

Determinación de patrones genéticos de cepas
parentales e híbridas de *Pleurotus spp.*

PRESENTA: MORALES BAJIO VERENICE

Director: Dr. Gustavo Valencia del Toro
Co-Director: Dr. Enrique Durán Páramo

México, D. F. Junio 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 13:00 horas del día 24 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI para examinar la tesis titulada:

"Determinación de patrones genéticos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp*"

Presentada por la alumna:

MORALES
Apellido paterno

BAJIO
Apellido materno

VERENICE
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	8	3
---	---	---	---	---	---	---

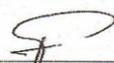
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

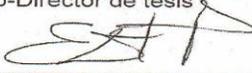
LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis



Dr. Gustavo Valencia del Toro

Co-Director de tesis



Dr. Enrique Durán Páramo



Dr. Jorge Yáñez Fernández



Dr. Claudio Garibay Orijel

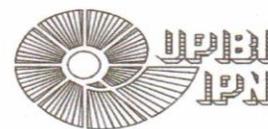


Dr. Fabián Robles Martínez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO



Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 19 del mes de Julio del año 2011, la que suscribe Verenice Morales Bajio alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091483, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Gustavo Valencia del Toro y codirección de Dr. Enrique Durán Páramo y cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación de patrones genéticos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.*", a Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo son el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gvoaltor@yahoo.com.mx, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Verenice Morales Bajio

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Verenice Morales Bajo



Vo. Bo. del director de tesis.

“Yo Gustavo Valencia del Toro declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

1.- Resumen

La producción de hongos comestibles registró un incremento anual de 6.2 millones de toneladas mundiales para el 2004, de las cuales 38,708 toneladas fueron producidas en México lo que constituye un 59% del total de la producción de los países latinoamericanos, por lo que nuestro país era considerado el 18° productor de hongos frescos a nivel mundial. Actualmente el país ocupa el 20 lugar en producción mundial de hongos comestibles y el 1° en Latinoamérica con el 60% de la producción total. La producción comercial de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47,468 toneladas anuales. Para la producción de *Pleurotus* se requiere incrementar el número de cepas fúngicas cultivables mediante el desarrollo de programas de hibridación eficaces y de conservación de su germoplasma.

En esta tesis se obtuvieron cepas híbridas de *Pleurotus spp.* por apareamiento de neohaplontes compatibles, los cuales fueron obtenidos por el proceso de desdicarización química, para ello se emplearon dos cepas parentales blancas, IE200 y CP253. Se realizó la recuperación de los neohaplontes para cada una de las cepas. Se cultivaron en paja las cepas híbridas y parentales y se determinaron los parámetros: Tasa de Producción (%TP), Eficiencia Biológica (%EB) y rendimiento (%R), para todas las cepas. Se realizó la extracción de ADN_g de las cepas empleadas por medio de un kit de extracción para plantas. Los resultados de la extracción fueron observados en un gel de agarosa al 0.7%. Se realizaron PCR-RAPD'S para evaluar los patrones genéticos generados a partir de la extracción de ADN_g del micelio de las cepas utilizadas. A través del software NTSYS se elaboraron los fenogramas correspondientes. La recuperación de los neohaplontes de las cepas parentales fue simétrica, obteniéndose los dos componentes monocarióticos de cada cepa trabajada. Se formaron las cepas híbridas IEC1, IEC2, IEC3 e IEC5, esta última cepa presentó la mayor %EB (79.34%), mientras que las cepas parentales tuvieron eficiencias entre 90.55% y 77.60% para las cepas CP253 e IE200 respectivamente. Se logró obtener ADN_g de las cepas trabajadas, las cuales se observaron en un gel de agarosa, en donde se observa que el ADN se encuentra por encima de los 23,130 pb. Posteriormente se realizaron PCR-RAPD's en donde se obtuvieron 129 bandas empleando 10 primers, de los cuales se construyeron los fenogramas típicos de dos de ellos (OPG-5 y OPF-9) y un fenograma general.

1.1.- ABSTRACT

Edible mushroom production registered an annual increase of 6.2 million tons worldwide in 2004, of which 38.708 tons were produced in Mexico which is 59% of the total production of the Latin American countries, so that our country was considered the 18 th producer of fresh mushrooms worldwide. The country currently occupies 20 place in world production of edible mushrooms and 1 in Latin America with 60% of total production. The commercial production of edible mushrooms in Mexico offers significant social benefits, economic and ecological. It is estimated that commercial production is about fresh 47.468 tons. For the production of *Pleurotus* is required to increase the number of fungal strains cultivated through the development of effective breeding programs and conservation of germplasm. In this thesis were obtained hybrid strains of *Pleurotus* spp. neohaplontes by mating compatible, which were obtained by chemical desdicariorización process and for this we used two parental strains white IE200 and CP253. We performed neohaplontes recovery for each of the strains. Straw were cultured hybrid and parental strains and determined the parameters: Production Rate (% TP), biological efficiency (% EB) and performance (% R) for all strains. We performed the extraction of gDNA from strains used by a plant extraction kit. The extraction results were observed in agarose gel 0.7%. RAPD-PCR were performed to evaluate'S genetic patterns generated from the extraction of gDNA from the mycelium of the strains used. Through the NTSYS software were developed for phenograms. The recovery of the parental strains neohaplontes was symmetrical, the two components obtained from each strain monocarióticos worked. Hybrid strains were formed IEC1, IEC2, and IEC5 IEC3 latter strain had the highest% EB (79.34%), while the parental strains were between 90.55% and efficiency 77.60% for strains CP253 and IE200 gDNA was achieved respectively worked strains, which were observed in an agarose gel, where it notes that the DNA is in excess of 23.130 bp. Subsequently performed PCR-RAPD's where 129 bands were obtained using 10 primers, which were built phenograms typical two (OPG-5 and OPF-9) and a phenogram general.

CONTENIDO

1.- Resumen	5
1.1.- ABSTRACT.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
Índice de cuadros	9
2.- INTRODUCCIÓN.....	10
2.1.- Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	10
2.2.-Importancia alimentaria	12
2.3.- Valor nutricional.....	14
2.4.- Métodos de monocariotización de hongos	15
2.5 El proceso de hibridación.	17
3.- ANTECEDENTES	19
3.1.- Técnica de PCR	21
3.2.- Técnica de PCR-RAPD.....	24
3.3.- Mejoramiento genético de <i>Pleurotus</i>	26
4.- JUSTIFICACIÓN	28
5.- OBJETIVOS.....	29
5.1.- General.....	29
5.2.- Específicos.....	29
6.- METODOLOGÍA	30
6.1.- Medios de cultivo.....	31
6.1.1.- Medio Extracto de Malta-Agar (EMA).....	31
6.1.2.- MEDIO LÍQUIDO	31
6.2.- Reactivación de cepas.....	31
6.3.- Desdicariotización química	31
6.4.- Formación de cepas híbridas	32
6.5.- Inóculo-grano a partir de micelio crecido en medio sólido.	33
6.6.- Preparación de sustrato.....	33
6.7.- Obtención de cuerpos fructíferos.....	33
6.8.- Determinación de parámetros de productividad	34
6.9.- Obtención de micelio en medio líquido.....	34
6.10.- Extracción de ADN _g	34
6.11.- Electroforesis en gel de agarosa	36
6.12.- Determinación de pureza y concentración del DNAG.....	37
6.13.- Determinación de patrones genéticos.....	37

7.- RESULTADOS	39
7.1.- Reactivación de cepas	39
7.2.- Desdicariorización química	40
7.3.- Formación de cepas híbridas	41
7.4.- Obtención de micelio en medio líquido.....	42
7.5.- Fructificación de cepas híbridas.....	43
7.6.- Extracción de ADN _g	48
7.7.- Determinación de pureza y concentración del ADN _g	49
7.8.- Determinación de patrones genéticos.....	49
8.- CONCLUSIONES	59
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	11
Figura 2. Ciclo sexual de <i>Pleurotus spp.</i>	12
Figura 3. Representación esquemática de la región del ITS del ribosoma nuclear de <i>Ganoderma</i> . 22	
Figura 4. Diagrama de bloques de los procedimientos realizados.....	30
Figura 5. Arreglo para la hibridación de micelios monocarióticos de cepas de <i>Pleurotus</i>	32
Figura 6. Condiciones de operación del equipo de PCR-RAPD.....	38
Figura 7. Cepas parentales viables para el estudio (a) IE200 y (b) CP253.....	40
Figura 8. Cepas parentales e híbridas inoculadas en sustrato trigo	44
Figura 9. Cuerpos fructíferos de las cepas parentales y las cepas híbrida	45
Figura 10. Gel de agarosa al 0.7% de cepas de <i>Pleurotus spp.</i>	48
Figura 11. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de ADN por medio de PCR-RAPD..	51
Figura 12. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de ADN de cepas de <i>Pleurotus spp.</i> por PCR-RAPD.	52
Figura 13. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de bandas de ADN de <i>Pleurotus spp</i> por PCR-RAPD..	53
Figura 14. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandeo de PCR-RAPD del oligonucleótido OPG-5 de las cepas empleadas en esta tesis.	55
Figura 15. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandeo de PCR-RAPD del oligonucleótido OPF-9 de las cepas empleadas en esta tesis.....	56
Figura 16. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandeo de PCR-RAPD analizando los diez iniciadores y las cepas empleadas en esta tesis.....	57

Índice de cuadros

Cuadro 1. Importancia comparativa de los hongos comestibles cultivados en México, en relación con los volúmenes de producción (toneladas) de algunos productos agrícolas, convencionales y orgánicos.	14
Cuadro 2. Comparación de los constituyentes alimenticios de <i>Pleurotus</i> con los aportados por otros alimentos convencionales.	15
Cuadro 3. Métodos utilizados para monocariotizar hongos.	17
Cuadro 4. Material biológico de <i>Pleurotus</i> utilizado.	30
Cuadro 5. Material biológico empleado en esta tesis.	31
Cuadro 6. Componentes del kit ChargeSwitch [®] gDNA plan kit.	35
Cuadro 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR-RAPD, se muestra temperatura óptima y el porcentaje de Guanina y Citosina y la secuencia de bases (empresa Operon Technologies).	38
Cuadro 8. Cepas parentales (dicarióticas) empleadas a lo largo de la tesis.	39
Cuadro 9. Recuperación de neohaplontes de cepas de <i>Pleurotus spp.</i>	41
Cuadro 10. Resultados del entrecruzamiento de micelio monocariote para obtener cepas híbridas.	41
Cuadro 11. Cepas híbridas de <i>Pleurotus spp.</i>	42
Cuadro 12. Determinación de peso húmedo de las cepas parentales e híbridas sometidas a condiciones de crecimiento diferentes.	43
Cuadro 13. Valor promedio del %EB, %TP, %R para las cepas parentales e híbridas se incluye el Error Estándar de la Media (ESM).	46
Cuadro 14. Densidades ópticas de cepas de <i>Pleurotus spp.</i>	49

2.- INTRODUCCIÓN

El reino fungi está formado de dos subdivisiones naturales (Myxomycota y Eumycota) y una división artificial de líquenes (que incluye a organismos mixtos constituidos por algas y hongos, asociados simbióticamente), a los hongos pertenecientes a la división Eumycota se les conoce como hongos verdaderos o perfectos y se subdividen en cuatro grupos: Phycomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota (Herrera y Ulloa, 1998).

Diversos hongos comestibles pertenecen a la división Basidiomycota. Son conocidos como basidiomicetos debido a sus estructuras de reproducción sexual. Estas estructuras son protuberancias que contienen 4 esporas cada una. Los basidiomicetos tienen gran relevancia en la vida humana y para el medio ambiente, puesto que presentan características alimenticias, medicinales y saprófitas (Prescott, 2002).

Los basidiomicetos incluyen sólo géneros macroscópicos como *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agaricus*, *Amanita*, entre otros y es en esta subdivisión donde se encuentran agrupados la mayoría de los hongos comestibles. Los basidiomicetos poseen hifas septadas, su reproducción puede ser sexual o asexual y sus cuerpos fructíferos se conocen como basidiomicetos (Herrera y Ulloa, 1998).

2.1.- Ciclo de vida del género *Pleurotus*

Para poder desarrollar un programa que sea eficiente para el mejoramiento genético entre hongos comestibles, es importante tomar en cuenta los procesos celulares, genéticos, ambientales y fisiológicos que determinan la inducción y desarrollo de sus cuerpos fructíferos, por ello resulta imprescindible conocer su ciclo biológico con la finalidad de tener mayores elementos para mejorar su cultivo y a partir de bases más sólidas para el desarrollo de programas de mejora genética. En el ciclo de vida de los basidiomicetos, se presentan tres fenómenos importantes que se muestran en la figura 1, se describen a continuación (Moore-Landecker, 1996; Herrera y Ulloa, 1998):

1.-Plasmogamia o anastomosis: Es el nombre que se le da cuando se lleva a cabo la fusión de dos células del micelio que se aparean (compatibles), a través de la cual los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común. La célula que se encuentra en estado haploide transcurre al estado dicariótico.

2-Cariogamia: Es el fenómeno de fusión de los núcleos, donde la célula en estado dicariótico (con juego $n+n$ de cromosomas) transcurre al estado diploide (con un nuevo juego $2n$ de cromosomas).

3.-Meiosis: Es el último fenómeno que ocurre en el ciclo vital y describe la división nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide ($2n$) al estado haploide (n). (Herrera y Ulloa, 1998).

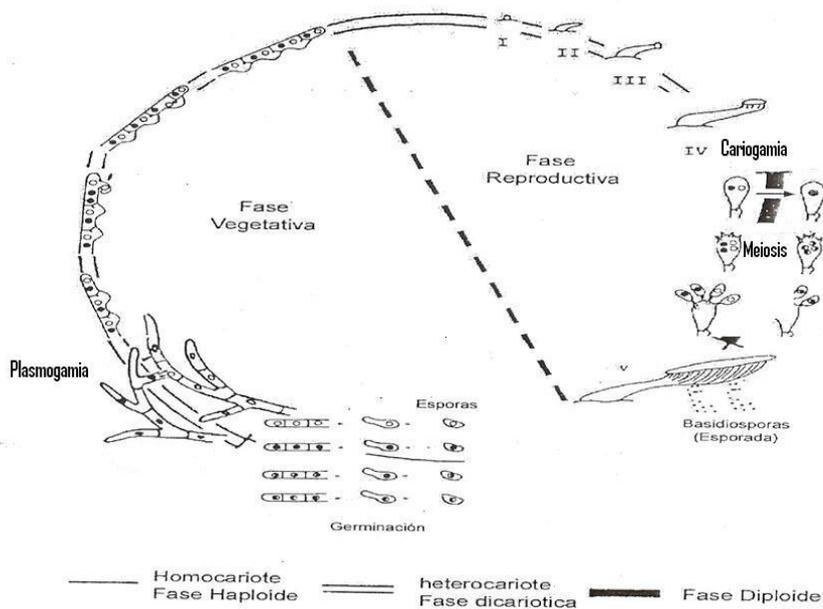


Figura 1. Ciclo de vida de *Pleurotus* (Tomado de Valencia del Toro, 2002).

De manera general, durante el ciclo biológico de *Pleurotus*, presentan tres fases del desarrollo micelial correspondientes a los tipos primario, secundario y terciario. El micelio primario se forma a partir de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas en estado haploide cuyo único núcleo en cada compartimiento celular se encuentra separado por una estructura denominada septo o doliporo. El micelio secundario por su parte consta de células binucleadas o dicarióticas, se deriva del micelio primario y se caracteriza por la presencia de fíbulas (estructuras que permiten la migración nuclear entre hifas en proceso continuo de elongación) y finalmente, el micelio terciario se origina a partir del micelio secundario, se encuentra organizado en tejidos especializados que forman los cuerpos fructíferos y es el tipo de micelio característico en la

reproducción sexual de este basidiomiceto (Koltin y col., 1972; Guzmán y col., 1993; Herrera y Ulloa, 1998).

En la Figura 2, se muestra el ciclo reproductor de *Pleurotus*. La fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denominan haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se llaman diploides. En el caso de *Pleurotus*, la cariogamia no se lleva a cabo de manera inmediata a la plasmogamia de tal forma que se produce una fase dicariótica o dicariofase en la cual, se obtiene una célula denominada dicariótico o dicariote misma que posee dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad y cada uno de ellos se conoce como dicarión (Herrera y Ulloa, 1998).

