

I. RESUMEN

Pleurotus djamor (Fr.) Boedijn es una especie gregaria o cespitosa que crece sobre troncos y ramas de una gran diversidad de árboles y plantas de bosques tropicales y subtropicales. Esta especie, de distribución pantropical, es utilizada como comestible en Guatemala y se ha reportado como tal en la Ciudad de Guatemala y Mixco; Sansare (El Progreso) y Jacaltenango (Huehuetenango), donde se conoce con los nombres de “hongo de izote”, “hongo blanco” y “Sajchiyo” (idioma Popti’).

En Guatemala, los estudios sobre *Pleurotus* se han enfocado a determinar especies, características fenotípicas de varias cepas nativas, evaluación de la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos lignocelulósicos, así como su cultivo a nivel artesanal, principalmente de *P. ostreatus* y *P. levis*. Sin embargo, el cultivo de *P. djamor*, aún no está difundido porque se ha trabajado poco a nivel artesanal. Adicionalmente, son casi inexistentes los estudios sobre mejoramiento genético de cepas guatemaltecas.

Teniendo en cuenta estos factores, la finalidad del presente trabajo fue el de obtener dicariones por entrecruzamiento de micelio monospórico de cepas nativas de *Pleurotus*, evaluando su productividad, de modo que se pudieran seleccionar cepas de rápido desarrollo micelial y alta producción de cuerpos fructíferos.

Para el efecto se aislaron monocariones a partir de dos cepas parentales de *Pleurotus djamor* var. *djamor*: 15 de la cepa 70.2003 (monocariones JH) procedente de Jacaltenango, Huehuetenango y 12 de la cepa 01.2006 (monocariones SS), procedente de San Andrés Semetabaj, Sololá. El mayor crecimiento micelial lo obtuvieron los monocariones JH₃ (71.8 mm) y SS₁₁ (77.3 mm).

Los tipos de incompatibilidad presentes en los monocariones JH fueron I, II, III y no se encontró el tipo IV, mientras que en los monocariones SS únicamente se presentaron los tipos de incompatibilidad II, III y no se encontraron los tipos I y IV.

Basándose en el tipo de incompatibilidad y velocidad de crecimiento miceliar, fueron elegidos 2 monocariones por cepa para realizar las cruzas interespecíficas. Del grupo JH se tomaron los monocariones 2 y 13 y del grupo SS los monocariones 9 y 12. No se usaron los monocariones con los mayores valores de crecimiento miceliar (JH₃ y SS₁₁), debido a que en el caso del primero, no existió el tipo de incompatibilidad respectivo en los monocariones SS. En el caso de la segunda, la cepa se contaminó y no fue posible descontaminarla.

Producto de las cruzas interespecíficas, se obtuvieron cuatro cepas dicarióticas (dicariones DJS), los cuales superaron en crecimiento miceliar a las cepas parentales. Sin embargo, en cuanto a la productividad, el dicarion DJS₃ fue el único que superó a las cepas parentales en cuanto a eficiencia biológica, aunque no existió diferencia significativa entre dicariones y parentales ($p > 0.05$).

Se considera que el dicarion DJS₃ es una cepa promisorio para su cultivo a nivel artesanal, dada sus características de crecimiento miceliar y eficiencia biológica.

II. INTRODUCCIÓN

Guatemala posee una diversidad de hongos sumamente interesante y rica, desde los microscópicos hasta los macromicetos, tanto saprobios de zonas tropicales húmedas, como basidiomicetos micorrícicos asociados a coníferas de las cumbres más altas de la Sierra de los Cuchumatanes (1). Dentro de esta diversidad, se encuentran los hongos comestibles, que han sido utilizados por el hombre desde tiempos inmemorables y que poseen un gran valor alimenticio, ecológico y comercial, encontrándose en este grupo varias especies de *Pleurotus*.

Pleurotus djamor (Fr.) Boedijn (también conocido como *P. flabellatus*), es una especie gregaria o cespitosa que crece sobre troncos y ramas de una gran diversidad de árboles y plantas de bosques tropicales y subtropicales. Esta especie, de distribución pantropical, es utilizada como comestible en varias regiones de México (2). En Guatemala, se ha reportado su comestibilidad en la Ciudad de Guatemala y Mixco (Guatemala), Sansare (El Progreso) y Jacaltenango (Huehuetenango), donde se conoce con los nombres de hongo de izote, hongo blanco y Sajchiyo (idioma Popti') (1).

En Guatemala los estudios sobre *Pleurotus*, se han enfocado a determinar su taxonomía y a evaluar la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos lignocelulósicos, las características fenotípicas de varias cepas nativas así como su cultivo a nivel artesanal, principalmente de *P. ostreatus* y *P. levis* (3- 6). En cuanto a *P. djamor*, su cultivo aún no está difundido ya que se ha cultivado poco a nivel artesanal y por la consistencia ligeramente coriácea de los cuerpos fructíferos. Además, se sabe poco de estudios sobre mejoramiento genético de tales cepas (1).

Teniendo en cuenta estos factores, la finalidad del presente trabajo fue el de obtener dicariones por entrecruzamiento de micelio monospórico de cepas nativas de *P. djamor*, evaluando su productividad, de modo que se puedan seleccionar cepas de rápido desarrollo miceliar y alta producción de cuerpos fructíferos con características aceptables para comercialización y aceptación por parte de los consumidores.

III. ANTECEDENTES

A. Los hongos

Los hongos forman un grupo taxonómico independiente de los vegetales y los animales, al cual se le denomina Reino Fungi. Los organismos que lo conforman son heterótrofos, inmóviles, poseen talos unicelulares o filamentosos rodeados por paredes celulares y se reproducen por esporas sexuales y asexuales. De acuerdo con el tamaño de las fructificaciones que producen, se pueden clasificar en macrohongos y microhongos, según sean macroscópicos o microscópicos, respectivamente, e incluso existen microhongos que no producen fructificaciones (7, 8).

Actualmente, los micólogos han tenido un progreso sin precedente al elaborar una clasificación filogenética de los hongos, basada en análisis de ADN, la cual evidenció que son organismos polifiléticos con morfologías convergentes, pero que derivaron independientemente de varios linajes eucarióticos. Así, se clasifican en cuatro phyla: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (7, 9-11).

El número de hongos en el mundo suponen 1.5 millones de especies, de manera que si este estimado es correcto, se han descrito menos del 5% de las especies (12,13). Esto se debe a que aún se tiene información incompleta de muchas especies, y que los hongos y los grupos parecidos a los hongos (mohos acuáticos, Reino Straminipila, mohos limosos y relacionados, Reino Protista) comprenden una asombrosa variedad de taxa, estrategias de vida y morfología (14).

Los hongos se cuentan entre los más importantes en el mundo, no sólo por el papel vital en la función de los ecosistemas, sino que además son esenciales e incluso cruciales en actividades como la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo del ambiente. Algunas especies son patógenas importantes de plantas y animales, mientras que otras forman simbiosis obligadas con algunas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales (14).

Muchos hongos también tienen una gran importancia económica, aquellos que se han domesticado se utilizan en la elaboración de cerveza, en cocina, fermentación industrial, biotecnología y algunas otras especies se cultivan o se recolectan para ser utilizadas como alimento (8).

Por esta diversidad son considerados como el segundo grupo más grande de organismos en la biosfera, después de los artrópodos. El número total de especies ha sido estimado alrededor de 1, 500,000 en el mundo, pero solamente el 5% de estas especies ha sido descrito y reportado. De los 300,000 taxones descritos, cerca de 10,000 especies son macrohongos. De éstas, alrededor de 2,000 especies (en más de 30 géneros) son consideradas como comestibles. Sólo 40 especies son cultivadas y alrededor de 20 de éstas, son cultivadas comercialmente (15).

B. Cultivo de hongos comestibles

Se refiere como tal al conocimiento y dominio total del ciclo de vida del hongo en el desarrollo de su micelio vegetativo y en la aparición de los cuerpos fructíferos en cantidades que superan ampliamente al producto que se puede recolectar en forma espontánea (16).

Los hongos comestibles son conocidos desde la antigüedad, considerándose a los chinos los primeros cultivadores y a los griegos y romanos como grandes consumidores. Existen dos fechas importantes en la historia del cultivo de hongos: durante el siglo XVIII, que comienza a cultivarse en Francia el “champignon de París” (*Agaricus bisporus*), mientras que en Asia se desarrolla el cultivo de especies como *Lentinula edodes* y *Auricularia* spp. (17) y luego en 1956, se publican algunos resultados de investigadores húngaros sobre el cultivo *Pleurotus ostreatus* (16).

Esta tecnología llegó al Nuevo Mundo hacia finales del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX de una manera muy discreta. No fue hasta la segunda mitad de este siglo, que esta industria se hizo presente de una manera importante en varios países de

América. A partir de los años setenta, con el impulso económico de desarrollar fuentes no convencionales de alimentos y de optimizar los recursos disponibles, y al aprovechamiento de técnicas para el cultivo comercial de especies fúngicas, creció el interés por cultivar este tipo de hongos (18).

Es entonces cuando el cultivo de hongos surge como alternativa alimenticia gracias a su fácil manejo y habilidad para crecer sobre residuos de carácter lignocelulósicos, como lo son muchos desechos agrícolas (18). Tal interés encontró un eco importante con el florecimiento a nivel mundial de una cultura ecológica, ávida de tecnologías “ambientalmente seguras” y al avance de la agricultura orgánica. Ante esta situación, poco a poco se ha ido conformando una conciencia naturalista mundial en la cual el cultivo de hongos encaja perfectamente (17).

El consumo y cultivo de hongos comestibles ha aumentado en todo el mundo. En pocos años ha pasado a ser de una actividad artesanal - con muchísimas improvisaciones - a una agroindustria altamente tecnificada y rentable (16). Se ha incrementado más de 14 veces en 30 años: desde 350 mil toneladas en 1965 hasta cerca de 4, 909,000 toneladas en 1994. Además se observó un considerable cambio en los géneros cultivados, ya que en 1979 la producción del champiñón común, *A. bisporus*, que representaba más del 70% de la oferta mundial, bajó en 1994 al 38% por aumento de otras especies (17). En la actualidad la producción de hongos comestibles cultivados se lleva a cabo en más de 80 países, repartidos en la mayoría de zonas climáticas del mundo. Las diferentes especies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. colombinus*, *P. cornucopiae*) se encuentran en la segunda posición entre los hongos comestibles más cultivados, con el 24% de la producción mundial (15).

Los hongos comestibles son de gran importancia alimenticia para los humanos, ya que además de su aroma y sabor, tienen una gran calidad nutricional (16). Análisis de la composición de los hongos comúnmente cultivados revelan que los hongos comestibles son ricos en proteínas y carbohidratos crudos, son moderados en fibra y cenizas y con bajo contenido de grasa. También son una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y

minerales, particularmente el fósforo y potasio. Contienen una cantidad substancial de tiamina, riboflavina, niacina y provitamina D₂. En 100 g de proteína cruda hay de 32 – 48 g de los nueve aminoácidos esenciales. De éstos, la lisina es la más abundante, mientras que el triptófano y metionina son los más bajos (19).

C. El cultivo de *Pleurotus* spp.

La producción comercial de *Pleurotus* spp. es una actividad relativamente reciente. Falck (1917) fue el primero en reportar el cultivo de este hongo en troncos en Europa. Más tarde, Etter (1929) produjo cuerpos fructíferos en cultivo. Block, Tsao y Han (1958, 1959) fueron los primeros en escribir un reporte detallado sobre el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en Estados Unidos, mientras que la primera explotación comercial de este hongo fue establecida en Europa, hasta la mitad de los años setenta. En 1994, la República Popular de China (el mayor productor de hongos comestibles) produjo 654,000 toneladas de *Pleurotus* spp., lo que representó el 82% del total mundial (17), pero en el 2002 produjo 2,594,000 toneladas, colocando a *Pleurotus* como el hongo comestible de mayor producción en esa región (19).

Los estudios y cultivo de *Pleurotus* se iniciaron en los países de América utilizando cepas extranjeras, pero fue en años recientes que se ha detectado que esta especie está ampliamente distribuida en el Continente por lo que se han desarrollado proyectos sobre el cultivo de cepas nativas en diferentes sustratos (18).

