazoleta basal o volva. Las láminas son estructuras foliáceas dispuestas de forma radial desde el margen hacia el estípite y cubiertas de basidios por ambas caras; el conjunto de basidios dispuestos en las láminas membranáceas constituyen el himenio. Algunos hongos poseen un anillo alrededor del estípite por debajo del margen píleo (**Figura 1**) (Alexopoulus, 1987).

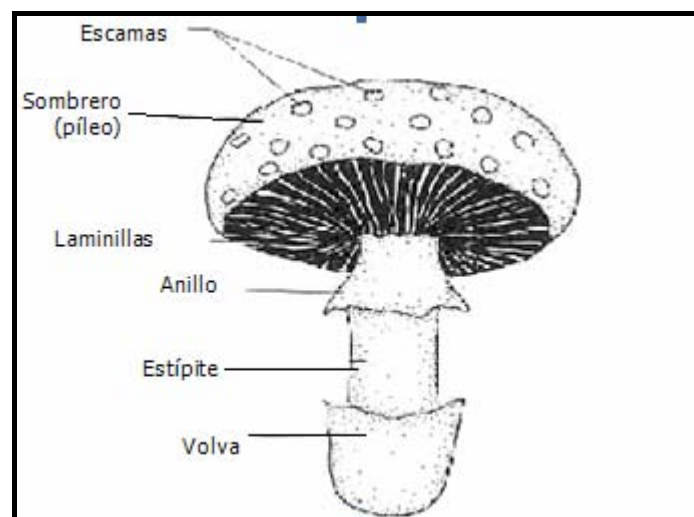


Figura 1. Dibujo esquemático del basidiocarpo de un hongo (Alexopoulus, 1987).

### **2.3. Nutrición**

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

Los carbohidratos de origen vegetal constituyen la fuente de energía más abundante para los hongos en la naturaleza, casi todos utilizan glucosa, maltosa, sacarosa, almidón, quitina, lignina, hemicelulosa y celulosa. La celulosa es el polímero más importante disponible para los hongos en una amplia gama de ambientes. La degradación de las celulosas solubles se lleva a cabo por dos enzimas producidas comúnmente por los hongos: la endo- $\beta$ -glucanasa y la  $\beta$ -glucosidasa, la primera rompe las cadenas de celulosa produciendo varias moléculas (como la celobiosa y la celotriosa), mientras que la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza los enlaces de las moléculas producidas por la glucanasa para dar glucosa, la cual es asimilada por la célula. La celulosa cristalina natural requiere una tercera enzima, la exo- $\beta$ -glucanasa, que separa unidades sucesivas de celobiosa de los extremos de las cadenas de celulosa. Es una enzima de frecuencia mucho más restringida, pues son pocos los hongos que la producen, entre estos se encuentran los ascomicetes y los basidiomicetes (Deacon, 1988).

Con respecto a los requerimientos de nitrógeno, se puede generalizar que todos los hongos utilizan aminoácidos, la mayoría puede utilizar amonio y unos cuantos pueden utilizar nitrato. Sin embargo, hay una preferencia marcada por el amonio.

Otras fuentes incluyen urea, hidroxilamina, L-aminoácidos y péptidos. Los D-aminoácidos son fuentes pobres de nitrógeno o en ciertos casos son tóxicos (Wainwright, 1992).

Dada una fuente de carbono adecuada, muchos hongos crecen con nutrientes orgánicos simples, ya que pueden sintetizar los constituyentes celulares necesarios a partir de nitrógeno inorgánico, fósforo, potasio, azufre, etc.

#### **2.4. Reproducción de los hongos (basidiomicetos).**

Cuando el micelio de un hongo ha acumulado suficiente alimento, en la periferia de la colonia se forman unos pequeños nudos hifales: los primordios. Estos se desarrollan formando esporóforos diminutos (botones) cuyos tejidos, con la suficiente humedad, se expandirán rápidamente dando lugar a la formación de los esporóforos. Los cuerpos fructíferos o esporóforos son el resultado de los procesos de reproducción sexual del hongo y constituyen los cuerpos reproductores pues en ellos se forman las esporas que constituyen la semilla de dispersión del hongo (**Figura 2**). Las esporas son de origen sexual, aunque también pueden ser asexuales o incluso estructuras asexuales microscópicas o macroscópicas, en el caso de los basidiomicetos, las esporas son de tipo sexual.

Cuando las esporas sexuales se depositan sobre el sustrato adecuado, germinan produciendo hifas que al ramificarse integrarán el micelio. El micelio originado por una spora tiene células monocarióticas, es decir, con un solo núcleo. Cuando el micelio monocariótico o primario, se fusiona con otro micelio primario se produce un micelio dicariótico o secundario, cuyas células tendrán dos núcleos. Esta unión sexual se llama plasmogamia y constituye el primer paso en la reproducción sexual del hongo. Las hifas constituyen la huella del intercambio nuclear entre las



células, indican que ha ocurrido la plasmogamia, ya que una fibula aparece debido a un intercambio nuclear y es consecuencia de la conjugación del micelio monocariótico para originar el micelio dicariótico. Al inicio se origina como una pequeña ramificación en el extremo de una hifa en crecimiento para posteriormente curvarse en forma de gancho (Guzmán *et al.*, 2002).

A partir del micelio secundario se forman los cuerpos fructíferos. En su himenio se forman los basidios, en los que antes de madurar, se lleva a cabo la cariogamia o fusión nuclear definitiva entre los dos núcleos que aparentemente se unieron en la plasmogamia. El núcleo zigótico resultante sufre rápidamente una meiosis en la cual los genes de tipo reproductivo y los que controlan otras características, se segregan en los cuatro núcleos hijos resultantes. El basidio tetranucleado produce cuatro extensiones tubulares denominadas esterigmas cuyos ápices se expanden formando las esporas. Finalmente los núcleos haploides migran a través de los esterigmas hacia las basidiosporas (Statemets & Chilton, 1983).

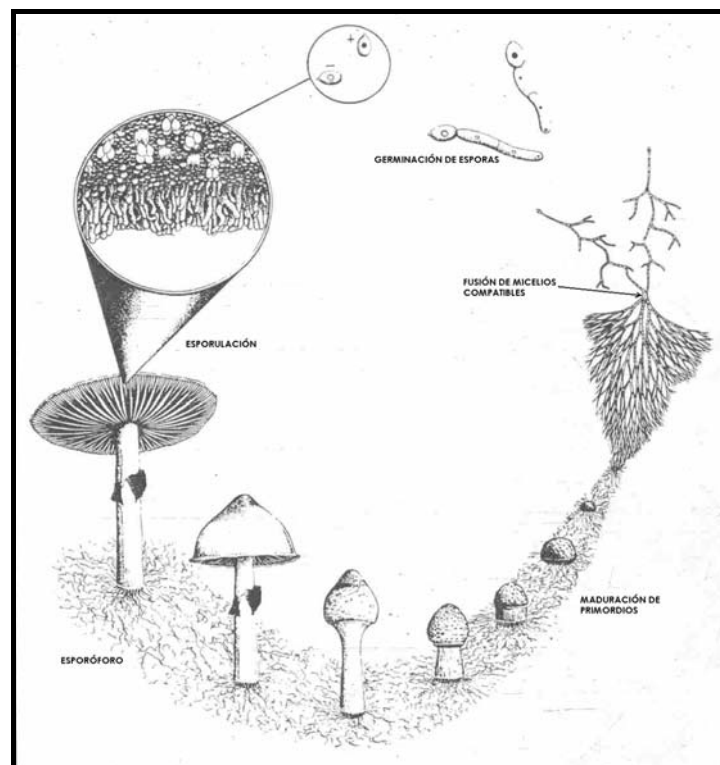


Figura 2. Ciclo de vida de los hongos macroscópicos (Statemets & Chilton, 1983)

Los hongos son haploides en casi todo su ciclo de vida (crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos), únicamente la célula formada en la cariogamia es diploide, dicha célula se divide inmediatamente su núcleo diploide, formando cuatro células haploides o basidiosporas.

### **2.5. Patrones de sexualidad: homotalismo y heterotalismo**

Después de la cariogamia el patrón de sexualidad de los hongos puede ser homotálico o heterotálico (**Figura 3**). El patrón de sexualidad homotálico u homotalismo es la condición sexual de los hongos, en la que la conjugación se realiza entre el micelio de un solo individuo. Existe el homotalismo primario y secundario; si las esporas que originaron el micelio son uninucleadas y compatibles entre sí se trata de homotalismo primario, mientras que si las esporas tienen dos núcleos compatibles entre sí y son capaces de formar un micelio secundario se trata de homotalismo secundario.

El heterotalismo se refiere a la formación de micelio secundario a través de dos individuos, puede haber heterotalismo unifactorial o bifactorial, según exista uno o dos juegos de caracteres genéticos. El heterotalismo unifactorial, tiene como producto final cuatro esporas uninucleadas, con un solo carácter genético cada una; en el heterotalismo bifactorial, las cuatro esporas uninucleadas formadas poseen un juego de caracteres genéticos, ya que hay cuatro genes ( $A_1$ ,  $A_2$ ;  $B_1$ ,  $B_2$ ) en dos cromosomas controlando los tipos reproductivos, por consiguiente en cada basidio hay cuatro basidiosporas de tipos distintos ( $A_1B_1$ ), ( $A_1B_2$ ), ( $A_2B_1$ ), ( $A_2B_2$ ), para que tenga lugar la reproducción sexual es necesario que se encuentre dos tipos compatibles. Lo más frecuente en los hongos basidiomicetos es que las especies sean heterotálicas, es decir, que las hifas procedentes de una espора se unan a las

de otra que tenga un componente genético distinto para formar el micelio secundario (Guzmán *et al.*, 2002).

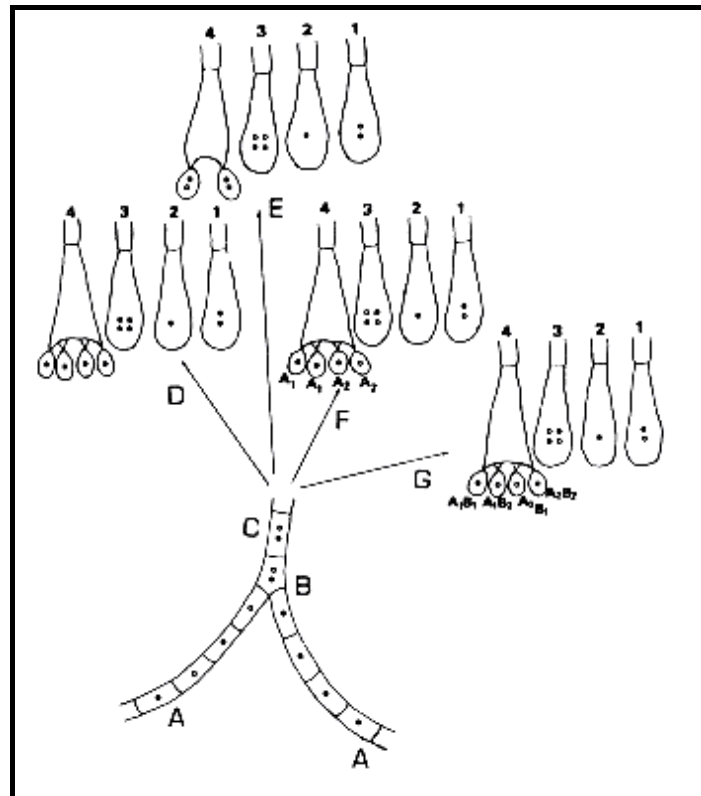


Fig.3 El carácter sexual de los hongos. A: Micelio monocariótico. B: Plasmogamia. C: Micelio dicariótico. D: Homotalismo primario. E: Homotalismo secundario. F: Heterotalismo unifactorial. G: Heterotalismo bifactorial (Guzmán *et al.*, 2002).

## 2.6. El hongo comestible *Lentinula edodes*

*Lentinula edodes* se conoce con el nombre de shiitake en Japón y Xiangyu en China. Es una seta de sombrero convexo de 4 a 16 cm de diámetro y de color variable de ocre parduzco claro a pardo-rojizo con cierto tono violáceo. Con el tiempo oscurece por el centro y suele agrietarse, viéndose la carne más clara en el fondo de las grietas. También son frecuentes las escamas, de tamaño y color variables, sobre todo en la periferia, cuyo margen está enrollado de joven. Sus esporas son alargadas y de color blanco. El pie o estípote a menudo es excéntrico, blanquecino por arriba y de tono más claro que el sombrero por abajo, donde es

algo escamoso. La carne es blanquecina, de sabor ácido agradable (García, 1998).

## 2.7. Propiedades nutricionales

Los hongos comestibles se caracterizan por ser ricos en proteínas y carbohidratos, tener bajo contenido de grasa y ser una buena fuente de minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales (Tabla 1).

Tabla 1. Composición proximal de *L. edodes* (Fuente: Chang, 2000)

Componente	Porcentaje en peso seco
Proteína cruda	13.4-17.5
Grasa cruda	4.9-8.0
Carbohidratos	67.5-78.0
Fibra cruda	7.3-8.0
Cenizas	3.7-7.0

El contenido de proteína de los hongos comestibles oscila entre 3.5 y 4% de su peso fresco, mientras que en base seca normalmente contienen entre 19 y 35% de proteína, en tanto que el arroz contiene 7.3%, el trigo 12.2% y la leche 25.2%. De manera adicional se debe mencionar que los hongos comestibles contienen 9 aminoácidos esenciales, en el caso de shiitake de 100 g de proteína cruda aproximadamente 36 g corresponden a aminoácidos esenciales, lo que lo posiciona como un alimento con proteínas de alto valor nutricional (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales de *L. edodes* (Fuente: Chang, 2000).

Aminoácidos esenciales	g aminoácido/100 g proteína cruda
Leucina	7.9
Isoleucina	4.9
Valina	3.7
Triptofano	Nd
Lisina	3.9
Treonina	5.9
Fenilalanina	5.9
Metionina	1.9
Histidina	1.9
<b>Total aminoácidos esenciales</b>	<b>36.0</b>

Nd=no determinado

El contenido de grasa en diferentes especies de hongos varía de 1.1 a 8.3% en base seca, con un contenido promedio de 4%. Al menos 72% del total de ácidos grasos son insaturados, el alto contenido de éstos se debe a que el ácido linoléico corresponde al 76% del total de ácidos grasos insaturados en *L. edodes*. La alta proporción de ácidos grasos insaturados y el alto porcentaje de ácido linoléico en los hongos comestibles es un factor significativo para considerar a los hongos como un alimento sano (Chang, 2000).

Se ha reportado que los hongos comestibles son una buena fuente de diversas vitaminas incluyendo tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), niacina, biotina y ácido ascórbico (vitamina C). El contenido aproximado de vitaminas en *L. edodes* es: B<sub>1</sub> 0.05 - 0.07 (mg/100 g); B<sub>2</sub> 0.15 - 0.2 (mg/100 g); folatos 21.51 (mg/100 g); B<sub>12</sub> 0.05 - 0.07 (mg/100 g); vitamina C 1.6 - 2.1 (mg/100 g). Recientemente Furlani & Godoy (2007) encontraron que aunque la cantidad de vitamina B<sub>1</sub> y vitamina B<sub>2</sub> que contiene es inferior a la reportada, su consumo puede contribuir a la suma de estos nutrientes en la dieta.

Lau *et al.* (1985) determinaron el contenido de ácido ascórbico de cuatro hongos comestibles (*P. sajor-caju*, *A. bisporus*, *V. volvacea* y *L. edodes*) y encontraron que shiitake posee el mayor contenido, siendo éste de 9.4 mg/100 g de muestra seca, mientras que para el resto de los hongos su contenido fluctuó entre 1.4 y 7.4 mg/100 g de muestra seca.

Shiitake también contiene minerales como: Zn, Fe, P, Ca, Mg, K y Na (Caglarýrmak, 2007). En la mayoría de los hongos el Ca y el Na están presentes en concentraciones similares. Sin embargo, en el caso de *L. edodes* el contenido de Ca es particularmente mayor (Chang, 2000).

## 2.8. Propiedades medicinales

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

Shiitake posee varios compuestos biológicamente activos, entre ellos se pueden mencionar los siguientes:

- Lentinan es un polisacárido ( $\beta$ -D-glucano) que causa regresión tumoral. Ha demostrado ser efectivo en prolongar la vida de pacientes con cáncer, especialmente aquellos con carcinoma rectal y gástrico. Además, es capaz de reducir algunos de los efectos de la quimioterapia como náusea, dolor, pérdida de cabello y debilitamiento del sistema inmune del individuo.
- El complejo polisacárido-proteína KS-2 es un péptido-manano excretado por el cultivo micelial de *L. edodes*. Este complejo suprime el Sarcoma 180 así como el carcinoma de Erlich en ratones cuando se les administra de forma oral o intraperitoneal, además induce la producción de interferón (Chang, 2000).
- La proteína Lentin ejerce actividad antifúngica e inhibitoria sobre la proliferación de células de leucemia.
- LEM y LAP son glicoproteínas aisladas del micelio y del medio de cultivo de *L. edodes*, respectivamente. Estos heteroglucanos contienen glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa y fructosa. Ambos han presentado actividad antitumoral.