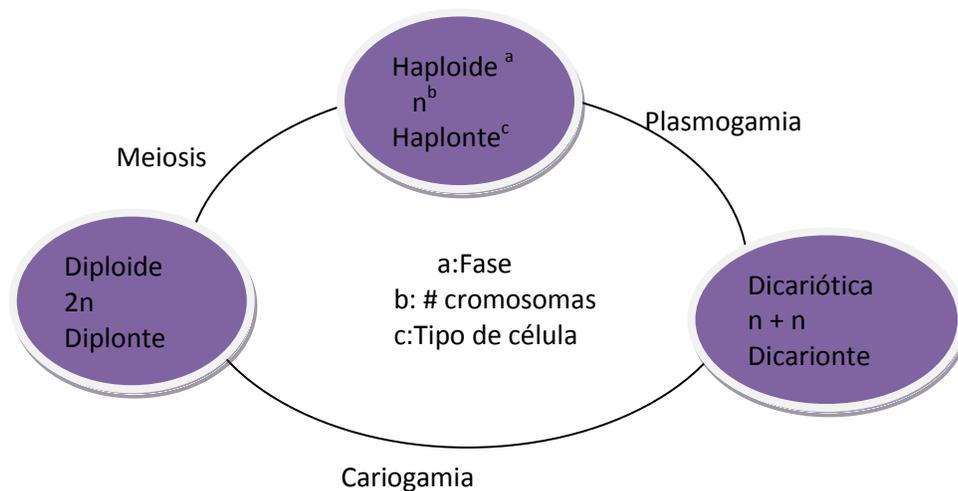


Figura 2. Ciclo sexual de *Pleurotus* spp.

2.2.-Importancia alimentaria

El consumo de alimentos naturales no sólo de buen sabor, sino también inocuos, nutritivos y con propiedades benéficas para la salud, representa la gran tendencia mundial de la alimentación humana en el siglo XXI. Tan sólo en los E.U.A., la demanda de productos orgánicos, suplementos alimenticios y medicinales se ha incrementado de \$ 3.3 a 14 billones de dólares durante el período 1990-2000, mientras que en el año 2002, fue de \$ 20.52 billones de dólares, lo cual indica el incremento en el consumo de hongos comestibles (Martínez-Carrera, 2002). Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47, 468 toneladas anuales (Mora y

Martínez-Carrera, 2007). Lo anterior nace de la confirmación de un principio fundamental y universal: la dieta humana debe ser completa, suficiente, equilibrada y que garantice una completa satisfacción biológica, psicológica y social. La mayoría de las personas consume hongos comestibles por su excelente sabor, aroma, y textura. Sin embargo, es poco conocido su gran potencial como alimento funcional con propiedades nutricionales y medicinales que promueven la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos ampliamente consumidos, ya que los hongos constituyen un reino de la naturaleza independiente de las plantas y los animales (Martínez-Carrera y *col.*, 2007).

La producción mundial supera los 7 millones de toneladas de hongos comestibles cultivados frescos por año, cuyo valor económico aproximado supera los 30 billones de dólares. La tasa promedio de incremento anual en la producción de hongos es superior al 11%. También se han descubierto notables propiedades medicinales en estos hongos (anti cancerígenas, antibióticas, que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión, anti trombóticas, antidiabéticas), lo cual ya brinda un impulso adicional al desarrollo de este campo. Se ha estimado que se generan operaciones comerciales de alto valor agregado superiores a los 3.6 billones de dólares en los mercados internacionales de la industria alimenticia, farmacéutica, de perfumería y cosméticos, observándose una creciente demanda en Europa, Norteamérica y Japón.

En el 2006, se estima que más de 10 millones de toneladas métricas de hongos comestibles y medicinales fueron producidos (Fan y *col.*, 2006). A nivel mundial, el champiñón (*Agaricus*) es el hongo comestible más importante con un nivel de producción superior a los 2 millones de toneladas métricas anuales, seguido por el *shiitake* (*Lentinula*) con más de 1.5 millones de toneladas, y las setas (*Pleurotus*) con alrededor de un millón de toneladas. La importancia ecológica de esta actividad radica en la utilización y reciclaje acelerado de millones de toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales utilizados como substrato de cultivo (Chang, 1999a; Kues y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004, Martínez-Carrera y *col.*, 2007). En la cuadro 1, se muestra la producción de los hongos comestibles tomando como base otros productos agrícolas.

Cuadro 1. Importancia comparativa de los hongos comestibles cultivados en México, en relación con los volúmenes de producción (toneladas) de algunos productos agrícolas, convencionales y orgánicos.

PRODUCTO	AÑO (TON)		
	1995	2001	2004
Hortalizas	59,183	83,527.11	62,487.34
Hortalizas (orgánico)	-	113.87	7.5
Tomate cherry	5,761	28,589.05	54,592.17
Tomate cherry (orgánico)	-	4,487.93	683.5
Tomate rojo (jitomate orgánico)	-	-	3,800
chícharo	39,894	48,014.78	53,717.33
Chícharo (orgánico)	-	385.17	336.25
Ajo	43,761	55,558.80	47,917.57
Ajo (orgánico)	-	206.75	106.99
Hongos comestibles cultivados	27,825	38,708	47,468
Cacao	49,425	46,737.65	43,974.52
Café cereza	1,725,960	1,645,821.86	1,665,406.18
Café cereza (orgánico)	-	-	31,571.36

*SAGARPA, 2005 (http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html).

2.3.- Valor nutricional

El género *Pleurotus* constituye una buena fuente de nutrientes, sin embargo la composición química de los cuerpos fructíferos, depende básicamente del tipo de cepa, la composición del sustrato, las técnicas del cultivo, así como la edad y la etapa del desarrollo del hongo (Cardona, 2001; Moda y col., 2005).

Diversas investigaciones han demostrado que el género *Pleurotus* presenta un amplio intervalo de humedad (73.3%-93%), alto contenido de proteína en los hongos comestibles (19-35% en base seca), así como concentraciones significativas de aminoácidos esenciales, principalmente de lisina, leucina, metionina y triptófano. También son ricos en vitaminas, tales como la tiamina (0.35-7.8 mg/100 g de hongos secos), y ácido ascórbico (1.4-9.4 mg/ 100g de hongos secos). Su contenido de grasas (1.1-8.3% en base seca), carbohidratos (46.6-81.8% en base seca), y fibra dietética (10-50%) es relativamente bajo (Chang y Miles, 1989; Wasser y Weis, 1999; Valencia del Toro y col., 2006). En el cuadro 2 se equiparan los componentes de *Pleurotus* con los de otros alimentos convencionales.

Cuadro 2. Comparación de los constituyentes alimenticios de *Pleurotus* con los aportados por otros alimentos convencionales.

Constituyentes presentes en <i>Pleurotus</i>	Comparación con otros alimentos
Humedad (73.3%)	Análogo al contenido en hortalizas
Proteínas (10.5-35%)	Dato significativo al comparar con Arroz (7.3%), leche (25.2%) y trigo (32.2%)
Grasas (1.08%-9.4%)	Altamente elevadas comparada al contenido en vegetales
Ácidos nucleicos (2.46-2.91%)	Comparado con cereales (4%) y carne de pescado ((2.2 – 5.7%)

Valencia del Toro y col., 2000.

2.4.- Métodos de monocariotización de hongos

A lo largo del tiempo la disociación de los dicariotes en monocariotes ha sido repetidamente obtenida por tratamientos mecánicos y/o químicos. Harder en 1927 introdujo la micro-operación, solo un bajo porcentaje de células sobrevivieron y un tipo de núcleo fue recuperado en de las especies trabajadas. Ginterová en 1973 observó que en un cultivo de *Pleurotus ostreatus* sumergido en agitación, un núcleo fue eliminado. Wessel en 1976 encontró que en los protoplastos del dicarion *Schizophyllum commune* se revirtieron en micelio dicariótico en un 20% a 40 %. Milles y Raper en 1956, utilizaron taurocolato de sodio y ácido cólico en varias cepas de las cuales 13 fueron de basidiomicetos, en donde se logró la separación de un núcleo de las cepas trabajadas. Takemaru en 1964, confirmó el efecto del colato de sodio en la monocariotización de 4 especies de hongos, cada una requirió diferentes concentraciones. Se obtuvo un alto nivel de selección nuclear. Sin embargo, ninguno de los métodos ni compuestos químicos antes mencionados presentó un buen efecto en la monocariotización.

Los primeros experimentos de desdicariotización química se llevaron a cabo utilizando sustancias altamente tóxicas, como desoxicolato de sodio o ácido cólico, las cuales al inhibir el desarrollo micelial requerían periodos de incubación muy largos para el logro de la desdicariotización, obteniéndose en la mayoría de los casos una recuperación no simétrica (Milles y Raper, 1956).

Leal-Lara (1980) desarrolló un nuevo método de desdicariotización química, con el cual logró recuperar los dos componentes monocarióticos (neohaplontes) de un dicarion en una pequeña muestra de 5 a 10 fragmentos miceliares. El método fue simple y rápido. El micelio visible pudo

obtenerse en aproximadamente una semana, en comparación con 6 a 16 semanas de incubación por los métodos previos, los cuales permitían la recuperación de un solo componente nuclear. El método fue probado con un total de 14 cepas (incluyendo dos mutantes) de 5 especies de basidiomicetos. En todos los casos los componentes nucleares fueron recuperados simétricamente en un estado inalterado, aun en una muestra tan grande de 1018 neohaplontes de la cepa dicariótica *Pleurotus ostreatus* "42x11". Este método no utilizó compuestos tóxicos para la desdicarización, sino soluciones de glicina pobres en fosfato y magnesio.

Leal-Lara y Eger-Hummel en 1982 implementaron el método de desdicarización química, utilizando soluciones no tóxicas de glucosa-glicina y glucosa-peptona, lo cual permitió detectar que la utilización glucosa-peptona proporcionaba la recuperación simétrica de las cepas trabajadas, de una forma más eficiente.

Arias en 1998, seleccionó 7 cepas de *Pleurotus ostreatus* que presentaron un rendimiento máximo significativo en un lapso de tiempo corto, con altos rendimientos y esporóforos más grandes, y logró la desdicarización de 6 de ellas, aunque no fue posible obtener de forma simétrica los dos componentes monocarióticos. Con los neohaplontes de estas cepas se realizaron apareamientos monocarión-monocarión, lográndose la formación de 13 híbridos. En el Cuadro 3, se muestran los métodos utilizados para obtener monocariontes, así como también los problemas que se presentan en las células que se obtienen. En el 2007, Ramírez-Carrillo y *col.*, emplearon el método de desdicarización química para la obtención de componentes monocarióticos de cepas de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*, logrando obtener 34 cepas híbridas obtenidas por apareamiento de progenie monocariótica o neohaplontes, las cuales tuvieron fructificación en sustrato paja.

En otro estudio realizado por Ramírez-Carrillo y Leal-Lara (2002), lograron la obtención de componentes monocarióticos de *Lentinula edodes*, por medio del proceso de desdicarización química, en donde se logro la recuperación simétrica de los componentes monocarióticos. En este mismo trabajo, se observo la resistencia que tienen ciertas cepas de *L. edodes*, ya que no sobrevivían cuando se sometían al proceso por más de 25 s., sin embargo en el caso de *Pleurotus* se han obtenido buenos resultados sometiendo las cepas hasta 60 s.

Cuadro 3. Métodos utilizados para monocariotizar hongos.

Método	Características	Año	
Químico ^a	Taurocolato de sodio /ácido cólico	Efecto en muy pocas especies Alto nivel de selección nuclear.	1956, 1963, 1964, 1967
	Poliximina	Muerte selectiva de núcleos menos resistentes.	1961
	Peptona-Glucosa ^{a,b}	No utiliza toxinas. Provee mecanismos selectivos de crecimiento de monocariontes. No existe evidencia de selección nuclear ni mutación	1963, 1982, 1998,1999, 2002
Físico ^a	Microcirugía	Bajo porcentaje de supervivencia celular. Solo un tipo nuclear recuperado.	1952 1972
	Cultivo sumergido. Regeneración de protoplastos.	Eliminación de un núcleo. Solo 20-40% de monocariosis. Variación en las propiedades biológicas (mutaciones).	1973 1976, 1985, 1994, 1999, 1002, 2003

^a Leal-Lara y Eger, 1982.

^b Arias,1998; Valencia-del Toro, 1999,2002.

^c Magae y col. 1985; Fukumasa-Nakai y col., 1994; Larraya y col., 1999,2002,2003.

La descariotización química tiene gran potencial ya que los neohaplontes obtenidos en principio contienen la información genética de los fenotipos que presenta el dicarion original. Por lo que se propone la utilización de este proceso como una herramienta para evaluar los aspectos: el efecto del citoplasma dicariótico bajo micelio monocariótico, la recombinación somática, la estabilidad del componente nucleico en dicariones y para la identificación de especies estériles en pruebas de interesterilidad. Además presenta la ventaja de reducir el tiempo requerido para aislar los genotipos de las cepas dicarióticas, debido a que no es necesario producir los cuerpos fructíferos para obtener las progenies (Valencia del Toro, 2003).

2.5 El proceso de hibridación.

El principal requerimiento para la hibridación, es la disponibilidad de organismos con diversidad genética y la extinción de una especie fúngica puede significar la pérdida de un gran número de genes únicos, por lo cual, es esencial establecer un banco de germoplasma a través de la colección de aislados silvestres de cepas de hongos comestibles disponibles, las cuales difieren en características y cuyas combinaciones genéticas pueden ser obtenidas mediante cruces

convencionales o por clonación genética utilizando la tecnología del ADN recombinante. También resulta importante el estudio de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas de los hongos para determinar sus tipos de apareamiento, las eficiencias en la degradación del sustrato, las tasas de crecimiento micelial y sus parámetros de cultivo (Zervakis y Venturella, 2002).

Tomando en cuenta que la hibridación es un medio por el cual, algunas características genéticas deseadas presentes en diferentes cepas pueden ser combinadas y con ello, obtener nuevas cepas y variedades con sus características mejoradas, resulta conveniente su aplicación con la finalidad de mejorar cultivos con baja inversión (Labarére y Bois, 2001).

El método convencional para obtener cepas híbridas de *Pleurotus* consiste en fructificar las cepas que van a ser mejoradas para obtener la progenie monocariótica (llamada monospórica), producto de la meiosis de los núcleos dicarióticos y que es liberada durante el proceso de esporulación. Una vez que se obtiene la progenie monospórica, es necesario realizar apareamiento entre ellos en todas las combinaciones posibles para identificar los tipos de compatibilidad y posteriormente, se realizan cruzamientos entre micelios monocarióticos compatibles para obtener las cepas híbridas (Arias, 1998; Labarére y Bois, 2001). Este método es utilizado para el estudio del género *Pleurotus*; sin embargo, el tiempo requerido para fructificar las cepas constituye una desventaja, conjuntamente con los procesos de recombinación meiótica, estas desventajas no se presentan en el método de apareamiento de neohaplontes, el cual consiste en desdicariorizar una cepa con características deseadas para separar sus componentes monocarióticos, también llamados neohaplontes por Fries y Aschan (1952) quienes lo refieren como el micelio brinkmanni y *Fomes cajanderi* en donde los basidios se encuentran dispersos y son transmitidas directamente por el micelio y *Fomes cajanderi* ocurridas en ausencia de una dicariofase; es decir, sobre micelio monocariótico, o bien, sin una dicariofase bien definida como el caso de *Agaricus bisporus* (Koltin y col., 1972).

El método de apareamiento de neohaplontes compatibles consiste en utilizar los neohaplontes obtenidos por desdicariorización química de una cepa con características deseadas para realizar cruzamientos con neohaplontes obtenidos de otra cepa para formar híbridos, proceso que permite obtener nuevas cepas de forma más rápida y asegurando conservar las características originales de las cepas parentales, ya que no se presenta la recombinación meiótica.

3-. ANTECEDENTES

Durante los últimos 20 años, la biotecnología moderna ha impactado notablemente la manipulación genética de diversos microorganismos, plantas y animales. Ya se comercializan organismos genéticamente modificados y existen grandes programas biotecnológicos internacionales (*e.g.*, el genoma humano, los genomas de diversas especies de interés económico) (Sierra-Galván, 2009). La falta de recursos humanos de alto nivel, así como de apoyos económicos para la operación e infraestructura, ha limitado el desarrollo de la biotecnología moderna aplicada a los hongos comestibles en los países en desarrollo, sobre todo en Latinoamérica (Martínez-Carrera, 2007). Avances en este campo demuestran la necesidad de modificar esta tendencia. Por citar sólo algunos ejemplos, se han desarrollado sistemas eficientes de transformación genética para el champiñón (*Agaricus*; Mikosch y *col.*, 2000), las setas (*Pleurotus*; Ma. y *col.*, 2004), y el shiitake (*Lentinula*; Alves de Lima y *col.*, 2001, Ramírez-Carrillo y *col.*, 2007), los hongos comestibles de mayor importancia social, ecológica y económica. Los sistemas de transformación genética están basados en marcadores genéticos dominantes de resistencia a la higromicina, la carboxina, al 5-fluoroindol, y al bialophos, así como en el uso del marcador de selección basado en auxótrofos de uracilo (Mikosch y *col.*, 2000; Honda y *col.*, 2000; Irie y *col.*, 2001).