Una de las razones del incremento en la popularidad de las especies de *Pleurotus* es la habilidad de este hongo para crecer en gran variedad de materias primas agrícolas. En el trópico, el hongo ostra o setas como también se le llaman en México, puede ser producido sobre una mezcla de aserrín y salvado de arroz; salvado y rastrojo de arroz, aserrín y hojas de guaje (*Leucaena* spp.) así como sobre combinaciones de materiales tropicales como olote de maíz, cáscara de semilla y ramas de algodón, bagazo y hojas de caña, tallos y hojas de maíz, pastos, cáscara de arroz, lirio acuático, entre otros (17). La capacidad de invadir diferentes sustratos se debe en gran medida a la producción de las enzimas peroxidasa. La

biodegradación por basidiomicetos se considera un proceso no-específico, oxidativo, el cual se lleva a cabo principalmente por la acción de tres tipos diferentes de enzimas: manganeso peroxidasas (MnPs), lignino peroxidasas (LiPs), y lacasa, conjunto de enzimas con alto poder degradativo (20).

Respecto a la producción mundial, España cuenta con una infraestructura importante para la producción de hongos comestibles que le permite aportar el 22% de la producción europea y le sitúa como el segundo productor europeo de este hongo después de Italia. La producción comercial de las *Pleurotus* spp. en España empezó en la mitad de los años ochenta, con incrementos mayores durante los años noventa (17).

La mayor parte de la producción de los Estados Unidos se hace con rastrojo de trigo picado, con cáscara de semilla de algodón o con mezclas de ambos. En Canadá, según Rincker y Chalmers (1998), se cultivan entre 600 y 900 toneladas de diferentes especies del género *Pleurotus*, principalmente en las regiones de Ontario y Columbia Británica (17).

En México, el cultivo de *P. ostreatus* inició en 1974 en la población de Cuajimalpa de Morelos, Distrito Federal (21). Actualmente, debido a diversas investigaciones y adaptaciones tecnológicas desarrolladas, el interés por cultivarlo se ha difundido en todos los ámbitos de ese país. Esto ha dado lugar a un innumerable grupo de pequeñas iniciativas de producción a baja escala, aún de economía familiar, las cuales comercializan el producto fresco. Durante el período 1990-1997 se observó en México un incremento en la producción superior al 400%. En el año 2002, se estimó una producción de 1825 toneladas, lo cual significó un nivel de producción comercial de unas 5 ton/día; por esta razón se ha considerado a México como el principal productor de *Pleurotus* en América (17).

El cultivo de *Pleurotus* spp. adquiere cada vez más interés en los países de América. Aunque no existen estadísticas oficiales al respecto, también se cultiva en Cuba, Colombia, Guatemala, Venezuela y Brasil. Por otra parte, se sabe que ha habido intentos por desarrollarlo o que existen pequeñas empresa de producción variable en El Salvador, Perú,

Ecuador y en general en aquellos países donde se cultiva *A. bisporus* (Argentina, Costa Rica, Colombia) (17).

En Guatemala, el cultivo de *Pleurotus* ha ido adquiriendo importancia en los últimos años, se ha reportado su comestibilidad en la Ciudad de Guatemala y Mixco (Guatemala), Sansare (El Progreso), Jacaltenango (Huehuetenango) y en el área de Occidente del país. La producción de *Pleurotus* en Guatemala dio inició en 1986 y para el año 2002 se reportó una producción de anual de 29,580 Kg. La mayor parte de la producción se consume en Guatemala (90%) y una pequeña porción (10%), se exporta a El Salvador y Honduras (22). Sin embargo, el cultivo de hongos con fines comerciales ha sido poco explotado y las cepas cultivadas que se utilizan son de origen extranjero y no cepas guatemaltecas (1).

D. Estudios realizados sobre el género *Pleurotus* y mejoramiento genético

En 1995 se realizó un estudio de cinco cepas nativas de *Pleurotus* spp. de la región de Chiapas, donde se evaluó el crecimiento miceliar, la producción y las características de los carpóforos producidos en cultivo artificial y sobre pulpa de café, con el objetivo de evaluar la productividad en planta pilotos de las cinco cepas (23).

En 1997, Salmenes y cols., iniciaron estudios para obtener y seleccionar genéticamente cepas de *Pleurotus* spp. con alta productividad, adaptadas a las condiciones ambientales cálidas de ciertas regiones de México, en base a la evaluación de la velocidad de crecimiento miceliar de cepas obtenidas en el laboratorio, como parámetro de selección de germoplasma con rápida producción de carpóforos (24).

De igual manera en 1998, Benítez y cols., evaluaron la producción de 18 cepas nativas de *Pleurotus djamor* de Soconusco, Chiapas. Las cepas se caracterizaron, seleccionaron y estudiaron a nivel laboratorio porque representaban un potencial genético desconocido que podía contribuir a resolver los problemas que presenta el cultivo de cepas de *Pleurotus* extranjeras. Esto se logró mediante estudios de laboratorio sobre la

correlación entre velocidad de crecimiento miceliar en varios medios y la producción de carpóforos (25).

En el año 2000, Vogel y Salmones compararon los cultivos de dos cepas de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., previamente seleccionadas en laboratorio, con una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.)Kumm., con la finalidad de determinar su productividad, y adicionalmente, observar su comportamiento ante la presencia de plagas y su manejo postcosecha, factores muy importantes para su uso comercial, concluyendo que la cepa en estudio produjo fructificaciones libres de patógenos, así como rendimientos adecuados que le permiten considerarla para su explotación comercial (26).

En Guatemala se han realizado estudios sobre *Pleurotus* enfocados únicamente a determinar su taxonomía y a evaluar la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos lignocelulósicos y otras características fenotípicas de varias cepas nativas, así como su cultivo a nivel artesanal, principalmente de *P. ostreatus* y *P. levis* (27). Se han realizado cultivos sobre pulpa de café y bagazo de citronela (28). También se han aislado varias cepas nativas procedentes de algunos lugares del país y se han cultivado sobre diferentes sustratos tales como pulpa de café, olote, paja de trigo y aserrín de pino (23). Por otro lado, la Universidad de San Carlos de Guatemala ha producido inóculo de dos cepas nativas para su cultivo a nivel artesanal en comunidades campesinas (28).

E. *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn

Sinónimo: *Pleurotus flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc

Pleurotus djamor es un hongo pantropical conocido todavía en la literatura como *Pleurotus flabellatus*, y es frecuentemente confundido y erróneamente identificado como *Pleurotus ostreatus*. Es una especie gregaria y cespitosa que crece sobre troncos, ramas y tocones de una gran diversidad de árboles y otras plantas. También crece en desechos agroindustriales como pulpa de café. Crece durante todo el año, pero preferiblemente en los meses lluviosos de junio a septiembre (29).

1. Descripción

Píleo de (10) 30-80 (100) mm de diámetro, variable desde flabeliforme, cóncavo, petaloide, subinfundibuliforme, subdimiado a espatulado; blanco con tonos rosados en etapas tempranas a blanco o cremoso o blanco amarillento, blanco grisáceo a veces con tonos gris-lila cuando son adultos, llegando a café claro o color de paja; en las especies de herbario el rango de colores va de café claro, salmón claro o salmón oscuro (29).

Contexto de 0.5-6.0 mm de grosor, siempre menos de 1 mm cuando está seco, blanco a amarillo claro, compacto, carnosos; fibriloso en el estípite, con olor farináceo y sabor que desaparece gradualmente con la madurez y/o con la desecación en herbario (29-30).

Himenio adnado, frecuentemente decurrente, no muy separado uno del otro; delgado, blanco a amarillento o amarillo, salmón cuando seco, con bordes enteros, raramente irregulares, algunos anastomosados o reticulados en la base (29).

El estípite ausente o de (5)10–20 x (1)4-8(10) mm, gradualmente delgado en la base; lateral o excéntrico, raramente central; sólido, subcoriáceo, superficie fibrilosa o finamente tomentosa o velutinada a glabrosa, blanca a blanquecina (29).

Esporada fresca que varía en tonos grises a gris amarillento, finalmente amarillo-miel o algunas veces gris-oliva. De (6.4) 7.2-9.6 (10.4) x (3.2) 4–4.8 μm , oblonga-elíptica o subcilíndrica, con un apículo bien definido; pared delgada, hialina y amiloide (29).

Basidios de (16.8) 20-28 (40) x (3.5) 4-5.6 (6.4) μm , tetraspóricos, algunas veces bi o trispóricos, subpiriformes o claviformes, ventricosos, hialinos, frecuentemente con unas fíbulas basales. Pleurocistidios ausentes (29).

Queilocistidios de (12.8) 16-32 (36) x (4) 5-9 (11) μm , común en especímenes jóvenes, menos frecuente en adultos; subcilíndricos, subclaviformes, subventricosos, a veces con constricciones irregulares, con una pared delgada, hialina, frecuentemente con un

corto mucrón o con un apéndice arriba de $13 \times 1-4 \mu\text{m}$, cilíndrico, delgado o grueso, capitado, ocasionalmente con un halo apical mucilaginoso (29).

Contexto, al principio monomítico después dimítico, con hifas hialinas, generativo, $2-12 (20) \mu\text{m}$ de diámetro con una pared gruesa o delgada [$0.8-1.6 (20) \mu\text{m}$], septadas y ramificadas, resultando en un esqueleto hifal de $3-15 \mu\text{m}$ de diámetro, con presencia de paredes de $(0.8)1.6-3.2 \mu\text{m}$ de grueso, no septadas ni ramificadas, a veces enrolladas; partes terminales atenuadas, $2-3 \mu\text{m}$ de diámetro, de pared delgada (29).

Trama himenoforal irregular, dimítica, con hifas similares a aquellas del contexto, esqueleto hifal generativo de $2.4-8.0 \mu\text{m}$ de diámetro, de pared gruesa o delgada, septado y ramificado, de $2.0-6.0 (12) \mu\text{m}$ de ancho, con paredes mayores de $2.4 \mu\text{m}$ de ancho, sin ramificaciones, no tabicadas (29).

Subhimenio con elementos globosos irregulares de $6.4-8 (20) \mu\text{m}$ de diámetro con hifas intermezcladas de $6.4-8 (21.6) \mu\text{m}$ de diámetro con paredes delgadas ($0.8-1.6 \mu\text{m}$) proyectadas al himenio como pseudocistidios, $24-44 \times 4.8-8.8 \mu\text{m}$, subventricosas hialinas, y algunas veces submucronados (29).

2. Posición taxonómica

Pleurotus djamor se distingue por su cuerpo fructífero comúnmente de blanco a blanco grisáceo, la forma de sus queilocistidios, su sistema hifal dimítico, su olor y sabor farináceos y la consistencia coriácea de sus fructificaciones (29).

Esta especie fue originalmente descrito por Rumph (1750) en *Herbarium Amboinense* bajo el nombre de *Boletus secundus arboreus*, como un hongo que crecía en los árboles, con píleo imbricado, de formas circulares a rectangulares o forma de hígado, presentando coloraciones rojizas cuando joven, que se desvanecían a blanco, amarillo-mate y amarillento en la madurez, careciendo de estípites o muy corto. El epíteto fue corregido por Fries (1821) como *Agaricus djamor* en tribu *Pleurotus*, subtribu *Concharia*. En 1836, Fries transfirió el epíteto de especies a *Lentinus*, y Boedijn (1959) lo hizo a *Pleurotus* (31).

El sistema hifal fue descrito como monomítico por Pegler (1977), y luego Corner (1981), que reportó especímenes de *P. djamor* en el Sureste de Asia, informó de la gran variabilidad morfológica e indicó que en etapas iniciales el sistema hifal es monomítico pero al madurar presenta un sistema hifal dimítico (29,31).