Aunque el mecanismo de acción no está completamente elucidado, se sabe que la acción antitumoral no se debe a un ataque directo de las células cancerígenas, sino a la activación de diferentes mecanismos de respuesta inmune en el huésped. Por otra parte, se cree que se potencia la respuesta de precursores de células T y macrófagos para la producción de citosinas producidas por linfocitos después del reconocimiento específico de células tumorales. Se ha observado también un marcado incremento en las cantidades de isoleucina (1 y 3) después de administrar los compuestos biológicamente activos, lo que provoca la maduración, diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes para los mecanismos de defensa del huésped (Wasser *et al.*, 2005).

## **2.9. Técnicas de cultivo**

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

### **2.9.1. Cultivo tradicional sobre troncos**

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

Inicialmente los troncos se inoculaban con esporas, sin embargo hoy en día se utiliza micelio propagado en aserrín con 20% de salvado de trigo o arroz y 3% de glucosa, humedecido y esterilizado, o bien desarrollando el micelio sobre taquetes de madera (de 16 mm de largo por 8 mm de ancho). Estos taquetes ya invadidos con micelio se introducen en perforaciones previamente hechas con un taladro en

los troncos que serán inoculados. Los troncos inoculados se colocan en un sitio templado y aireado donde habrá que evitar que se sequen (deben contener un 35 - 55% de humedad) o se humedezcan demasiado (favoreciendo la aparición de mohos).

Cuando los troncos ya están invadidos por el micelio, después de 5 a 16 meses (dependiendo de la clase de tronco y sobre todo de la temperatura), los troncos se llevan al sitio definitivo para la fructificación que será inducida por las lluvias (o riegos) y los cambios de temperatura que suceden naturalmente en primavera y otoño. Un procedimiento moderno de cultivo en invernadero consiste en sumergir los troncos en agua a una temperatura menor de 17°C, posteriormente se trasladan al invernadero donde prevalece una temperatura ambiente entre 15 y 20°C y una humedad relativa mayor al 80%. Bajo estas condiciones los esporóforos se desarrollan en las siguientes 2 semanas. La producción de esporóforos en los troncos sucede por oleadas o brotes separadas entre sí por un tiempo muy variable (3 a 6 meses) y los troncos pueden mantenerse en producción por un período de 2 a 6 años, obteniéndose rendimientos de 10 a 20% del peso seco de la madera (García, 1998).

### **2.9.2 Cultivo en bolsas de aserrín**

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

El gran progreso para el cultivo a escala comercial fue el uso de bolsas de plástico esterilizables, en las cuales el sustrato puede comprimirse, esterilizarse, inocularse y



permitir la propagación del micelio. El sustrato suele mezclarse con salvado de trigo o arroz, restos de maíz o de semillas de algodón, cáscaras de cacahuates, etc., se ajusta el contenido de humedad y se inocula con el micelio del hongo. En estas bolsas o troncos artificiales el micelio se propaga formando un bloque sólido al cabo de 30-70 días, cuando aparecen manchas húmedas café entre la superficie del bloque el sustrato está listo para pasar a la etapa de fructificación, en ese momento la bolsa es removida. Para estimular la formación de primordios se debe incrementar la humedad relativa por medio de riegos continuos, disminuir la temperatura del ambiente (12 -20°C) y dar ciclos 12 horas de luz natural o artificial por 12 horas de oscuridad (Schmidt, 2006).

Los rendimientos que se reportan mediante el empleo de este tipo de cultivo son del 70-261% (Ramírez & Leal, 2002).

#### **2.10. Mejoramiento genético**

Además de las diferencias entre los métodos de cultivo y/o composición de los sustratos, la selección de genotipos adaptados a sustratos es un camino para mejorar la producción de shiitake con el fin de obtener cepas altamente productivas, propias para la producción a escala comercial y desarrollar información acerca de la adaptación del hongo a sustratos lignocelulosíticos específicos (Martínez, 1988; Silva *et al.*, 2005). La selección de los genotipos puede lograrse a través de un programa de mejoramiento genético.

Cualquier programa de mejoramiento genético de hongos comestibles depende del conocimiento biológico de la especie que se desea mejorar, por lo que es necesario conocer su ciclo de vida, patrón de sexualidad, hábitat natural, sustrato en el que se desarrolla, requerimientos nutricionales y ambientales, así como su

relación con otros organismos y la disponibilidad de diversidad genética en el material (color, tolerancia a la temperatura, resistencia a enfermedades, patrones de producción durante la fructificación -número de brotes y periodo de entre estos- y peso de los esporóforos). De las variables involucradas dependerá en gran medida el éxito del programa, el cual buscará lograr la mejor combinación de genes que controlen las características de interés comercial (Chang, 2000).

Aunque actualmente hay un auge en el uso de técnicas modernas de ingeniería genética para programas de mejoramiento genético, en el caso de los hongos comestibles se presenta la dificultad de que se trata de organismos complejos con una amplia gama de características, muchas de las cuales están bajo el control de varios genes. Por tal motivo, la mayoría de los programas de mejoramiento genético para hongos comestibles se basan en el sistema natural de recombinación genética producido por el apareamiento de micelios monocarióticos compatibles. El propósito del entrecruzamiento es combinar las características presentes en cepas distintas mediante cruces controladas para obtener así cepas cuyo genoma posiblemente les permitirá expresar las características de las cepas seleccionadas (Sonnenberg, 2005). En general, existen dos formas de lograr un mejoramiento genético siguiendo este principio: 1) Aislamiento de la progenie meiótica (esporada) y 2) Desdicarización (obtención de componentes monocarióticos).

#### **2.10.1. Recolección de la progenie meiótica**

Este método consiste en recolectar las esporas producidas por los esporóforos de las cepas de interés y con aquellas compatibles efectuar apareamientos. Sin embargo, existen reportes de que mediante tal metodología los híbridos no siempre superan a las cepas parentales (Gaitán, 2000; Salmones *et al.*, 2004). Por

otra parte es un método tardado debido a que es necesario fructificar las cepas en un inicio para obtener la esporada y posteriormente para evaluar las características de las cepas obtenidas. Otra desventaja en el uso de este método es que deben realizarse muchas cruces ya que no se tienen las bases genéticas y moleculares para asegurar la presencia de las características deseadas en la progenie obtenida. Esta incertidumbre sobre el aporte genético de las esporas se debe a que para su segregación el micelio dicariótico sufre primeramente la cariogamia y posteriormente la meiosis. Durante la cariogamia se fusionan los núcleos del micelio dicariótico produciendo un núcleo zigótico, éste último sufre la meiosis, fase en la cual se da la recombinación genética y se producen cuatro tipos de esporas que no tendrán la totalidad del material genético de la cepa original.

### **2.10.2. Desdicariorización**

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

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

pero permite la recuperación de neohaplontes (Arteaga *et al.*, 1996). El efecto desdicarizante de las soluciones de glucosa-peptona se atribuye a la presencia de sales biliares o algún tóxico producido durante la esterilización de la solución desdicarizadora pero no se conoce con certeza el mecanismo que provoca la desdicarización de micelios dicarióticos. Miles y Raper (1956) y Tokimoto *et al.*, (1978) propusieron la siguiente hipótesis: la destrucción del dicariote por agentes químicos resulta en un defecto en la fusión entre las fibulas y la penúltima célula durante el proceso, lo que ocasiona que la fibula y la penúltima célula contengan un solo núcleo y se forme el neohaplonte.

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

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de los hongos comestibles ha tomado gran importancia en los últimos años, por una parte los hongos comestibles se han convertido en una alternativa nutricional debido a su contenido de proteínas, fibra, vitaminas, minerales. Por otra parte su cultivo y comercialización poseen un alto potencial económico; las especies provenientes de países orientales como China, Japón y Korea son las que dominan el mercado mundial, lo que ha permitido que dichas naciones ganen terreno en esta industria que anualmente deja ganancias por millones de dólares.

*Lentinula edodes* también conocido como shiitake es el segundo hongo comestible más importante después del champiñón común, *Agaricus bisporus* (Chang, 2002). Crece de manera silvestre en el Este de Asia y también se ha cultivado en forma artificial por más de mil años, debido a sus cualidades gastronómicas, nutricionales y medicinales (propiedades antitumorales, hipocolesterolémicas y antivirales) (Good *et al.*, 2007; Chang, 2000).

*Lentinula edodes* se ha cultivado de tradicionalmente en troncos de maderas duras, permitiendo la utilización de residuos madereros, por lo que este tipo de cultivo es de bajo costo de implementación. Sin embargo, la producción es estacional, pues sólo durante otoño y primavera se dan las condiciones naturales de temperatura y humedad necesarias para que el hongo fructifique. Con la finalidad de reducir la duración del ciclo de cultivo, los costos de producción y favorecer el cultivo bajo condiciones controladas, se han sustituido las técnicas tradicionales por el uso de sustratos sintéticos como viruta y aserrín de diferentes árboles y algunos suplementos como: salvado de trigo, arroz, avena, cebada, cáscara de cacahuate, mijo, trigo, sorgo, etc (Bernabé *et al.*, 2006) lo cual permite una producción continua, pero con un mayor costo de inversión inicial, así como

un alto consumo de energía (Kalberer, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2000; Ramírez & Leal, 2002). Además se debe considerar que *Lentinula edodes* no es fácil de cultivar porque crece en sustratos difíciles de degradar y requiere de largos periodos de incubación (1 a 2 años en el método tradicional o 4 a 6 meses en el cultivo sintético).

El proceso de selección de cepas para la adaptación y cultivo de hongos comestibles a nivel industrial, es una etapa sumamente importante en la producción de hongos comestibles de amplia aceptación comercial, no solamente porque garantiza la cantidad y calidad de los cuerpos fructíferos producidos, sino también porque de esta manera es posible contar con cepas aptas para el cultivo bajo diferentes condiciones y/o diversos sustratos. Cepas con tales características pueden obtenerse a partir de las cepas disponibles de *Lentinula edodes* por medio de un mejoramiento genético. La descariotización es una técnica que permite recuperar los componentes monocarióticos de las cepas dicarióticas (comerciales); se ha aplicado de manera exitosa en hongos como: *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* y *Lentinula edodes* (Leal, & Eger, 1980; Arteaga *et al.*, 1996), es por esto que representa una alternativa para el mejoramiento genético de *Lentinula edodes*.

En este trabajo se planteó obtener los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) de diferentes cepas parentales con características favorables para su cultivo (facilidad de adaptación a diferentes sustratos, tiempos de incubación cortos, altos rendimientos, tamaño y color de los cuerpos fructíferos, entre otras), para posteriormente entrecruzarlos y obtener cepas dicarióticas que probablemente superen o mezclen las características de las cepas parentales.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

- Obtener nuevas cepas dicarióticas de *Lentinula edodes* con mejores características de producción por medio de apareamientos entre neohaplontes.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los componentes monocarióticos (neohaplontes) de diferentes cepas de *Lentinula edodes*.
- Clasificar los componentes monocarióticos en los dos tipos de compatibilidad.
- Cruzar los neohaplontes obtenidos en todas las combinaciones posibles.
- Obtener cepas dicarióticas mediante cruza dicarion-monocarion para aquellas cepas de las cuales no sea posible aislar los sus dos componentes monocarióticos.
- Evaluar las características de producción de las cepas dicarióticas obtenidas y las características morfológicas (color y tamaño de los cuerpos fructíferos), con respecto a las cepas parentales y a las reconstituidas.

## 5. HIPÓTESIS

Si una cepa dicariótica se somete al efecto desdicarizante de una solución de glucosa-peptona entonces se obtendrán sus componentes monocarióticos (neohaplontes) que contienen las características de la cepa dicariótica.

Si se entrecruzan neohaplontes compatibles de diferentes cepas de *L. edodes*, los dicariotes resultantes presentarán características combinadas de las cepas parentales.

Si se aparean los neohaplontes correspondientes a los dos componentes monocarióticos de una cepa, el dicariote resultante presentará características de fructificación distintas con respecto a la cepa parental debido al efecto de la solución desdicarizadora.

Si se efectúan cruas dicarion-monocarion entre una cepa dicariótica y neohaplontes obtenidos a partir de esta, los nuevos dicariotes presentarán características morfológicas y de producción diferentes a la cepa original.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

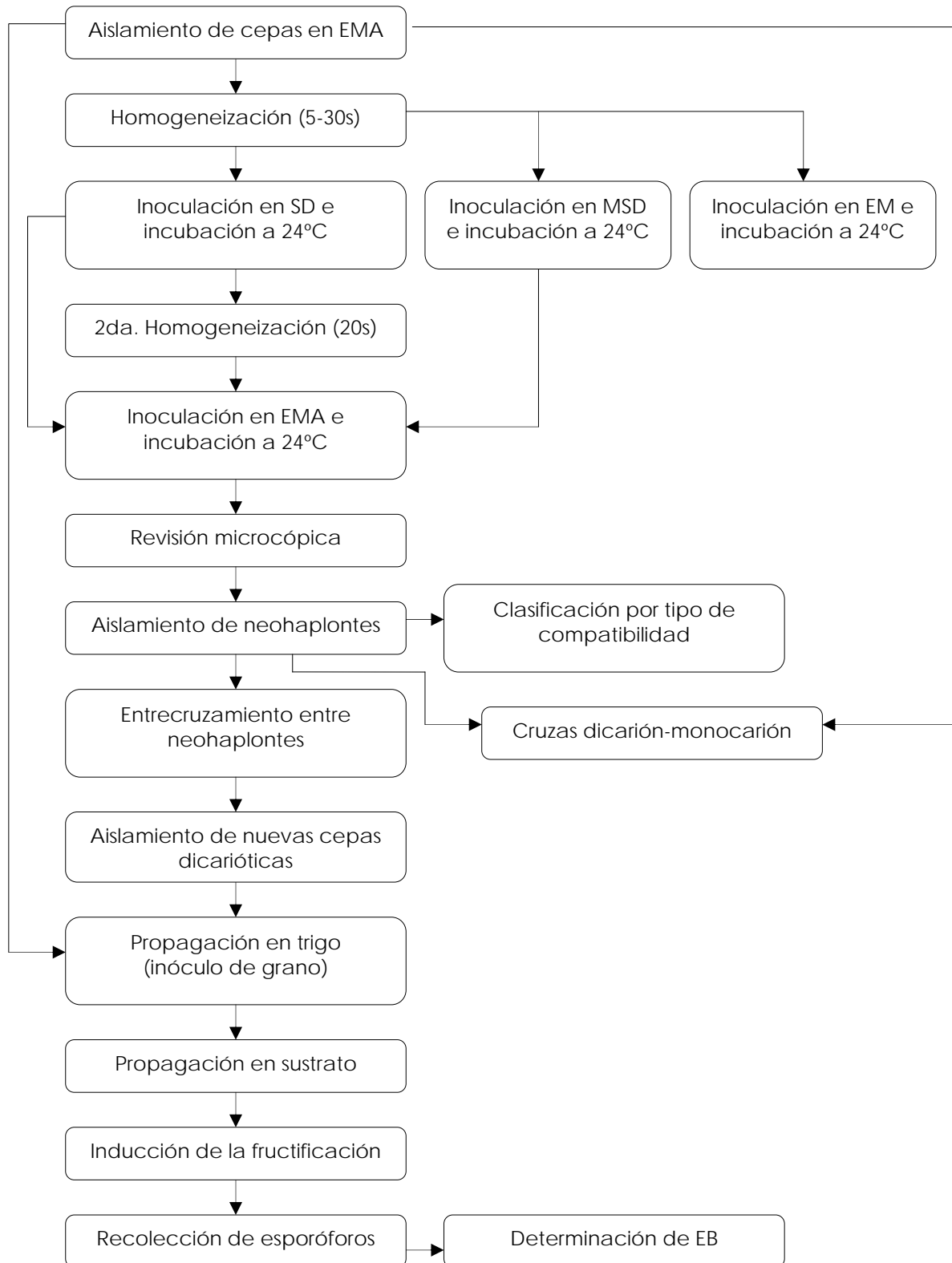


Figura 4. Diagrama general para llevar a cabo el mejoramiento genético de las cepas de *L. edodes*

En este trabajo se utilizaron 4 cepas de *Lentinula edodes*. Todas las cepas están disponibles en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. Para el mantenimiento de las cepas y la propagación micelial se empleó medio de extracto de malta agar (EMA).

### **6.1. Preparación de medios de cultivo**

#### 6.1.1. Medio de extracto de malta

Se preparó medio líquido de extracto de malta (EM) con 15 g de extracto de malta disueltos en 1 litro de agua destilada, se dosificaron 50 ml del medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos.

El medio de extracto de malta agar (EMA) se preparó disolviendo 15 g de extracto de malta y 18 g de agar bacteriológico en 1 litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos. Del medio estéril se colocaron 10 ml en cajas Petri estériles, con la ayuda de una jeringa de llenado continuo. Una vez solidificado el medio, las cajas se colocaron dentro de bolsas de plástico y se incubaron a 24°C durante 24 horas para verificar su esterilidad.

#### 6.1.2. Solución desdicarizadora

De acuerdo al método desdicarizante empleado con cepas de *Pleurotus* spp. (Leal & Eger, 1980), se preparó una solución desdicarizadora básica con 20 g de glucosa anhidra y 20 g de peptona, disueltas en 1 litro de agua destilada. En matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, se colocaron 50 ml de la solución desdicarizadora y se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos.