Con el sistema de transformación basado en la resistencia a la carboxina, se ha logrado la sobre-expresión de genes recombinantes productores de enzimas degradadoras de lignina, tales como la manganeso-peroxidasa (Honda y *col.*, 2000). El ADN nuclear y el ADN mitocondrial han sido ampliamente estudiados y caracterizados en los hongos comestibles. El cariotipo electroforético ha indicado un número cromosómico de 6-13 cromosomas (Fan y *col.*, 2006), con tamaño cromosómico de 20.8-39.5 megabases (Sonnenberg, 2000). Se cuenta con un número confiable de marcadores genéticos, funcionales que se han obtenido por las técnicas: RFLPs, RAPDs, SCARs, SSRs (Iracabal y *col.*, 1995; Singh, 2006; Sanagawa y Magae, 2005). El sistema enzimático extracelular, caracterizado por la producción de lacasas, celulasas, manganeso-peroxidasas y veratril-alcohol oxidasas, ha sido ampliamente estudiado a nivel bioquímico y molecular (Martínez-Carrera, 2002; Ruiz-Dueñas y *col.*, 2001; Varela y *col.*, 2001; Whiteford y Thurston, 2000).

Desde el punto de vista genético, *Pleurotus* spp. ofrece un excelente sistema para el análisis de especiación en basidiomicetos. Por lo consiguiente, y con el fin de proveer información acerca de la relación genética dentro y entre colecciones de diferentes regiones geográficas, se han llevado a

cabo diversos estudios de incompatibilidad en el género, en especies tales como *P. ostreatus* (Terakawa, 1960; Eugenio y Anderson, 1968; Anderson y col., 1973; Manning, 1977), *P. pulmonarius* (Eger, 1978; Eger y Leal-Lara, 1979), *P. columbinus* (Anderson y col., 1991) y *P. sapidus* (Zervakis y Balis, 1995). Estos estudios han demostrado la existencia de grupos de interesterilidad y grupos que aunque morfológicamente están localizados en diferente taxa, pueden o no pertenecer a una misma especie biológica. Dichos patrones de interesterilidad (denominada “especiación”) pueden ser observados como una demarcación café-obscura en la zona de unión entre dos homocariones. Este tipo de reacción puede ser interpretada como un proceso de especiación debido a un aislamiento geográfico. En un gran número de casos se pueden observar complejos de especies o poblaciones en proceso de especiación, tales como el complejo *Armillaria mellea* (Anderson y col., 1978), el grupo *Collybia drophila* (Vilgalys y Miller, 1983; Vilgalys y Miller, 1987), *Agaricus bitorquis* (Martínez-Carrera y col., 1995), el grupo *Agaricus arverses* (Calvo-Bado y col., 2001) y en otras especies silvestres del género *Agaricus* (Moore y col., 2001).

Las variaciones morfológicas de los basidiomicetos, tienen como resultado una taxonomía confusa y las delimitaciones de las especies son difíciles (Alam y col., 2009). En algunas especies de hongos, los diseños puros de diferencias morfológicas y genéticas, que divergen en torno a la geografía de las distintas poblaciones, sugieren un modelo “alopátrico” de especiación (Vilgalys, 1991). Las características morfológicas son inadecuadas para resolver las relaciones evolutivas y sistemáticas, por lo cual la información filogénica molecular es útil para establecer un esquema taxonómico seguro para la taxa de *Pleurotus* (Zervakis y col. 2004). Estudios sobre la secuencia de ADN dado información importante para varios grupos de basidiomicetos sobre las relaciones evolutivas, la especiación en conjunto con la biogeografía (Moncalvo y col. 2000, 2002).

Se han empleado análisis filogenéticos, que usan datos de secuencias moleculares particulares, las cuales prometen resolver relaciones filogenéticas para entender la especificidad de algunas especies complejas problemáticas en los basidiomicetos, trabajando con el ADN ribosomal (ADN_r), ilustra la importancia de la biogeografía para entender la variedad en *Pleurotus* (Vilgalys y Lin Sun, 1994).

Se han desarrollado herramientas genéticas para *P. ostreatus* que han permitido el análisis del genoma y la localización de una región genómica en el cromosoma VII directamente relacionado con incrementos en la producción de *Pleurotus* (incluyendo marcadores moleculares, ligados a genes y cariotipos y mapeos genéticos). Para realizar análisis de rasgos cuantitativos se emplea el

loci de rasgos cuantitativos “Quantitative Trait Loci” (QTLs) (Larraya y col., 2003; Peña y col., 2002; Peña y col., 2004). El género *Pleurotus* son basidiomicetos controlados por un sistema genético tetrapolar. Contiene dos loci para los diferentes pasos de la fusión de la hifa, migración nuclear y en el crecimiento dicariótico estos loci se identifican con marcadores moleculares anclados al locus *matB*, para inferir en dos subunidades (*matB* y *matB*) y relacionar su especificidad con el crecimiento monocariótico (*matA* y *matB*) (Larraya y col., 2001).

La selección y mejora de las setas comestibles ha progresado muy lentamente debido a la falta de herramientas genéticas diseñadas para tal fin y a las dificultades técnicas que conlleva el análisis de nuevos híbridos a escala semiindustrial o industrial (Vogel y Salmones, 2000). Por lo tanto, la mejora destinada a la producción ha sido un proceso de prueba y error en el que un gran número de híbridos obtenidos a partir de cultivos monoespóricos se analizaban conjuntamente para evaluar su producción (Eger, 1976, Salmones y col., 2004, Huerta y col., 2009).

Para un eficiente cultivo de cepas de *Pleurotus* se deben seleccionar variedades adaptadas a diferentes sustratos y condiciones de cultivo, mediante la mejora genética de las cepas nativas y es el medio por el cual se obtienen nuevas cepas y variedades con características mejoradas (Calvo-Bado, 2001, Bran y col., 2006). Se han realizado diversos trabajos de caracterización e identificación de *Pleurotus spp.* por PCR-RAPD, puesto que hace posible la identificación de cientos de nuevos marcadores en un tiempo corto con lo cual los mapas genéticos pueden ser creados rápidamente. Es particularmente válida para mapeo genómico en todas aquellas especies para las cuales, se carece de otros marcadores genéticos ó estos son raros. En esta tesis, se aplicó la técnica de PCR-RAPD, para determinar la presencia de marcadores moleculares en las cepas híbridas formadas.

3.1.- Técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa de biología molecular que permite la rápida producción de cantidades de análisis de ADN, a partir de a partir de pequeñas cantidades iniciales (Saiki y col., 1988). La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores (“primers” o cebadores) que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, “blanco” de la amplificación.

Estos primers son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos son complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco (González, 2008). Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturalizado al incrementar la temperatura (92°C). en la segunda, la temperatura es rápidamente reducida (35-60 dependiendo del tamaño y secuencia del primer, permite la hibridación del ADN-ADN de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”, enseguida la temperatura es elevada (72°C) para que la ADN polimerasa como por ejemplo las de *Thermus aquaticus* (polimerasa taq), *Thermus termophilus* (Tth), las cuales son resistentes a altas temperaturas, realice la extensión de la cadena a partir de cada Terminal 3' de los primers mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia blanco, este ciclo se repite unas decenas de veces de manera que después de unos 20 ciclos se obtiene más de un millón de veces la cantidad inicial de la “secuencia-blanco”(Lefebvre y col., 2001).

Las investigaciones sobre PCR han estado principalmente enfocadas a la secuenciación nucleotídica de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) localizados entre el ADN_r nuclear 18S y el 28S (Figura 3) (Alam y col. 2009), y han hecho posible determinar las relaciones filogenéticas entre especies de hongos del género *Ganoderma* (Moncalvo y col., 1995). También, la región ITS1 ha sido utilizada para la taxonomía de varias especies de *Ganoderma* de Polonia (Sokol y col., 1999). Las regiones ITS1 e ITS2 han sido usadas exitosamente para el análisis filogenético de las especies de los géneros *Tricholoma* y *Cortinarius* (Mankel y col., 1999, Goo y col., 2002).

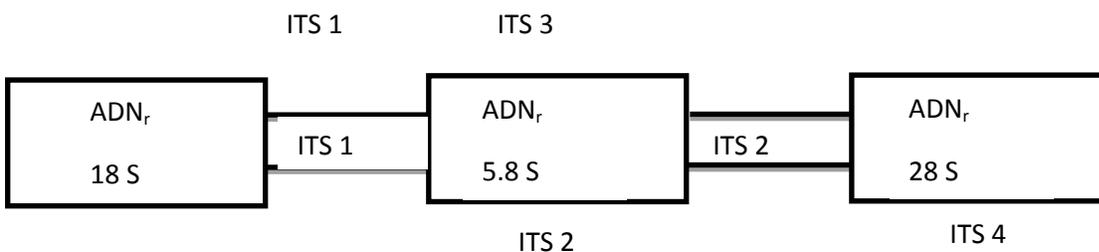


Figura 3. Representación esquemática de la región del ITS del ribosoma nuclear de *Ganoderma*.

Se han usado primers que amplifican fragmentos específicos de genes de la subunidad grande del ADN ribosomal para caracterizar hongos secos obtenidos de herbarios (Bruns y col., 1990). Un fragmento de ADN de 370 pb de tamaño fue amplificado con buenos resultados usando PCR para identificar material viejo y seco de macromicetos (Wingfield y Wingfield, 1993).

Las secuencias de genes mitocondriales se han empleado para fines taxonómicos y filogenéticos en varios organismos eucariontes, por ejemplo: se han obtenido árboles consensuados mediante el uso de la secuencia nucleotídica mitocondrial de las tres primeras subunidades de la citocroma C oxidasa (*Cox I* a *Cox III*) de varias especies de *Drosophila*, las cuales fueron similares a las establecidas con secuencias de los genes nucleares (Spicer, 1995).

En los hongos, un nuevo enfoque basado en amplificaciones por PCR y análisis de secuencia de los dominios variables de unidad pequeña del ADN del ribosoma mitocondrial (SSU ADN_r), fue desarrollado por González y col., (1997). El análisis de la secuencia de estos dominios en las especies de los géneros *Agrocybe* y *Pleurotus* parece conciliar resultados útiles en análisis taxonómicos y filogenéticos (González y Labarère, 1998) y para la identificación de micelio de hongos en ceparios y colecciones.

El análisis de los ITS y de otras regiones del ADN_r ha sido llevado a cabo en diversos hongos comestibles como el grupo *Agaricus arvenses* (Calvo-Bado y col., 2001), *Auricularia* spp. (Berres y col., 1995), *Armillaria* spp. (Chilliali y col., 1998), *Ganoderma* spp. (Moncalvo, 1995; Goo y col., 2002.) y *Lentinus-Lentinula* (Hibbett y col., 1997; Sugui y col. 2003) y en *Pleurotus* spp. (Laraya y col., 2003; Alam y col., 2009; Neda y col., 1995). Sin embargo, aun con estos estudios, la relación evolutiva entre las especies de *Pleurotus* no está bien entendida, lo cual se refleja en su compleja taxonomía. Vilgalys y Sun (1994) demostraron la relación filogenética que existe en ocho grupos de especies de *Pleurotus*.

Se han realizado estudios moleculares basados en el análisis del polimorfismo de restricción del ADN ribosomal-RFLP (Random fragment length polymorphisms) de 29 colecciones de *Pleurotus* spp., mostrando una gran variabilidad genética dentro de una misma especie, lo cual se refleja en la variabilidad fenotípica. Se sugirió que ciertos fragmentos de ADN, denominados en biología molecular como marcadores moleculares, correspondientes a ciertos grupos de especies que podrían ser usados para la correcta identificación de estas especies de *Pleurotus*, pero además, el uso de secuencias específicas para cada especie (primers) y el uso de la tecnología de PCR permitirá la identificación correcta de las especies (Spicer. 1995). Estudios Filogenéticos moleculares, han demostrado que los ITS son una región de ADN muy utilizada para la evaluación de relaciones filogenéticas a bajos niveles taxonómicos (Alam y col. 2009). En el 2010 Chandra y col., lograron la identificación de las especies de *Pleurotus* cultivadas en India, como *Pleurotus florida*, *Pleurotus membranaeceus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus djamur*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus ostreatus*, esto lo realizaron basados en los

patrones de la amplificación polimórfica del ADN, en donde se emplearon 10 primers de los cuales un iniciador (OPD-07) fue el que discrimino las especies estudiadas.

3.2.- Técnica de PCR-RAPD

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, variedad RAPD “Polimorfismo Amplificado al Azar” (Random Amplified Polymorphism) es un procedimiento en donde se utiliza una secuencia arbitraria y por lo tanto su secuencia blanco es arbitraria. Para que ocurra la amplificación de un fragmento RAPD en el genoma analizado, las secuencias de ADN complementarias al primer arbitrario deben estar suficientemente adyacentes (< 4000 pares de bases) y en orientación opuesta, de manera que sea posible la amplificación de ese segmento mediante la ADN polimerasa. En función a la gran cantidad de ADN producido, este fragmento amplificado puede ser visualizado directamente en forma de una banda en un gel de electroforesis teñido (Grattapaglia y Elias, 1998).

PCR-RAPD hace posible la identificación de cientos de nuevos marcadores en un tiempo corto con lo cual los mapas genéticos pueden ser creados rápidamente (Ragot y Hoisington, 1993); es particularmente válida para mapeo genómico en todas aquellas especies para las cuales, se carece de otros marcadores genéticos ó estos son raros. Mientras que PCR estándar, emplea primers diseñados para amplificar una secuencia objetivo específica. En RAPD, tanto los primers como la secuencia objetivo a amplificar no es específica, es totalmente azarosa; posteriormente a que es realizada la amplificación empleando los primers azarosos o arbitrarios, se observa mediante electroforesis en agarosa si existió amplificación del ADN. La técnica PCR-RAPD ha sido usada para la creación de mapas genéticos y la identificación de marcadores moleculares en diversas poblaciones de organismos (Hardys y col., 1993, Tingey y del-Tufo, 1993), para determinar paternidad en libélulas (Hardys y col., 1993), identificar polimorfismos en parásitos (Edwards y Hoy, 1993, Roehrdanz y col., 1993) y analizar parentesco entre gusanos (Scott y col., 1992, Scott y Williams 1993).

Es particularmente empleada para aquellas especies de las cuales se tiene escasa información genética; es válida puesto que: dos o más primers han sido empleados simultáneamente para generar fragmentos de ADN reproducible que son diferentes de todas esas obtenciones que se lograrían con un primer específico y particular (Labarère y Bois, 2001).

Un punto importante en el empleo de PCR-RAPD es que, está sumamente relacionada a la concentración inicial de ADN, esto influye durante la amplificación así que las bandas pueden variar en la intensidad, al ser reveladas, es por ello que el buen empleo de la técnica, depende de una excelente obtención de ADN. Una desventaja que tiene probabilidad de acontecer, es la comigración de fragmentos de similar tamaño con diferentes secuencias (Labarère y bois, 2001).

La técnica se ha empleado en la caracterización de Basidiomicetos en diferentes ocasiones. En el año 2001 Zervakis, Giuseppe, y Kalliopi, informan que al emplear 5 primers obtienen 45 bandas polimórficas, produciendo 35 distintos tipos electroforéticos y 42 patrones de RAPD, donde se determina la separación de las poblaciones fúngicas en 5 tipos (clasificaciones) diferentes, concluyendo que las diferencias en los crecimientos de *Pleurotus* en el Mediterráneo se deben tanto a los factores de reproducción como a los geográficos.

En diversas partes del mundo se realizan estudios con PCR-RAPD. En Israel se emplea para realizar arreglos genéticos en doce poblaciones diversas de *Pleurotus eryngii*, mostrando un elevado nivel de polimorfismo. Según los resultados, estas variaciones están ampliamente ligadas con el entorno geográfico en el que se desarrolla *Pleurotus* (Lewinsohn y col., 2001).

En Rusia se aplicó la misma técnica, para analizar las contribuciones de la especie y del factor geográfico en las variaciones, encontrándose que esta última depende más de su aislamiento reproductivo que del factor geográfico; se propone que por esto existen barreras entre la reproducción de especies (compatibilidad) y que las condiciones geográficas también jugarán un papel importante en la especiación alotrópica (Shnyreva y Shtaer, 2006).

En el continente Americano también se ha realizado estudios basados en esta técnica. Se han enfocado en un buen método de extracción del ADN de basidiomicetos, corroborando la integridad del mismo con PCR RAPD y también han determinado que, en base a que RAPD arroja fragmentos constantes y consistentes, reproducibles en diferentes geles, serviría como una buena técnica para la caracterización y la diferenciación genética en el estudio de la especiación en Hongos (Fonseca y col., 2008).

En esta tesis, esta técnica se empleó para estudiar el patrón de bandeo las cepas parentales e híbridas formadas en el laboratorio, con la finalidad de encontrar algún marcador molecular que

permita caracterizar las cepas híbridas formadas para aportar elementos sobre los cambios genéticos que se producen en los procesos de hibridación por apareamiento de neohaplontes compatibles.

3.3.- Mejoramiento genético de *Pleurotus*

Según Labarére (1991, 1994) para un eficiente cultivo de cepas de las especies del género *Pleurotus*, se consideran actividades previas de importancia básica: la selección de variedades adaptadas a diferentes substratos y condiciones de cultivo, la mejora genética y la preparación de la semilla.

La hibridación es el único medio controlable por medio del cual algunas características genéticas deseadas presentes en diferentes cepas pueden ser combinadas. Es el medio de obtener nuevas cepas y nuevas variedades con características mejoradas (rendimiento, calidad, sabor) y resulta conveniente para los materiales y climas en los que se piensa cultivar a bajo costo.