Guzmán *et al.* (1992) dividieron el complejo taxonómico de *Pleurotus djamor* en especies separadas. En su esquema taxonómico, *P. djamor* se compara con la definición de Corner (1981) de *P. djamor* var. *djamor* y var. *roseus*. También, *P. djamor* var. *fuscoroseus* fue considerada equivalente a *P. ostreatoroseus* Sing. de Brasil y México y con *P. salmoneostramineus* Vassileva, del norte del lejano Oriente; sin embargo, las relaciones filogenéticas del complejo de *P. djamor* han sido poco examinadas por técnicas de biología molecular (31).

Filogenéticamente, *P. djamor* se relaciona con a *P. pulmonarius*/*P. sajor-caju* y *P. eryngii*. Estas especies están relacionadas con *P. sapidus* y *P. colombinus* por el método UPGMA y con *P. pulmonarius*/*P. sajor-caju* por el método de “empalme de vecinos” (neighbour-joining). En un análisis basado en marcadores nucleares, *P. djamor* ha sido asociado con *P. cornucopiae*, o considerado como un intermedio entre *P. ostreatus* y *P. eryngii*, o se sugiere que son las especies más divergentes de este género, constituyendo un subgrupo (Ver anexo 1) (32).

3. Características coloniales macroscópicas y microscópicas

P. djamor presenta un micelio hialino, filamentoso, crecimiento radial adherido al sustrato. Margen irregular, ondulado; contra la luz, produce refracción desigual provocando un aspecto de relieve. No presenta un olor distintivo. El micelio cubre la caja de petri en seis semanas. Se observan zonas rosadas en algunas cepas. Micelio progresivo con fíbulas hialinas de pared delgada, con hifas escasamente ramificadas de 1.5–2.6 μm de diámetro (30).

En medio de la colonia, se presentan ciertas hifas contorneadas de 1.5–4.2 μm de diámetro. Cerca del inóculo con hifas regularmente ramificadas de 1.6–4.2 μm de diámetro

y con microgotas de 2.5–5.2 μm de diámetro. No se observan en micelio dicariótico pero presente en micelio monocariótico (30).

4. El tipo de incompatibilidad sexual (*mating-type*) de *Pleurotus* spp.

Pleurotus spp. es un género heterotálico tetrapolar, es decir que la fecundación sólo puede tener lugar entre dos micelios homocarióticos de genotipos diferentes para dos genes: los genes de incompatibilidad sexual o de *tipo acoplamiento*. Los hongos heterotálicos se prestan bien a la mejora genética debido a que es fácil obtener micelios homocarióticos — por el sesgo o rodeo de las esporas— y, por lo tanto, es fácil dominar y controlar los cruzamientos que se deseen hacer con ellos. En el caso de las especies de *Pleurotus*, la incompatibilidad sexual depende de dos genes o factores (*A* y *B*) poseedores cada uno de múltiples alelos (9). El factor *A* controla el apareamiento nuclear, formación de fíbulas, coordinación de la división celular y la septación de las fíbulas. El factor *B* es el responsable del control de la migración nuclear, disolución de los septos y la fusión de las fíbulas (33,34).

En el basidiocarpo, que es dicariótico, se forman esporas que poseen un sólo tipo de núcleo con un juego cromosómico (*n*). Al germinar, estas esporas dan lugar a un micelio primario u homocariótico, el cual puede ser propagado por multiplicación vegetativa. La fusión de dos micelios homocarióticos sexualmente compatibles; es decir, diferentes para los alelos de incompatibilidad, permite obtener un micelio dicariótico, que contendrá entonces dos tipos de núcleos haploides cada uno proveniente de uno de los dos parentales homocarióticos. Esta fusión corresponde a la primera etapa de la fecundación que es la plasmogamia (15,33).

La fecundación tiene lugar cuando los dos homocariontes confrontados poseen alelos diferentes para los dos genes de incompatibilidad sexual (15). En otras palabras, dos micelios monocarióticos son compatibles si tienen diferentes alelos en ambos loci (34). El conocimiento del “matingtype” o genes de incompatibilidad es importante para los cruzamientos y para la diferenciación del cuerpo fructífero. Estos genes controlan la

plasmogamia de las cepas híbridas y mantienen el estado dicariótico de los hongos. La variabilidad de los genes de incompatibilidad sexual ha sido intensamente estudiada en los hongos, particularmente en los homobasidiomicetos, en donde el sistema de heterotalismo de alelos múltiples motiva a usar extra-cruzamientos en lugar de intracruzamientos. El multialelismo facilita el estudio del origen, la evolución y la estructura genética de los genes de incompatibilidad y puede ser una de las bases para identificar genéticamente diferentes asilamientos para mejoramiento genético o para separar micelios individuales dentro de una población natural (15,35).

El micelio dicariótico constituye la semilla de los productores de hongos. Es más vigoroso que el micelio homocariótico y también puede ser objeto de una multiplicación vegetativa que aprovechan los productores de semilla para multiplicar las variedades. Cuando este micelio se pone en condiciones favorables para la fructificación (substrato, temperatura, luminosidad, CO₂, humedad) puede dar lugar a un basidiocarpo, que es la estructura diferenciada que se comercializa. En este basidiocarpo, tiene lugar la segunda parte de la fecundación (cariogamia), precisamente en los basidios, y da lugar a un núcleo diploide (2n) que tras la meiosis genera los núcleos haploides (n) que van a constituir las esporas (Ver anexo 2) (15).

F. Cultivo de *Pleurotus djamor*

Pleurotus djamor ha sido objeto de atención de especialistas en cultivo de hongos comestibles y ha sido demostrado en los trabajos de Quimio (1978) y Bana *et al.* (1979) en Asia, y en Guatemala, por De León *et al.* (1983) con resultados muy satisfactorios (28).

Este hongo puede ser cultivado en escala industrial en diversos residuos orgánicos, como paja, citronela, pulpa y bagazo de café. De León *et al.* (1983), obtuvieron una eficiencia biológica de 96% de una cepa inglesa de *P. flabellatus* en una mezcla de paja de cebada y pulpa de café, 28% en mezcla de bagazo de citronela y paja de cebada, y 10.9% en pulpa de café (28).

Vega *et al.* (2006) estudiaron el cultivo de 14 cepas silvestres de *P. djamor*, aisladas de diferentes provincias en Panamá, utilizando como sustrato paja de arroz y pulpa de café pasteurizados por inmersión en agua caliente. Los ciclos de cultivo variaron de 43 a 51 días, evaluándose dos a tres cosechas. En paja de arroz, la eficiencia biológica fluctuó entre 19.0 y 61.3%, el rendimiento entre 6.7 y 21.9%, y la tasa de producción de 0.4 y 1.4%. Mientras que en pulpa de café los parámetros oscilaron entre 43.5 y 93.5% de eficiencia biológica, 10.1 y 21.7% de rendimiento y tasa de producción de 0.9 y 1.8%. Esta técnica puede ser una alternativa viable para la producción de hongos comestibles proporcionando un alimento de aceptable valor nutrimental y a la vez generar un residuo bioconvertido y aprovechable como abono orgánico (36).

López y cols. (2005), evaluaron la producción y degradación de *P. djamor* en sustratos de rastrojo de maíz, calabaza y bagazo de henequén en el medio rural yucateco. Estos subproductos se han utilizado como sustratos para el cultivo de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn y *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., a nivel de laboratorio, pero con escasos estudios de producción en el medio rural tropical, más aún, con las especies silvestres de *P. djamor* de la región que podrían estar mejor adaptadas a las condiciones tropicales. Los resultados indican que los mejores sustratos para el cultivo en laboratorio fueron el bagazo de henequén y el rastrojo de calabaza, mientras que para la casa rural, fueron el bagazo de henequén y el rastrojo de maíz (37).

G. Estudios de entrecruzamiento genético

Lechner y colaboradores (2002), realizaron varios ensayos de compatibilidad interespecífica entre los polos de compatibilidad sexual del *Pleurotus* de la Patagonia y cepas control de *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus ostreatus*. Los resultados indicaron que las cepas de la Patagonia fueron 100 % compatibles con *P. ostreatus* e incompatibles con *P. pulmonarius*. Los dicariones obtenidos a partir de los apareamientos produjeron fructificaciones fértiles ya que los basidiocarpos produjeron esporas viables (38).

En 2004, Salmones y cols., realizaron el entrecruzamiento y evaluaron la producción de variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn, obteniéndose micelios monospóricos de tres cepas de *Pleurotus djamor* var. *djamor*, var. *roseus* y var. *salmoneostramineus*, determinándose sus tipos de apareamiento. También se seleccionaron monocariones de rápido crecimiento miceliar para realizar cruza interespecíficas. Determinaron que las cepas híbridas superaban la productividad de sus parentales, por lo que se consideraron con posibilidades de ser cultivadas comercialmente (39).

Actualmente, en Guatemala no se han realizado investigaciones sobre mejoramiento genético de los cultivos de estos hongos comestibles, ya que los estudios actuales sobre *Pleurotus* se han enfocado a determinar su variedad de especies y a evaluar la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos y evaluación del cultivo artesanal (2-6).

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país con una alta biodiversidad, pero la deforestación, el avance de la frontera agrícola y otros factores están contribuyendo al deterioro de los ecosistemas en los que se desarrollan las diversas especies de hongos comestibles, que es necesario proteger y mejorar para su utilización en beneficio del país.

Los hongos comestibles se conocen en nuestro país desde tiempos inmemorables y actualmente se han reportado más de 80 especies de uso tradicional, entre ellas *Pleurotus djamor*, el cual se utiliza ampliamente en las localidades de Sansare, Mixco y Guatemala.

Aunque se han aislado cepas nativas y se han realizado cultivos de esta especie sobre diferentes sustratos, en nuestro país no se han realizado investigaciones sobre el mejoramiento genético mediante el entrecruzamiento de monocariones de rápido crecimiento miceliar.

La importancia de realizar este estudio fue el seleccionar cepas de rápido desarrollo y alta producción de cuerpos fructíferos con características aceptables para comercialización y mejor aceptación por parte de los consumidores.

No está de más indicar que dicha investigación contribuyó según lo enmarcado dentro del Acuerdo sobre Identidad y Derechos de los Pueblos Indígenas, Apartado III: Derechos Culturales, sección F: Ciencia y Tecnología, impulsando los intercambios científicos y técnicos de los conocimientos contemporáneos a los pueblos indígenas. Ya que los beneficiados directos de los resultados fueron comunidades indígenas que se dedican al cultivo de hongos comestibles, particularmente *Pleurotus*.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar dicariones de rápido desarrollo miceliar y alta producción de cuerpos fructíferos con características aceptables para comercialización por medio de cruzas interespecíficas de micelio monospórico de cepas silvestres de *Pleurotus djamor*.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar monocariones aislados a partir de cepas parentales de *Pleurotus djamor*, para evaluar su crecimiento miceliar *in vitro*.
2. Identificar el tipo de incompatibilidad de los monocariones aislados para obtener cruzas interespecíficas.
3. Evaluar el crecimiento miceliar de los dicariones, para seleccionar los de mayor velocidad de crecimiento miceliar en condiciones de laboratorio.
4. Evaluar la productividad de los dicariones obtenidos por medio de elaboración de inóculos y producción cuerpos fructíferos.
5. Comparar las características de los cuerpos fructíferos de las cepas parentales y de los dicariones para detectar las características adecuadas para cultivo artesanal.

VI. HIPÓTESIS

Las cepas obtenidas por entrecruzamiento interespecífico presentan mayor velocidad de crecimiento miceliar y mayor eficiencia biológica que las cepas parentales de *Pleurotus djamor* var. *djamor* (Fr.) Boedijn.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

1. Cepas parentales

a. Cepa *Pleurotus djamor* var. *djamor* 70.2003

Procedente de Jacaltenango, Huehuetenango

b. Cepa *Pleurotus djamor* var. *djamor* 01.2006

Procedente de San Andrés Semetabaj, Sololá

Estas cepas se encuentran depositadas en el cepario de Micología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

B. Metodología

1. FASE DE LABORATORIO

a. Revitalización de cepas parentales de *Pleurotus djamor*

- Se revitalizaron las cepas *Pleurotus djamor* 70.2003 y 01.2006.
- Se incrementó de biomasa por cultivo en medio sólido PDA.
- Se incubó a 26°C hasta que el micelio cubrió toda la caja de Petri.

b. Producción de inóculo de las cepas parentales de *Pleurotus djamor*

- Se prepararon granos de maicillo remojando previamente durante 16 horas.
- Se pesaron 200 gramos en bolsas de polipapel.