### 6.1.3. Medio sólido desdicarriotizante

El medio sólido desdicarriotizante (MSD) se preparó disolviendo 20 g de glucosa anhidra, 20 g peptona y 18 g de agar bacteriológico en 1 litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión durante 30 minutos. Se colocaron 10 ml de medio estéril en cajas Petri estériles, con la ayuda de una jeringa de llenado continuo. Una vez solidificado el medio, las cajas se colocaron dentro de bolsas de plástico y se incubaron a 24°C durante 24 horas para verificar su esterilidad.

### **6.2. Preparación del inóculo para la solución desdicarriotizadora**

Para propagar las cepas de *Lentinula edodes* en medio de extracto de malta agar se colocaron 4 inóculos de 0.3 mm de diámetro (en 4 puntos equidistantes de la placa de agar a 1.5 cm del borde de la caja). Las cajas inoculadas se incubaron a 24°C hasta que se observaron colonias de 3 cm de diámetro aproximadamente.

### **6.3. Fragmentación y desdicarriotización de las cepas**

Se preparó un homogenizado colocando cuatro colonias de 3 cm de diámetro de la cepa en estudio (crecidas en EMA) en un vaso estéril de un homogeneizador de laboratorio (Waring Commercial Blendor, Modelo 31BL91) con 50 ml de agua destilada estéril. El homogeneizador se operó por 5, 10, 15, 20 y 30 segundos a la máxima velocidad. Los matraces con solución desdicarriotizadora y con solución de extracto de malta se inocularon con 50 y 100 µl del homogenizado y se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias.

#### **6.4. Determinación de la desdicarriotización de las cepas**

Al detectar visualmente desarrollo micelial en los matraces con solución desdicarriotizadora , se inocularon 50 y 100 µl de su contenido en placas con EMA y se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Además se homogeneizó el contenido de los matraces nuevamente en el homogeneizador de laboratorio durante 20 segundos y se inocularon placas de EMA con 25 y 50 µl del homogeneizado, incubando a 24°C hasta la aparición de colonias. Las colonias observadas se examinaron al microscopio para determinar la ausencia de fíbulas. Las colonias en que se observó ausencia de fíbulas fueron resembradas en EMA para verificar que la colonia fuera de tipo monocariótica al desarrollarse nuevamente.

Los matraces con solución de extracto de malta inoculados con el micelio homogenizado sirvieron para observar la viabilidad del micelio después de la homogeneización.

#### **6.5. Identificación de los dos tipos de neohaplontes**

Para identificar los dos componentes monocarióticos de la cepa desdicarriotizada, se seleccionaron dos neohaplontes y se realizaron cruzas con todos los neohaplontes obtenidos para cada cepa en medio EMA. Para ello se colocó un fragmento de aproximadamente 2 mm de lado de uno de los neohaplontes en medio EMA junto a un fragmento de las mismas dimensiones de otro de los neohaplontes. Las cajas se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Las colonias desarrolladas se examinaron al microscopio para determinar la presencia de fíbulas. Para confirmar la identificación correcta de los neohaplontes, dos nuevos neohaplontes se cruzaron nuevamente con todos los neohaplontes. Las

cajas con las cruces se incubaron y observaron al microscopio una vez que se observó desarrollo micelial de las colonias.

### **6.6. Producción de nuevas cepas dicarióticas**

Para la producción de nuevas cepas dicarióticas se efectuaron cruces entre todos los neohaplontes disponibles en medio EMA. Las cajas se incubaron a 24°C hasta la aparición de colonias. Las colonias desarrolladas se examinaron al microscopio para determinar la presencia de fibulas. Las colonias dicarióticas fueron aisladas en medio EMA. Para confirmar la condición monocariótica de los neohaplontes y garantizar la correcta identificación de los dicariotes producidos por entrecruzamiento de neohaplontes, se realizó un "Control". Es decir cada uno de los neohaplontes se resembró en EMA, las cajas se incubaron a 24°C hasta la formación de colonias, las cuales se examinaron al microscopio para asegurar el estado monocariótico de cada colonia.

### **6.7. Reconstitución de cepas mediante cruces dicarión-monocarión**

Se colocaron 4 fragmentos de aproximadamente 2 mm de lado de un neohaplonte en medio EMA, las cajas se incubaron a 24°C hasta observar colonias de alrededor de 1 cm de diámetro, en ese momento en la periferia de la colonia monocariótica se colocó un fragmento de 2 mm de lado de la cepa dicariótica a partir de la cual se aisló el neohaplonte. Las cajas volvieron a incubarse a 24°C y se revisaron diariamente al microscopio hasta observar fibulas en la periferia del lado opuesto de la colonia monocariótica donde no fue colocado el micelio dicariótico de la cepa original. El nuevo micelio dicariótico se aisló en medio EMA.

#### **6.8. Preparación e incubación del inóculo de grano**

Se utilizaron granos de trigo los cuales después de eliminar impurezas y lavarlos se sometieron a cocción en agua a temperatura de ebullición durante 30-45 minutos, se drenó el agua y el grano se enfrió con agua corriente. El grano frío se pesó y mezcló con  $\text{CaSO}_4$  al 1.3% y  $\text{CaCO}_3$  al 0.3% en base húmeda, se colocaron 300 g del grano en bolsas de polipapel (23 cm x 43 cm), dichas bolsas se esterilizaron en autoclave (2 h a  $121^\circ\text{C}$  y  $15 \text{ lb/in}^2$ ), una vez frías se inocularon con el micelio previamente propagado en una caja con medio EMA de cada una de las cepas dicarióticas (nuevas, parentales y reconstituidas). Las bolsas ya inoculadas se incubaron a  $24^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad durante 4 semanas tiempo en el cual se consiguió la invasión total del grano con el micelio. Bajo estas condiciones fue posible la propagación del micelio de todas las cepas dicarióticas disponibles.

#### **6.9. Preparación e incubación del sustrato**

Para la preparación del sustrato se empleó la formulación mostrada en la Tabla 3. Se hidrataron durante 24 horas aserrín, mijo y cascarilla de algodón, transcurrido este tiempo, se drenó el exceso de agua; posteriormente se pesó la cantidad establecida en la formulación para cada bolsa de sustrato, se mezcló con el resto de los componentes (sorgo molido, sulfato de amonio, ácido cítrico y Benlate) en forma homogénea y se ajustó la humedad aproximadamente al 60%.

Tabla 3. Formulación del sustrato empleado en el cultivo de las cepas de *L. edodes*

Componentes del sustrato	Proporción (%)
Aserrín	50
Cascarilla de algodón	36
Mijo	6
Sorgo molido	6
Sulfato de amonio	0,5
Ácido cítrico	0,5
Benlate	1

Una vez preparada la mezcla se colocaron 1.5 kg del sustrato en bolsas de polipapel y se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión durante dos horas. Una vez frías las bolsas se inocularon con 5% de inóculo de grano de la cepa dicariótica (se prepararon 6 réplicas para cada cepa) y se incubaron a 24°C en condiciones de oscuridad durante 10 semanas.

Durante el periodo de incubación se monitoreó el progreso de la invasión micelial, la aparición de primordios y el pardeamiento de los bloques de sustrato. Para ello se registró semanalmente qué porcentaje de la superficie de cada bloque de sustrato estaba cubierta por el micelio del hongo (invasión micelial), por primordios (formación de primordios) o por una capa de color café (pardeamiento).

#### **6.10. Inducción de la fructificación**

Una vez completado el tiempo de incubación, se procedió a retirar las bolsas de plástico que cubrían cada bloque de sustrato, posteriormente fueron trasladados al cuarto de fructificación. La fructificación se indujo mediante riegos regulares (4 veces por día durante 15 minutos), ventilación con aire húmedo e iluminación continua. Los cuerpos fructíferos se cosecharon antes de la apertura total del píleo y se recolectaron durante un período de 8 semanas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Experimentos de desdicariorización para las cepas de *L. edodes*.

#### 7.1.1. Crecimiento micelial de las cepas de *Lentinula edodes* en solución desdicariorizadora y en extracto de malta.

En un experimento inicial se evaluó el crecimiento micelial de las diferentes cepas en medio líquido de extracto de malta (EM) y en solución desdicariorizadora (SD). Para ello el micelio fue sometido a una homogenización por 5, 10, 15, 20 y 30 segundos y los matraces fueron inoculados con dos volúmenes de inoculación (50 y 100  $\mu$ l) de cada tiempo de homogenización. Esta evaluación inicial permitió conocer las condiciones óptimas para la desdicariorización de cada cepa.

##### 7.1.1.1. Cepa L5

En la **Tabla 4** se observa que el desarrollo micelial de la cepa L5 después de 8 días de incubación en EM fue abundante en todos los casos, mientras que el desarrollo micelial en la SD resultó menor al observado en EM, a excepción de los matraces con SD inoculados con 100  $\mu$ l del micelio homogeneizado por 5 y 10 segundos, en los cuales el crecimiento micelial también fue abundante.

Tabla 4. Crecimiento micelial de la cepa L5 a los 8 días de incubación en solución de EM y en SD inoculadas con un homogeneizado de cuatro colonias en EMA.

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>EM (líquido)</i>		<i>Solución desdicariorizadora</i>	
	<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>			
	<i>50</i>	<i>100</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
5	A	A	R	A
10	A	A	R	A
15	A	A	R	R
20	A	A	R	R
30	A	A	R	R

A: Crecimiento micelial abundante

R: Crecimiento micelial regular



**7.1.1.2. Cepa L10**

En la **Tabla 5** se presenta el crecimiento micelial después de 6 días de incubación para la cepa L10 en solución de EM y SD. En la solución de EM el mayor crecimiento micelial se observó en los matraces inoculados con micelio homogeneizado por 5, 10 y 15 segundos, mientras que en la SD el mayor crecimiento micelial se observa sólo en los matraces inoculados con micelio homogeneizado por 5 y 10 segundos, así como para los matraces inoculados con micelio homogeneizado por 20 segundos, siempre y cuando el volumen de inoculación sea de 100  $\mu$ l.

Tabla 5. Crecimiento micelial de la cepa L10 a los 6 días de incubación en solución de EM y en SD inoculadas con un homogeneizado de cuatro colonias en EMA.

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>EM (líquido)</i>	<i>Solución desdicarionizadora</i>	
	<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>		
	<i>50</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
5	R	R	R
10	R	R	R
15	R	E	E
20	E	E	R
30	E	E	E

R: Crecimiento micelial regular  
E: Crecimiento micelial escaso

**7.1.1.3. Cepa L18**

En la **Tabla 6** se observa que el desarrollo micelial de la cepa L18 en EM fue igual de abundante al desarrollo micelial en los matraces de SD inoculados con 100  $\mu$ l de micelio homogeneizado. Sin embargo, el desarrollo micelial en SD fue menor en los matraces inoculados con 50  $\mu$ l de micelio homogeneizado.

Tabla 6. Crecimiento micelial de la cepa L18 a los 6 días de incubación en solución de EM y en SD inoculadas con un homogeneizado de cuatro colonias en EMA.

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>EM (líquido)</i>	<i>Solución desdicarionizadora</i>	
	<i>Volumen de inoculación (µl)</i>		
	<i>50</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
5	A	R	A
10	A	R	A
15	A	E	A
20	A	R	A
30	A	R	A

A: Crecimiento micelial abundante  
 R: Crecimiento micelial regular  
 E: Crecimiento micelial escaso

#### 7.1.1.4. Cepa L21

En la **Tabla 7** se observa que el crecimiento micelial de la cepa L21 fue mayor en los matraces con EM en comparación con los matraces con solución desdicarionizadora inoculadas con 50 µl del micelio homogeneizado por 5 y 10 segundos. Para el resto de los matraces no hubo diferencia en el crecimiento micelial entre la solución de EM y la SD.

Tabla 7. Crecimiento micelial de la cepa L21 a los 5 días de incubación en solución de EM y en SD inoculadas con un homogeneizado de cuatro colonias en EMA.

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>EM (líquido)</i>	<i>Solución desdicarionizadora</i>	
	<i>Volumen de inoculación (µl)</i>		
	<i>50</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
5	A	E	A
10	A	R	A
15	R	R	R
20	R	R	R
30	R	R	R

A: Crecimiento micelial abundante  
 R: Crecimiento micelial regular  
 E: Crecimiento micelial escaso

Los resultados anteriores permiten confirmar la sensibilidad del micelio de cada cepa de *Lentinula edodes* al daño mecánico provocado por la homogeneización, el cual se reportó en experimentos previos de desdicarionización en los cuales se manejaban tiempos de homogeneización de 150 segundos, condiciones bajo las

cuales el crecimiento micelial en SD era nulo o muy escaso (Arteaga *et al.*, 1997). La reducción en el tiempo de homogeneización a 5, 10, 15, 20 y 30 segundos permitió observar un mayor crecimiento micelial en las soluciones de EM y SD. Se observó que las cepas empleadas resisten diferentes tiempos de homogeneización y requieren tiempos de incubación y volúmenes de inoculación en SD distintos, lo cual puede estar relacionado a su resistencia particular frente al daño mecánico. Así la cepa L21 requirió sólo 5 días de incubación para crecer de manera regular en SD mientras que la cepa L5 requirió 8 días de incubación. Por otra parte la resistencia de la cepa L10 a tiempos de homogeneización mayores a 15 segundos fue mínima, lo cual se reflejó en un escaso crecimiento micelial.

En general se observó que el crecimiento micelial de las cepas en la solución de EM fue mayor al observado en SD, salvo en muy pocos casos en donde el crecimiento micelial fue semejante en ambas soluciones (SD y EM), lo cual sugiere que la solución desdicarizadora presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial.

### ***7.1.2. Evaluación de las colonias en EMA de las diferentes cepas previamente inoculadas en solución desdicarizadora***

En la evaluación de las colonias desarrolladas en EMA se consideró el efecto de una segunda homogeneización de 20 segundos previa a la inoculación del micelio (previamente desarrollado en SD) en EMA. También se consideró el tiempo de incubación requerido para su crecimiento, el número de colonias obtenidas y si presentaban o no fíbulas.

#### **7.1.2.1 Cepa L5**

En el primer experimento de desdicarización de la cepa L5 se sometió el micelio a 5 tiempos de homogeneización (5, 10, 15, 20 y 30 segundos) y se inocularon

volúmenes de 50 y 100  $\mu$ l en matraces con 50 ml de la solución desdicarriotizadora, se dejaron incubar hasta la detección de desarrollo micelial (8 días). Una vez que se observó desarrollo micelial se inocularon cajas Petri con medio EMA con 50 y 100  $\mu$ l de la solución desdicarriotizadora antes de ser sometida a una segunda homogeneización. Posteriormente la solución desdicarriotizadora fue homogeneizada por 20 segundos y nuevamente se inocularon cajas Petri con EMA con 50 y 100  $\mu$ l de la solución desdicarriotizadora.

En el primer experimento de desdicarriotización el número de colonias de la cepa L5 en EMA obtenidas a partir de la inoculación de la SD antes de ser homogeneizada fue muy bajo y semejante para todos los tiempos de homogeneización y los dos volúmenes de inoculación de la solución desdicarriotizadora. En general se observaron menos de 2 colonias por placa, en comparación con el abundante número de colonias obtenidas después de una segunda homogeneización de la SD. En este caso se observa que a medida que se incrementa el tiempo de homogeneización aumenta la cantidad de colonias recuperadas y sólo se observa una reducción en la cantidad de colonias recuperadas en EMA al pasar de 20 a 30 segundos de homogeneización (**Tabla 8**). Además se observó que el desarrollo de las colonias a partir de la solución que no fue sometida a una segunda homogeneización requirieron de tiempos de incubación más prolongados (hasta 21 días), mientras que para las colonias que fueron sometidas a una segunda homogeneización el tiempo de incubación se redujo a 8 días.

Tabla 8. Efecto del tiempo de homogeneización y volumen de inoculación de la solución desdicarionizadora sobre la formación de colonias de la cepa L5 en medio EMA antes y después de homogeneizar la solución desdicarionizadora (Primer experimento)

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias			
<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>Volumen de inoculación en SD (µl)</i>	<i>Total de colonias aisladas en EMA</i>			
		<i>Sin 2ª homogeneización*</i>		<i>Con 2ª homogeneización**</i>	
		<i>Tipo de micelio</i>			
		<b>M</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>D</b>
5	50	0	1	0	12
	100	0	0	0	22
10	50	0	0	0	46
	100	0	1	0	0
15	50	0	1	0	40
	100	0	1	0	0
20	50	0	1	0	365
	100	0	0	0	0
30	50	0	1	0	102
	100	0	2	0	0

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

\*Número de colonias aisladas después de 21 días de incubación

\*\*Número de colonias aisladas después de 8 días de incubación

Como resultado de este primer ensayo se observó que la homogeneización de la SD permitió fragmentar el micelio y éste al permanecer viable aumentó la posibilidad de recuperar colonias en EMA; es decir, la falta de homogeneización produjo pocos fragmentos y por ello el número de colonias obtenido fue muy bajo (2 como máximo). Con base en estos resultados se decidió que para los siguientes experimentos de desdicarionización una vez que se observara desarrollo micelial en la SD, ésta se sometería a una segunda homogeneización por 20 segundos antes de su inoculación en EMA. Además como se observó que el número de colonias en EMA estaba en función del tiempo de homogeneización dado a la cepa antes de inocular la solución desdicarionizadora (el cual afecta la viabilidad del micelio) y los volúmenes de inoculación en EMA se decidió repetir el experimento bajo las siguientes condiciones:

Tiempo de homogenización de la cepa: 20 segundos

Volumen de inoculación en SD: 50 y 100  $\mu$ l

Tiempo de incubación en SD: 8 días

Volumen de inoculación (con 20 segundos de homogenización) en EMA: 30 y 50  $\mu$ l

Como se observa en la **Tabla 9** en el segundo experimento de desdicariorización de la cepa L5 no fue posible el aislamiento de neohaplontes.