La creación varietal o mejora genética se hace por medio de cruzamientos que permiten obtener nuevos genotipos, entre los cuales será necesario escoger las nuevas variedades. Este cruzamiento se realiza en la primera etapa de la fecundación, es decir, la fusión de dos individuos homocarióticos genéticamente compatibles (plasmogamia) y se utiliza porque produce un micelio dicariótico capaz de diferenciarse y dar lugar a un basidiocarpo (Labarére 1994).

Para hibridar hongos comestibles cultivados se pueden usar varios métodos teóricos y prácticos. Para un eficiente programa de hibridación, se deben considerar muy cuidadosamente tres puntos:

- (i) La definición del objetivo, es decir, las características del hongo deseado.
- (ii) El uso de un método de cruzamiento adaptado al objetivo y a los hongos preexistentes para el programa de trabajo.
- (iii) Un buen conocimiento del ciclo del vida del hongo usado y los puntos del ciclo de vida importantes para la diferenciación de los cuerpos fructíferos, los cuales son el producto comestible y comercial (Labarére, 1992).

Pleurotus spp. es un género heterotálico tetrapolar, es decir que la fecundación sólo puede tener lugar entre dos micelios monocarióticos 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 (Labarère, 1992).

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. 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 (James y col. 2004).

La fecundación tiene lugar cuando los dos homocariontes confrontados poseen alelos diferentes para los dos genes de incompatibilidad sexual. El conocimiento del *mating-type* 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 (Sunagawa y Magae, 2005).

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 extracruzamientos en lugar de intracruzamientos (Noël y col., 1991). 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 (Noël y col., 1991; Labarère, 1992).

4.- JUSTIFICACIÓN

La utilización del método de desdicarriotización química ha sido importante para la producción de cepas híbridas de setas comestibles ya que permite la generación de componentes monocarióticos que posteriormente se aparean para la obtención de híbridos. Es importante el estudio de los patrones genéticos de cepas dicacrióticas (parentales e híbridas) utilizadas en el mejoramiento genético de setas comestibles, utilizando el método de desdicarriotización química.

Considerando que el análisis de RAPD arroja fragmentos constantes y consistentes, reproducibles en diferentes geles, se utilizó como una técnica para la caracterización de las cepas híbridas obtenidas a partir de cepas parentales blancas.

Por lo que con la finalidad de aportar elementos en la caracterización del germoplasma de cepas de *Pleurotus* obtenidas, en éste trabajo se realizó la caracterización genética de cepas híbridas y parentales mediante la técnica de RAPD's.

5.- OBJETIVOS

5.1.- General

Evaluar los patrones genéticos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.*

5.2.- Específicos

- Obtener neohaplotones de cepas parentales blancas de *Pleurotus spp.* por descicariotización química
- Obtener cepas híbridas de *Pleurotus spp.* por apareamiento de neohaplotones compatibles.
- Comparar el patrón de bandeo de las cepas utilizadas y hacer su caracterización

6.- METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos que se propusieron, fue importante realizar una serie de procedimientos los cuales se muestran en la figura 4, los dos primeros procedimientos permitieron la obtención de biomasa tanto en medio sólido como en líquido, posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante un kit el cual se describe posteriormente, al obtener el ADN de las cepas, se realizaron PCR-RAPD'S para así llevar a cabo la caracterización genética de los patrones que fueron arrojados por PCR-RAPD.

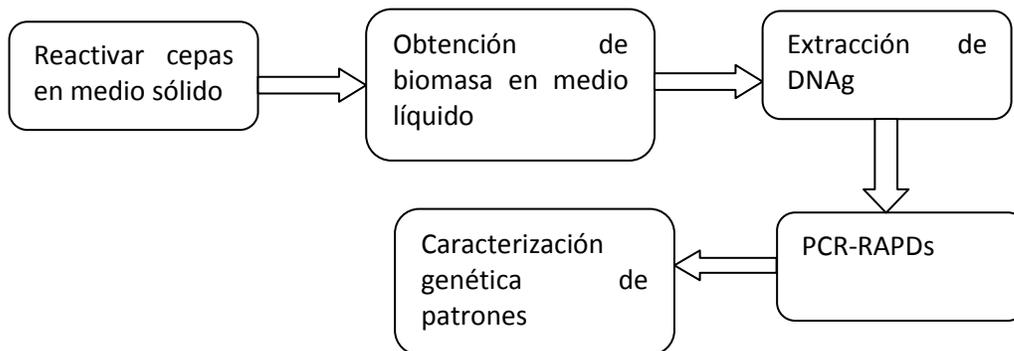


Figura 4. Diagrama de bloques de los procedimientos realizados.

En esta tesis, se emplearon cepas parentales pertenecientes a la colección del Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. En el cuadro 4 se presentan las dos cepas del género *Pleurotus* que se utilizaron, indicando su procedencia:

Cuadro 4. Material biológico de *Pleurotus* utilizado.

CEPAS (clave)	PROCEDENCIA	ESPECIE
IE200	Instituto de Ecología, México	<i>Pleurotus djamura</i>
CP253	Colegio Posgraduados, Puebla	<i>Pleurotus</i> sp.

Las cepas fueron reactivadas en medio Extracto de Malta-Agar (EMA), para su conservación y uso. En el cuadro 5 se muestran las cepas que se manejaron, así como su clasificación.

Cuadro 5. Material biológico empleado en esta tesis.

Cepa parental	Neohaplontes	Híbridos
IE200	IE200 monocarionte 1 IE200 monocarionte 2 IE200 monocarionte 3 IE200 monocarionte 5	IE200 ₍₁₎ XCP253 ₍₆₎
CP253	CP253 monocarionte 6	IE200 ₍₂₎ XCP253 ₍₆₎
		IE200 ₍₃₎ XCP253 ₍₆₎
		IE200 ₍₅₎ XCP253 ₍₆₎

6.1.- Medios de cultivo

En este trabajo se emplearon dos medios de cultivo, el medio sólido y el líquido, el objetivo del medio sólido fue el crecimiento del micelio, mientras que el medio líquido permitió obtener biomasa necesaria para extraer ADN.

6.1.1.- Medio Extracto de Malta-Agar (EMA)

Para preparar 300 mL de este medio sólido, se colocaron 4.5 g de extracto de malta y 6 g de agar agregando 300 mL de agua destilada, esto se preparó en matraces Erlenmeyer tapados, que se sometieron a esterilización por calor húmedo (121°C y 15 Lb de presión, durante 20 minutos). El vaciado del medio se realizó en cajas petri estériles en una campana de flujo laminar dejando solidificar el medio, se incubaron a 28°C durante 24 hrs. para prueba de esterilidad.

6.1.2.- MEDIO LÍQUIDO

Para realizar el medio líquido, se emplearon 20 g de Extracto de malta en agua destilada, esto se preparó en recipientes tapados, posteriormente se sometieron a esterilización por calor húmedo (121°C y 15 Lb de presión, durante 20 minutos). El medio se incubó a 28 °C hasta su uso.

6.2.- Reactivación de cepas

Para la reactivación de las cepas que se trabajaron, se sembraron en medio sólido, previamente esterilizado. Se incubaron a 28°C y se mantuvieron bajo observación para eliminar la presencia de contaminación. Este proceso se repitió en diversas ocasiones, para mantener la viabilidad de las cepas.

6.3.- Desdicarriotización química

Se tomaron ¾ partes de la caja inoculó con las cepas, se sometió a homogenización durante 60 s. en un homogenizador el cual contenía 50 mL de agua destilada y previamente esterilizado. Se tomaron alícuotas de 30µL y 50µL del homogenizado para inocular cajas Petri con medio EMA,

posteriormente se realizó un extendido con varilla para dispersar el homogenizado. Se etiquetó e incubó a 28°C hasta observar crecimiento micelial nuevamente.

En el momento en que se observó presencia de micelio, las placas incubadas fueron observadas en el microscopio para determinar si el micelio tenía presencia o ausencia de fíbulas, lo que indicaría si se trataba de un micelio dicariótico o monocariótico, el cual es de nuestro interés para la formación de cepas híbridas.

De igual forma, se realizó el análisis estadístico por medio de χ^2 esto permitió conocer la proporción en la que fueron recuperados los dos tipos de neohaplontes.

6.4.- Formación de cepas híbridas

Una vez que se obtuvieron micelios monocarióticos de las diferentes cepas, se prosiguió con la formación de cepas híbridas, el cual implicó el siguiente procedimiento, en una caja con medio EMA estéril, se realizó un arreglo como el que se muestra en la figura 5, donde fueron colocadas dos secciones de 1cm² aproximadamente de micelio monocariótico de cepas diferentes, se etiquetaron las secciones correctamente y se incubaron a 28°C hasta que hubo crecimiento micelial, en cuanto esto ocurrió, se observaron al microscopio para determinar si tenía presencia de fíbulas, lo que implica que la hibridación se había llevado a cabo. Por lo tanto se separó esta sección y fue colocada en una caja con medio sólido para mantenerla viable durante la tesis.

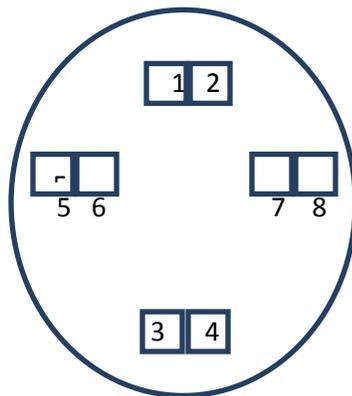


Figura 5. Arreglo para la hibridación de micelios monocarióticos de cepas de *Pleurotus*. Donde los números (1-4) significan el cruzamiento de las secciones de micelios monocarióticos de cepas parentales diferentes sometidas al proceso de dedicariotización química.

Una vez obtenidos los componentes monocarióticos de las cepas parentales, se prosiguió a la reconstitución de las mismas, esto se realizó uniendo los dos neohaplontes de cada una de ellas en una caja Petri con medio EMA. Se colocaron juntos 1 cm² aproximadamente de cada uno de los monocariontes y se incubaron a 28°C hasta que existió crecimiento micelial, cuando esto ocurrió,

se observo en microscopio la presencia o ausencia de fíbulas, lo cual indicó la reconstitución de la cepa parental.

Una vez formadas las cepas híbridas y las parentales reconstituidas, fue necesario determinar si era estériles o inestériles, para ello fue necesario hacer fructificar las cepas formadas. Posteriormente fue necesario determinar algunos parámetros de productividad como lo son Eficiencia Biológica (%EB), Tasa de Producción (%TP) y Rendimiento (%R). Para ello se realizaron varios procedimientos previos que se describen a continuación.

6.5.- Inóculo-grano a partir de micelio crecido en medio sólido.

Para obtener el inóculo grano se utilizó trigo perfectamente lavado, remojado a temperatura ambiente durante 24 horas y drenado para eliminar el exceso de agua, del cual se colocaron 150 g de trigo en bolsas de polipapel para su esterilización en autoclave a 121°C y a una presión de 15 lb durante 20 minutos. Después de ser esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, se inocularon con trozos de micelio, en cantidades equivalentes para cada una de las cepas. Las bolsas inoculadas se incubaron en una cámara oscura a 28°C hasta la invasión total por el micelio.

6.6.- Preparación de sustrato

El sustrato que se empleó fue la paja de trigo, el cual se corto en trozos de 2-4 cm de longitud aproximadamente, se sumergió en un recipiente con agua durante 24 horas para hidratarla a una temperatura ambiente con su paso posterior de eliminar el exceso de agua. A continuación se empacó en bolsas de 1 kg de polipapel, se pasteurizó con vapor por 2 horas.

6.7.- Obtención de cuerpos fructíferos

El sustrato estéril y frío fue inoculado en condiciones de esterilidad con el inóculo-grano (aproximadamente 5 g inóculo-grano/100 g de sustrato húmedo). Las bolsas fueron comprimidos y sellados, en este caso se realizaron 10 replicas de cada cepa.

Las bolsas se incubaron a 28°C, al haber transcurrido 5 días se perforaron para permitir el intercambio gaseoso manteniéndose en incubación hasta que el micelio invadió todo el sustrato. En el tiempo de incubación se llevaron a cabo observaciones periódicas. Al evidenciarse la formación de primordios, se quitaron las cubiertas de plástico a los empaques que posteriormente se llevaron a una cámara de fructificación con una humedad de 85-95% HR, una ventilación de 0.5% de CO₂, a una temperatura de 15 a 30°C, y luz por 12 h/día con el objetivo de inducir la formación de esporóforos. Al pasar una semana aproximadamente y antes de que ocurra del

proceso de esporulación, se cortaron los cuerpos fructíferos desde la base para que éstos pudieran ser pesados y medidos.

6.8.- Determinación de parámetros de productividad

La Eficiencia Biológica (%EB) se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$EB(\%) = \frac{\text{peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{peso del sustrato seco (g)}} * 100 \%$$

Donde el peso del sustrato seco se obtuvo por diferencia con respecto a la humedad del sustrato. Con el %EB se determinó la tasa de producción (%TP), también llamada promedio diario de la eficiencia biológica, con la siguiente relación matemática:

$$TP(\%) = \frac{EB(\%)}{\text{ciclo de producción}}$$

En donde el ciclo de producción fue el tiempo total de cultivo, desde la inoculación hasta la primera cosecha.

Para determinar el Rendimiento (%R) se empleó la siguiente relación matemática:

$$R(\%) = \frac{\text{peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{peso del sustrato húmedo (g)}} * 100\%$$

Para evaluar la productividad de las cepas parentales e híbridas, se utilizó el análisis estadístico ANOVA de una vía para comparar los parámetros %EB, %TP y %R de cada una de las cepas. El análisis estadístico de los datos obtenidos finales se realizó con un análisis ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Duncan, haciendo uso del programa SPSS para Windows versión 12.0.

6.9.- Obtención de micelio en medio líquido

Una vez que la cepa creció en medio sólido e invadió el mismo, fueron homogenizadas ¼ partes de la caja con medio sólido y la cepa crecida. El homogenizado fue realizado en un homogenizador que contenía 50 µL de agua destilada (los cuales fueron esterilizados juntos previamente). Durante 60 s. fue sometido a una fuerza mecánica para lograr romper las células del hongo. Posteriormente se inocularon los recipientes con medio líquido con 50 µL del homogenizado, fueron etiquetados correctamente e incubados a 28°C, hasta que el hongo invadió este medio.

6.10.- Extracción de ADN_g

Para realizar la extracción del DNA de las cepas que se trabajaron, se empleó el kit “ChargeSwitch® ADN_g plant Kit” del catálogo No. CS18000 de Invitrogen, en la cuadro 6, se muestran los componentes de este kit para extraer el DNAG, así como la acción que tienen durante la extracción. Se emplearon las cepas en peso húmedo.

Cuadro 6. Componentes del kit ChargeSwitch® gDNA plant kit.

COMPONENTE	DESCRIPCIÓN
ChargeSwitch® N5	Buffer de precipitación: Acetato de Potasio y Cloruro de Potasio
ChargeSwitch® L18	Buffer de Lisis: Urea
ChargeSwitch® D1	10% detergente y Tritonx-10
ChargeSwitch® E6	Buffer de elusión: Tris-HCl 10mM, pH 8.5 con EDTA 1mM
ChargeSwitch® SDS	Sodio Dodecil Sulfato al 10% en agua desionizada
ChargeSwitch® W12	Buffer de lavado
ChargeSwitch® Magnetic Beads	Perlas magnéticas de adhesión: 25mg/mL en MES 10mM, pH 5.0, NaCl 10mM, Tween20 al 0.1%
RNasa A	5 mg/mL en Tris-Hcl 10mM, pH 8.5, EDTA 10mM

El protocolo que se empleó se menciona en el kit ChargeSwitch® gDNA plant Kit Catálogo No.CS18000 de invitrogen y se describe a continuación:

Enfriar el buffer de precipitación (N5) sobre hielo, macerar 0.5 g de micelio fresco con nitrógeno líquido en el mortero a temperatura ambiente, adicionar 1 mL de ChargeSwitch Lysis Buffer (L18). Transferir la solución a un tubo de 1.5 mL y Adicionar 2 µL de RNasa A, a la muestra macerada, mezclar en vortex por un minuto, adicionar 100 µL de SDS al 10% por cada mililitro de muestra. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, adicionar 400 µL de Buffer de precipitación (N5) a la muestra y mezclar por inversión 10 s. hasta formar precipitado, centrifugar a velocidad de 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para obtener una muestra limpia, transferir la muestra a tubo nuevo y estéril, evitando arrastrar el precipitado y adicionar 100 µL de detergente al 10 % (D1) sobre 1.2 mililitros de muestra lisada. Adicionar 40 µL de perlas magnéticas re-suspendidas. Mezclar gentilmente por pipeteo arriba y abajo 5 veces usando una pipeta de un mililitro, sin formar burbujas, eventualmente distribuir las perlas con la solución, incubar a temperatura ambiente por un minuto y colocar los tubos en el Rack Magnético hasta que las

perlas formen un pellet adherido. Sin remover los tubos del magneto, cuidadosamente aspirar y descartar el sobrenadante, tener cuidado de no tocar las perlas con la pipeta, remover los tubos del magneto y agregar 1 mililitro de Buffer de Lavado (W12) al tubo y agitar gentilmente para re-suspender las perlas. Colocar los tubos en el magneto hasta que las perlas formen un pellet y el sobrenadante esté claro, remover los tubos del Rack Magnético, agregar 150 μ L de Buffer de Elusión (E-6) mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, posteriormente colocar el tubo en el Rack Magnético hasta que se forme un pellet y el sobrenadante esté claro. Sin remover los tubos del magneto, cuidadosamente aspirar y transferir el sobrenadante con DNA sin tocar los pellet de perlas a un nuevo tubo, se rotulará y congelará hasta su uso posterior.