- Se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión por 30 minutos.
- Se sembró la biomasa obtenida en caja de Petri en el maicillo para la producción de inóculo.
- Se incubaron a 26°C hasta que el micelio cubrió todo el sustrato.

c. Producción de cuerpos fructíferos de las cepas parentales de *Pleurotus djamor*

- Se preparó y humedeció el sustrato (pulpa de café) por 12 horas.
- Se llenaron las bolsas de polipapel con 500 g de pulpa de café.
- Se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión por 45 minutos.
- Se determinó el porcentaje de humedad.
- Se realizó la siembra de la pulpa de café con inóculo producido al 2%.
- Se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, hasta que se obtuvo el crecimiento del hongo en los sustratos.
- Se realizó la fructificación en condiciones de invernadero artesanal, por carecer de un invernadero con condiciones controladas, regando los sustratos 4 veces al día.

d. Obtención de monocariones a partir de esporas de las cepas parentales de *Pleurotus djamor* (38).

- Se escogieron cuerpos fructíferos de las cepas y se colocaron en caja de Petri de vidrio estéril y sobre papel filtro por 24 horas.
- Se prepararon tubos de ensayo con 10 mL de solución de Tween 80 más cloranfenicol (20 mg/L).
- Se cortaron fragmentos de papel filtro con tijeras estériles y en condiciones de esterilidad y se colocaron en cada tubo de ensayo con solución preparada, agitando para producir una suspensión de las esporas.
- Se realizaron diluciones 1×10^3 y 1×10^5 y se agitaron los tubos.
- Se tomaron estérilmente alícuotas de 0.3, 0.3 y 0.4 mL de cada dilución y se vertieron sobre cajas de agar agua al 2.0% por esparcido.

- Las cajas se incubaron a 26°C por 48 horas.
- Se examinaron las placas bajo un estereoscopio bajo condiciones de esterilidad y se entresacaron una a una varias esporas, con ayuda de una aguja de disección.
- Se sembraron aproximadamente 30 cultivos monospóricos en cajas con el medio de germinación PDA de cada una de las cepas.
- Las cajas se incubaron a 26°C hasta que se obtuvo el micelio monocariótico.
- Se confirmó la identidad de micelio monocariótico por medio de la ausencia de fíbulas con una preparación de azul de lactofenol.
- Se realizó una descripción macro y microscópica de las colonias.
- Al terminar este tiempo, se cortaron fragmentos de micelio y guardarlos en el cepario en tubos de ensayo.

e. Determinación de diámetro de crecimiento miceliar de monocariones aislados, durante 10 días de incubación (40).

- Se preparó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Se esterilizó por 15 min. a 121°C y se sirvió en cajas.
- Se inocularon 10 cajas del medio PDA, con cada uno de los monocariones con un segmento de 0.5 mm de cultivo.
- Se identificaron las cajas de petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.
- Se sellaron las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Se incubó a 26°C.
- Se anotó la velocidad de crecimiento determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 2 días, durante un máximo de 10 días.
- Se determinó gráficamente el diámetro de crecimiento miceliar mediante la medición de los diámetros que se traspasen perpendicularmente, sumar y dividir entre 2 para calcular el diámetro medio.

f. Determinación de los tipos de incompatibilidad (mating type) de los monocariones de las cepas de *Pleurotus djamor* (19).

Se seleccionaron de 10-12 monocariones que presentaron valores altos de crecimiento miceliar de cada una de las cepas 70.2003 y 01.2006 y se estudió cada grupo por separado, realizando 3 pruebas:

1. Prueba 1 (Para determinar el tipo de incompatibilidad A_1B_1)

Se seleccionó un monocarión y se asignó arbitrariamente el tipo de incompatibilidad A_1B_1 y se confrontó cada uno del resto de monocariones, sembrando un pequeño fragmento de micelio sobre agar PDA a una distancia de 2.5 cm. Luego se incubaron a 26°C por 5 días. Al concluir ese tiempo, se realizaron las preparaciones (del área de unión de las dos colonias) con azul de lactofenol (400 aumentos) en busca de la reacción compatible la cual se demuestra por la presencia de fibulas. Si tenían una reacción compatible se designó como tipo de incompatibilidad A_2B_2 .

2. Prueba 2 (Para determinar el tipo de incompatibilidad A_2B_2)

Se seleccionó uno de los monocariones A_2B_2 determinado en la prueba 1 y se confrontaron todos los monocariones que NO presentaron una reacción compatible en la prueba 1 y se realizó el mismo procedimiento. A los que presentaron una reacción compatible se designará como tipo de incompatibilidad A_1B_1 .

3. Prueba 3 (Para determinar el tipo de incompatibilidad A_1B_2)

Se seleccionó un monocarión que NO presentó una reacción compatible en las pruebas 1 y 2 y se asignó arbitrariamente el tipo de incompatibilidad A_1B_2 y se confrontó con los monocariones que NO presentaron una reacción compatible en las pruebas 1 y 2, de la misma manera que los pasos anteriores. Entonces, los monocariones con reacción

compatible se designaron como tipo de incompatibilidad A_2B_1 y los que NO presentaron reacción compatible se designaron como tipo de incompatibilidad A_1B_2 .

Diagrama de Incompatibilidades

Incompatibilidad Asignada	Reacción compatible	Incompatibilidad Resultante
A_1B_1	+	A_2B_2
A_2B_2	+	A_1B_1
A_1B_2	+	A_2B_1
A_2B_1	-	A_1B_2

g. Cruzas interespecíficas de monocariones (24).

- De los monocariones determinados para los 4 tipos de incompatibilidad obtenidos en el paso anterior, se seleccionaron las cruzas para cada una de las cepas.
- Se sembraron cada uno de los cultivos monospóricos y se entrecruzaron por especie (cepas 1 y 2), de acuerdo con sus tipos de incompatibilidad (es decir, se cruzaron los tipos I y III, y los tipos II y IV)
- Se incubaron a 26°C
- Se realizó el aislamiento de los cultivos dicarióticos obtenidos (cepas híbridas)

h. Determinación de diámetro de crecimiento micelial de dicariones obtenidos, durante 10 días de incubación (40).

- Se preparó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Se esterilizó los medios por 5 minutos a 121°C
- Se inocularon 10 cajas del medio PDA, con cada uno de los dicariones con un segmento de 0.5 mm de cultivo.
- Se identificaron las cajas de petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.

- Se sellaron las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Se incubó a 26°C.
- Se anotó la velocidad de crecimiento determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 2 días, durante un máximo de 10 días.
- Se determinó gráficamente el diámetro de crecimiento miceliar mediante la medición de los diámetros que se traspasen perpendicularmente, sumar y dividir entre 2 para calcular el diámetro medio. Este diámetro se calculó cada 2 días para estimar el diámetro de crecimiento miceliar.

i. Producción de inóculo de las cepas híbridas en condiciones de laboratorio (17).

- Se incrementó la biomasa de los cruces seleccionados.
- Se prepararon granos de maicillo remojando previamente durante 16 horas.
- Se pesaron 200 gramos en bolsas de polipapel.
- Se esterilizó a 121°C y 15 lbs de presión por 30 minutos.
- Se realizó la siembra de la biomasa obtenida en caja de Petri, en el maicillo para producción de inóculo incubando a 26°C hasta que el micelio cubrió todo el sustrato.

2. FASE DE CAMPO EN INVERNADERO EXPERIMENTAL

a. Producción de cuerpos fructíferos de las cepas híbridas en condiciones artesanales (19).

Los módulos de producción que se utilizaron para esta fase fueron facilitados por la Asociación ADIFE, en el Parcelamiento La Giralda, Tecpán, Chimaltenango. Estos módulos artesanales fueron exclusivos para el cultivo de hongos comestibles. Asimismo, las comunidades de la región manifestaban interés en seguir produciendo *Pleurotus djamor* pero con mejores eficiencias. Se utilizaron sistemas cerrados, para que las pruebas se llevaran a cabo bajo condiciones de investigación controladas.

- Se preparó y humedeció el sustrato (pulpa de café) por 24 horas en agua alcalina al 2%.
- Se llenaron las bolsas de polipapel con 500 g de pulpa de café.
- Se determinación de porcentaje de humedad del contenido.
- Se sembró la pulpa de café con el inóculo producido al 2%.
- Se incubó a temperatura ambiente y en condiciones de obscuridad, hasta que se obtuvo el crecimiento de hongos en los sustratos.
- Se realizó la fructificación en condiciones de invernadero artesanal.
- Se determinaron las características de los hongos obtenidos en las diferentes cosechas.
- Se determinó la eficiencia biológica y la tasa de producción

C. Análisis Estadístico

Tipo de Diseño: Totalmente al azar

Mediciones:

- Diámetro de Crecimiento Miceliar
- Porcentaje de Eficiencia Biologica (EB)
- Tasa de Producción (TP)

Total aproximado de Tratamientos: 14 (cepas = variable independiente)

Cepas Parentales (2), Híbridos (10 – 12)

Cálculo de Número de Réplicas:

$$n_j = \frac{2 NC^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

n_j : número de réplicas por grupo o tratamiento

NC: Nivel de confianza para prueba de hipótesis.

$\alpha = 0.05$ $Z_{\alpha=0.05}$ y 14 tratamientos = 2.935

σ^2 = Varianza esperada

Δ^2 = Límite de error (distancia entre 2 grupos para considerarlos diferentes).

El número de réplicas que se utilizó, se obtuvo por medio de $\Delta = 2\sigma$

$$n_j = \frac{2 NC^2 \sigma^2}{4 \Delta^2} = \frac{NC^2}{2} = 5$$

Por lo tanto el número de réplicas fue de 5.

Análisis de resultados:

Los valores de EB (eficiencia biología) de las cepas parentales y las cruzas o cepas híbridas se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía y las pruebas de intervalos múltiples de Duncan, para determinar las diferencias significativas entre tratamientos.

VIII. RESULTADOS

Se aislaron 27 monocariones de las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor*, 15 de la cepa 70.03 y 12 de la cepa 01.06, los cuales fueron almacenados en condiciones de cepario y posteriormente se revitalizaron para determinar el crecimiento de cada uno de ellos (Figuras 1-6).

Al evaluar el crecimiento micelial de los monocariones obtenidos a partir de la cepa 70.03 (monocariones JH), se determinó que el mayor crecimiento lo obtuvo el monocarión JH₃ (71.8 mm), seguido del JH₅ (70.8 mm), JH₇ (70.4 mm) y JH₂ (70.0 mm). El resto de monocariones presentaron crecimiento menor a los 70.0 mm, de los cuales el menor crecimiento correspondió al monocarión JH₆ (39.2 mm) (Tabla 1, Anexo 3).

El análisis estadístico mostró diferencia significativa al confrontar el crecimiento micelial de cada uno de los monocariones (Anexo 4). Por otro lado, se obtuvieron cinco agrupaciones según la prueba de Duncan. Los monocariones JH₃, JH₅, JH₇, JH₂ y JH₁ conformaron el grupo A ($p=0.264$); los monocariones JH₈, JH₄ y JH₁₃ el grupo B ($p=0.402$); los monocariones JH₁₅, JH₁₄, JH₁₂ y JH₉, el grupo C ($p=0.457$), mientras que los monocariones JH₁₀ y JH₁₁, conformaron el grupo D ($p=0.133$) y finalmente, el monocarión JH₆ el grupo E ($p=1.000$). Los grupos no mostraron diferencia significativa entre los integrantes del mismo grupo, pero sí diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$).

En cuanto a las características microscópicas de los monocariones JH, todas las colonias presentaron textura algodonosa y la mayor parte de ellas evidenciaron una coloración blanco amarillenta, abundantes agregaciones miceliares y exudado de color ámbar (Figura 4). Microscópicamente presentaron hifas de 1.0 -5.0 μm , hialinas, poco ramificadas y sin fíbulas (Tabla 1).