Tabla 9. Recuperación de colonias de la cepa L5 en EMA inoculado con 30 y 50  $\mu$ l de SD previamente inoculada con 50 y 100  $\mu$ l de micelio homogeneizado durante 20 segundos (Segundo experimento)

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias							
<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>Volumen de inoculación en SD (<math>\mu</math>l)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>						<i>Total de colonias aisladas</i>	
		4		5		6		<i>Tipo de micelio</i>	
		<i>Volumen de inoculación en cajas con EMA (<math>\mu</math>l)</i>							
		30	50	30	50	30	50	<i>M</i>	<i>D</i>
20	50	0	2	0	1	8	1	0	26
		0	1	0	0	4	2		
		0	0	0	0	5	2		
	100	0	14	6	12	0	6	0	81
		0	4	5	8	0	3		
		0	8	1	8	0	6		

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

### 6.1.2.2 Cepa L10

En la **Tabla 10** se observa que el total de colonias recuperadas en EMA en el primer experimento de desdicariorización de la cepa L10 fue de entre 1 y 7, sin embargo se observó que en su totalidad fueron de tipo dicariótico y que el mayor número se obtuvo a partir del micelio homogeneizado por 10 segundos. Por ello en el segundo experimento de desdicariorización para la cepa L10 se establecieron las siguientes condiciones:

Tiempo de homogenización de la cepa: 10 segundos

Volumen de inoculación en SD: 50, 100 $\mu$ l

Tiempo de incubación en SD: 6 días

Volumen de inoculación (con 20 s de homogeneización) en EMA: 20 y 30  $\mu$ l

Tabla 10. Recuperación de colonias de la cepa L10 en EMA inoculado con SD previamente inoculada con 50 y 100 µl de micelio homogeneizado a diferentes tiempos (Primer experimento)

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias					
<i>Tiempo de homogenización (segundos)</i>	<i>Volumen de inoculación en SD (µl)</i>	<i>Tiempo de incubación en medio EMA (días)</i>				<i>Total de colonias aisladas</i>	
		6		7		<i>Tipo de micelio</i>	
		<i>Volumen de inoculación en cajas con EMA (µl)</i>					
		20	30	20	30	<i>M</i>	<i>D</i>
5	50	0	0	1	0	0	1
	100	0	2	0	1	0	3
10	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	3	0	4	0	7
15	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	1	0	2	0	3
20	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1
30	50	0	1	0	0	0	1
	100	0	0	0	0	0	0

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

Como se observa en la **Tabla 11** en el segundo experimento de desdicariorización de la cepa L10 fue posible aumentar el número de colonias en EMA, sin embargo ninguna fue de tipo monocariótico.

Tabla 11. Recuperación de colonias de la cepa L10 en EMA inoculado con SD previamente inoculada con 50 y 100  $\mu$ l de micelio homogeneizado por 10 segundos (Segundo experimento)

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias											
Tiempo de homogeneización (segundos)	Volumen de inoculación en SD ( $\mu$ l)	Tiempo de incubación (días)										Total de colonias aisladas	
		4		6		7		14		15		Tipo de micelio	
		20	30	20	30	20	30	20	30	20	30	M	D
10	50	0	12	2	2	4	8	3	0	1	1	0	48
		0	1	1	2	2	5	0	0	0	0		
		0	2	0	0	2	0	0	0	0	0		
	100	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

### 7.1.2.3 Cepa L18

Para la cepa L18 el total de colonias recuperadas en EMA osciló entre 3 y 28. En este caso se observó que una fue de tipo monocariótico, es decir se logró recuperar el primer neohaplonte, el cual se obtuvo a partir de la solución desdicarizadora inoculada con micelio homogeneizado por 15 segundos (Tabla 12).



## *Resultados y Discusión*

Tabla 12. Recuperación de colonias de la cepa L18 en EMA inoculado con SD previamente inoculada con 50 y 100  $\mu$ l de micelio homogeneizado a diferentes tiempos (Primer experimento)

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias							
<i>Tiempo de homogenización (segundos)</i>	<i>Volumen de inoculación en SD (<math>\mu</math>l)</i>	<i>Tiempo de incubación en medio EMA (días)</i>						<i>Total de colonias aisladas</i>	
		5		8		12		<i>Tipo de micelio</i>	
		<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>							
		20	30	20	30	20	30	<i>M</i>	<i>D</i>
5	50	2	1	0	0	0	0	0	3
	100	6	1	0	0	0	0	0	7
10	50	16	11	1	0	0	0	0	28
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
15	50	6	0	0	1	0	0	1	6
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
20	50	0	6	0	0	0	0	0	6
	100	11	8	0	0	1	3	0	23
30	50	0	0	4	0	0	0	0	4
	100	0	4	0	0	0	1	0	5

M = Micelio de tipo monocariótico  
D= Micelio de tipo dicariótico

### **7.1.2.4 Cepa L21**

Como se observa en la **Tabla 13** el número de colonias en EMA para la cepa L21 fue de entre 1 y 9 colonias, y una de estas colonias fue de tipo monocariótico.

## *Resultados y Discusión*

Tabla 13. Recuperación de colonias de la cepa L21 en EMA inoculado con SD previamente inoculada con 50 y 100  $\mu$ l de micelio homogeneizado a diferentes tiempos

Condiciones de preparación de inóculo en SD		Condiciones de procesamiento de SD para recuperación de colonias							
<i>Tiempo de homogenización (segundos)</i>	<i>Volumen de inoculación en SD (<math>\mu</math>l)</i>	<i>Tiempo de incubación en medio EMA (días)</i>						<i>Total de colonias aisladas</i>	
		<i>1</i>		<i>7</i>		<i>8</i>		<i>Tipo de micelio</i>	
		<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>							
		<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>M</i>	<i>D</i>
5	50 $\mu$ l	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 $\mu$ l	0	0	2	5	1	1	0	9
10	50 $\mu$ l	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 $\mu$ l	0	0	2	3	0	1	0	6
15	50 $\mu$ l	0	0	1	3	0	3	0	7
	100 $\mu$ l	0	0	1	0	0	0	0	1
20	50 $\mu$ l	0	0	3	2	2	0	1	6
	100 $\mu$ l	0	0	0	0	0	0	0	0
30	50 $\mu$ l	0	0	0	1	0	0	0	1
	100 $\mu$ l	1	0	1	2	0	0	0	4

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

Los resultados obtenidos con las cinco cepas permiten confirmar el efecto desdicariotizante de la solución de glucosa y peptona reportado en trabajos previos (Leal & Eger, 1980; Arteaga *et al.*, 1996). El tiempo para la recuperación de neohaplontes en el presente trabajo fue de entre 1 y 16 días mientras que en trabajos previos se emplearon hasta 24 días de incubación, lo cual es un buen indicativo de la optimización del método.

### *7.1.3. Evaluación de las colonias en medio sólido desdicariotizante de las diferentes cepas.*

Se decidió utilizar un medio sólido desdicariotizante (MSD) con la misma composición de la solución desdicariotizadora pero adicionado con 18g/l de agar

bacteriológico, este medio fue inoculado con 20 y 30  $\mu$ l del micelio homogeneizado de la cepa. El objetivo de utilizar un medio sólido desdicarizante se basa en que durante el crecimiento de la cepa en SD los neohaplontes presentes pueden cruzarse de ser compatibles y producir nuevamente células dicarióticas; al emplear un MSD cabe la posibilidad de que encontrando las condiciones óptimas (tiempo de homogeneización y volumen de inoculación) aumente la posibilidad de recuperación de neohaplontes para las diferentes cepas.

### 7.1.3.1. Cepa L5

En la **Tabla 14** se observa que el número de colonias de la cepa L5 en MSD fue en total de 107 después de 15 días de incubación. Al comparar este resultado con la recuperación de colonias en medio EMA inoculado con SD, este fue 1.6 veces más al número obtenido en EMA sin embargo, todas las colonias fueron de tipo dicariótico y al igual que en EMA, la morfología micelial fue en su mayoría anormal.

Tabla 14. Recuperación de colonias de la cepa L5 en medio sólido desdicarizante inoculado con 20 y 30  $\mu$ l de micelio homogeneizado por 20 segundos

<i>Tiempo de homogenización (segundos)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>										<i>Total de colonias aisladas</i>	
	6		8		9		10		15		<i>Tipo de micelio</i>	
	<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>											
	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30	M	D
20	6	0	0	10	11	8	0	15	20	37	0	107

M = Micelio de tipo monocariótico  
D= Micelio de tipo dicariótico

### 7.1.3.2. Cepa L10

Para la cepa L10 el número de colonias recuperadas en MSD fue mayor al obtenido en EMA inoculado con SD. Además en este caso se lograron aislar 2 neohaplontes como se observa en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Recuperación de colonias de la cepa L10 en medio sólido desdicarizante inoculado con 20 y 30  $\mu$ l de micelio homogeneizado por 20 segundos

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>								<i>Total de colonias aisladas</i>	
	<i>6</i>		<i>12</i>		<i>13</i>		<i>16</i>		<i>Tipo de micelio</i>	
	<i>Volumen de inoculación (<math>\mu</math>l)</i>									
	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>M</i>	<i>D</i>
10	0	4	16	8	21	0	24	60	2	131

M = Micelio de tipo monocariótico

D= Micelio de tipo dicariótico

### 7.1.3.3. Cepa L18

En un primer experimento para la cepa L18 se emplearon 5 tiempos de homogeneización (5, 10, 15, 20 y 30 segundos). Bajo estas condiciones, el número de colonias recuperadas en MSD fue de entre 15 y 50 colonias, siendo todas de tipo dicariótico (**Tabla 16**). Sin embargo, permitió determinar el tiempo óptimo de homogeneización para la cepa L18 (10 segundos). De esta manera, en un segundo experimento de desdicarización fue posible aislar un neohaplonte del medio inoculado con un homogeneizado de 10 segundos (**Tabla 17**).

Tabla 16. Recuperación de colonias de la cepa L18 en medio sólido desdicarionizante inoculado con 20 µl de micelio homogeneizado a diferentes tiempos (Primer experimento)

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>			<i>Total de colonias aisladas</i>	
	5	7	8	<i>Tipo de micelio</i>	
				<i>M</i>	<i>D</i>
5	2	7	6	0	15
10	0	7	43	0	50
15	1	3	42	0	46
20	0	4	18	0	22
30	0	7	21	0	28

M = Micelio de tipo monocariótico  
D= Micelio de tipo dicariótico

Tabla 17. Recuperación de colonias de la cepa L18 en medio sólido desdicarionizante inoculado con 20 y 30 µl de micelio homogeneizado por 10 segundos (Segundo experimento)

<i>Tiempo de homogeneización (segundos)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>						<i>Total de colonias aisladas</i>	
	4		5		10		<i>Tipo de micelio</i>	
	<i>Volumen de inoculación (µl)</i>							
	20	30	20	30	20	30	<i>M</i>	<i>D</i>
10	3	6	11	5	28	34	1	86

M = Micelio de tipo monocariótico  
D= Micelio de tipo dicariótico

#### 7.1.3.4. Cepa L21

Para la cepa L21 el número de colonias recuperadas en MSD fueron cuantificadas durante los primeros 7 días de incubación, tiempo en el cual fue posible aislar 1 neohaplonte (**Tabla 18**). Después de ese tiempo las colonias fueron incontables.

Tabla 18. Recuperación de colonias de la cepa L21 en medio sólido desdicarizante inoculado con 20 y 30 µl de micelio homogeneizado a diferentes tiempos

<i>Tiempo de homogenización (segundos)</i>	<i>Tiempo de incubación (días)</i>				<i>Total de colonias aisladas</i>	
	<i>6</i>		<i>7</i>		<i>Tipo de micelio</i>	
	<i>Volumen de inoculación (µl)</i>					
	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>M</i>	<i>D</i>
5	7	15	0	11	0	33
10	24	15	0	0	1	38
15	10	25	0	0	0	35
20	12	7	0	0	0	19
30	7	11	0	0	0	18

M = Micelio de tipo monocariótico  
D= Micelio de tipo dicariótico

En resumen los resultados obtenidos con las cuatro cepas de *L. edodes* sugieren la importancia de determinar tanto el volumen de inoculación como el tiempo óptimo de homogeneización para cada cepa en MSD. Así para la cepa L10 resultó más eficaz el MSD ya que permitió aislar 2 neohaplontes , en tanto que a partir de SD no fue posible aislar neohaplontes. Para las cepas L21 y L18 no hubo diferencia entre el MSD y la SD ya que para ambas cepas se logró aislar 1 neohaplonte de cada medio. Todos los neohaplontes obtenidos fueron aislados en medio EMA y la nomenclatura utilizada para su denominación consideró el nombre de la cepa a partir de la cual fue aislado seguido por un guión y el número que indica su orden de aislamiento y la letra S(**Tabla 19**).

Finalmente se observa que para la cepa L5 no fue posible la obtención de neohaplontes.

Tabla 19. Neohaplontes obtenidos para cada cepa de *Lentinula edodes* indicando el tiempo de homogenización y el medio empleado para la desdicariorización.

Cepas	Tiempo de homogenización (segundos)	Medio empleado para la desdicariorización	Neohaplontes recuperados	Nomenclatura de los neohaplontes
L5	20	*	0	-
L10	10	MSD	2	L10-1S
				L10-4S
L18	10	MSD	1	L18-1S
	15	SD	1	L18-2S
L21	10	MSD	1	L21-2S
	20	SD	1	L21-3S

\*Nota: No fue posible aislar neohaplontes en ningún medio

## 7.2. Clasificación de los neohaplontes obtenidos en los dos tipos de compatibilidad.

Para clasificar los neohaplontes de las cepas desdicariorizadas en los dos tipos de compatibilidad, se seleccionaron dos neohaplontes y se realizaron cruza con todos los neohaplontes obtenidos para cada cepa en medio EMA. Para confirmar la condición monocariótica de los neohaplontes y garantizar la correcta identificación de los dicariorotes producidos por entrecruzamiento de neohaplontes, se realizó un "Control" que correspondía a una resiembra de los neohaplontes empleados. Con base en los resultados obtenidos del apareamiento de neohaplontes de cada cepa (**Tablas 20, 21 y 22**) fue posible identificar las cepas en donde se lograron recuperar los dos componentes monocarióticos o neohaplontes de cada cepa dicariótica, sometida al proceso de desdicariorización.

En la **Tabla 20** se observa que sólo para la cepa L10 fue posible recuperar los neohaplontes correspondientes a los dos tipos de compatibilidad de la cepa.

Tabla 20. Apareamiento entre neohaplontes de la cepa L10

Neohaplontes obtenidos	Neohaplontes seleccionados		Control
	L10-1S	L10-4S	
L10-1S	-	+	M
L10-4S	+	-	M

(-): Ausencia de fibulas

(+): Presencia de fibulas

M: micelio tipo monocariótico

Por otro lado En las **Tablas 21 y 22**, correspondientes a las cruzas para las cepas L18 y L21 se observó que todos los neohaplontes recuperados pertenecen a un solo tipo de compatibilidad, es decir en ningún caso se observó la formación de fibulas. Estos resultados indican que para estas cepas sólo fue posible recuperar entre los neohaplontes un solo tipo de compatibilidad.

Tabla 21. Apareamiento entre neohaplontes de la cepa L18

Neohaplontes obtenidos	Neohaplontes seleccionados		Control
	L18-1S	L18-2S	
L18-1S	-	-	M
L18-2S	-	-	M

(-): Ausencia de fibulas

(+): Presencia de fibulas

M: micelio tipo monocariótico

Tabla 22. Apareamiento entre neohaplontes de la cepa L21

Neohaplontes obtenidos	Neohaplontes seleccionados		Control
	L21-2S	L21-3S	
L21-2S	-	-	M
L21-3S	-	-	M

(-): Ausencia de fibulas

(+): Presencia de fibulas

M: micelio tipo monocariótico

### 7.3. Producción de cepas dicarióticas por apareamiento de neohaplontes

Para la producción de nuevas cepas dicarióticas se efectuaron cruzas entre todos los neohaplontes disponibles en medio EMA como se indica en la Sección 6.6 de



Materiales y Métodos. Como se observa en la **Tabla 23** las cruzas se realizaron por duplicado y en todos los casos el resultado de la cruce fue reproducible.