6.11.- Electroforesis en gel de agarosa

Para determinar la integridad del ADN extraído se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, se realizaron los siguientes pasos:

1. Se realizó un gel de agarosa al 0.7% en solución buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, para ello, se colocaron tanto la agarosa como el TBE en un matraz Erlenmeyer y se calentó en una parrilla con la ayuda de un agitador magnético hasta que la agarosa se encontró totalmente disuelta.
2. Estando la agarosa, totalmente disuelta, se dejó enfriar un poco para posteriormente agregar 1 μ L de GelRed 10,000X (Invitrogen) por cada 10mL de TBE, hasta su completa disolución.
4. Una vez disuelto, éste se colocó en el molde para gel de electroforesis (previamente limpio y adaptado con el peine para generar los pozos) y se cubrió de la luz, puesto que GelRed 10,000X, es fotosensible.
5. Se mantuvo alejado de la luz hasta que solidificó totalmente. Posterior a su solidificación, se retiró el peine dejando los pozos libres.
6. Una vez listo el gel, éste se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con TBE 0.5X.
7. En papel parafilm se colocaron 2 μ L de buffer de corrimiento y 8 μ L de muestra de ADNg; se mezclaron por pipeteo arriba y abajo, hasta su completa homogenización.
8. La mezcla se tomó evitando la formación de burbujas y se depositó en uno de los pozos del gel (previamente designados).
9. En el primero de los pozos, se colocó una muestra de referencia (marcador molecular λ HINDIII (Invitrogen)) y en el último de los pozos se colocó el marcador molecular 1 Kb Ladder.(Invitrogen)
10. Se aplicó un voltaje de 75 V durante 95 min.

11. Ocurrido lo anterior, se detuvo el corrimiento; se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se reveló el bandeo, mediante luz U.V., para ello se utilizó un fotodocumentador modelo Gel Logic 440 Imaging System de Kodak
12. Se realizó una toma de imagen digital.
13. Se analizaron los resultados con el programa NTSYS.

6.12.- Determinación de pureza y concentración del DNAg

Se realizaron diluciones del DNAg obtenido, en agua desionizada, en la proporción 2:8 2µL de DNAg y agua. Se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 260nm y 280nm y los datos obtenidos se emplearon en las siguientes ecuaciones:

$$PUREZA = \frac{ABS_{260nm}}{ABS_{280nm}} \dots\dots\dots \text{ecuación (1)}$$

$$CONCENTRACIÓN = \frac{ABS_{260nm} * FD * \frac{50\mu g}{\mu l}}{1000} \dots\dots\dots \text{ecuación (2)}$$

En la ecuación 2, *FD* representa al factor de dilución y es igual al volumen de aforo/ volumen de la alícuota (100/2), mientras que 50µg/µL y 1000 son factores de conversión constantes para DNAg (CIMMYT, 2005).

6.13.- Determinación de patrones genéticos

Para la identificación de los patrones genéticos de las cepas híbridas y parentales, se empleó la técnica de PCR-RAPD. En el cuadro 7 se muestran los 10 oligonucleótidos de 10 bases cada uno de la empresa Operon Technologies empleados para la amplificación de las bandas de ADN, así como también se muestra la secuencia de bases que estos tienen y la temperatura óptima de cada oligonucleótido

Cuadro 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR-RAPD, se muestra temperatura óptima y el porcentaje de Guanina y Citosina y la secuencia de bases (empresa Operon Technologies).

Oligonucleótido	G + C %	5'- 3'
OPF-1 (33.3 °C)	60	ACGGATCCTG
OPG-2 (36.6 °C)	70	GGCACTGAGG
OPH-2 (36.7 °C)	60	TCGGACGTGA
OPH-3 (33.9 °C)	60	AGACGTCCAC
OPH-3' (37.5 °C)	70	GGAAGTCGCC
OPG-3 (37.8 °C)	70	GAGCCCTCCA
OPG-5 (32.8 °C)	60	CTGAGACGGA
OPF-6 (32 °C)	60	GGGAATTCCG
OPF-9 (33.3 °C)	60	CCAAGCTTCC
OPF-13 (35.6 °C)	60	GGCTGCAGAA

Para realizar PCR-RAPD, fue necesario programar el equipo, con las condiciones adecuadas, para ello, el equipo fue operado en las condiciones y con los ciclos que se mencionan en la figura 6. Estas condiciones se determinaron después de una serie de pruebas preliminares.

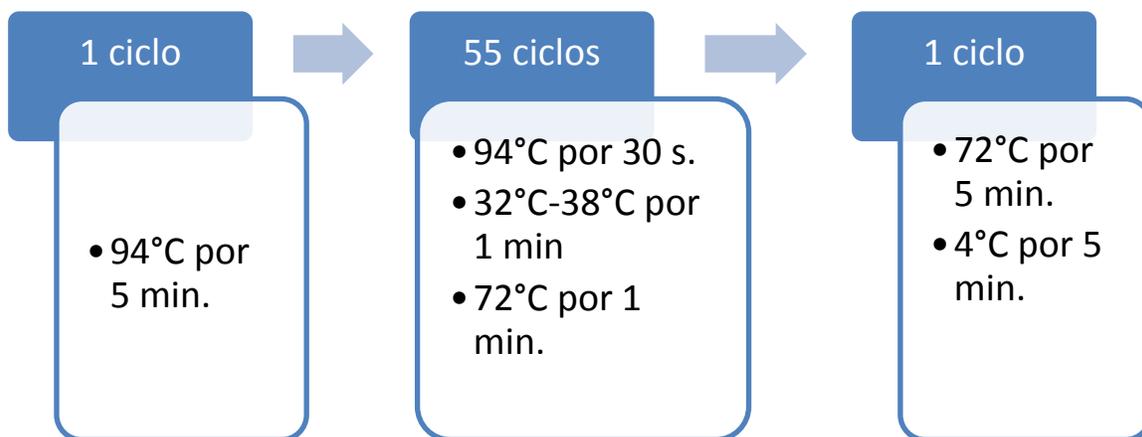


Figura 6. Condiciones de operación del equipo de PCR-RAPD.

Una vez obtenidas las bandas respectivas para cada oligonucleótido, se utilizó el software NTSYS (Numerical Taxonomy SYStem) para hacer el análisis de las mismas, se elaboraron matrices de datos considerando 1 como la presencia de una banda y 0 su ausencia. Con esta información se

generaron los fenogramas correspondientes a las diferentes comparaciones de bandas obtenidas de las cepas trabajadas.

7.- RESULTADOS

7.1.- Reactivación de cepas

Empleando el medio EMA, se reactivaron las cepas parentales IE200 y CP253, en el cuadro 8 se muestran las características morfológicas de las cepas.

Cuadro 8. Cepas parentales (dicarióticas) empleadas a lo largo de la tesis.

Cepa	Procedencia (Especie)		Crecimiento		Color ¹		
					Mielial ² (Tipo/Abundancia)		Esporóforo
CP- 253	CP	Puebla, (<i>Pleurotus</i> sp)	Méx.	A	Ex	Blanco (N ₀₀ A ₀₀ M ₀₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)
IE-200	Inst.	Ecología, (<i>djamur</i>)	Méx.(P.	F	R	Blanco (N ₀₀ A ₀₀ M ₀₀)	Durazno (N ₀₀ A ₃₀ M ₃₀)

(1) El color de cuerpos fructíferos y esporadas se determinó de acuerdo con el atlas de colores de Kornerup, A., J. H. Wanscher, 1967 y Koppers, H. 1979

(2) Crecimiento mielial. Tipo: A = algodonoso, F = filamentoso, Abundancia, Ex = exuberante, R = regular.

Como se observa en el cuadro 7, las cepas parentales tienen cuerpos fructíferos blancos con un crecimiento en medio sólido del tipo algodonoso para la cepa CP253 y para la cepa IE200 su crecimiento es filamentoso, lo cual implica que las dos cepas contienen características morfológicas diferentes, sin embargo en las esporas que se producen en los cuerpos fructíferos las dos cepas tienen la misma coloración. En la figura 7 se muestra el crecimiento del micelio de las cepas en medio EMA.

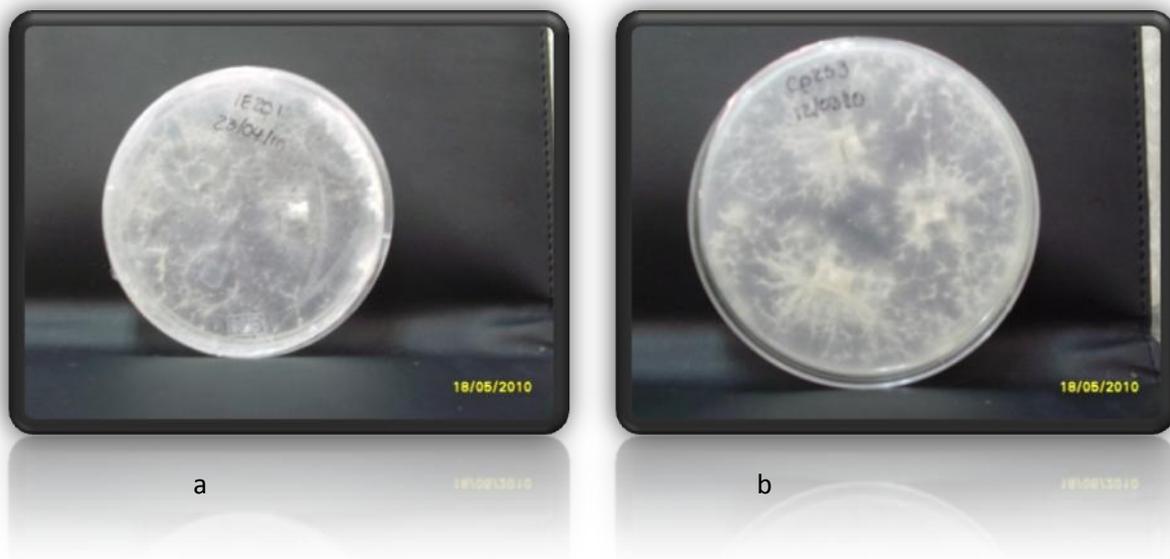


Figura 7. Cepas parentales viables para el estudio (a) IE200 y (b) CP253

7.2.- Desdicariorización química

Siguiendo el protocolo antes mencionado, se logró la desdicariorización de las dos cepas parentales empleadas, por lo cual se confirmó el efecto desdicariorizador de la peptona que demostró ser efectiva con las dos cepas parentales empleadas de *Pleurotus spp.*, en el cuadro 9 se muestran el número de neohaplontes obtenidos después de este procedimiento, así como también el resultado del análisis estadístico, realizado por medio de X^2 , el cual nos indicó que se obtuvo una recuperación simétrica, esto se determinó a partir del valor de la significancia que aparece entre paréntesis. Cuando el valor es mayor a 0.05, implica que la recuperación fue simétrica, en las dos cepas parentales se puede observar que este valor es mayor al establecido. En el 2002, Valencia del Toro y *col.* Lograron obtener los dos componentes monocariontes de 10 cepas que trabajaron, aunque el número de neohaplontes no fue el mismo para cada cepa empleada. Sin embargo en el 2007, Maldonado empleó el método de desdicariorización química a tres cepas de *Pleurotus spp.*, en donde no se logró la recuperación simétrica de los neohaplontes obtenidos por este método. Lo cual implica que no importando el número de micelios monocarióticos, se puede lograr una recuperación simétrica como lo fue en esta tesis. Como se puede observar en el cuadro 8, solo para la cepa parental CP253 se obtuvo el mismo número de neohaplontes de cada tipo. Mientras que para la cepa parental IE200 se lograron obtener 6 neohaplontes del tipo Nh_1 y solo 2 del tipo Nh_2 .

Cuadro 9. Recuperación de neohaplontes de cepas de *Pleurotus spp.*

Cepas Dicarióticas	Neohaplontes Recuperados			Componentes Recuperados	Prueba χ^2 para recuperación simétrica (nh1:nh2 = 1:1)*
	Total	Tipo Nh1	Tipo Nh2		
CP253	6	3	3	2	0.00 (1.00)
IE 200	8	6	2	2	2.00 (0.15))

NOTA: Entre paréntesis se presenta el valor de la significancia (p).

7.3.- Formación de cepas híbridas

Tomando en cuenta el número de neohaplontes obtenidos a partir de la desdicariorización química, se realizaron los apareamientos entre componentes monocarióticos obtenidos de cada cepa (cuadro 10), se registró con el signo positivo (+) cuando las hifas del micelio en la zona de contacto de ambas cepas presentaban fíbulas, lo que indicó compatibilidad, cuando no hubo presencia de fíbulas, no se consideró apareamiento por lo que se registró con el signo negativo (-).

Cuadro 10. Resultados del entrecruzamiento de micelio monocarionte para obtener cepas híbridas.

Nh's	IE200 ₁	IE200 ₂	IE200 ₃	IE200 ₄	IE200 ₅	IE200 ₆	IE200 ₇	IE200 ₈
CP253 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-
CP253 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
CP253 ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
CP253 ₄	-	-	-	-	-	-	-	-
CP253 ₅	-	-	-	-	-	-	-	-
CP253 ₆	+	+	+	-	+	-	-	-

Cuando el cruzamiento fue positivo, se formó la cepa híbrida, así, en esta tesis se logró obtener cuatro cepas híbridas a partir de las cepas parentales IE200 y CP253, las cepas se presenta en el cuadro 11, el subíndice utilizado para cada cepa indica el tipo de neohaplonte que se utilizó para la realizar el apareamiento. Una vez confirmada la presencia de fíbulas, se prosiguió con el aislamiento y mantenimiento de las nuevas cepas híbridas formadas.

Cuadro 11. Cepas híbridas de *Pleurotus spp.*

Cepa parental ₁	Cepa parental ₂	Cepa híbrida	Clave
IE200 ₁	CP253 ₆	IE200 ₁ x CP253 ₆	IECP1
IE200 ₂	CP253 ₆	IE200 ₂ x CP253 ₆	IECP2
IE200 ₃	CP253 ₆	IE200 ₃ x CP253 ₆	IECP3
IE200 ₅	CP253 ₆	IE200 ₅ x CP253 ₆	IECP5

En esta tesis, solo se logro la formación de cuatro cepas híbridas, sin embargo empleando el mismo procedimiento, en el 2002, Valencia del Toro logro la obtención de diez cepas híbridas, lo cual se puede deber al número de micelios monocarióticos a partir del proceso de desdicariorización química. Tomando en cuenta que las cepas parentales que se desdicariorizaron son blancas, se esperaría que las cepas híbridas mantuvieran esta coloración. De igual forma, las cepas híbridas mantuvieron la misma morfología micelial que la cepa parental Cp253, algodonoso y exuberante. En el 2006, Bran y *col.*, lograron obtener 12 cepas híbridas por medio del cruzamiento de neohaplontes compatibles de cepas de *Pleurotus djamur* y *Pleurotus ostreatus*, en donde determinaron que las colonias obtenidas a partir de *P. djamur* obtuvieron un diámetro medio mayor que las cepas parentales, mientras que los monocariontes de *Pleurotus ostreatus*, no superaron a las cepas parentales. En esta tesis, los monocariontes de ambas cepas parentales, superaron el diámetro de las progenitoras, lo cual se ve reflejado en la productividad de las cepas híbridas en las cuales tuvieron participación estos monocariontes, principalmente en la cepa IECP5.

7.4.- Obtención de micelio en medio líquido

La obtención del micelio en medio líquido se optimizó utilizando 30mL del homogenizado obtenido a partir del micelio de una caja petri disuelto en 50 mL de agua destilada estéril, con tiempos de homogenización de 60 s. y temperatura 20 °C, se inocularon con éxito las cepas parentales, híbridas y reconstituidas de la cepa CP253. En el cuadro 12, se presentan la biomasa de micelio líquido obtenida de cada cepa, el tiempo de crecimiento en días y las condiciones de agitación 100rpm y 25°C. Se puede observar que las cepas híbridas crecieron mucho más rápido que las cepas parentales. Para la obtención de micelio en medio líquido se implementaron dos condiciones de trabajo, sin agitación y con agitación, como se puede observar en el cuadro 11, la biomasa obtenida en condiciones de agitación fue mayor que en las condiciones sin agitación

tanto en las cepas híbridas como en las parentales, pero si se compara la biomasa solo con el tratamiento con agitación se puede observar que las cepas híbridas tuvieron mayor producción de biomasa en un menor tiempo. En el tratamiento sin agitación, la cepa híbrida IEC2 tuvo menor producción de biomasa que las demás cepas híbridas. En el 2007 Aguilar, obtuvo 1.51g/L de biomasa de la cepa parental IE200 en un periodo de 15 días en el medio PCS (Peptona Con Sacarosa), empleando el medio EMS, la cantidad celular fue de 4.39 g/L en un periodo de 15 días, en esta tesis, se logro obtener 89 g/L de esta cepa en 16 días en medio Extracto de Malta líquido, lo cual implica que este medio produce mucho mayor cantidad de biomasa que los reportados por Aguilar en el 2007. Con respecto a la cepa parental CP253, no se tienen datos reportados, ya que no se había empleado para este proceso.