Tabla 1. Características del crecimiento micelar de los monocariones JH a los 7 días de incubación a 26°C*.

Monocarión	Diámetro (mm)**	Características de la colonia				
		Textura	Color	Agregaciones miceliarias***	Exudado	Hifas (µm)
JH 3	71.8 ± 1.85 a	Algodonosa	Blanco amarillento	++	Presente	1.0-4.0
JH 5	70.8 ± 1.25 a	Algodonosa	Blanco	-	Presente	1.0-3.0
JH 7	70.4 ± 0.54 a	Algodonosa	Blanco	-	Presente	1.0-3.0
JH 2	70.0 ± 2.15 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+	Ausente	1.0-3.0
JH 1	67.4 ± 5.33 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-3.0
JH 8	62.9 ± 1.14 b	Algodonosa	Blanco amarillento	++	Presente	1.0-3.0
JH 4	62.1 ± 2.13 b	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-5.0
JH 13	61.6 ± 0.65 b	Algodonosa	Blanco	+	Ausente	1.0-3.0
JH 15	57.7 ± 1.71 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	1.0-4.0
JH 14	57.2 ± 2.72 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-5.0
JH 12	56.8 ± 2.30 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-3.0
JH 9	56.5 ± 2.15 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-3.0
JH10	51.2 ± 1.60 d	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-2.0
JH 11	49.0 ± 2.15 d	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Presente	1.0-5.0
JH 6	39.2 ± 2.41 e	Algodonosa	Blanco amarillento	+	Presente	1.0-3.0

* Los resultados se presentan ordenados descendientemente, de acuerdo con el diámetro de las colonias.

** Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

***-: ausentes. ++: escasas. ++: regular cantidad. +++: abundantes.

Al evaluar el crecimiento micelar de los monocariones aislados de la cepa 01.06 (SS), se determinó que el mayor crecimiento lo obtuvo el monocarión SS₁₁ (77.3 mm), seguido del monocarión SS₁₂ (76.9 mm). El resto de monocariones tuvieron crecimiento menor a 69.4 mm, de los cuales, el monocarión SS₃, presentó el menor crecimiento (34.9 mm) (Tabla 2, Anexo 5).

El análisis estadístico mostró diferencia significativa al confrontar el crecimiento micelar de cada uno de los monocariones (Anexo 6). Se obtuvieron cinco agrupaciones según la prueba de Duncan: los monocariones SS₁₁ y SS₁₂ conformaron el grupo A ($p=0.834$); los monocariones SS₆, SS₈, SS₉ y SS₁₀ el grupo B ($p=0.079$); el monocarión SS₇ el grupo C ($p=1.000$). Los monocariones SS₁, SS₂, SS₄ y SS₅ conformaron el grupo D ($p=0.405$) y finalmente, el monocarión SS₃, el grupo E ($p=1.000$). Los grupos tampoco mostraron diferencia significativa entre los elementos del mismo grupo, pero sí diferencia significativa entre cada grupo ($p < 0.05$).

Las colonias de los monocariones SS presentaron textura algodonosa, coloración blanco amarillenta, agregaciones miceliarias y no se observó exudado (Figura 5).

Microscópicamente se observaron hifas de 1.0 - 6.0 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas y sin fíbulas (Tabla 2).

Tabla 2. Características del crecimiento miceliar de los monocariones SS a los 7 días de incubación a 26^o*.

Monocarión	Diámetro (mm)**	Características de la colonia				
		Textura	Color	Agregaciones miceliares***	Exudado	Hifas (μm)
SS 11	77.3 \pm 1.52 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
SS 12	76.9 \pm 0.54 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	1.0-5.0
SS 8	69.4 \pm 3.83 b	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
SS 9	67.8 \pm 1.75 b	Algodonosa	Blanco amarillento	++	Ausente	2.0-5.0
SS 6	67.5 \pm 1.45 b	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	3.0-6.0
SS 10	64.2 \pm 1.35 b	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-4.0
SS 7	58.1 \pm 3.28 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
SS 1	50.6 \pm 1.85 d	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-4.0
SS 2	45.0 \pm 3.67 d	Algodonosa	Blanco	++	Ausente	2.0-5.0
SS 5	44.2 \pm 2.63 d	Algodonosa	Blanco	-	Ausente	1.0-3.0
SS 4	43.3 \pm 4.17 d	Algodonosa	Blanco	+++	Ausente	2.0-5.0
SS 3	34.9 \pm 5.63 e	Algodonosa	Blanco amarillento	++	Ausente	1.0-3.0

*Los resultados se presentan ordenados descendientemente, de acuerdo con el diámetro de las colonias.

** Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

***-: ausentes. ++: escasas. ++: regular cantidad. +++: abundantes.

Los tipos de incompatibilidad presentes en los aislamientos monocarióticos JH, dos correspondieron al tipo de incompatibilidad I, cinco al tipo II, siete al tipo III y no fue encontrado ningún monocarión que correspondiera al tipo IV. De los doce monocariones SS, dos correspondieron al tipo de incompatibilidad II, diez al tipo III y no se encontraron los tipos I y IV (Tabla 3) (Figuras 7-9).

Tabla 3. Tipos de incompatibilidad de los monocariones aislados a partir de las cepas parentales de *Pleurotus djamor* var. *djamor*.

Tipos de incompatibilidad	Monocariones	
	Cepa 70.03	Cepa 01.06
I (A ₁ B ₁)	JH ₂ , JH ₁₃	-----
II (A ₁ B ₂)	JH ₁ , JH ₃ , JH ₄ , JH ₆ , JH ₁₄	SS ₃ , SS ₄
III (A ₂ B ₂)	JH ₅ , JH ₇ , JH ₈ , JH ₁₁ , JH ₁₂ , JH ₁₅	SS ₁ , SS ₂ , SS ₅ , SS ₆ , SS ₇ , SS ₈ , SS ₉ , SS ₁₀ , SS ₁₁ , SS ₁₂
IV (A ₂ B ₁)	---	----

Basándose en el tipo de incompatibilidad y velocidad de crecimiento miceliar, fueron elegidos 2 monocariones por cepa para realizar las cruzas interespecíficas. No se usaron los monocariones con los mayores valores de crecimiento miceliar (JH₃ y SS₁₁), debido a que en el caso del primero, no existió el tipo de incompatibilidad respectivo en los monocariones SS. En el caso del segundo, la cepa se contaminó y no fue posible descontaminarla. Del grupo JH se tomaron los monocariones 2 y 13 y del grupo SS, los monocariones 9 y 12. Del producto de las cruzas, se obtuvieron 4 dicariones (Tabla 4) (Figuras 10-12).

Tabla 4. Cruzas y dicariones obtenidos a partir de los monocariones de *Pleurotus djamor* var. *djamor* de cepas parentales 70.03 (JH) vs. 01.06 (SS)

Tipo de incompatibilidad	Cruzas efectuadas	Dicariones resultantes
I (JH) x III (SS) ^a	JH ₂ x SS ₁₂	DJS ₁
I (JH) x III (SS)	JH ₁₃ x SS ₁₂	DJS ₂
I (JH) x III (SS)	JH ₁₃ x SS ₉	DJS ₃
I (JH) x III (SS)	JH ₂ x SS ₉	DJS ₄

^a I: A₁B₁; III: A₂B₂

Respecto al crecimiento miceliar a los 5 días de incubación, todos los dicariones DJS produjeron colonias con mayor diámetro de crecimiento miceliar respecto a las cepas parentales, siendo los mejores los dicariones DJS₂, DJS₃ y DJS₁, con un diámetro en mm de 68.2 mm, 65.3 mm y 64.6 mm, respectivamente. Además que las cepas parentales presentaron un diámetro de 47.0 mm para la cepa 70.2003 y 45.6 mm, para la cepa 01.2006 (Tabla 5, Anexo 7).

El análisis estadístico mostró diferencia significativa al confrontar el crecimiento miceliar de los dicariones y cepas parentales (Anexo 8), obteniéndose tres agrupaciones según la prueba de Duncan, respecto al crecimiento miceliar observado entre dicariones y parentales: el grupo A estuvo conformado por los tres dicariones obtenidos: DJS₂, DJS₃, DJS₁ (p=0.077). El grupo B por el dicarion DJS₄ (p=1.000) y el grupo C, por las cepas parentales 70.03 y 01.06 (p=0.449). Los grupos no mostraron diferencia significativa entre los elementos del mismo grupo, pero sí diferencia significativa entre cada grupo (p< 0.05).

Los dicariones DJS obtenidos, presentaron colonias algodonosas, color blanco amarillento principalmente hacia el centro, abundantes agregaciones miceliarias y ausencia de exudado. Microscópicamente se observaron hifas de 2.0 - 5.0 μm de ancho, hialinas y abundantes fíbulas. Las cepas parentales presentaron características similares entre ellas, así como con los dicariones, con la salvedad de que la cepa parental 01.06, produjo hifas de 1.0 - 5.0 μm (Tabla 5) (Figuras 13-18).

Tabla 5. Diámetro de las colonias y dicariones DJS, después de 5 días de incubación en el medio PDA, a 26°C.

Dicariones/ Parentales	Diámetro (mm)*	Características de la colonia				
		Textura	Color	Agregaciones miceliarias	Exudado	Hifas (μm)
DJS ₂	68.2 \pm 2.85 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
DJS ₃	65.3 \pm 1.95 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
DJS ₁	64.6 \pm 2.05 a	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
DJS ₄	60.1 \pm 3.78 b	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
70.2003	47.0 \pm 1.85 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	2.0-5.0
01.2006	45.6 \pm 6.24 c	Algodonosa	Blanco amarillento	+++	Ausente	1.0-5.0

* Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

** -: ausentes. ++: escasas. +++: regular cantidad. ++++: abundantes.

La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en pulpa de café evidenció que el período de incubación de los sustratos fue de 17 días, obteniéndose todas las cosechas en un lapso de 31 días, con un total de 3 a 8 cosechas. Durante el desarrollo del experimento la temperatura promedio fue de 23°C y la humedad de 92%.

El análisis estadístico según la prueba de Duncan no mostró diferencia significativa al confrontar la eficiencia biológica de cada uno de los dicariones y cepas parentales ($p = 0.142$) (Anexo 9). A pesar de que la mayor eficiencia biológica se observó en el dicarion DJS₃ (75.84%) que superó a las dos cepas parentales. Los dicariones DJS₁ (69.17%) y DJS₂ (70.28%) no superaron a la cepa parental 70.03 (71.46%), pero sí a la cepa parental 01.06 (68.35%). El dicarion DJS₄ (64.47%) no superó a ninguna de las cepas parentales, ni a los demás dicariones (Tabla 6, Anexo 10).

En cuanto al color de los púleos producidos en cultivo, todas las cepas produjeron basidiomas de color blanco-grisáceo. Además, respecto al diámetro de los púleos, los dicariones DJS₃, DJS₂, DJS₁ y la cepa parental 70.03, presentaron entre 1.2 y 11.5 cm,

mientras que la cepa parental 01.2006, los presentó entre 1.7 y 10.7 cm. El dicarion DJS₄ presentó los píleos más pequeños, con diámetros entre 1.5 y 9.5 cm (Tabla 6) (Figuras 19-21).