*Lentinula edodes* posee un patrón de sexualidad heterotálico tetrapolar, por lo que produce esporas de cuatro tipos de compatibilidad, las cuales son compatibles y por tanto capaces de producir micelio dicariótico solamente en ciertas combinaciones. Los resultados obtenidos en el entrecruzamiento de neohaplontes presentados en la **Tabla 23** permitieron detectar la compatibilidad entre los mismos y con ello su capacidad de apareamiento. Estos resultados confirman que los neohaplontes L10-1S y L10-4S presentan factores de compatibilidad distintos (A1B1 y A2B2) y por ello capacidad de formar micelio tipo dicariótico al entrecruzarlos como se había observado al realizar su clasificación en los dos tipos de compatibilidad. Por otra parte la obtención de los dicariotes L10-1S/L18-1S, L10-4S/L18-1S, L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-2S, L10-1S/L21-2S y L10-4S/L21-2S evidencia que los neohaplontes L18-1S, L18-2S y L21-2S poseen un factor de compatibilidad A3B3 totalmente diferente al de los neohaplontes L10-1S y L10-4S, de lo contrario no se habría detectado la presencia de fibulas posterior al entrecruzamiento. El neohaplonte L21-3S no fue compatible con ninguno de los neohaplontes pese a que, de acuerdo a la clasificación de compatibilidad entre los neohaplontes de la cepa parental L21 efectuada previamente, correspondía al mismo tipo de compatibilidad que el neohaplonte L21-2S el cual sí fue compatible con los neohaplontes L10-1S y L10-4S, tal comportamiento conduce a considerar una posible alteración de la capacidad de apareamiento de tal neohaplonte.

Como resultado de las cruzas se obtuvieron 6 nuevos dicariotes, además del dicariote reconstituido de la cepa L10 (L10-1S/L10-4S). Las colonias dicarióticas fueron aisladas en EMA.

Tabla 23. Entrecruzamiento de todos los neohaplotes de las diferentes cepas de *Lentinula edodes*

Tipo de compatibilidad	Neohaplotes	A1B1	A2B2	A3B3	A3B3	A3B3	AXBX	Control
		L10-1S	L10-4S	L18-1S	L18-2S	L21-2S	L21-3S	
A1B1	L10-1S	-	+	+	+	+	-	M
A2B2	L10-4S	+	-	+	+	+	-	M
A3B3	L18-1S	+	+	-	-	-	-	M
A3B3	L18-2S	+	+	-	-	-	-	M
A3B3	L21-2S	+	+	-	-	-	-	M
AXBX	L21-3S	-	-	-	-	-	-	M

(-): Ausencia de fibulas  
 (+): Presencia de fibulas  
 M: micelio tipo monocariótico

La nomenclatura de los nuevos dicariotes se realizó considerando los nombres de los neohaplotes involucrados en su obtención. A continuación se enlistan los nuevos dicariotes obtenidos:

- L10-1S/L18-1S
- L10-4S/L18-1S
- L10-1S/L18-2S
- L10-4S/L18-2S
- L10-1S/L21-2S
- L10-4S/L21-2S

#### 7.4. Producción de cepas dicarióticas por cruzas dicarión-monocarión

Aunque la desdicarionización resultó efectiva para aislar neohaplotes de las cepas dicarióticas, sólo fue posible recuperar los dos componentes monocarióticos de una cepa (L10). Una forma alternativa de combinar los núcleos de un micelio

dicariótico con otros monocariotes es mediante el fenómeno Buller, un mecanismo de intercambio nuclear entre monocariotes y dicariotes por medio de cruza dicarición-monocarición (Sonnenberg, 2005). Como en este trabajo no se lograron obtener los dos componentes monocarióticos de todas las cepas utilizadas, se efectuaron cruza dicarición-monocarición entre los neohaplontes de las cepas L18 y L21 y las respectivas cepas parentales, como se indica en la Sección 6.7 de Metodología.

La **Figura 5** muestra una fotografía tomada durante la revisión al microscopio de la cruza dicarición-monocarición del neohaplonte L18-2S y la cepa L18, en ella se detecta la dicariotización del micelio monocariótico debido a la presencia de hifas con fibulas (cercanas al número 5 de la reglilla del ocular) rodeadas completamente por micelio monocariótico. Resulta importante resaltar que dicha fotografía corresponde al campo observado en una parte de la periferia de la colonia monocariótica totalmente distante a la posición de la colonia dicariótica (el lado opuesto).

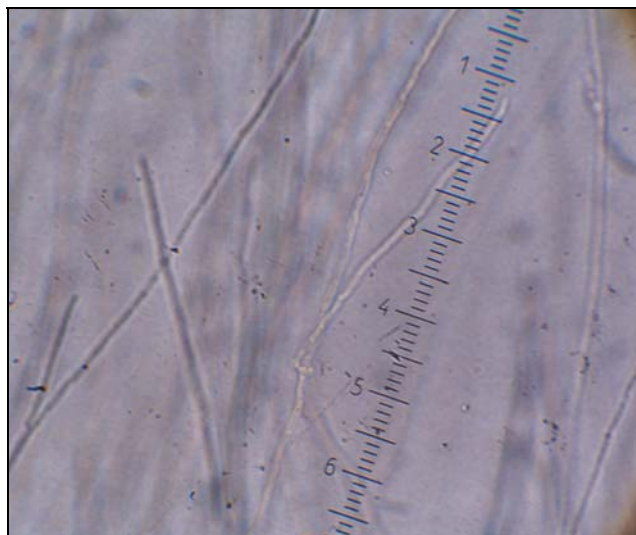


Figura 5. Dicariotización del neohaplonte L18-2S mediante cruza dicarición-monocarición con la cepa L18. (Fotografía tomada en el microscopio óptico durante la realización de este trabajo, Laboratorio 324)

En las **Tablas 24 y 25** se muestran los resultados obtenidos después de efectuar las cruza dicarición-monocarición entre los neohaplontes y sus respectivas cepas dicarióticas originales. En todos los casos fue posible la dicariorización del micelio monocariótico excepto para el neohaplonte L21-3S, el cual a pesar de haber sido clasificado con el mismo tipo de compatibilidad del neohaplonte L21-2S, fue incapaz de dicariorizarse mediante cruza dicarición-monocarición y también fue incapaz de producir micelio dicariótico al aparearlo con aquellos neohaplontes con los cuales el neohaplonte L21-2S sí resultó ser compatible (neohaplontes L10-1S y L10-4S), lo que sugiere una posible alteración en el sistema de apareamiento del neohaplonte L21-3S que podría ser atribuida al proceso químico de desdicariorización al cual fue sometido.

Tabla 24. Apareamiento dicarición monocarición entre neohaplontes de la cepa L18 y la cepa dicariótica original.

Neohaplontes obtenidos	Cepa dicariótica original
	L18
L18-1S	+
L18-2S	+

(+): Formación de nuevo micelio dicariótico

Tabla 25. Apareamiento dicarición monocarición entre neohaplontes de la cepa L21 y la cepa dicariótica original.

Neohaplontes obtenidos	Cepa dicariótica original
	L21
L21-2S	+
L21-3S	-

(+): Formación de nuevo micelio dicariótico

(-): No se observó la formación de nuevo micelio dicariótico

Todos los dicariorotes obtenidos fueron aislados en EMA y a cada uno de estos le fue asignada una clave que comprendía el nombre de las cepas y los neohaplontes implicados en la cruza:

Cepa (L18 o L21)/Neohaplonte

### **7.5. Fructificación de las cepas dicarióticas obtenidas.**

Para evaluar las características morfológicas y de producción de las cepas dicarióticas obtenidas (por apareamiento de neohaplontes y cruza dicarión-monocarión) fue necesario preparar el inóculo de grano de los nuevos dicariotes obtenidos, así como de las cepas parentales (cepas L10, L18 y L21). Para el caso de las cepas obtenidas mediante cruza dicarión-monocarión, únicamente se llevó a la etapa de fructificación a la cepa L18/L18-2S, ya que al momento de preparar el inóculo de grano aún no se obtenían el total de dicariotes mediante cruza dicarión-monocarión.

#### ***7.5.1. Desarrollo micelial de las cepas dicarióticas en inóculo de grano***

Para llevar a cabo la fructificación de las cepas fue necesaria su propagación en un sustrato que permitiera el desarrollo micelial del organismo, para ello se preparó inicialmente el inóculo de grano, el cual sirvió a su vez para la posterior propagación del hongo en el sustrato seleccionado (**Tabla 3**). Las bolsas de inóculo de grano (3 bolsas de 300g por cepa) se incubaron a 24°C en condiciones de oscuridad durante 4 semanas, tiempo en el cual se observó la invasión total del grano por el micelio. Bajo tales condiciones fue posible la propagación del micelio de todas las cepas dicarióticas disponibles, lo que se detectó por la formación de una capa blanca sobre el grano de trigo (**Figura 6**).



Figura 6. Inóculo de grano de la cepa L10-1S/L10-4S a las 4 semanas de incubación. (Fotografía tomada durante la realización de este trabajo, Laboratorio 324).

Una vez que el inóculo de grano estuvo totalmente invadido por el micelio de las cepas, éste se inoculó en el sustrato para su fructificación.

### **7.5.2. Desarrollo micelial de las cepas dicarióticas en el sustrato.**

Para cada cepa dicariótica se prepararon 6 bolsas con sustrato, las cuales fueron inoculadas con 5% de inóculo de grano de la cepa dicariótica y posteriormente incubadas a 24°C en condiciones de oscuridad durante 10 semanas, durante ese tiempo se monitoreó el progreso en la invasión del sustrato por el micelio, la aparición de primordios y el pardeamiento de los bloques de sustrato (cambio de coloración de blanco a café) (**Figura 7**).

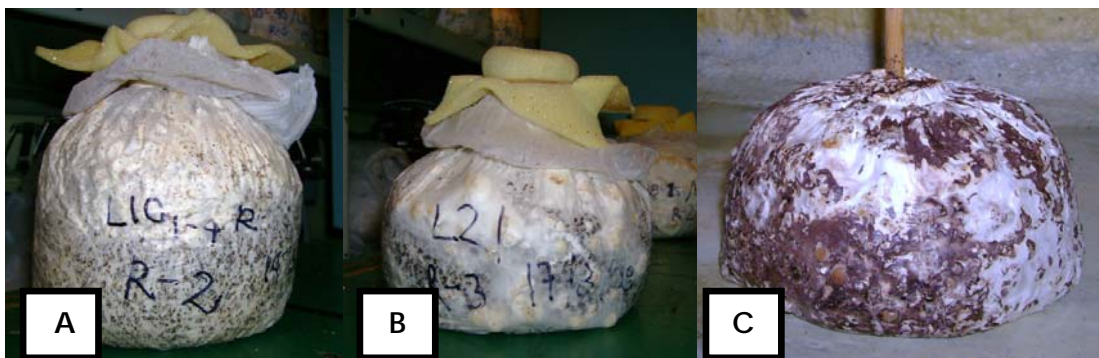


Figura 7: A. Invasión micelial del sustrato. B. Formación de primordios. C. Pardeamiento del sustrato (Fotografías tomadas durante la realización de este trabajo, Laboratorio 324)

La invasión micelial de la totalidad del sustrato requirió entre 4 y 6 semanas, de acuerdo a lo observado durante la incubación del sustrato. Las cepas L18, L21, L10-4S/L18-1S, L10-1S/L21-2S y L10-4S/L21-2S, fueron las que invadieron el sustrato más rápidamente, en tanto que las cepas que tardaron más tiempo en invadir el sustrato fueron L10, L10-1S/L10-4S, L10-1S/L18-1S, L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-2S y L18/L18-2S (**Figura 8**). Es importante destacar que la única cepa parental que presentó una lenta invasión micelial fue la cepa L10 al igual que el dicariote reconstituido a partir de los 2 neohaplontes recuperados. Este comportamiento

también se presenta en algunos dicariotes en cuya obtención participó un componente monocariótico de la cepa L10 (cepas L10-1S/L18-1S, L10-1S/L18-2S y L10-4S/L18-2S). Sin embargo, también se observan algunos dicariotes (en donde participa un neohaplonte de la cepa L10) que invaden el sustrato en poco tiempo (cepas L10-4S/L18-1S, L10-1S/L21-2S y L10-4S/L21-2S).

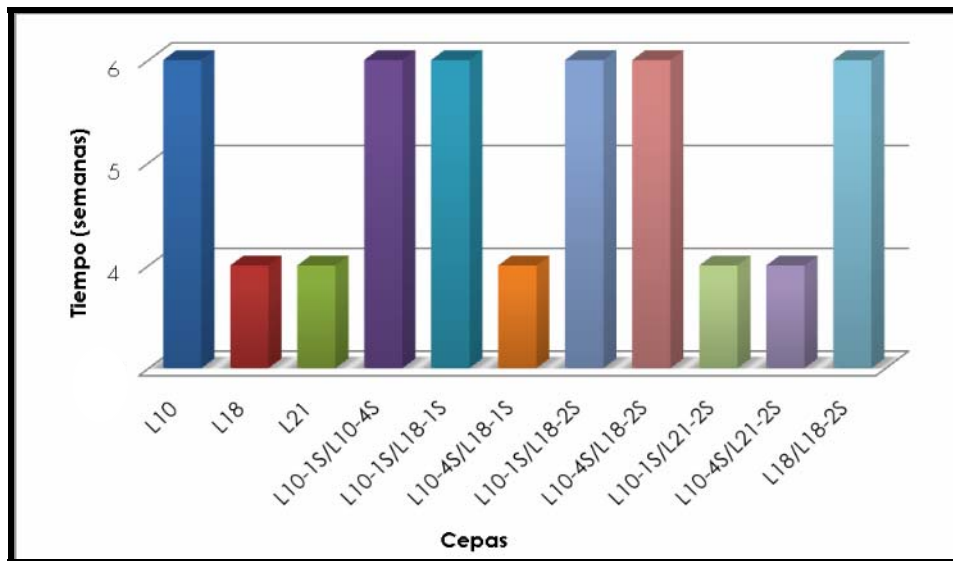


Figura 8. Comparación de los tiempos requeridos para la invasión micelial total del sustrato de las diferentes cepas de *Lentinula edodes*.

El tiempo requerido por cada cepa para iniciar la formación de los primordios también fue considerado como un dato importante para evaluar las características de las diferentes cepas. En la **Figura 9** se observa que las cepas requirieron entre 3 y 5 semanas para la formación de primordios. Las cepas que formaron los primordios en tan sólo 3 semanas fueron: L18, L10-4S/L18-1S, L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-2S, L10-1S/L21-2S, L10-4S/L21-2S y L18/L18-2S, mientras que las cepas L10 y L10-1S/L10-4S requirieron de 5 semanas para la formación de primordios.

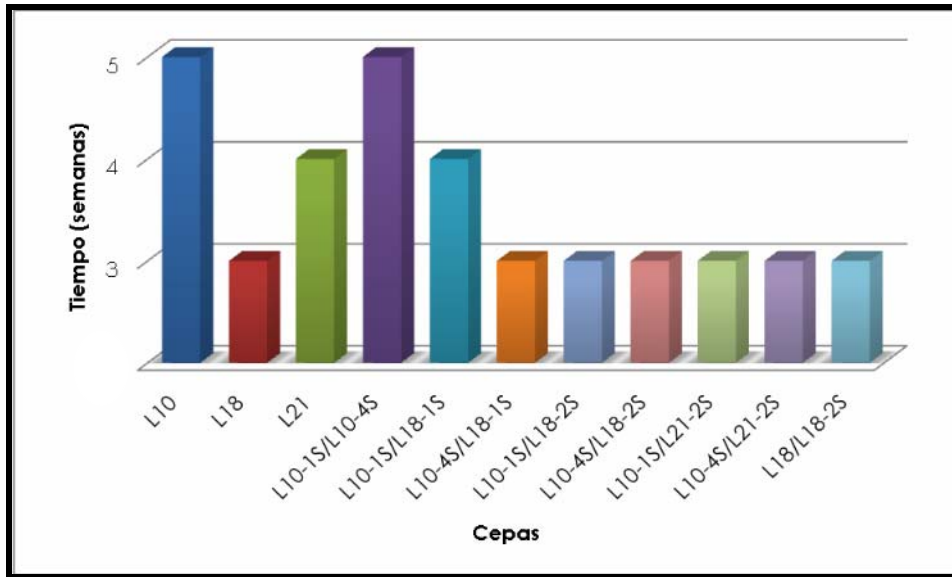


Figura 9. Comparación del tiempo requerido por las diferentes cepas de *Lentinula edodes* para la formación de primordios

La cantidad y el tamaño de los primordios producidos por cada una de las cepas al final del periodo de incubación se resume en la **Figura10** y **Tabla 26**. Para las nuevas cepas dicarióticas se observó que el porcentaje de primordios producidos por la mayoría (75%) fue entre 80 y 100%, sólo las cepas L10-1S/L10-4S y L10-1S/L18-1S presentaron una baja producción de primordios (20 y 30% respectivamente). En general el tamaño de los primordios de las diferentes cepas fue de 2 a 5 cm y solamente para la cepa reconstituída L10-1S/L10-4S el diámetro de los primordios fue menor (0.5 a 1cm).

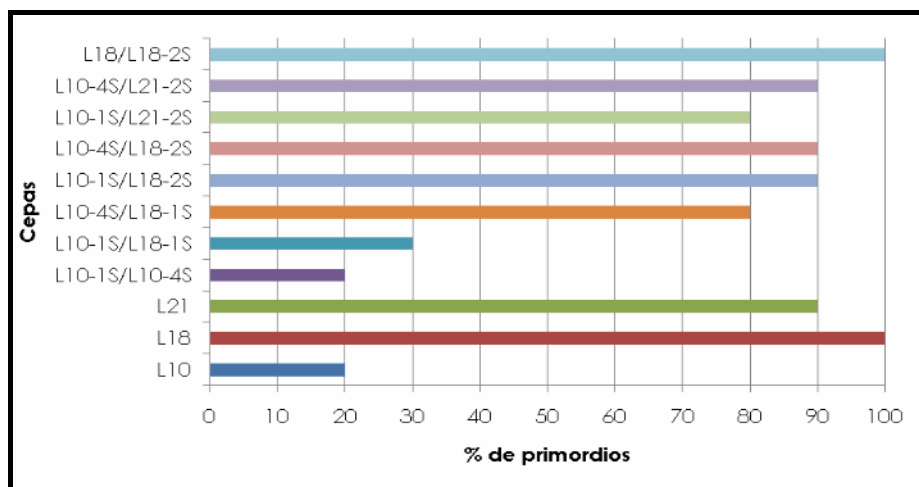


Figura 10. Comparación entre la cantidad de primordios de las diferentes cepas de *Lentinula edodes* al final del periodo de incubación.