Cuadro 12. Determinación de peso húmedo de las cepas parentales e híbridas sometidas a condiciones de crecimiento diferentes

CEPA	Sin agitación		Con agitación	
	Peso húmedo (g/L)	Tiempo (días)	Peso húmedo (g/L)	Tiempo (días)
IE200	11.6	23	89	16
CP253	7.2	20	45	14
IECP1	34.4	18	68.8	14
IECP2	6.8	18	65.8	14
IECP3	33.6	18	88.6	14
IECP5	35.2	18	71.2	14

7.5.- Fructificación de cepas híbridas

Una de las partes importantes en este estudio, fue determinar si las cepas híbridas y reconstituidas eran inestériles o estériles, para ello, se sembraron en sustrato trigo, para posteriormente ser inoculadas en sustrato paja y determinar sus parámetros de producción. En la siguiente figura (8) se presenta el inóculo-grano o “semilla” obtenido para la siembra posterior en el sustrato paja, se observa que el micelio de todas las cepas invadió el trigo en la cepa parental

IE200 en un periodo de 20 días, la cepa parental CP253 en un tiempo de 15 días al igual que las cepas híbridas.



Figura 8. Cepas parentales e híbridas inoculadas en sustrato trigo (a) cepa parental IE200, (b) cepa parental CP253, (c) cepa híbrida IEC3 (IE200₃XCP253₆), (d) cepa híbrida IEC5 (IE200₅XCP253₆), (e) cepa híbrida IEC2 (IE200₂XCP253₆).

Una vez inoculados en sustrato trigo, se logró la inoculación en sustrato paja, en la figura 9, se muestra que las híbridas formadas en esta tesis son inestériles, ya que producen cuerpos fructíferos, lo que implica que pueden reproducirse. También se observa que las cepas híbridas mantienen la misma coloración que las cepas parentales.



a



b



c



d



e



Figura 9. Cuerpos fructíferos de las cepas parentales IE200 (a), CP253 (b) y las cepas híbrida IECP1 (c), cepa híbrida IECP5 (híbrido 5) (d), la cepa híbrida IECP2 (e) y la cepa híbrida IECP3 (f).

Con la fructificación de todas las cepas los cuerpos fructíferos fueron cortados y pesados de manera individual esto para determinar el peso unitario (PU), de manera similar, se pesaron los hongos frescos totales de cada cosecha. Se determinaron los parámetros de productividad (cuadro 12) %EB (Eficiencia Biológica), %TP (Tasa de Producción) y %R (Rendimiento). Es importante mencionar que solo se determinó la EB para la primera cosecha, debido a que es la cosecha en la que se obtuvieron la mayor cantidad de cuerpos fructíferos.

Cuadro 13. Valor promedio del %EB, %TP, %R para las cepas parentales e híbridas se incluye el Error Estándar de la Media (ESM).

<u>CEPA</u>	<u>CLAVE</u>	<u>% EB ± ESM</u>	<u>%TP ± ESM</u>	<u>% R ± ESM</u>
<i>Parentales</i>				
IE200		77.60 ± 10.01	3.88 ± 0.50	12.82 ± 1.65
CP253		90.55 ± 6.7	4.52 ± 0.33	14.96 ± 1.11
<i>Híbridos</i>				
IE200 ₁ XCP253 ₆	IECP1	49.89 ± 18.13	2.77 ± 1.00	8.21 ± 2.98
IE200 ₂ XCP253 ₆	IECP2	10.54 ± 3.09	0.62 ± 0.18	1.90 ± 0.55
IE200 ₃ XCP253 ₆	IECP3	51.46 ± 8.44	2.86 ± 0.46	8.46 ± 1.39
IE200 ₅ XCP253 ₆	IECP5	79.34 ± 16.74	3.97 ± 0.83	13.11 ± 2.76
CP253 reconstituida		86.71 ± 8.66	5.10 ± 0.50	15.67 ± 1.56

Como se puede observar en el cuadro 13, la eficiencia biológica tiene un intervalo desde 10.54 hasta 90.55% siendo la cepa parental CP253 la que obtuvo la mayor eficiencia biológica (90.55%), posteriormente, la cepa CP253 reconstituida obtuvo una eficiencia biológica de 86.71%, cabe mencionar que las cepas parentales trabajadas, son nativas. En cuanto a las cepas híbridas, la eficiencia biológica más alta, corresponde a la cepa IE200₅XCP253₆ con el 79.34%, sin embargo la cepa híbrida que obtuvo menor eficiencia biológica fue la cepa IE200₂XCP253₆, lo cual si se quisiera comercializar esta cepa sería descartada por la baja eficiencia biológica que presenta. En el 2001, Valencia del Toro reportó una eficiencia biológica para la cepa IE200 de 102.1%, la cual está por encima de la eficiencia biológica obtenida en esta tesis.

Los valores obtenidos de TP se encuentran en un intervalo de 0.62%-5.10%, donde la tasa de producción más alta, corresponde a la cepa CP253 reconstituida con un valor de 5.10%. La cepa híbrida IE200₅ XCP253₆ fue la que tuvo mayor producción (3.97%) entre las cepas híbridas. Sin embargo la cepa de CP253 reconstituida obtuvo una tasa de producción más alta de todas las cepas analizadas, esta fue de 5.10 %. Salmones y col en 1997, reportaron valores de Tasa de Producción en cepas de *Pleurotus spp.* en un rango de 0.31 a 1.68%, para un número de cosechas de dos a cinco y en Valencia del Toro, et al. (2001-2003) el intervalo de %TP fue de 1.7 a 3.7% con dos cosechas. Debido a que este parámetro de productividad incluye el tiempo total del cultivo, es importante señalar que el número de cosechas es determinante para el valor de %TP, y debido a esto se obtienen valores diferentes en este parámetro con respecto a los reportados por otros investigadores (Valencia del Toro, et al., 2001-2003), sin embargo, se aprecia que los valores obtenidos de %TP en esta tesis, son superiores de los valores informados por Salmones y col. (1997). Debe de considerarse que las cepas con que se trabajó por parte de los investigadores citados, no son las mismas con las que se hizo la presente tesis y que cada cepa tiene diferente ciclo de producción, lo que está relacionado con el tiempo que tardan las cepas de *Pleurotus spp.* en degradar el sustrato.

El análisis estadístico ANOVA de una vía, para la eficiencia biológica ($F_{(6,37)}=9.94$; $p=0.0001$) indica que no existen diferencias significativas para este parámetro entre las cepas parentales e híbridas. En cuanto al parámetro de tasa de producción, este mismo análisis, indica que no existen diferencias significativas ($F_{(6,37)}=10.30$; $p=0.0001$) entre las cepas parentales con respecto a las cepas híbridas. Al realizar el análisis estadístico ANOVA para el rendimiento, indica que tampoco existen diferencias significativas para este parámetro ($F_{(6,37)}= 9.61$; $p=0.0001$).

La prueba *post hoc* de Duncan, determinó para la eficiencia biológica existen tres grupos en donde se evaluó este parámetro, el primero de ellos y con menor eficiencia, se encuentra la cepa híbrida IECP2, el segundo grupo está formado por las cepas híbridas IECP1 e IECP3, finalmente el tercer grupo se encuentran las cepas parentales (IE200 y CP253), CP253 reconstituida y la cepa híbrida IECP5, lo cual indica que esta cepa comparte las mismas características que las cepas parentales para este parámetro. Este mismo comportamiento tiene el parámetro de rendimiento con respecto a la prueba *post hoc* de Duncan.

Esta misma prueba para el parámetro de tasa de producción indica que se formaron cuatro grupos, en el primer grupo se encuentra la cepa IECP2, con la menor tasa de producción. En el segundo grupo se encuentran las cepas IECP1 e IECP3. El tercer grupo está formado por las cepas

IE200 e IECp5, finalmente el cuarto grupo se forma por la cepa parental CP253 y CP253 reconstituida, en este parámetro se puede observar que la cepa híbrida IECp5, cuenta con el mismo tiempo para producir carpóforos que la cepa parental IE200.

7.6.- Extracción de ADN_g

Con el micelio obtenido a partir del medio líquido, se prosiguió con la extracción de ADN, la cual se realizó a partir del protocolo mencionado en materiales y métodos. Se empleó como marcador molecular λ HIND III, este marcador tiene un peso molecular de 23,130 Kpb, como se puede observar en la figura 10, el ADN extraído está por encima del peso de 23,130 kpb, la intensidad de las bandas es muy tenue, esto puede ser debido a la cantidad de micelio obtenido en medio líquido. En la figura 10, la banda del carril 9 (control positivo), muestra una mayor intensidad en el gel que las demás cepas. El resto de las cepas, mantienen una misma intensidad, aunque en el cuadro 12, se observa que la cepa IE200 tiene mayor concentración de ADN, mientras que la cepa IE200₅XCP253₆ tiene menor concentración de ADN.



Figura 10. Gel de agarosa al 0.7% de cepas de *Pleurotus spp.* el orden de las muestras se mencionan a continuación. Carril 1: Marcador molecular λ HINDIII, Carril 2: cepa parental IE200, Carril 3: cepa parental CP253, Carril 4: IECp1 (IE200₁XCP253₆), Carril 5: IECp2 (IE200₂XCP253₆), Carril 6: IECp3 (IE200₃XCP253₆), Carril 7: IECp5 (IE200₅XCP253₆), Carril 8: CP253 reconstituida, Carril 9: control positivo (UAPO), carril 10: PCM

7.7.- Determinación de pureza y concentración del ADNg

En el cuadro 14 se presentan los valores de densidad óptica del ADNg obtenidos de las diferentes cepas de *Pleurotus* spp. utilizadas en esta tesis, dichos valores se encuentran en un rango de 1.02 a 1.91 valores de la relación matemática A_{260}/A_{280} que es utilizada como un indicativo de pureza. En trabajos anteriores realizados con otras cepas de *Pleurotus*, se han obtenido valores de pureza que están dentro del intervalo antes mencionado (Maldonado, 2007), en esta tesis, la cepa que obtuvo un valor de pureza dentro del lo reportado por la bibliografía, fue la cepa IECP3 e independientemente de que no se tengan los rangos indicado en la bibliografía (1.8-2.0) ha sido posible obtener resultado positivos en la técnica de PCR. Los valores de pureza fueron mayores a uno en todos los casos. El empleo del kit de extracción permitió un ahorro de tiempo, ya que se realizó en 3 horas.

Cuadro 14. Densidades ópticas de cepas de *Pleurotus* spp.

Cepa	260 nm	280 nm	Pureza	Concentración (µg/µL)
IE200	0.471	0.340	1.3852	1.1775
CP253	0.047	0.034	1.3823	0.1175
IECP1 (IE200 ₁ XCP253 ₆)	0.298	0.279	1.0681	0.745
IECP2 IE200 ₂ XCP253 ₆	0.311	0.194	1.6030	0.7775
IECP3 IE200 ₃ XCP253 ₆	0.055	0.018	1.91	0.1375
IECP5 IE200 ₅ XCP253 ₆	0.046	0.045	1.0222	0.115
CP253 reconstituida	0.166	0.103	1.6116	0.415

7.8.- Determinación de patrones genéticos

Empleando las condiciones de operación de PCR-RAPD, se logró la amplificación de bandas de ADN_g de todas las cepas empleadas en esta tesis. En las siguientes tres figuras (11-13), se muestran los gels de agarosa al 0.7% donde se evidencia la amplificación de las diferentes cepas empleando los diez iniciadores mencionados anteriormente. Como se puede observar en el primer

gel (figura 11), las cepas que mostraron amplificación con el iniciador OPG-6 fueron la cepa parental CP253 y el control positivo, las bandas de estas cepas se encuentran en las 9,162 pb.

Con respecto al segundo iniciador (OPF-9) se obtuvieron 17 bandas para las diferentes cepas. Las cepas híbridas presentaron amplificación de ADN_g, para la cepa IECP1 se amplificaron cuatro bandas, la primera de ella de aproximadamente 12,216 pb, la segunda de 9,162 pb, la tercera y cuarta se encuentran por debajo de los 4,072 pb. Para la cepa híbrida IECP2 al igual se detectaron cuatro bandas, con pesos similares a la de la cepa anterior. Sin embargo la cepa híbrida IECP3, sólo presentó dos bandas con pesos aproximados de 12,216 pb y 9,162 pb. La cepa híbrida IECP5 únicamente presentó una banda con un peso menor a 9,162 pb. La cepa CP253 presentó 5 bandas amplificadas, la primera entre 12,216 pb y 10,180 pb, la segunda de menos de 9,162 pb, la tercera de 4,072 pb, la cuarta y quinta se encuentran entre 4,072 y 3,054 pb. La cepa PCM presentó cuatro bandas amplificadas la primera de ellas de 9,162, la segunda mayor a 4,072, la tercera por debajo de este mismo peso finalmente la cuarta banda se encuentra aproximadamente en los 3,054 pb.

Con el iniciador OPF-9, todas las cepas híbridas lograron la amplificación de ADN, al igual que la cepa parental CP253, analizando el patrón de bandeo arrojado por este iniciador se observa que las cepas IECP1, IECP2 e IECP3, muestran una banda aproximadamente a 12,216 pb, mientras que la cepa IECP5 no presenta esta banda. Sin embargo las cepas IECP1, IECP2 e IECP5 comparten una banda que se encuentra en 2,036 pb.

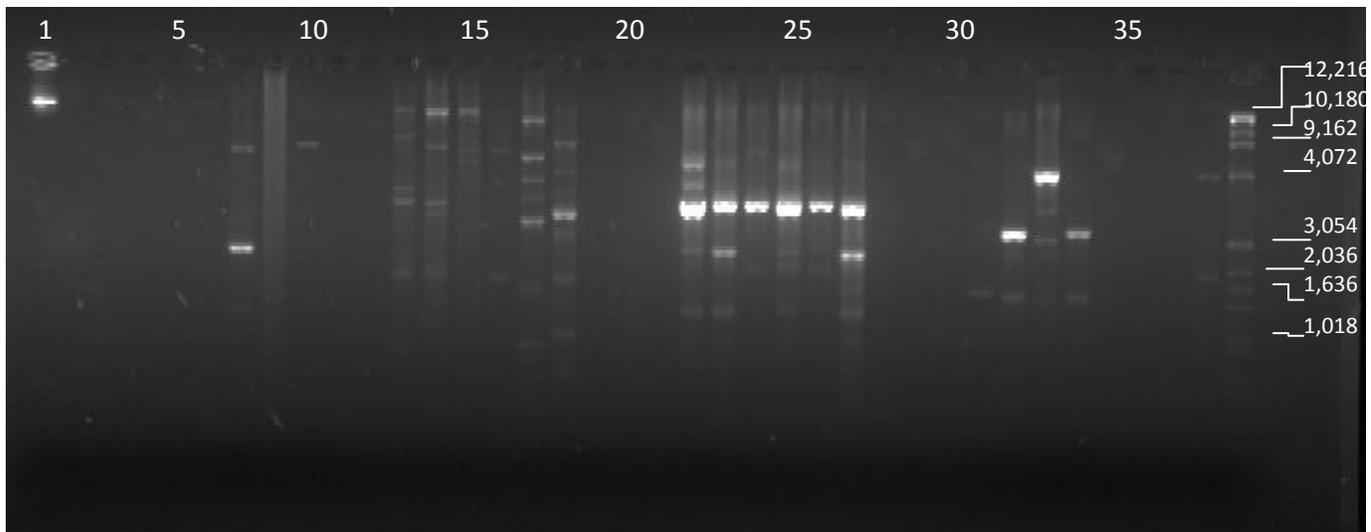


Figura 11. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de ADN por medio de PCR-RAPD. En el carril 1 se colocó el marcador molecular λ HIND III, del carril 2-10 las cepas IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPPG-6. Del carril 11-19 IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPF-9. Del carril 20-28 IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con con OPG-5. Del carril 29-37 IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con con OPF-1. En el carril 38 marcador molecular 1K Ladder.