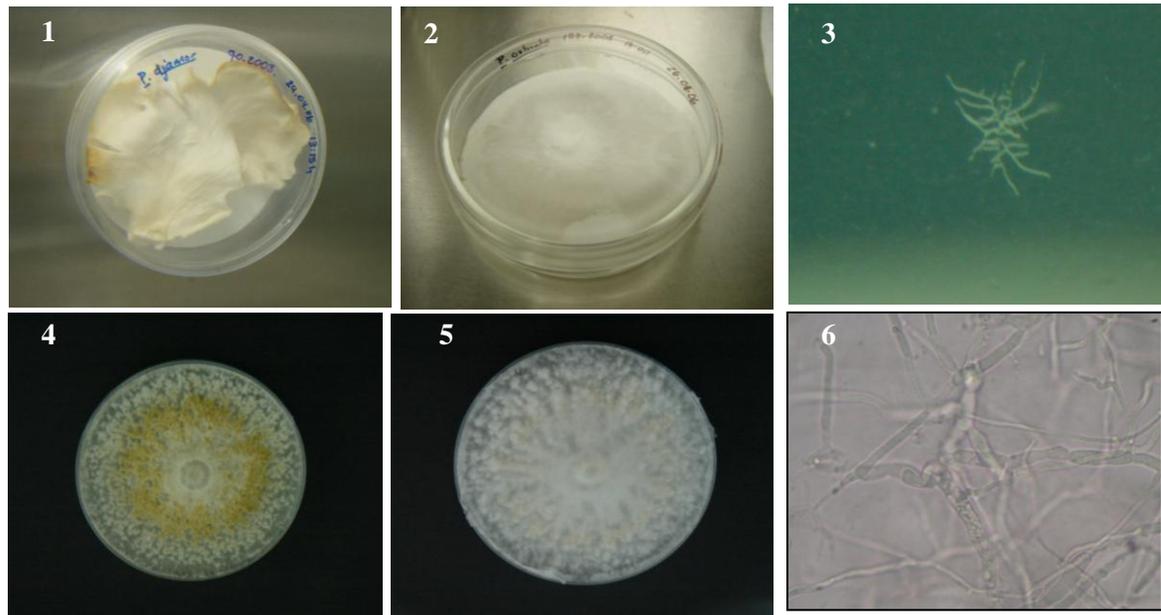
Tabla 6. Productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* sobre pulpa de café *

Cepas	Peso fresco de basidiomas	Eficiencia Biológica (%)**	No. de cosechas	Diámetro de los píleos (cm)	Color de basidiomas
DJS ₃	2696.32	75.84 ±9.25	6	1.2-11.5	Blanco grisáceo
70.2003	2563.00	71.46±11.9	8	1.2-11.5	Blanco grisáceo
DJS ₂	2490.32	70.28±5.32	7	1.2-11.5	Blanco grisáceo
DJS ₁	1248.50	69.17±4.51	3	1.5-11.5	Blanco grisáceo
01.2006	1682.70	68.35±4.08	4	1.7-10.7	Blanco grisáceo
DJS ₄	2785.30	64.47±17.8	6	1.5-9.5	Blanco grisáceo

*Con excepción del peso fresco, el número de cosechas y diámetro de los píleos; los valores son promedio de 8 repeticiones.

**No existió diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Duncan ($p>0.05$).

Respecto a las cruzas obtenidas de las cepas de *P. djamor* var. *djamor*, se concluye que el dicarion DJS₃ es una cepa promisoriosa para cultivo a nivel artesanal, dada su rapidez de crecimiento micelial y productividad, donde superó en eficiencia biológica a las cepas parentales en el sustrato de pulpa de café.



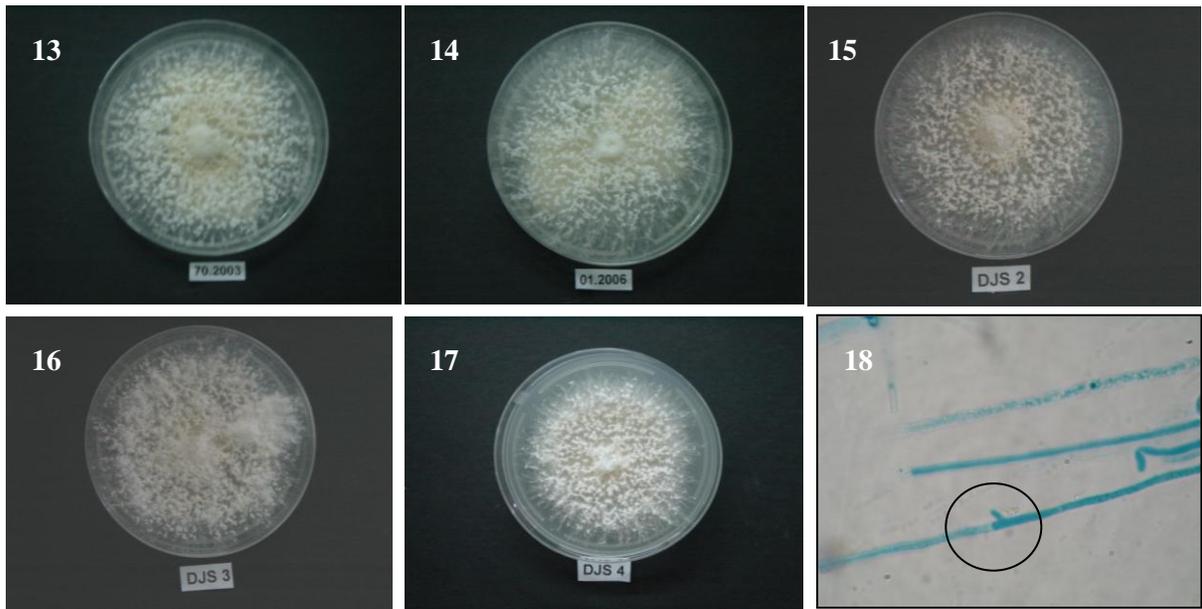
Figs.1-6. Aislamiento de monocariones. 1. Esporulación de los basidiocarpos. 2. Obtención de esporada en condiciones de esterilidad. 3. Micelio haploide (monocarion) desarrollado a partir de una basidiospora, sobre agar-agua al 20% (x75). 4-5. Monocariones de *P. djamor* var. *djamor*. 4. Monocarion JH, obsérvese la coloración blanco amarillento de la colonia. 5. Monocarion SS. 6. Hifas monocarióticas, nótese la ausencia de fibulas (x1000).



Figs. 7-9. Determinación de los tipos de incompatibilidad de los monocariones. 7. Preparación del micelio con azul de lactofenol para su observación. 8. JH₅ (A₂B₂) (izquierda) x JH₁ (A₁B₂) (derecha), incompatibles. 9. Falsas fíbulas observadas en la reacción incompatible (señaladas con el círculo) (x1000).



Figs. 10-12. 10. Cruzas interespecimen de los monocariones compatibles e incompatibles. 11. Entrecruzamiento entre los monocariones JH₂ y SS₁₂, para obtener el dicarion DJ_{S1}. 12. Fíbulas presentes en la zona de entrecruzamiento (x1000).



Figs. 13-18. Cepas parentales y dicariones de *P. djamor* var. *djamor*. 13. Cepa parental 70.03. 14. Cepa parental 01.06. 15. Dicarión DJS₂. 16. Dicarión DJS₃. 17. Dicarión DJS₄. 18. Célula gancho (hook cell) en la formación de una fíbula (x1000).



Figs. 19-21. Basidiomas (cuerpos fructíferos) de cepas parentales y dicariones de *P. djamor* var. *djamor*, producidos sobre pulpa de café. . 19. Cepa parental 70.03. 20. Cepa parental 01.06. 21. Dicarión DJS₂.

IX. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue seleccionar dicariones de rápido desarrollo micelial y alta producción de cuerpos fructíferos con características aceptables para comercialización por medio de cruza interespecíficas de micelio monocariótico de cepas silvestres de *Pleurotus djamor* var. *djamor*.

Respecto al crecimiento micelial, se observó que tanto los monocariones obtenidos de la cepa 70.03 (JH), como los aislados de la cepa 01.06 (SS), formaron cinco grupos estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). Este aspecto indica que si bien se trata de aislamientos de la misma especie, el crecimiento micelial puede variar no solamente entre cepas, sino que también entre aislamientos de una misma cepa como también ha sido reportado en México (41).

Por otra parte, los monocariones JH y SS, aislados de las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor*, presentaron diámetros de crecimiento micelial similares a los obtenidos a partir de tres cepas mexicanas de *P. djamor*, adscritas a las variedades ecológicas *djamor* (IE-116), *roseus* (IE-134) y *salmonostramineus* (IE-153). Por otra parte, en este estudio, el diámetro mínimo observado fue de 34.9 mm (monocarión SS₃), mientras que en las cepas mexicanas el diámetro mínimo fue de 19.6 mm (para uno de los monocariones de la cepa IE-153) (39). Sin embargo, la cepa mexicana IE-116 (*P. djamor*) presentó monocariones de mayor diámetro (82.5 mm) respecto a todos los obtenidos en la presente investigación, donde el diámetro máximo lo obtuvo el monocarión SS₁₁ (77.3 mm).

Los aislamientos monocarióticos obtenidos a partir de las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* presentaron un patrón de sexualidad heterotálico, tetrapolar y de completa compatibilidad entre sí, tal y como se ha reportado para *Pleurotus djamor* (34, 42). Esta especie, a pesar de que tiene tres formas comúnmente recolectadas, todas sus variantes son totalmente compatibles entre sí, aún entre aislamientos de Asia subtropical, Nueva Zelanda y América Central (43).

Las especies tetrapolares como *P. djamor*, presentan cuatro grupos de incompatibilidad, por lo que se supone que pueden ser encontrados también en forma de aislamientos monocarióticos. Esta cualidad no se encontró en todos los monocariones JH, obtenidos de la cepa *P. djamor* var. *djamor* 70.03, ya que en ella no se produjo el tipo de incompatibilidad IV. Asimismo, en los monocariones SS de la cepa *P. djamor* var. *djamor* 01.06, tampoco se produjeron los tipos de incompatibilidad I y IV. Este factor no es fácil de controlar, ya que el tipo de incompatibilidad en monocariones se distribuye totalmente al azar y para detectarlos se requiere del aislamiento de una gran cantidad de monocariones (34, 42).

Respecto a las cruzas realizadas, éstas se efectuaron acorde a los tipos de incompatibilidad que presentaron los monocariones, por lo que al observar fíbulas en la zona de contacto de las hifas se constató que los monocariones cruzados habían sido compatibles e indicaban la formación de una nueva cepa dicariótica. Además las cepas monocarióticas exhiben un sistema de compatibilidad sexual heterotálico y tetrapolar (42).

Los cuatro dicariones obtenidos de los entrecruzamientos (dicariones DJS), superaron en diámetro de crecimiento miceliar a las cepas parentales, por lo que se acepta la hipótesis referente al crecimiento miceliar. Por otro lado, el dicarion DJS₂ que presentó el mayor crecimiento miceliar, se puede considerar idóneo con fines de productividad.

Asimismo, los diámetros observados en los dicariones DJS, fueron superiores a los reportados para dicariones de la cepa IE-11 (*P. djamor*) de origen guatemalteco pero registrada en México, pero similares a los diámetros de los dicariones de las cepa IE-121 (Cuba) y de la cepa IE-145 (México) (24).

En la producción de cuerpos fructíferos a nivel de módulo artesanal, los valores de eficiencia biológica obtenidos para las cepas de *P. djamor* var. *djamor* cultivadas en pulpa de café, mostraron que el dicarion DJS₃ fue la única crusa que superó a los parentales así como a los otros dicariones. Sin embargo, no existió diferencia estadística significativa

entre cepas parentales y dicariones ($p > 0.05$), por lo que se infiere que todos los dicariones obtenidos son potencialmente utilizables para la producción de cuerpos fructíferos.

Basándose en los resultados obtenidos, se pudo concluir que las cepas aisladas por entrecruzamiento interespecífico presentan mayor velocidad de crecimiento miceliar que las cepas parentales; sin embargo, en cuanto a eficiencia biológica, solamente el dicarion DJS₃ superó a las cepas parentales de *Pleurotus djamor* var. *djamor*.

Por otra parte, no se encontró relación entre el crecimiento miceliar con la eficiencia biológica, ya que en la producción de cuerpos fructíferos, a nivel de módulo artesanal, los valores de eficiencia biológica de las cepas cultivadas en pulpa de café, mostraron que el dicarion DJS₃ fue el que alcanzó el mayor valor de eficiencia biológica, mientras que en crecimiento miceliar, el que alcanzó el diámetro mayor fue el dicarion DJS₂. Esta diferencia observada posiblemente sea debido a que la producción de cuerpos fructíferos no se realizó bajo condiciones totalmente controladas (24).