Tabla 26. Tamaño de los primordios producidos por las diferentes cepas al final del periodo de incubación

Cepa		Tamaño aproximado de los primordios (cm)
Parentales	L10	0.5 - 1
	L18	2 - 10
	L21	5 - 8
Híbridas	L10-1S/L18-1S	1 - 3
	L10-1S/L18-2S	2 - 3
	L10-4S/L18-1S	2 - 4
	L10-4S/L18-2S	2 - 3
	L10-1S/L21-2S	2 - 3
	L10-4S/L21-2S	3 - 4
Reconstituídas	L10-1S/L10-4S	0.5 - 1
	L18/L18-2S	4 - 5

Por otro lado se observó que para las cepas L21, L18/L18-2S y L10-4S/L18-1S se formaron primordios que casi alcanzaron la morfología de un esporóforo y provocaron la ruptura de la bolsa durante la incubación del sustrato (**Figura 11**).



Figura 10. Esporóforos producidos por la cepa L21 durante la etapa de incubación (Fotografía tomada durante la realización de este trabajo, Laboratorio 324)

El pardeamiento de las bolsas fue la tercera característica a comparar para las diferentes cepas. En la **Figura 12** se presenta un gráfico comparativo del tiempo requerido para iniciar el pardeamiento del sustrato por las cepas, en general el tiempo fue de entre 6 y 8 semanas. De este gráfico hay que destacar que las cepas L10 y L10-1SxL10-4S no están incluidas, debido a que después de 10 semanas de incubación los bloques de sustrato permanecieron completamente blancos.

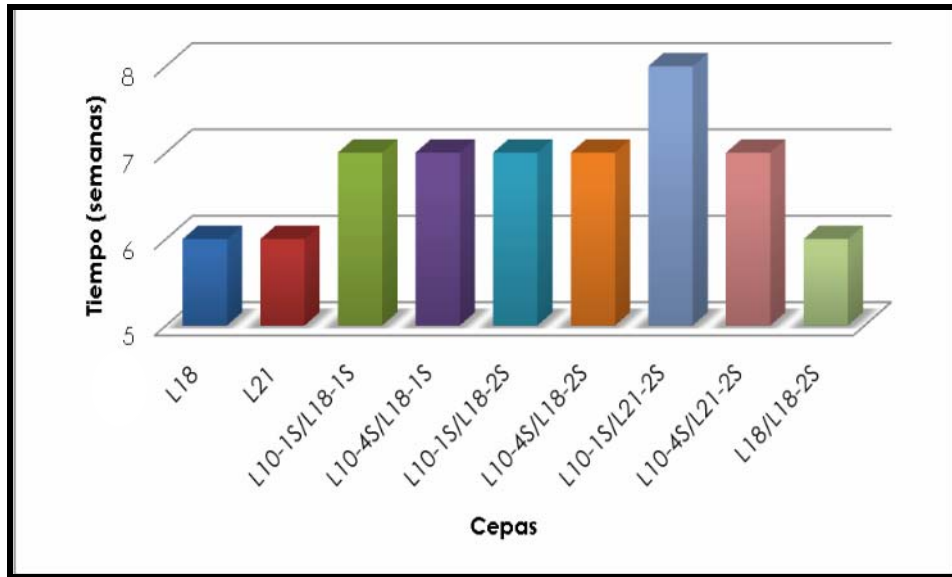


Figura 12. Comparación del tiempo requerido para iniciar el pardeamiento de los bloques de sustrato por las diferentes cepas de *Lentinula edodes*.

El grado de pardeamiento promedio de las diferentes cepas observado en los bloques de sustrato se presenta en la **Tabla 27**. Con el propósito de observar si el porcentaje de pardeamiento de las diferentes cepas presentó diferencias significativas se realizó un análisis de varianza usando un diseño aleatorio en el que la variable independiente fue cepas y otro más usando un diseño por bloques cuyas variables independientes fueron cepas y número de réplicas. De acuerdo al análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de pardeamiento de las diferentes cepas, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Rango Múltiple de Duncan para identificar las cepas que presentaron el mayor porcentaje de pardeamiento. De acuerdo al análisis estadístico realizado las cepas híbridas L10-1S/L18-2S, L10-4S/L21-2S, L10-4S/L18-2S y L10-1S/L21-2S presentaron el mayor grado de pardeamiento (25 a 45%), en tanto que las cepas parentales L18 y L21 presentaron un porcentaje de pardeamiento estadísticamente inferior al de tales cepas (11%).

Tabla 27. Porcentaje de pardeamiento de las diferentes cepas al final del periodo de incubación

Cepa	% Pardeamiento promedio	Clasificación por Duncan*
L10-1S/L18-1S	4,17 $\pm$ 3.76	a
L18/L18-2S	5,83 $\pm$ 4.92	a
L18	10,83 $\pm$ 2.04	b
L21	11,67 $\pm$ 4.08	b
L10-4S/L18-1S	13,33 $\pm$ 13.66	b
L10-4S/L21-2S	25,00 $\pm$ 8.37	c
L10-1S/L18-2S	25,00 $\pm$ 12.25	c
L10-1S/L21-2S	33,33 $\pm$ 40.82	c
L10-4S/L18-2S	40,00 $\pm$ 31.62	c

\*Letras diferentes indican diferencias altamente significativas en los valores de % pardeamiento promedio (Prueba de rango múltiple de Duncan  $p=0.05$ ).

### 7.5.3 Inducción de la fructificación y producción de esporóforos

Una vez concluido el periodo de 10 semanas de incubación se eliminaron las bolsas que cubrían los bloques de sustrato y éstos fueron transferidos al cuarto de fructificación. La fase reproductiva del hongo fue inducida mediante riegos regulares (cada 6 horas durante 15 minutos), ventilación con aire húmedo (2 horas después de cada riego) e iluminación continua. Sin embargo, tales condiciones ambientales fueron insuficientes para la formación de esporóforos en todas las réplicas de las diferentes cepas.

Las cepas parentales L18 y L21 fructificaron después de 2 a 4 semanas de la inducción, en tanto que para la cepa L10 únicamente una de las réplicas fructificó a la 5ª semana. La cepa reconstituida L10-1S/L10-4S tuvo un comportamiento similar al de la cepa parental pues únicamente dos de sus réplicas fructificaron entre la 2ª y 4ª semana de inducción. Para las cepas híbridas el inicio de la producción de esporóforos ocurrió durante la 2ª semana de inducción, sin embargo sólo la totalidad de réplicas de las cepas L10-1S/L18-1S y L18/L18-2S iniciaron la producción de esporóforos, en contraste con las cepas L10-1S/L21-2S y

L10-4S/L21-2S, de las cuales sólo de 1 a 2 réplicas produjeron esporóforos bajo las condiciones ambientales mantenidas en el cuarto de fructificación (Tabla 28).

Tabla 28. Semana de inicio de la producción de esporóforos y número de réplicas en producción de las diferentes cepas de *L. edodes*.

Cepas		Número de réplicas con producción de esporóforos	Semana de inicio de la fructificación
Parentales	L10	1	5
	L18	6	2-4
	L21	6	2-4
Híbridas	L10-1S/L18-1S	6	2-6
	L10-1S/L18-2S	3	2-3
	L10-1S/L21-2S	2	2-3
	L10-4S/L18-1S	4	2-5
	L10-4S/L18-2S	5	2
	L10-4S/L21-2S	1	2
Reconstituidas	L18/L18-2S	6	2-3
	L10-1S/L10-4S	2	2-4

Debido a las variaciones observadas entre réplicas, se decidió cambiar las condiciones ambientales para aquellas réplicas que no habían iniciado la producción de esporóforos después de 3 semanas de inducción. Los bloques de sustrato fueron trasladados a un cuarto con una temperatura de 9°C y permanecieron allí durante 48 horas. Sin embargo, dicho tratamiento no promovió la formación de primordios. Así después de 7 semanas de la inducción todos los bloques de sustrato de las diferentes cepas fueron sumergidos en agua fría (9°C) durante 62 horas. De esta forma, durante la séptima y octava semana después de la inducción inició la producción de esporóforos en los bloques de sustrato que hasta ese momento no habían producido hongos. Así la cepa L10-1S/L18-1S produjo un segundo brote de hongos en todas sus réplicas, en tanto que para las cepas L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-1S, L10-4S/L18-2S, sólo 1 ó 2 de sus réplicas produjeron un segundo brote de hongos.

**7.5.4. Características morfológicas de los esporóforos**

En la evaluación morfológica de los esporóforos producidos se consideraron características como: color, presencia o ausencia de escamas en el pileo, tamaño del estípite (grosor y longitud) y espesor del pileo. En la **Tabla 29** se resumen las características morfológicas de los esporóforos de las diferentes cepas.

Tabla 29. Principales características morfológicas de los esporóforos producidos por las diferentes cepas de *L. edodes*.

Cepas		Píleo						Estípite				
		Color café			Escamas		Espesor		Delgado	Grueso	Corto	Largo
		Claro	Oscuro	Muy oscuro	Presencia	Ausencia	Delgado	Grueso				
Parentales	L10		■		■			■			■	
	L18			■		■		■		■		
	L21			■		■		■		■		
Híbridas	L10-1S/L18-1S	■			■		■			■		
	L10-1S/L18-2S	■			■		■		■		■	
	L10-1S/L21-2S	■			■		■			■		
	L10-4S/L18-1S	■			■		■				■	
	L10-4S/L18-2S	■			■		■		■		■	
	L10-4S/L21-2S			■	■			■		■		
Reconstituídas	L18/L18-2S		■	■		■		■		■		
	L10-1S/L10-4S	■			■		■		■		■	

En general los hongos producidos por la cepa L10 fueron café oscuro, con escamas en el borde del pileo, el cual era delgado, poco convexo y con estípite largo y delgado (ver **Figura 13**).



Figura 13. Esporóforos producidos por la cepa L10

La cepa L18 produjo esporóforos café muy oscuro, con pileo grueso, sin escamas, estípote delgado y corto durante la tercera semana de cosecha, en tanto que los hongos producidos durante la octava semana presentaron una tonalidad café menos oscura que los primeros (ver **Figura 14**).

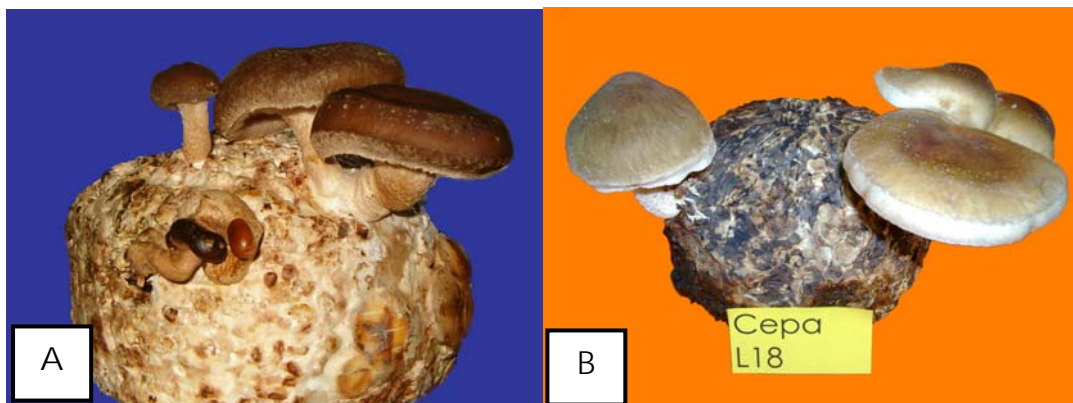


Figura 14. Esporóforos producidos por la cepa L18 durante la 3<sup>a</sup>(A) y 8<sup>a</sup> semana (B) de cosecha.

Los hongos producidos por la cepa L21 al inicio de la cosecha presentaban un color café muy oscuro, sin embargo los producidos en el segundo brote fueron más claros, pero en ambos casos el pileo fue grueso, sin escamas y el estípote delgado y muy corto en algunos casos, a tal grado que éste no era proporcional al sombrero del hongo (**Figura 15**).

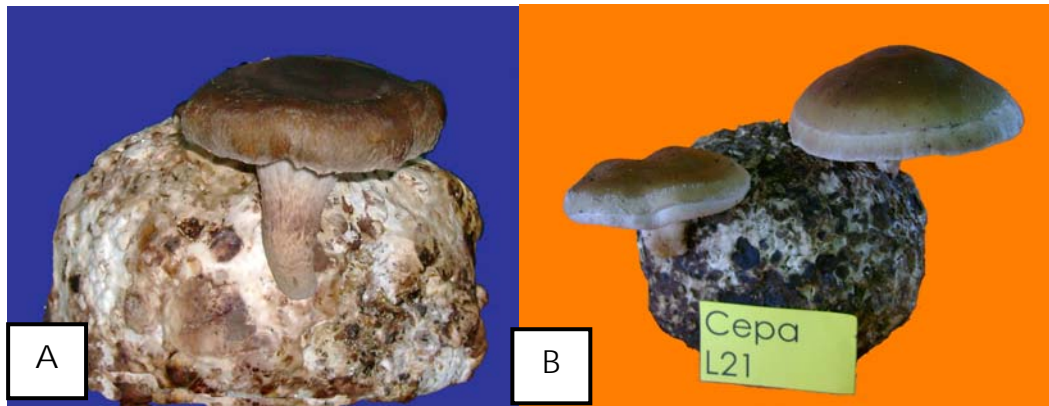


Figura 15. Esporóforos producidos por la cepa L21 durante la 3<sup>a</sup>(A) y 8<sup>a</sup> semana (B) de cosecha.

La cepa reconstituída L10-1S/L10-4S produjo hongos de color café claro, con estípote muy largo y delgado, píleo grueso, convexo y con escamas (**Figura 16**). Al compararlo con la cepa parental L10 destaca tanto el color más claro del píleo como su mayor espesor.



Figura 16. Esporóforos producidos por la cepa L10-1S/L10-4S

Para la cepa L18/L18-2S los primeros esporóforos producidos presentaron estípote grueso y píleo de color café muy oscuro sin embargo, los hongos del 2<sup>o</sup> brote se caracterizaron por un estípote delgado y corto, píleo grueso color café oscuro sin escamas (**Figura 17**).



Figura 17. Esporóforos producidos por la cepa L18/L18-2S en el 1º(A) y 2º brote (B)

En las **Figuras 18, 19, 20 y 21** se presentan imágenes de los hongos producidos por el apareamiento de neohaplontes entre las cepas L10 y L18. En cada figura se muestran dos imágenes de los esporóforos producidos por una misma cepa en 2 brotes (3º y 8º semana).

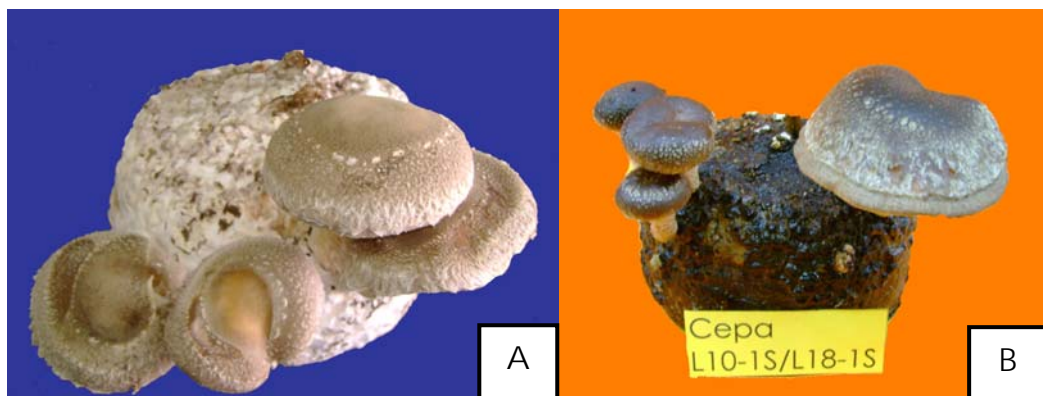


Figura 18. Esporóforos producidos por la cepa L10-1S/L18-1S en el 1º(A) y 2º brote (B)

En general, se observó la presencia de escamas en el borde del píleo de todos los hongos y la diferencia principal entre los esporóforos de una misma cepa producidos el 1º y 2º brote radicó en la tonalidad café del hongo, siendo ésta más intensa en el 2º brote. Estos resultados se atribuyen a las variaciones de temperatura, humedad y ventilación a las cuales estaban sometidas las cepas, ya que aunque se trató de controlar tales factores en el cuarto de fructificación,



irremediablemente éstos se ven influenciados por los factores ambientales externos. De esta manera, los hongos producidos durante el 2º brote presentaban mayor humedad y menor firmeza que los del primer brote, lo cual también pudo verse afectado por el aumento en la humedad del sustrato después de sumergirlo en agua.