El segundo gel de agarosa se muestra en la figura 12, en él aparecen las banda obtenidas para cuatro de los 10 iniciadores propuestos. En donde se puede observar que la cepa parental IE200 muestra la amplificación de dos bandas para el iniciador OPH-3, la primera se encuentra por debajo de las 4,072 pb, mientras que la segunda se encuentra en las 3,054 pb. De igual forma la cepa parental CP253 presentó amplificación de bandas, su primera banda se localiza por debajo de las 4,072 pb, en este carril se pueden observar dos bandas más que se encuentran por debajo de los 4,072 pb, pero también se encuentra una cuarta en las 3,054 pb. Es importante notar que las dos cepas parentales no habían logrado la amplificación con ninguno de los cuatro iniciadores anteriores. La cepa híbrida IECP1 al igual que la cepa IECP2, muestran amplificaciones muy similares, sus bandas se encuentran en las 9,162pb, mientras que la segunda banda se encuentra en las 4,072 pb. Sin embargo comienzan con sus diferencias en la tercera banda, mientras que IECP1 tiene la tercer banda un poco mayor a 3,054 pb, la cepa IECP5, la muestra por debajo de las 4,072 pb. También la cepa híbrida IECP5 muestra amplificación, esta cepa se observan dos bandas, una por debajo de 4,072 pb y la segunda un poco más arriba de las 3,054 pb. La cepa parental CP253 solo muestra la amplificación de una banda entre las 3,054 y 2,036 pb.

También la cepa control UAPO muestra una sola banda con un peso menor de 2,036 pb. Es importante observar que el patrón de bandeo que se muestra con este iniciador, indica que tanto las cepas parentales como las cepas híbridas lograron la amplificación de ADN, de las cuales la cepa parental CP253 y las cepas híbridas IEC1 e IEC2 muestran una banda común en 10,180 pb al igual que otra banda en 9,162 pb.

Con el sexto iniciador (OPF-13) no se logró la amplificación de ninguna cepa. Para el séptimo iniciador (OPG-2) solo la cepa parental CP253 y la cepa IEC2 presentaron amplificación, las cuales comparten el mismo peso molecular de sus bandas, el cual es aproximadamente de 9,162 pb y la segunda se encuentra por debajo de los 4,072 pb.

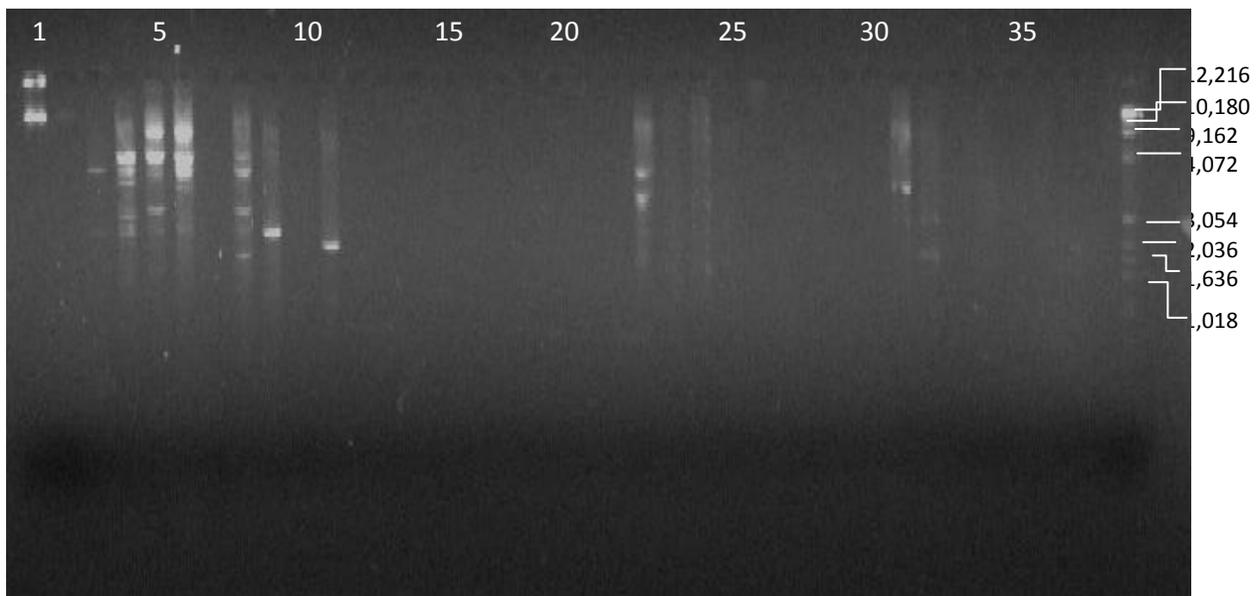


Figura 12. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de ADN de cepas de *Pleurotus spp.* por PCR-RAPD. Carril 1 y 2 marcador molecular λ HIND III. Del carril 3-11 IE200, CP253, IEC1 (IE200₁XCP253₆), IEC2 (IE200₂XCP253₆), IEC3 (IE200₃XCP253₆), IEC5 (IE200₅XCP253₆),CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPH-3. Del carril 12-20 IE200, CP253, IEC1 (IE200₁XCP253₆), IEC2 (IE200₂XCP253₆), IEC3 (IE200₃XCP253₆), IEC5 (IE200₅XCP253₆),CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPF-13. Del carril 21-29 IE200, CP253, IEC1 (IE200₁XCP253₆), IEC2 (IE200₂XCP253₆), IEC3 (IE200₃XCP253₆), IEC5 (IE200₅XCP253₆),CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPG-2. Del carril 30-38 IE200, CP253, IEC1 (IE200₁XCP253₆), IEC2 (IE200₂XCP253₆), IEC3 (IE200₃XCP253₆), IEC5 (IE200₅XCP253₆),CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO PO con OPH-2. Carril 39 marcador 1K Ladder.

Finalmente se muestra el tercer gel (figura 13) con los últimos dos iniciadores restantes, en este gel se observó que para el iniciador OPH-3, la cepa parental CP253 amplificó dos bandas, las cuales se encuentran una en los 4,072 pb y la segunda por debajo de este los 4,072 pb. La cepa híbrida

IECP3, muestra tres bandas, la primera de ella entre los 3,054 pb la segunda en los 1,636 pb y la tercera por debajo de los 1,018 pb. De igual manera la cepa IEC5 amplificó solo dos bandas, de las cuales la primera se encuentra por debajo de las 9,162 pb y la segunda se encuentra por debajo de las 3,054 pb. El último iniciador empleado fue OPG-3, con este iniciador la cepa parental CP253 mostró cuatro bandas, de las cuales la primera se encuentra en los 10,180 pb, la segunda se encuentra por debajo de los 9,182 pb, la tercera banda se localiza por arriba de los 3,054 pb y finalmente la cuarta se encuentra por debajo de los 1,636 pb. De igual forma, la cepa IEC1, mostró tres bandas las cuales se encuentran por arriba de los 3,054 pb, la segunda se encuentra un poco debajo de los 3,054 pb y finalmente la tercera en los 1.636 pb. La cepa híbrida IEC3, presentó seis bandas amplificadas, la mayoría se encuentra entre los 4,072 y 3,054 pb

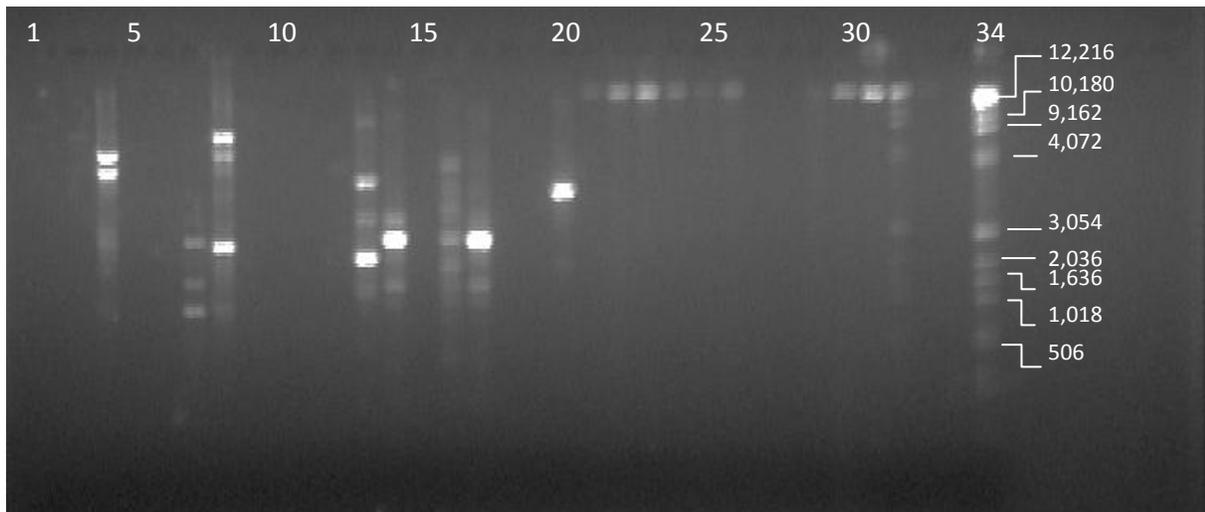


Figura 13. Gel de agarosa al 0.7% a 75 volts durante 95 minutos donde se muestra la amplificación de bandas de ADN de *Pleurotus spp* por PCR-RAPD. En los carriles 1 y 2 se colocó el marcador λ HIND III. Del carril 3-11 IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPH-3'. Del carril 12-20 IE200, CP253, IECP1 (IE200₁XCP253₆), IECP2 (IE200₂XCP253₆), IECP3 (IE200₃XCP253₆), IECP5 (IE200₅XCP253₆), CP253 liofilizada, PCM liofilizada, UAPO con OPG-3. Del 21-30 se realizaron diversas diluciones del marcador molecular λ HIND III. Carril 31. Marcador 1Kb Ladder. Carril 34 marcador 1Kb Ladder.

Para determinar la relación que existe entre las cepas empleadas en esta tesis, se empleó el programa computacional NTSYS. Para realizar el análisis por medio de este programa, fue necesario evaluar el número de bandas en cada oligonucleótido, así como también las amplificaciones para cada cepa, por ello se construyeron varias matrices, una general en la que se consideraron todos los oligonucleótidos trabajados contra las cepas utilizadas, la cual se muestra en el anexo 1, las otras matrices fueron para cada oligonucleótido con respecto a las cepas de

Pleurotus spp., cada matriz fue analizada con el programa NTSYS, determinándose la similitud mediante el índice de información Jacard y posteriormente el fenograma correspondiente.

De las cepas trabajadas con los diferentes iniciadores, el oligonucleótido que mayor número de bandas de diversos pesos moleculares obtuvo fue OPG-5 con 31 bandas, seguido por el oligonucleótido OPF-9 con 27 bandas de diferente peso molecular, en tercer lugar se encuentra el oligonucleótido OPH-3 con 24 bandas de diferente peso molecular.

El fenograma del oligonucleótido OPG-5 se muestra en la figura 14 en el cual se puede observar que las cepas híbridas IECP2 e IECP5 comparten la misma rama con un coeficiente de similitud de 0.83, mientras que la cepa híbrida IECP1 muestra un coeficiente de similitud de 0.40, la cepa empleada como testigo (PCM) mostro un coeficiente de similitud de 0.55 con respecto a las cepas híbridas IECP2 e IECP5. La cepa parental CP253 y la cepa híbrida IECP3 comparten la misma rama con un coeficiente de similitud de 0.6. En esta tesis, se empleó el análisis de cluster para la construcción de los fenogramas de los oligonucleótidos mostrados en las siguientes figuras (14-16). En el 2010, Chandra y col. Lograron la identificación de 14 cepas de *P. nebrodensis*, empleando el análisis de cluster basado en la matriz original de datos arrojados por el perfil de RAPD.

OLIGONUCLEOTIDO OPG-5

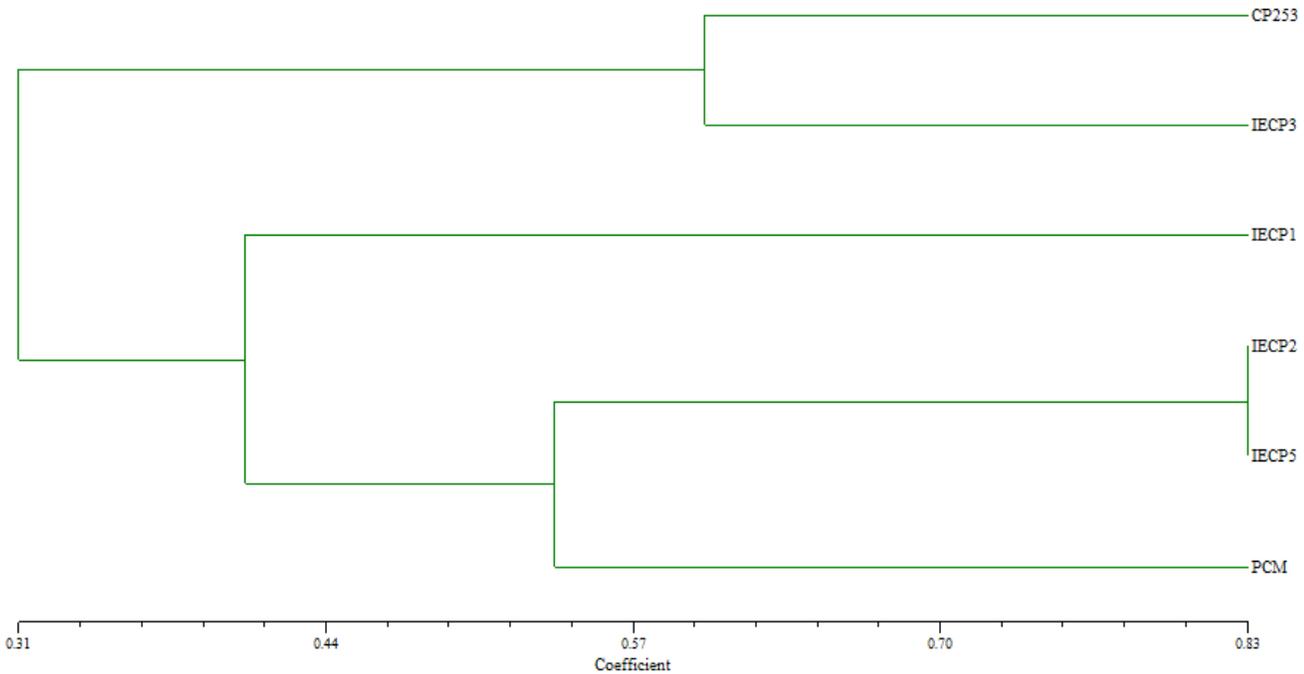


Figura 14. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandejo de PCR-RAPD del oligonucleótido OPG-5 de las cepas empleadas en esta tesis.

En la figura 15, se muestra el fenograma obtenido para el iniciador OPF-9, en donde se observa que las cepas híbridas IECP1 e IECP2 comparten la misma rama con un coeficiente de similitud de 0.50, mientras que la cepa IECP5 tiene un coeficiente de similitud de 0.35. La cepa híbrida IECP3 tiene un coeficiente de similitud de 0.15 con respecto a las demás cepas híbridas, en cuanto a la cepa parental CP253 y el testigo PCM no mostraron ninguna similitud con respecto a las cepas híbridas.

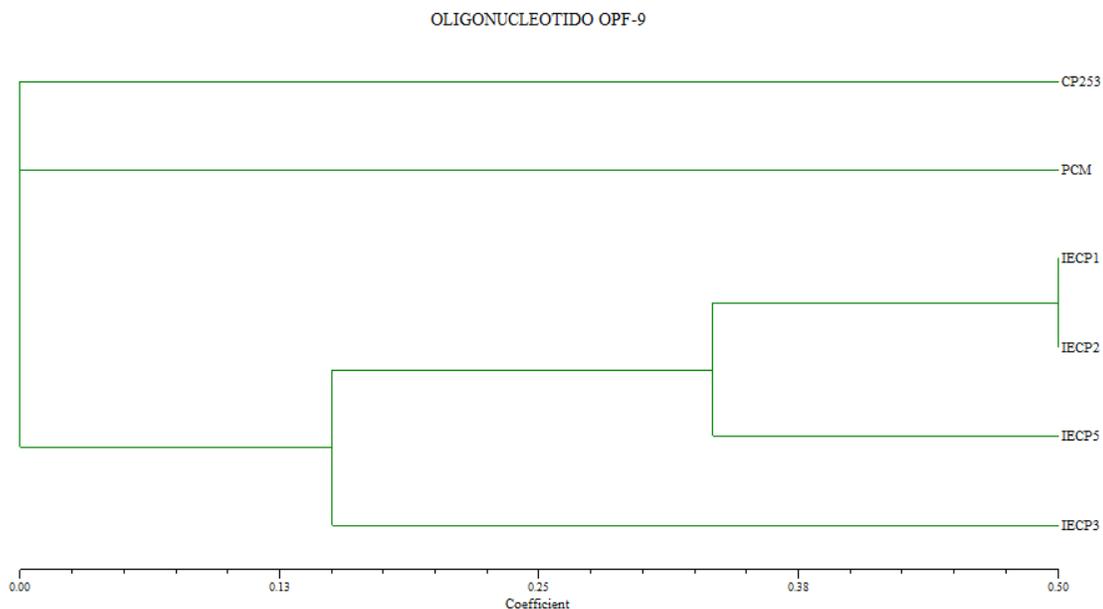


Figura 15. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandeado de PCR-RAPD del oligonucleótido OPF-9 de las cepas empleadas en esta tesis.