Por tal razón, se considera que la rápida velocidad de crecimiento de las cepas en caja de petri no necesariamente se relaciona con su habilidad para degradar determinado sustrato para la producción de basidiomas, tal como ha sido sugerido por Salmenes y cols. (24).

Al comparar estos resultados con estudios en otros países, se observó que los valores de eficiencia biológica encontrados en este estudio fueron menores a los reportados para las cepas mexicanas IE-116, IE-153 y a algunas cruas obtenidas a partir de éstas, cultivadas en paja de cebada (39).

Con respecto al tamaño de las fructificaciones, las cruas presentaron tamaños similares con las parentales en pulpa de café; por el contrario, el dicarion DJS₄ produjo basidiomas de menor tamaño, lo que se correlaciona con la baja productividad de esta cepa, comparada con los demás dicariones.

Por otro lado, tomando en cuenta que las cepas fueron evaluadas por separado y bajo condiciones ambientales de cultivo artesanal, se asume que la disminución en la productividad de algunas cruzas se debió a factores genéticos y ambientales, por la heterogeneidad de alelos presentes en el proceso de selección y la gran variabilidad en la temperatura y humedad en los módulos de producción de basidiomas. El efecto de estos parámetros afecta la producción y tamaño de los cuerpos fructíferos tal como reporta Salmones y cols. (24).

En conclusión, se indica que el dicarion DJS_3 es una cepa promisorio para cultivo a nivel artesanal aunque no haya existido diferencia significativa entre la eficiencia biológica obtenida en pulpa de café, con respecto a las cepas parentales.

X. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 27 monocariones de las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor*, 15 de la cepa 70.03 (monocariones JH) y 12 de la cepa 01.06 (monocariones SS).
2. De los monocariones JH, el mayor crecimiento miceliar en los monocariones lo obtuvo el aislamiento JH₃ (71.8 mm), seguido del JH₅ (70.8 mm), JH₇ (70.4 mm) y JH₂ (70.0 mm).
3. De los monocariones SS, el mayor crecimiento lo obtuvo el monocarión SS₁₁ (77.3mm), seguido del monocarión SS₁₂ (76.9 mm).
4. Los tipos de incompatibilidad presentes en los monocariones JH fueron I, II, III y no se encontró el tipo IV y en los monocariones SS, únicamente se presentaron los tipos de incompatibilidad II, III y no se encontraron los tipos I y IV.
5. Producto de las cruzas interespecíficas, se obtuvieron cuatro cepas dicarióticas (dicariones DJS), que superaron en crecimiento miceliar a las cepas parentales.
6. El dicarión DJS₃ que superó a ambas cepas parentales en cuanto a eficiencia biológica, por lo que se considera una cepa promisoría para su cultivo a nivel artesanal.

XI.RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios posteriores con los monocariones y dicariones obtenidos en este estudio, con el fin de evaluar su productividad bajo diferentes condiciones ambientales, así como determinar su eficiencia biológica sobre diferentes sustratos.
2. Estudiar con más detalles las mejoras en cepas de entrecruzamiento respecto a su consistencia y sabor, como características adicionales que favorezcan su comercialización y aceptación por parte de los consumidores.
3. Obtener más generaciones de dicariones, con la finalidad de establecer la segregación y selección de características adecuadas para su cultivo a nivel comercial.

XII. REFERENCIAS

1. Bran, M., *et al.* Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Revista Científica de Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Edición especial, 2003; 1 (1): 5-24.
2. Guzmán, G., *et al.* Studies of the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamor* in México and in other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. *Crypt Bot* 1993; 3: 213-220.
3. Bran, M.C., *et al.* Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase I). Informe Técnico Final, Dirección General de Investigación, 2001; 73p.
4. Bran, M.C., *et al.* Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase II). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación, 2002; 68p.
5. Bran, M.C., *et al.* Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase III). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación, 2003; 60p.
6. Bran, M.C., *et al.* Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase IV). Informe de Avance. Dirección General de Investigación, 2004.
7. Alexopoulos C. *Introductory Mycology*. 4^a ed. USA: John Wiley & Sons Inc. 1996; 896p.
8. Guzmán G. Los hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción a la microbiota tropical de México. México: Instituto de Ecología, 2003; 316p.
9. Guarro J., Gené J., Stchigel A. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (3): 454-500.
10. Galagan, J., Henn, M., Cuomo, C., Birren, B. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Res* 2005; 15: 1620-1630.
11. Hawksworth, D. Pandora's mycological box: molecular sequences vs. Morphology in understanding fungal relationships and biodiversity. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 127-133.
12. Hawksworth, D. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol Res* 1991; 95 (6): 641- 655.

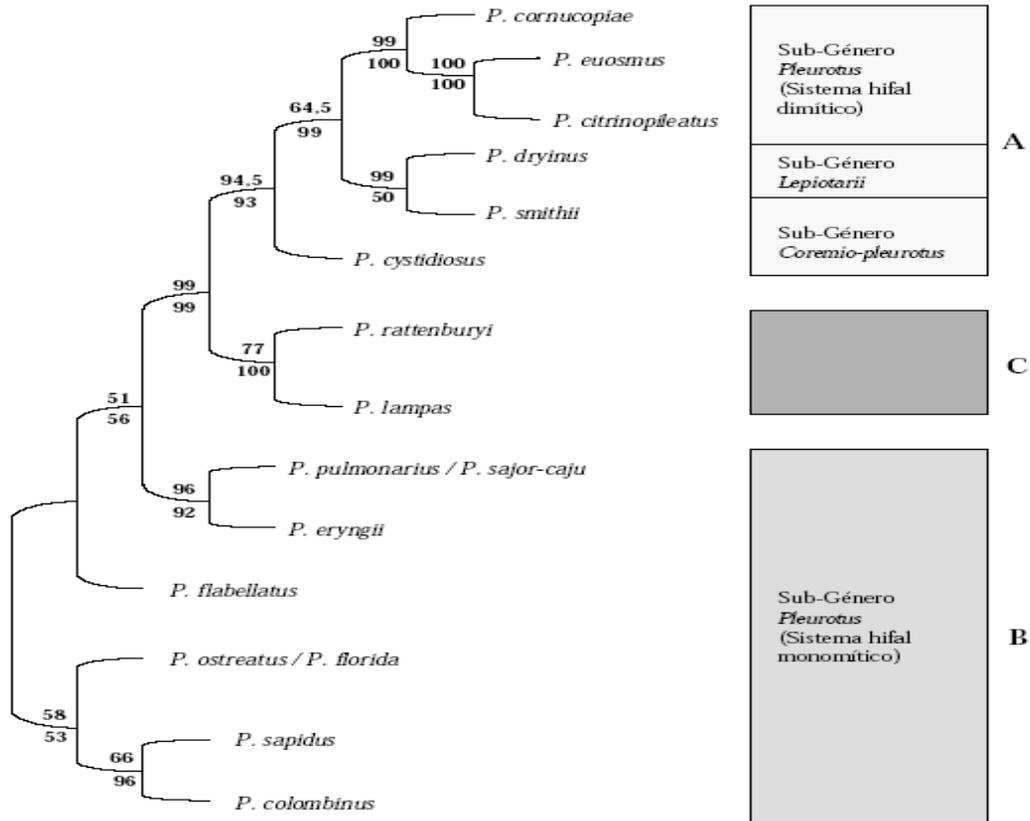
13. Hawksworth, D. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001; 105 (12): 1422-1432
14. Mueller G., et al. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. USA. 2004; 777p.
15. Chang, S.T. y P. G. Miles. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. CRC Press, Boca Raton, 2004; 451 pp.
16. Deschamps, J.R. Producción y comercialización de hongos comestibles. Orientación Gráfica. Buenos Aires, 2003; 210 p.
17. Labarére, J., Bois, F. La conservación y uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus*. Sánchez, J., Royse, D. (Eds). Editorial Limusa, México, 2001; 91-100 pp
18. Sánchez, J., Royse, D. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. Estadísticas mundiales de producción con énfasis en Hispanoamérica. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. (Eds). Editorial Limusa, México, 2001;19-26pp.
19. Ancona, L., S. Medina y G. Cetz. Preferencia en el consumo de *Pleurotus djamor* en Baca, Yucatán, México. *Rev Mex Mic* 2005; 20: 39-44.
20. Motato, K. et al. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano y aserrín como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *VITAE: Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, Colombia*, 2006; 13 (1): 45-50.
21. Martínez-Carrera, D., P. Morales y M. Sobal. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con paja de cebada o pulpa de café. *Micol Neotrop Apl* 1990; 3: 49-52.
22. De León, R. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Micol Apl Int* 2003; 15 (1): 31-35
23. Hernández-Ibarra, H., et al. Estudio de 5 cepas nativas de *Pleurotus* spp. de la región de Tapachula, Chiapas, México. *Rev Mex Mic* 1995; 11: 29-38.
24. Salmones, D., et al. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y la productividad. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 173-176.
25. Benítez Camilo, F. A., G. Huerta-Palacios y J. E. Sánchez-Vázquez. Producción de 18 cepas de *Pleurotus djamor* del Soconusco, Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas* 1998; 1: 25-36.

26. Vogel, F. Salmones, D. Análisis comparativo de cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas en una planta comercial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 138-141.
27. De León, R., *et al.* Coffee byproducts and citronella bagasse as substrate for *Pleurotus* production. *Mush News Trop* 1983; 4 (1): 13-16.
28. Bran, M. *et al.* Producción de inóculo de cepas nativas de hongos comestibles, para estimular el cultivo en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización. Informe técnico final. Dirección General de Investigación. 2005; 28p.
29. Guzmán, G., L. Montoya, D. Salmones y V. M. Bandala. Studies of the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamor* in Mexico and in other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi industrial culture. *Crypt Bot* 1993; 3: 213-220.
30. Nicholl, D.B. Phenetic plasticity in *Pleurotus djamor*. *Mycotaxon* 2000; 76: 17-37
31. González, P., Labarère, J. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology* 2000; 146: 209-221.
32. Lechner, B.E. *et al.* The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia* 2004; 96(4): 845-858.
33. Consensus Document on the Biology of *Pleurotus* spp. (Oyster Mushroom). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 34 ENV/JM/MONO(2005)17 © OECD 2005.
34. James, T.Y. *et al.* The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fun Gen Biol* 2004; 41: 813-825.
35. Labarère, J. Métodos de la genética aplicada a la obtención y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. *Boletín de la Asociación Española de Cultivadores de Champiñón*. 1994; 9- 15.
36. Vega, A. *et al.* Cultivo de cepas nativas de *Pleurotus djamor* en Panamá, en paja de arroz y pulpa de café. *Rev Mex Mic* 2006; 23: 93-97.
37. López, C. E. *et al.* Cultivo de *Pleurotus djamor* en condiciones de laboratorio y en una casa rural tropical. *Rev Mex Mic* 2005; 21: 34-97.
38. Lechner, B.E. *et al.* Presence of *Pleurotus ostreatus* in Patagonia, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 111-114

39. Salmenes, D., L. Mestizo Valdéz y R. Gaitán-Hernández. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin. Rev Mex Mic 2004; 18: 21-26
40. Mier T., Toriello C., Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. 1ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México 2002. p 34.
41. Sánchez, J. Crecimiento y fructificación. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus*. Sánchez, J., Royse, D. (Eds). Editorial Limusa, México, 2001; 294p, p59.
42. Lechner, B. *et al.* The genus *Pleurotus* in Argentina: mating test. Sydowia 2005; 57 (2): 233-245.
43. Petersen, R. Contributions of mating studies to mushrooms systematic. Can J Bot 1995; 73 (1): 831-842.