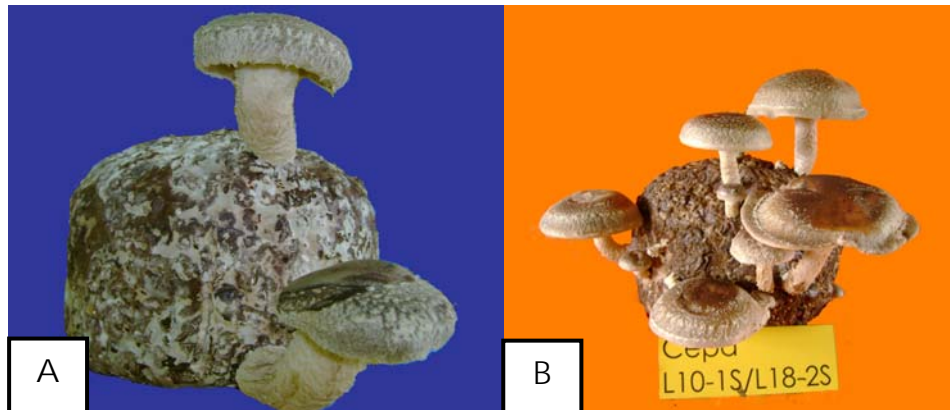


Figura 19. Esporóforos producidos por la cepa L10-1S/L18-2S en el 1º(A) y 2º brote (B)

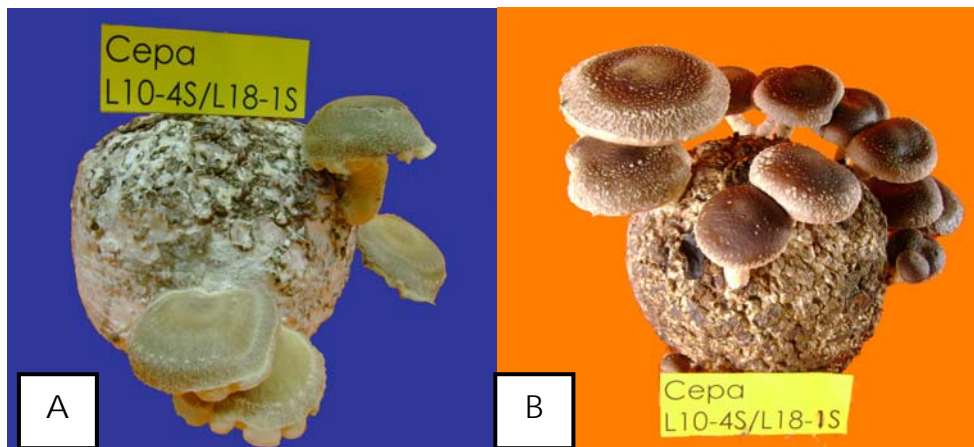


Figura 20. Esporóforos producidos por la cepa L10-4S/L18-1S en el 1º(A) y 2º brote (B)

Los esporóforos de la cepa L10-4S/L18-2S presentaron el pìleo más grueso que el resto de las cepas híbridas entre L10 y L18. Por otra parte, el pìleo de la cepa L10-1S/L18-1S fue el más convexo entre los híbridos, pues estos últimos (L10-1S/L18-2S, L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S) presentaban un sombrero más aplanado pese a que éste no se había abierto por completo.

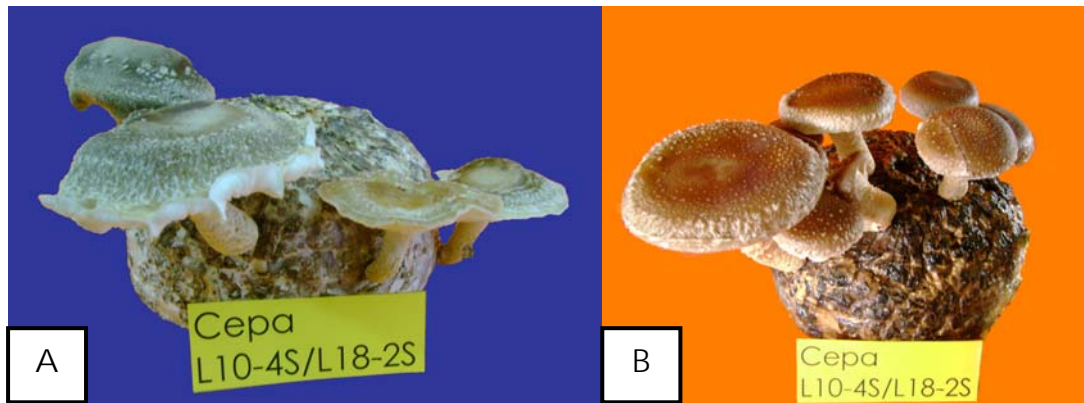


Figura 21. Esporóforos producidos por la cepa L10-4S/L18-2S en el 1º(A) y 2º brote (B)

También se observó que el grosor del estípite de los primeros hongos producidos por las cepas L10-1S/L18-2S y L10-4S/L18-1S fue más grueso que los del 2º brote, lo cual posiblemente se puede atribuir a que los primordios formados durante el periodo de incubación continuaron su diferenciación y maduraron hasta formar los esporóforos desde antes del periodo de inducción. Además los hongos de la cepa L10-1S/L18-1S fueron los que presentaron un estípite más corto en relación al tamaño del sombrero que el resto de los híbridos, característica muy atractiva para los productores.

Al realizar una comparación entre morfología de los híbridos de L10/L18 con respecto a las cepas parentales, se observó que: 1) todos los híbridos presentaban escamas al igual que la cepa L10, 2) el espesor del píleo fue grueso en la cepa L10-4S/L18-2S semejante a los esporóforos de la cepa L18. Sin embargo los otros tres híbridos presentaron píleo delgado semejante a la cepa parental L10 y 3) únicamente el estípite de los hongos de L10-1S/L18-1S fue corto como el de la cepa L18.

En cuanto a los esporóforos procedentes de las cepas híbridas obtenidas por el apareamiento de neohaplontes de las cepas L10 y L21, estos presentaban escamas en la periferia del píleo, el cual era grueso. La morfología de los pocos esporóforos de la cepa L10-1S/L21-2S producidos en el 1º y 2º brote fue totalmente

distinta. En el 2º brote su estípite fue más delgado y firme, y el pileo más convexo y regular (**Figura 22**), la única similitud fue la tonalidad café del sombrero que en ambos casos fue café claro.

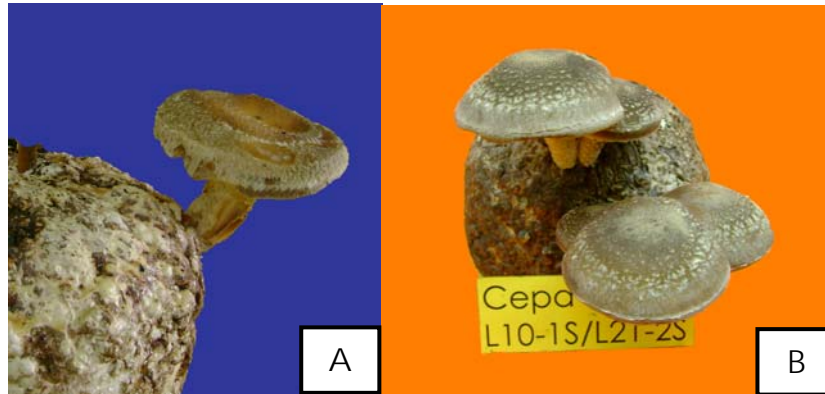


Figura 22. Esporóforos producidos por la cepa L10-1S/L21-2S en el 1º(A) y 2º brote(B)  
La cepa L10-4S/L21-2S produjo hongos con un sombrero menos convexo que los de la cepa L10-1S/L21-2S y en los dos brotes los hongos fueron de color café muy oscuro.

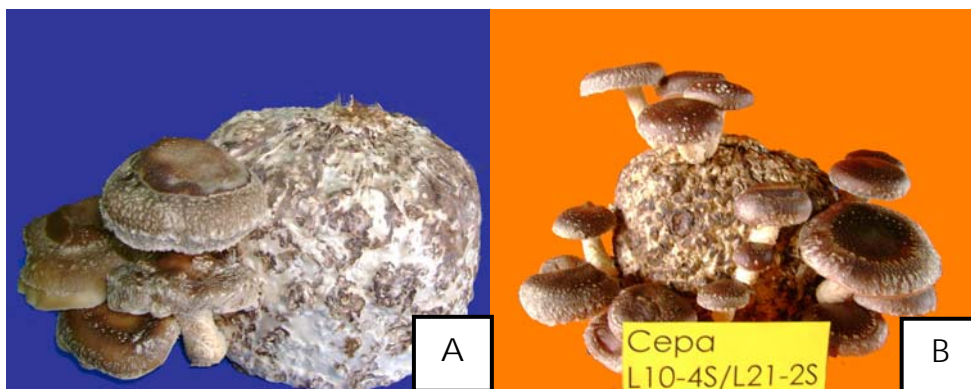


Figura 23. Esporóforos producidos por la cepa L10-4S/L21-2S en el 1º(A) y 2º brote (B)

Comparando las características de los híbridos de las cepas L10 y L21 con respecto a las cepas parentales se observó que: 1) los híbridos presentaron las escamas características de la cepa L10, 2) el espesor del pileo fue grueso y el estípite corto y delgado semejante a la cepa L21 y 3) el color de los esporóforos del híbrido L10-4S/L21-2S fue similar al color café muy oscuro de la cepa L21, en tanto que el color



de los esporóforos de la cepa L10-1S/L21-2S fue diferente al de ambas cepas parentales (Figura 23).

### 7.5.5 Peso unitario de los esporóforos y número de piezas producidas por cepa

El peso unitario de los hongos y el número de piezas que produce una cepa son factores importantes a considerar en la producción y comercialización de hongos comestibles. Por tal motivo se utilizó el peso unitario como criterio de clasificación de los esporóforos en cuatro categorías: chicos, medianos, grandes y muy grandes (Tabla 30).

Tabla 30. Clasificación en función del peso de los hongos producidos por las diferentes cepas de *L. edodes*

Cepas		Porcentaje de hongos producidos			
		Chicos (1-15 g)	Medianos (16-30 g)	Grandes (31-55 g)	Muy grandes (>55 g)
Parentales	L10	0,00	12,50	37,50	50,00
	L18	19,44	47,22	25,00	8,33
	L21	9,09	36,36	27,27	27,27
Híbridas	L10-1S/L18-1S	6,06	36,36	27,27	27,27
	L10-1S/L18-2S	47,37	21,05	21,05	10,53
	L10-1S/L21-2S	25,00	50,00	25,00	0,00
	L10-4S/L18-1S	34,48	34,48	24,14	6,90
	L10-4S/L18-2S	21,28	38,30	29,79	8,51
	L10-4S/L21-2S	38,10	40,48	16,67	4,76
Reconstituidas	L18/L18-2S	36,36	24,24	27,27	12,12
	L10-1S/L10-4S	0,00	27,27	45,45	27,27

 Destaca el tipo mayoritario de hongos  
 Destaca el segundo tipo de hongos predominante

Por otra parte se consideró la cantidad de hongos producidas por cada cepa al finalizar las 8 semanas de cosecha y su peso promedio (Tabla 31).

Tabla 31. Cantidad y peso promedio de los hongos producidos por las diferentes cepas de *L. edodes*

Cepas		Número promedio de hongos acumulados/ bolsa	Peso promedio de los esporóforos (g)
Parentales	L10	3 ± 1	57,56 ± 18,90
	L18	10 ± 2	30,60 ± 23,97
	L21	6 ± 3	40,31 ± 25,91
Híbridas	L10-1S/L18-1S	6 ± 1	28,56 ± 32,87
	L10-1S/L18-2S	6 ± 3	21,25 ± 14,57
	L10-1S/L21-2S	3 ± 2	28,18 ± 16,39
	L10-4S/L18-1S	17 ± 4	22,91 ± 14,40
	L10-4S/L18-2S	9 ± 4	22,26 ± 18,62
	L10-4S/L21-2S	21 ± 4	52,21 ± 30,97
Reconstituidas	L18/L18-2S	7 ± 3	30,25 ± 23,27
	L10-1S/L10-4S	3 ± 2	42,54 ± 24,54

Para las cepas parentales L18 y L21 predominaron los hongos de tamaño mediano, mientras que la cepa L10 produjo principalmente hongos grandes y muy grandes (**Tabla 30**). Sin embargo, el número de hongos producidos por la cepa L10 fue bajo (3 piezas) en comparación con la cepa L18 que produjo una mayor cantidad de hongos por bolsa (10 piezas) (**Tabla 31**).

La cepa reconstituída L10-1S/L10-4S se comportó de manera semejante a la cepa parental L10 en la cantidad de esporóforos producidos (3 piezas) y en esta cepa predominaron los hongos de tamaño grande y al igual que la cepa L10 no produjo hongos chicos. Para la cepa L18/L18-2S el tipo predominante fue chico y no mediano como la cepa L18 y la cantidad de hongos cosechados fue menor (7 hongos).

En el caso de las cepas híbridas, aquellas que produjeron un mayor número de hongos fueron las cepas L10-4S/L18-1S y L10-4S/L21-2S, con una producción de 17 y 21 hongos respectivamente. La cepa L10-4S/L18-1S produjo chicos, medianos y

grandes mientras que para la cepa L10-4S/L21-2S predominaron los hongos chicos y medianos. Para el resto de las cepas híbridas (L10-1S/L18-1S, L10-4S/L18-2S y L10-1S/L21-2S) se observó que en general producen hongos de tamaño mediano (excepto L10-1S/L18-2S que principalmente produce hongos chicos). Además se observó que las cepas híbridas que poseen el componente monocariótico L10-1S de la cepa parental L10 producen menor cantidad de hongos (3 a 6) que aquellas cepas híbridas que poseen el componente monocariótico L10-4S de la misma (9 a 21 hongos).

### **7.5.6. Determinación de los rendimientos en la etapa de producción**

El parámetro más usado para reportar la producción de los hongos es la Eficiencia Biológica (EB), la cual expresa los gramos de hongos frescos por 100 gramos de sustrato seco. La EB acumulada se obtiene mediante la suma de los valores de la EB obtenida en cada semana del periodo de cosecha y permite determinar el rendimiento obtenido al final de la cosecha.

Con el propósito de observar si las EB totales de las diferentes cepas presentaron diferencias significativas entre ellas se realizó un análisis de varianza usando un diseño aleatorio en el que la variable independiente fue cepas y otro más usando un diseño por bloques cuyas variables independientes fueron cepas y número de réplicas (6 réplicas). De acuerdo al análisis estadístico se obtuvieron diferencias altamente significativas en la EB acumulada de las diferentes cepas, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Rango Múltiple de Duncan para identificar las cepas más productivas. La EB acumulada promedio de las diferentes cepas así como los resultados obtenidos de la Prueba de Rango Múltiple de Duncan se presentan en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Eficiencia biológica acumulada promedio de las diferentes cepas y clasificación de acuerdo a la Prueba de Rango Múltiple de Duncan

Cepas	EB acumulada promedio (g de hongo fresco/ 100 g de sustrato en base seca)	Clasificación por Duncan*
L10-1S/L21-2S	4,48±2,62	a
L10-1S/L18-2S	14,53±1,56	b
L10	15,6±12,79	b
L10-1S/L10-4S	20,36±0,52	c
L21	30,91±1,42	d
L10-1S/L18-1S	34,35±3,88	d
L18/L18-2S	36,11±1,88	e
L18	46,57±13,40	f
L10-4S/L18-1S	52,47±3,73	f
L10-4S/L18-2S	42,53±4,97	f
L10-4S/L21-2S	64,84±10,08	g

\*Letras diferentes indican diferencias altamente significativas en los valores de EB (Prueba de rango múltiple de Duncan  $p=0.05$ )

De acuerdo al análisis estadístico realizado, la cepa más productiva fue la cepa híbrida L10-4S/L21-2S con un rendimiento promedio de 64.84%, superando así a las dos cepas parentales (L10 y L21).

La cepa reconstituída L10-1S/L10-4S fue más productiva que la cepa original (L10), en contraste con la cepa L18/L18-2S (proveniente de una cruce dicarión-monocarión) que fue menos productiva que la parental L18.

Todas las cepas híbridas (exceptuando la cepa L10-1S/L21-2S que presentó los rendimientos más bajos) superaron los rendimientos de la cepa parental L10 lo cual nos indica que como parte del mejoramiento genético se logra incrementar los rendimientos. Por otra parte, para las cepas híbridas donde están involucrados neohaplontes de la cepa L18, se observa que 2 de los híbridos (L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S) produjeron rendimientos estadísticamente iguales a los de la cepa parental L18, que correspondió a la cepa parental más productiva.

### **7.6. Discusión general**

Fueron cuatro los efectos observados como producto de la inoculación de las cepas en SD y en MSD:

- Disminución en el desarrollo micelial de las cepas en comparación al observado en EM.
- Modificación de la morfología micelial (cepa L5)
- Obtención de neohaplontes (Cepas: L10, L6, L21 y L18)
- Alteración de la capacidad de apareamiento (neohaplonte L21-3S)

Para explicar los efectos observados hay que considerar la composición química de la SD la cual está compuesta por glucosa y peptona de carne, la peptona es un hidrolizado de proteína que además de representar una fuente de nitrógeno aporta algunas vitaminas y sales inorgánicas como fosfatos y suministran también algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu (Schmidt, 2006). Sin embargo, el tratamiento térmico que recibe la SD durante su preparación favorece la reacción de Maillard produciéndose diferentes compuestos. El efecto inhibitorio de la SD podría deberse a la presencia de compuestos que provoquen un daño de diferente magnitud como pudo observarse en los diferentes experimentos de descicariotización. Por otra parte el efecto tóxico de la SD podría ser ocasionado por la falta de disponibilidad de la fuente de N, debido a la reacción entre los péptidos y la glucosa (reacción de Maillard) y considerando que el nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular, la falta de disponibilidad del nitrógeno puede ser responsable del limitado crecimiento micelial en la SD debido a que la célula no es capaz de realizar la síntesis metabólica normal y por ello se producen los efectos observados.



La reducción del tiempo de homogenización en comparación con trabajos previos de desdicarización, en los cuales se empleaban hasta 120 segundos de homogeneización, permitió aumentar la recuperación de neohaplontes (Arteaga, *et al.*, 1996), pues dicha reducción produjo una mayor cantidad de fragmentos viables.

El hecho de que el tiempo de homogeneización que favorece la recuperación de neohaplontes sea distinto para cada cepa (**Tabla 23**) implica que cada cepa responde en forma diferente al daño mecánico y a los efectos de la solución desdicarizadora para permitir la recuperación de neohaplontes.

La alteración en la capacidad de apareamiento del neohaplonte L21-3S podría estar relacionada con el método de obtención del mismo, pues para su aislamiento fue necesario someter a la cepa original al proceso de desdicarización química, a pesar de que el mecanismo de acción de dicho proceso no se conoce con certeza, entre sus efectos se ha observado pérdida de la información genética, pues los esporóforos producidos por las cepas reconstituídas a partir de neohaplontes han presentado la morfología del hongo comestible *Pleurotus* spp. en trabajos previos (Andrade, 2007). En el caso del presente trabajo es posible que la capacidad de apareamiento del neohaplonte se haya visto afectada, impidiéndole la formación de micelio dicariótico al entrecruzarlo con otros neohaplontes o su dicarización mediante cruces dicarización-monocarización.

En este trabajo se observó una relación entre el desarrollo micelial de las cepas en la etapa de incubación y los rendimientos obtenidos durante el periodo de cosecha. Por una parte se observó que las cepas que requirieron más tiempo para la formación de primordios (L10, L10-1S/L10-4S y L10-1S/L18-1S), a su vez presentaron

la menor cantidad de estos y un bajo o nulo grado de pardeamiento al final del periodo de incubación. Así mismo, tales cepas fueron las que presentaron los rendimientos más bajos. En el caso de las cepas que invadieron rápidamente el sustrato y cubrieron más del 80% del sustrato con primordios (L18, L10-4S/L18-2S, L10-1S/L18-2S y L10-4S/L21-2S), el grado de pardeamiento fue de alrededor de 20-40% y a su vez fueron las cepas más productivas. De acuerdo a Chang (2000) aunque los primordios formados durante el periodo de incubación sobre la superficie del sustrato tienen potencial para convertirse en cuerpos fructíferos, la mayoría no lo logra. Sin embargo, su aparición provoca la formación de espacios de aire entre la capa de micelio que cubre al sustrato y la bolsa de plástico, lo que incrementa la circulación de aire y con ello el pardeamiento del sustrato. La humedad del sustrato es un factor que también influye sobre el pardeamiento del sustrato, ya que de ser baja la humedad (menor a 60 %) el pardeamiento se dificulta. Si el pardeamiento transcurre adecuadamente, el bloque de sustrato fructifica normalmente produciendo hongos de buena calidad y con altos rendimientos. Por otro lado, si el pardeamiento no es bueno, la cepa requiere periodos más largos de inducción para fructificar y tanto la cantidad, como calidad de los hongos es menor (Li, 2005).

Son varios los estudios referentes al cultivo de *L. edodes* que concuerdan en que la disminución de la temperatura a alrededor de 14-22°C, el mantenimiento de humedad relativa de 65-70% y la necesidad de iluminación, son factores necesarios para la reproducción y maduración de los cuerpos fructíferos (Fung *et al.*, 2005; Li, 2005; Ramírez & Leal., 2002). Así mismo, algunos estudios plantean como parte del proceso de producción de hongos, la necesidad de sumergir los bloques de sustrato en agua fría (alrededor de 10°C) al final del pardeamiento

para estimular la producción de hongos. Esto debido a que durante el pardeamiento los bloques de sustrato pierden agua por la evaporación y la respiración micelial. Para recuperar esta pérdida de agua los bloques de sustrato se sumergen en agua durante 24 horas o más, dependiendo de la velocidad de rehidratación del sustrato (Royse *et al.*, 2002; Li, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo durante el periodo de cosecha relativos al comportamiento de las cepas frente a las condiciones ambientales impuestas permitieron confirmar que sumergir los bloques de sustrato en agua fría resulta una técnica eficaz para inducir la formación de esporóforos, ya que las condiciones ambientales que se habían provisto fueron insuficientes para permitir la fructificación de la totalidad de las réplicas de las diferentes cepas después de 6 semanas. En contraste, después de sumergir los bloques de sustrato la producción de hongos fue inmediata (durante la 7<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> semana) permitiendo así mejorar los rendimiento de las cepas.

Los seres vivos son el resultado de la acción conjunta de genes y medio ambiente. Así las características observadas en los nuevos dicariotes son el producto tanto del genotipo presente en los neohaplontes involucrados en su obtención como del ambiente en el cual se desarrollaron. Sin embargo, las diferencias fenotípicas de los híbridos con respecto a los dicariotes parentales, son resultado, en mayor medida, de las diferencias genotípicas entre cepas y en menor medida del ambiente. Esto último debido a que las cepas se desarrollaron en el mismo sustrato y bajo condiciones ambientales similares (aunque en el cuarto de fructificación pudieron detectarse diferencias ambientales entre zonas) pero el ambiente no deja de tener una influencia importante.

El fenotipo describe todos los aspectos de la morfología, fisiología y relaciones ecológicas de un organismo y puede cambiar dependiendo de la sucesión de

ambientes que experimente el organismo. De esta manera un genotipo particular puede producir muchos fenotipos distintos (Suzuki *et al.*, 1994). Esto permite a su vez explicar la variabilidad observada principalmente en la tonalidad café de los esporóforos de una misma cepa cosechados en distintas semanas y que se atribuyó a los cambios de humedad relativa.

Las diferencias morfológicas y de producción entre el dicariote reconstituido L10-1S/L10-4 y L18/L18-2S con respecto a los dicariotes parentales evidencian que además de los efectos tóxicos de la SD mencionados anteriormente, también se modifica el aporte genético original de los componentes monocarióticos del dicariote. Así mismo, las diferencias morfológicas detectadas entre las cepas L10-1S/L18-1S y L10-1S/L18-2S y los dicariotes L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S muestran que a pesar de que los neohaplontes L18-1S y L18-2S presentaron el mismo tipo de compatibilidad, estos mantuvieron genotipos distintos al haber sido aislados bajo condiciones distintas. Aunque los rendimientos de las cepas L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S fueron iguales estadísticamente y el tamaño predominante de hongos fue mediano en ambos casos, tanto la cantidad de hongos producidos como la morfología de los esporóforos no lo fueron y esto nos permite suponer que se trata de cepas distintas.

Las características observadas en los híbridos resultaron ser una combinación del genotipo de los neohaplontes involucrados, incluso fue posible identificar algunas características impuestas por alguno de los neohaplontes, como la expresión de escamas características de L10 en todos los híbridos o el espesor del píleo característico de las cepas L18 y L21.

Las características de producción de una cepa son parte del fenotipo presente, por ello a pesar de que su genotipo sea el producto de genotipos que exhibían determinadas características de producción en cierto ambiente, no necesariamente se exhibirá el fenotipo que exhibían los progenitores. Por tal motivo pese a que la cepa L18 resultó ser la cepa parental más productiva y capaz de producir la mayor cantidad de hongos, los híbridos derivados de esta no fueron los mejores. Por el contrario, el híbrido L10-4S/L21-2S aislado a partir del entrecruzamiento de los neohaplontes de las cepas L10 y L21 cuyas características (EB y cantidad de hongos producidos) no superaban a la cepa L18 resultó ser el más productivo.

Finalmente hay que resaltar que en este trabajo los híbridos de *L. edodes* obtenidos por entrecruzamiento de neohaplontes conservaron la morfología que caracteriza a dicho hongo comestible, lo que no se observó en trabajos previos (Andrade, 2007). Además fue posible la obtención de un dicariote (L10-4S/L21-2S) que superó en productividad a las cepas parentales involucradas en su obtención. También se obtuvieron tres dicariotes que igualaron a una de las cepas parentales (L10-4S/L18-1S y L10-4S/L18-2S fueron semejantes a la cepa L18, en tanto que L10-1S/L18-2S fue semejante a la cepa L10). Finalmente cuatro dicariotes híbridos superaron a la cepa parental L10 (L10-1S/L18-1S, L10-4S/L18-1S, L10-4S/L18-2S y L10-4S/L21-2S). Estos resultados en conjunto sugieren que se logró realizar una óptima combinación de genes que controlan las características de importancia comercial y con ello un mejoramiento genético en las cepas de *Lentinula edodes*.

## 8. CONCLUSIONES

- La solución desdicarionizadora permitió obtener neohaplontes de las cepas dicarióticas L10, L18 y L21 de *Lentinula edodes*.
- Los efectos que puede provocar a las cepas la solución desdicarionizadora además de la desdicarionización son: alteración de la morfología micelial, disminución del crecimiento micelial y alteración de la capacidad de apareamiento de los neohaplontes.
- Se logró la obtención de los dos componentes monocarióticos de la cepa L10, para las cepas L18 y L21 sólo fue posible la obtención de un componente monocariótico.
- Los neohaplontes L18-1S, L18-2S y L21-2S presentaron el mismo tipo de compatibilidad A3B3.
- Se obtuvieron 6 nuevas cepas dicarióticas, 1 dicariote reconstituido y 1 cepa dicariótica mediante cruces di-mono.
- El desarrollo de primordios y el pardeamiento del sustrato durante el periodo de incubación son factores importantes que repercuten positivamente sobre las características de producción de una cepa.
- Los factores ambientales bajo los que se desarrolla una cepa (iluminación, humedad, aireación, composición del medio de desarrollo, etc) afectan sus características fenotípicas.
- Las características morfológicas predominantes de los híbridos fueron: presencia de escamas en los bordes del píleo con marcadas diferencias entre cepas en espesor, tamaño del estípite y la tonalidad café del píleo.
- La cepa L10-4S/L21-2S resultó ser una cepa híbrida fenotípicamente superior a las cepas parentales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C., C. Mims. 1987. **Introducción a la micología**. Ediciones Omega, 2ªed. España, Barcelona, págs. 678-682; 765-773.
- Andrade, V. 2007. Caracterización de cepas con grandes esporóforos de *Lentinula edodes* (Shiitake). **Tesis de licenciatura**, UNAM. México, D.F., págs. 59-75.
- Arteaga, E., K. De Lachica, R. Ramírez, H. Leal. 1996. Desdicariorización excéntrica de *Lentinus spp*. **Rev. Mex. Mic. 12**: 15-21.
- Bernabé, T., G. Mata, M. Cayetano & G. Gutierrez. 2006. Cultivo experimental del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México. **Rev. Mex. Mic. 23**: 63-68.
- Caglarýrmak, N. 2007. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. **Food Chemistry 105**: 1188–1194
- Chang, S.T. 2000. **Edible Mushroom and their cultivation**. CRC Press. 1ªed. United States, págs. 100; 205-215.
- Chang, S.T. 2002. Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products**. Sánchez *et al.*, (eds), UAEM, 1-8.
- Deacon, J. 1988. **Introducción a la micología moderna**. Ed. Limusa. 1ªed. México, D.F., págs. 11-13.
- 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* (shiitake). In: **Fifth Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Acta Edulis Fungi. Vol.12**. Tal *et al.*, (eds), Shangai Xinhua Printing Co., Ltd, 285-289.

- Furlani, R. P. Z. & H.T. Godoy. 2007. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushroom. **Food chem.**; Article in press. Disponible en línea: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Consultado: 26/08/07.
- Gaitán, R., 2000. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. **Rev. Iberoam. Micol**; **17**: 20-24.
- García, M. 1998. **Cultivo de setas y trufas**. Ediciones Mundi. 3ªed. España, Barcelona, págs. 17-22; 167-170.
- Good, C.S., A. Smania, R. Curi & S. Salvador. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **J. Food Eng.**, **80**: 631-638.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmenes, C. Soto & L. Guzmán. **El cultivo de los hongos comestibles**. IPN. 1ªed. México, D.F, pág. 5-25, 2002.
- Kalberer, P.P. 2000. Influence of urea and ammonium chloride on crop yield and fruit body size of shiitake (*Lentinula edodes*). **Mushroom Science.**, **15**: 361-366.
- Kilpatrick, M., D.J. Murray, F. Ward. 2000. Influence of substrate formulation and autoclave treatment on *Lentinula edodes* production. **Mushroom Science.**, **15**: 803-809.
- Lau, O.W., K.K. Shiu & S.T. Chang. 1985. Determination of ascorbic acid in vegetables and fruits by differential pulse polarography, **J. Sci. Food agric.**, **36**: 733.
- Leal, H. & Eger, H. 1980. A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rootting Basidiomycetes. **Theor. And Appl.Genetics.****61**:65-68.
- Li, Y. 2005. High yield cultivation techniques for year-round production of *Lentinula edodes* in solar greenhouse. **In: Fifth Conference on Mushroom**



- Biology and Mushroom Products. Acta Edulis Fungi. Vol.12.** Tal *et al.*, (eds), Shangai Xinhua Printing Co., Ltd, 299-305.
- Martínez, D. 1988. Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala. **Rev. Mex. Mic.4:** 281-286.
  - Medina, R. Chile, 2008. Artículos: Hongos medicinales. Disponible en línea: [www.micotec.cl](http://www.micotec.cl). Consultado: 13/06/08.
  - Mireles, C., E. López. 2005. Evaluación del hongo comestible *Lentinula edodes* (shiitake) en sustratos de aserrín con suplementos. **Tesis de licenciatura**, UNAM. México, D.F. pág. 15-16.
  - Miles, P.G. & J. R. Raper. 1956. Recovery of the component strains from dicaryotic mycelia. **Mycología 48:** 484-494.
  - Nishibori, K & K. Kinugawa. 1978. Eccentric recovery of parental monocaryons in the chemical dedicaryotization of *Lentinula edodes*. **Mushroom Science 10:** 201-210
  - Ramírez, R. & H. Leal. 2002. Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. **In: Mushroom Biology and Mushroom Products.** Sánchez *et al.*, (eds), UAEM, 289-293.
  - Royse, D.J., T.W. Rhodes & J.E. Sánchez. 2002. Vacuum soaking of wood chip shiitake *Lentinula edodes* logs to reduce soak time and stimulate mushroom yield. **In: Mushroom Biology and Mushroom Products.** Sánchez *et al.*, (eds), UAEM, 295-301.
  - Salmones, D., L. Mestizo & R. Gaitán. 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. **Rev. Mex. Mic. 18:** 21-26.
  - Schmidt, O. 2006. **Wood and tree fungi. Biology, damage, protection and use.** Ed. Springer, 1ªed, Alemania, pág. 4-22; 65-75; 239-243.

- Silva, E.M., A. Machuca & M. Milagres. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry** 40: 161–164.
- Sonnenberg, A.S.M, J.P. Baars, P.M. Hendrickx & R.W. Kerrigan. 2005. Breeding Mushroom: State of the Art. In: **Fifth Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Acta Edulis Fungi. Vol.12.** Tal *et al.*, (eds), Shangai Xinhua Printing Co., Ltd, 163-173.
- Statements, P. & J.S. Chilton. 1983. **The mushroom cultivator: A practical guide to growing mushroom at home.** Agarikon Press. United States, Washington. , págs. 4-9.
- Susuki, D.T, A.J.F. Griffiths, J.H. Miller, R. Lewontin. 1994. **Introducción al análisis genético.** Ed. Interamericana Mc Graw Hill, 4ªed, España, Madrid, págs. 3; 7-12.
- Tokimoto, T. , Kawasumi, T. Kiuchi, Y., Futatsugi,K. 1978. Monokaryotization studies in the Basidiomycetes. Chemical induction. **Rep. Tottori Myc. Inst.(Japan)4:** 35-38.
- Wainwright, M. 1992. **Introducción a la biotecnología de los hongos.** Ed. Acribia, 1ªed, España, Zaragoza, págs.10-11.
- Wasser, S.P. & M. Didukh. 2005. Culinary-Medicinal higher Basidiomycete mushroom as a prominent source of dietary supplements and drugs for the 21<sup>st</sup> century. In: **Fifth Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Acta Edulis Fungi Vol.12.** Tal *et al.*, (eds), Shangai Xinhua Printing Co., Ltd, 21-29