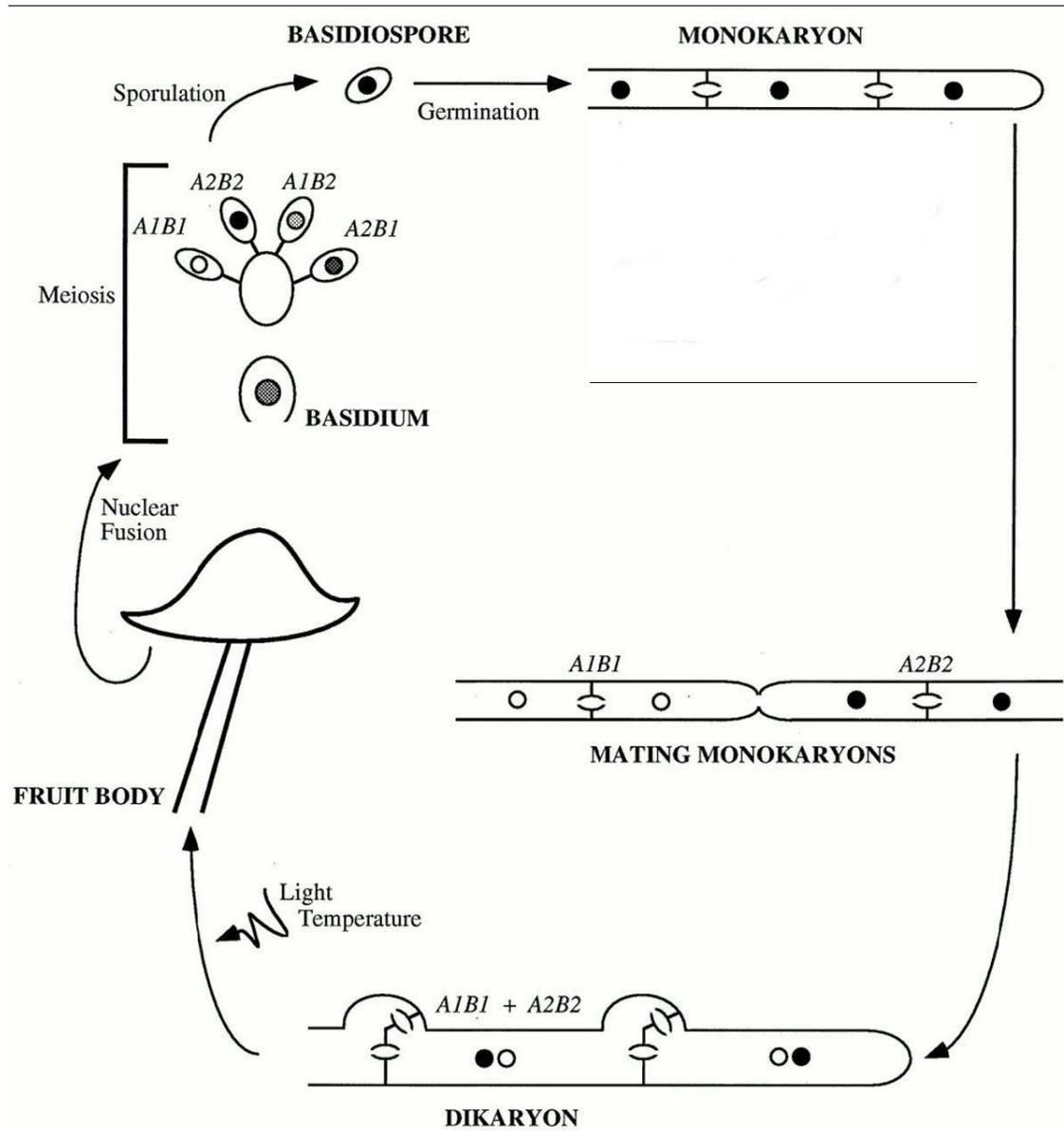
XIII. ANEXOS

Anexo 1. Relaciones entre 16 aislados de *Pleurotus* spp. basadas en las secuencias de los dominios variables mitocondriales V4, V6 y V9. Este árbol fue construido usando el método UPGMA. Los grupos y subgrupos fueron definidos según Singer (1986).



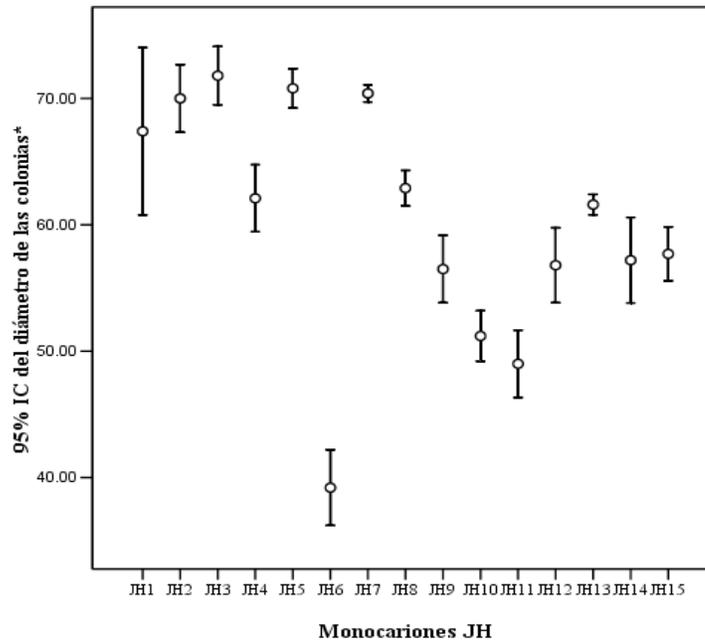
Tomado de: Lechner, B.E. *et al.* The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia* 2004; 96 (4): 845-858.

Anexo 2. Ciclo de Vida de *Pleurotus* spp. (33)



Tomado de: Consensus Document on the Biology of *Pleurotus* spp. (Oyster Mushroom). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 34 ENV/JM/MONO(2005)17 © OECD 2005.

Anexo 3. Crecimiento micelial de los monocariones JH.

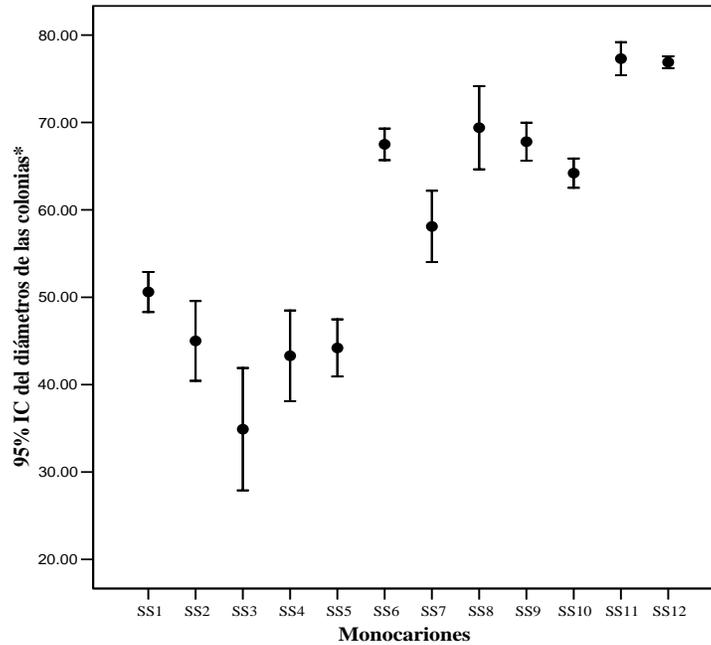


Anexo 4. Prueba de ANOVA de los efectos inter-sujetos en el crecimiento micelial de los monocariones JH.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	5997.347 ^a	14	428.382	81.961	0.000
Intersección	272767.053	1	272767.053	52187.574	0.000
Monocariones JH	5997.347	14	428.382	81.961	0.000
Error	313.600	60	5.227		
Total	279078.000	75			
Total corregida	6310.947	74			

^a. R cuadrado = 0.950 (R cuadrado corregida = 0.939)

Anexo 5. Crecimiento miceliar de los monocariones SS.

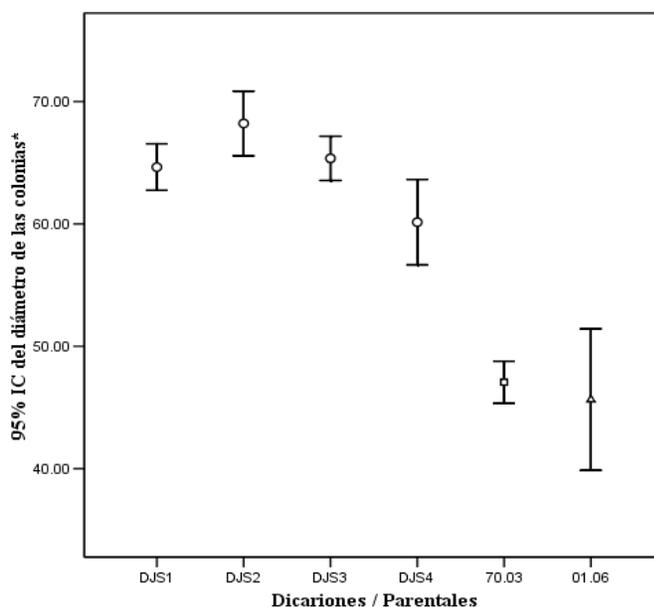


Anexo 6. Prueba de ANOVA de los efectos inter-sujetos en el crecimiento miceliar de los monocariones SS.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	11237.233 ^a	11	1021.567	113.245	0.000
Intersección	203700.267	1	203700.267	22581.092	0.000
Monocariones SS	11237.233	11	1021.567	113.245	0.000
Error	433.000	48	9.021		
Total	215370.500	60			
Total corregida	116670.233	59			

^a. R cuadrado = 0.963 (R cuadrado corregida = 0.954)

Anexo 7. Crecimiento miceliar de las cepas parentales y dicariones DJS.



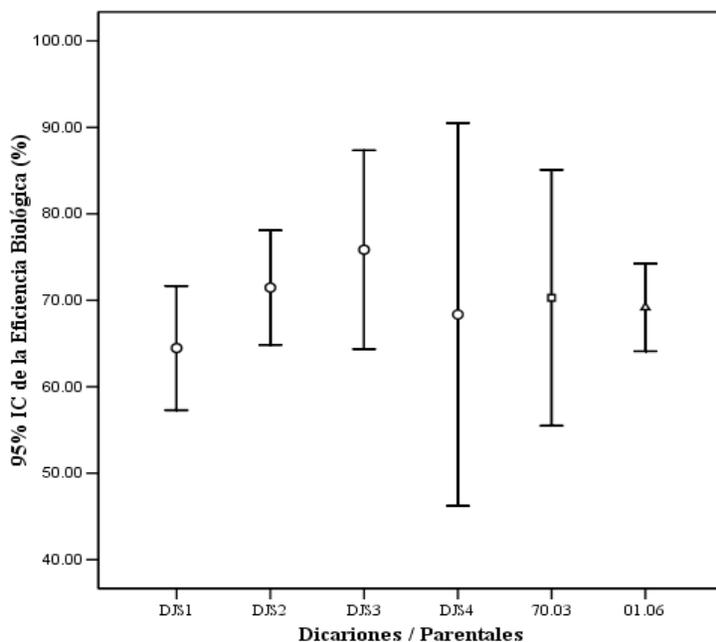
Anexo 8. Prueba de ANOVA de los efectos inter-sujetos en el crecimiento miceliar de los dicariones DJS y cepas parentales.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	3344.173 ^a	5	668.835	54.964	0.000
Intersección	143793.006	1	143793.006	11816.676	0.000
Dicariones DJS y cepas parentales	3344.173	5	668.835	59.964	0.000
Error	438.071	36	12.169		
Total	147575.250	42			
Total corregida	3782.244	41			

^a. R cuadrado = 0.884 (R cuadrado corregida = 0.868)

VAR00002 (variable dependiente) = crecimiento miceliar, VAR00001 = dicariones y parentales

Anexo 10. Eficiencia biológica de los dicariones y cepas parentales.



Anexo 9. Prueba de ANOVA de los efectos inter-sujetos en la eficiencia biológica de los dicariones DJS y cepas parentales.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	320.633 ^a	5	64.127	0.608	0.694
Intersección	140846.629	1	140846.629	1335.825	0.000
Dicariones DJS y cepas parentales	320.633	5	64.127	0.608	0.694
Error	2425.073	23	105.438		
Total	145334.726	29			
Total corregida	2745.706	28			

^a. R cuadrado = 0.117 (R cuadrado corregida = - 0.075)