Finalmente se elaboró un fenograma general (figura 16) en donde se analiza el comportamiento de las cepas con los diez oligonucleótidos empleados a lo largo de la tesis, en este fenograma se observan los coeficiente de similitud para cada una de las cepas, teniendo que las cepas IECP2 e IECP5 muestran un coeficiente de similitud de 0.54, mientras que la cepa IECP1 tiene un coeficiente de similitud de 0.30. En cuanto a la cepa parental CP253 muestra un coeficiente de similitud de 0.13 con respecto a las tres cepas híbridas mencionadas anteriormente, sin embargo, la cepa IECP3 mostro un coeficiente de 0.8 con respecto a las mismas cepas. Analizando las dos cepas empleadas como testigo, es importante mencionar que la cepa PCM mostro un coeficiente de similitud de 0.15 con respecto a las cepas híbridas IECP2 e IECP5, esto considerando que esta cepa no tuvo participación alguna en la formación de las cepas híbridas. En cuanto a la cepa UAPO esta tuvo un coeficiente de similitud de 0.01.

En el 2010, Chandra evaluó 10 primers evaluar los cultivos de la especie *Pleurotus spp.* de India, de los cuales tres fueron seleccionados para la amplificación de ADN de *Pleurotus spp.* de los cuales los pesos moleculares de las bandas amplificadas se encuentran en un rango de 1.2-0.14 kb. En este mismo estudio, los índices de similitud fueron calculados por medio de la identidad normalizada. Estos coeficientes de similitud de las ocho cepas se encuentran en un rango de 0.111 para *P. flabellatus* a 0.727 para *P. cystidiosus*. Mientras que el coeficiente de similitud promedio

fue de 0.357. Mientras que en esta tesis, el rango de los coeficientes de similitud son de 0.01 para la cepa UAPO hasta 0.50 para las cepas híbridas IECP1 e IECP2.

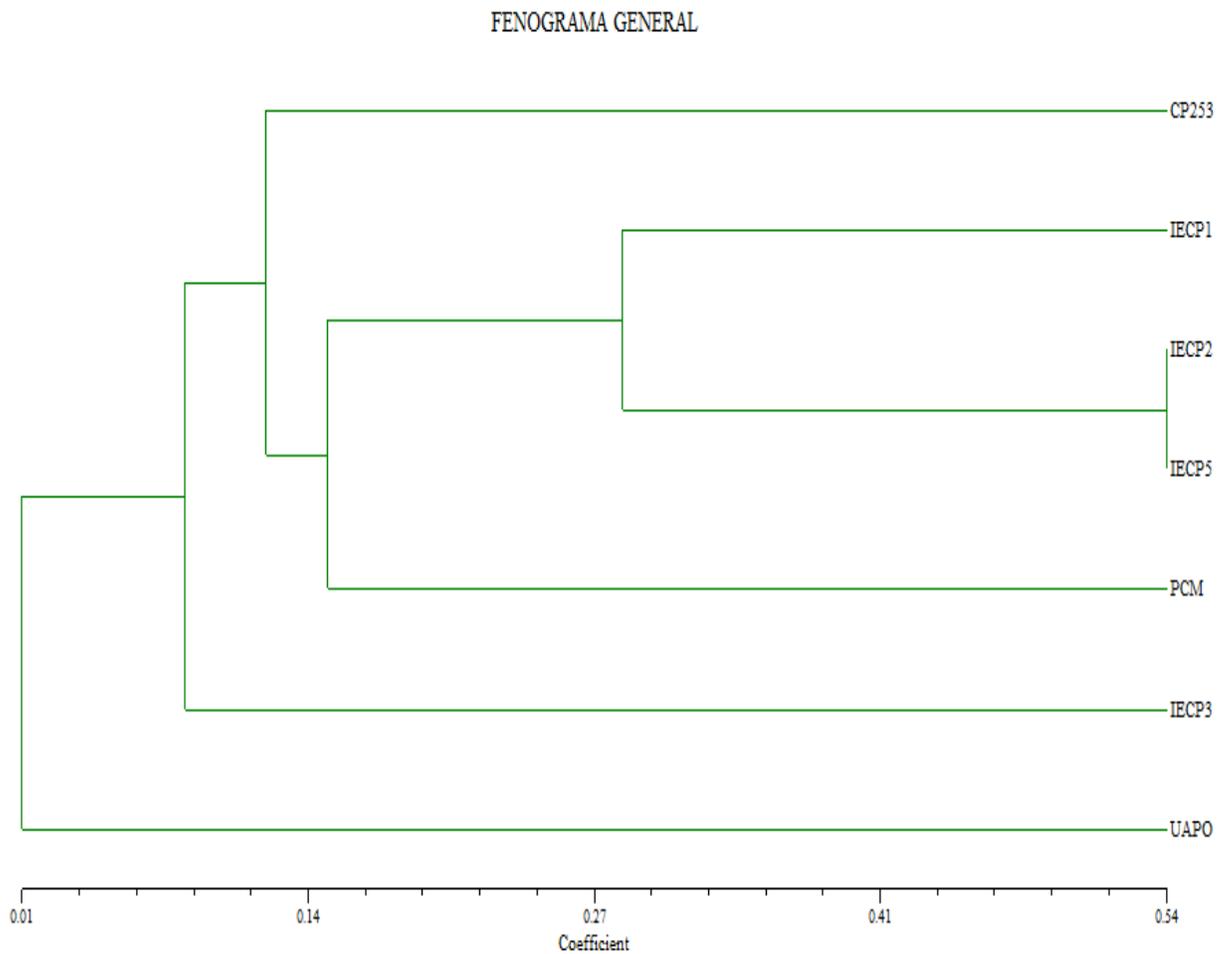


Figura 16. Fenograma UPGMA construido a partir de la matriz original de datos arrojado por el bandeado de PCR-RAPD analizando los diez iniciadores y las cepas empleadas en esta tesis.

La técnica de PCR-RAPD ha sido empleada con éxito para distinguir otros géneros de hongos, como por ejemplo la discriminación de diferentes cepas de *Agaricus bisporus* (Khush y col., 1992, Moore y Chiu, 2001), así como también ha sido empleada para la identificación y evaluación genética de progenies monosporicas de *A. bisporus* y *Pleurotus ostreatus*.

En el 2009, Alam y col. Empleó 20 primers, de los cuales solo 12 tuvieron una amplificación eficiente para el ADN genómico. Las bandas que fueron amplificadas tienen un tamaño de 0.20

hasta 2.0 Kb. En este estudio, se obtuvieron los mismos resultados tanto en los perfiles arrojados por RAPD que por el análisis de secuencia de la región de ITS.

Es importante mencionar que a pesar de que existió amplificación de bandas por medio de RAPD, un procedimiento importante para verificar estos resultados es la secuenciación, ya que existen diversos inconvenientes con el uso de primers, ya que pueden existir heteroduplex, la hibridación de las hebras de ADN, este tipo de problemas puede revelar un número mayor de bandas o de picos en los análisis de electroforesis. Otro de los inconvenientes que se producen son los quiméros, existen dos tipos, los que son formados por la alineación incompleta del primer y los que se forman durante el cambio de la hebra molde en la síntesis de ADN (Kanagawa, 2003). Por ello es importante la secuenciación de los productos obtenidos por RAPD en esta tesis, para descartar algún problema como los antes mencionados.

8.- CONCLUSIONES

1. Las condiciones empleadas en el laboratorio, permitieron obtener micelios monocariontes a partir de la desdicarionización química de las cepas parentales IE200 y CP253.
2. Se logró obtener una simetría en el número de neohaplontes obtenidos a partir de la desdicarionización química, aún trabajando con una cantidad relativamente pequeña de neohaplontes.
3. Se obtuvieron cuatro cepas híbridas (IECP1, IECP2, IECP3 e IECP5) que generaron cuerpos fructíferos y por lo tanto fueron fértiles. La coloración de los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas son semejantes a las parentales.
4. La cepa híbrida IECP5 comparte parámetros de producción semejantes a los de las progenitoras. Encontrándose según el análisis estadístico con una eficiencia biológica de 9.94, una tasa de producción de 9.61 y un rendimiento del 10.30.
5. De la amplificación de ADN por medio de PCR.RAPD, se obtuvieron amplificaciones en las cepas híbridas en diferentes iniciadores, siendo el iniciador OPG-5 el que obtuvo mayor número de bandas (31 bandas de diferente peso molecular), seguido por OPF-9 con 27 bandas diferentes.
6. En los fenogramas obtenidos para los iniciadores OPF-9 y OPH-3, las cepas IECP1 e IECP2, se encuentran en la misma rama, mientras que las cepas IECP2 e IECP5 se localizaron en la misma rama para el iniciador OPG-5.
7. Las cepas que tienen un coeficiente de similitud mayor fueron las híbridas IECP2 e IECP5 (0.54).

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilar, D. L. (2007). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp. Tesis de Maestría en Ciencias Bioprocesos. UPIBI. IPN.

Alves de Lima, P. L., Delmanto, R. D., Sugui, M. M., Da Eira, A. F., Salvadori, D. M., Sperit, G., Ribeiro, L. R., (2001). *Lentinula edodes* (Berk) Plegler (*Shiitake*) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. *Mutant Res.* 496:23-32.

Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B., Lee, T. S. (2009). Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Microbiology.* 37(3): 183-188.

Anderson, J.B., Petsche, D. M., Smith M. L.(1987). Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 79:69-76.

Anderson, N., G.R. Furnier., A.S. Wang., J.W. Schwandt. (1991). The member and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. *Can. J. Bot.* 69:2187-2191.

Anderson, N., Wang S. S., Schwandt J. W. (1973). The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycología.* 65:28-35.

Arias, G. A. (1998). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para el cultivo comercial por apareamiento entre neohaplontes. Tesis de Maestría. UNAM, México, D. F.

Bran, M., Morales, E., Cáceres, R., González, M., Flores, R. (2006). Mejoramiento genético y producción inóculo de cepas nativas de *Pleurotus spp.* Resúmenes de investigaciones de área técnica. 43-48.

Bruns, T.D., Foge R., Taylor J. W. (1990). Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium species. *Mycologia* 82: 175-184.

Calvo-Bado, L. (2001). Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. En Sánchez, V. J. E., Royse, D. J. la biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* El colegio de la frontera sur. México. 71-79 pp.

Cardona, U. L. F. (2001). Revisión: Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *crónica forestal y del medio ambiente.* 16: 99-119.

Chandra, S., Ghosh, K., Avharya, K. (2010). Comparative studies on the Indian cultivated *Pleurotus* species by RAPD. *Nature and Science* 8(7):90-94.

Chang, S. T., Miles, P. G. (1989). Edible Mushrooms and their cultivation. CRC. Press INC., Boca de Ratón.

Chang, S. T. (1999). Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century. Nongreen revolution. International Journal of Medicinal Mushrooms. 1:1-7.

Chang, S. T. (1999a). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. In China. International Journal of Medicinal Mushrooms 1:291-300.

Chang, S. T., Miles P. G. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact. CRC Press, Boca Raton.

Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos (2008). El cultivo de Setas en Morelos.

Eger, G., Eden, G., Wissing, E. (1976). *Pleurotus otreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. Theoretical and applied genetics. 47: 155-163.

Eger, G. (1978). Biology and breeding of *Pleurotus*. In: Chang, S. T., Hayes, W. A. (eds). The biology and cultivation of edible mushrooms. New York, Academic Press. 497-519.

Eger, G., Li, S. F., Leal-Lara, H. (1979). Contribution of the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. Mycología 71:577-588.

Eugenio, C. P., Anderson, N. A. (1968). The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Mycología. 60: 627- 634.

Fan, L., Pan, H., Thomaz, A., Pandey, A., Soccol, C. R. (2006). Advances in mushroom research in the last decade. Food Technol. Biotechnol. 44(3):303-311

Fonseca, G., Ávila, E., Scowitz, Liana, Antunes, A., Vieira, J., Levy, J. Oyster (2008). Mushrooms Species Differentiation Through Molecular markers RAPD. International Journal of Plant Breeding and Genetics 2(1):13-18. ISSN 1819-3595. CEP 96201-900, Río Grande, RS, Brasil

Fries, N., Aschan, K. (1952). The physiological heterogeneity of the dikariotic mycelium of *Polyporus abietinus* investigated with the aid of the micrurgical technique. Sven. Bot. Tidskr. 46:429-445.

Fukumasa-Nakai, Y., Matsumoto, T., Komatsu, M. (1994). Dedikarionization of the Shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. J. Gen. Appl. Microbiol. 40:551-552.

Grattapaglia, D., Elias M. (1998) introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN. Brasil.

Ginterová, A. (1973). Desdikaryotization of higher fungi in submerged culture. Folia Microbiology. 18:277-280.

Goo, Y., Zhov, S., Chen, G., Dai, X., Ye, J. (2002). A phase I/II study of *Ganoderma lucidum* (curt. F.) P. kurst extract (Ganopoly) in patients with advanced cancer. *Int. J. Med. Mushrooms*. 4:207-214.

González, O. (2008). Regeneración In vitro de *Turbinicarpus pseudopectinatus*(Backeb) Glass y P. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPD'S. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM.

González, P., Labarère, J. (1998). Sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains highly species-specific variations within the genus *Agrocybe*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4149-4160.

González, P., G. Barroso, J. Labarère. (1997). DNA sequence and secondary structure of the mitochondrial small subunit ribosomal coding region including a group IC-2 intron from the cultivated basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Gene* 184: 55-63.

Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. México. 245 pp.

Hardys, H., B., Schierwater, S. L. Dellaporta., R. DeSalle and L. W. Buss (1993). Determination of paternity in dragonflies by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Ecol.* 2: 79-87.

Harder, R. (1927). Über mikrochirurgische operation an hymenony zeton *Z. Wiss. Mikrosk. Mikrosk Tech.* 44:173-192.

Herrera, T., Ulloa, M. (1998). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica-UNAM. México.

Hibbet, D. S., Pine, E. M., Langer, G., Donoghue, M. J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:12002-12006.

Honda, Y., Matsumaya, T., Irie, T., Watanabe T., Kuwahara, M. (2000). Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 37:209-212.

Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, E., Leal-Lara, H. (2009). Grupos de interesterilidad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista mexicana de micología*. Vol. 30. 31-42 pp.

Iracabal, B., Zervakis, G., Labarère J. (1995). Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*. 141:1479-1490.

James, T. Y., Liou, S. R., Vilgalys, R. (2004). The genetic structure and diversity of the A and B mating-tape genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamur*. *Fungal Genetics and Biology* , 41:813-825.

Kanagawa, T. (2003). Bias and Artifacts in multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 96, N. 4, 317-323 pp.

Koltin, Y., Stamberg, J., Lemke, P. A. (1972). Genetic Structure and Evolution of the Incompatibility Factors in Higher Fungi. *Bacteriological reviews*. 36(2):156-171.

Khush, R. S., Becker, E., Wach, M. (1992). DNA amplification polymorphism of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environment Microbiology*. 58: 2971-2977.

Kues, U. V., Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiology Biotechnology*. 54:141-152.

Leal-Lara, H. (1980). Sporelessness in Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr.). Kummer A genetical study by means of a new desdikaryotization method Ph. D. Disseertation, Marburg University, Marbulgl Lahn.

Leal-Lara, H., Eger-Hummel, G. (1982). A monokariotization method and its use for genetic studies in Word-rooting basidiomycetes. *Theoretical and applied genetics*. 61: 65-68.

Labarère, J. 1992. Breeding of edible mushrooms. In: T. Quimio (ed.). *Development of Mushroom Cultivation Technology and its Utilisation*. Foreign Languages Publishing House, Pyongyang, Korea.

Labarère, J., Bois, F. (2001). La conservación y el uso de recursos genéticos de *Pleurotus* spp. El colegio de la frontera sur. México,

Larraya, L. M., Peñas, M. M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A. G., Ramírez, L. (1999). Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genetic*. 34:486-493.

Larraya, L., Pérez, G., Iribarren, I., Blanco, J. A., Alfonso, M., Pisabrro, A. G. y Ramírez, L.(2001). Relationship Between Monokaryotic Growth Rate and Mating Type in th Edible Basidiomycete *Pleurotus otreatus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 67:3385-3390.

Larraya, L., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A. G. y Ramírez L. (2002). Quantitative Trait Loci Controlling Vegetative Growth Rate in the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microl*. 68:1109-1114.

Larraya, L., Alfonso, M., Pisabarro, A. G. y Ramírez, L. (2003). Mapping of genomic regions (QTLs) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *P. ostreatus*. *Appl. Enviroment Microbiology*. 69(6):3617-3625.

Lefebvre, V., Goffinet, B., Chauvet, J., Caromel, B. y Signoiet P. (2001). Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theorical and Applied genetics*. 102:741-750.

Ma, S. M., Wang, Y. F., Yi, R. H. (2004). Review of edible fungi breeding. *J. N. W. Sci. Tech. University Agric. Forestry*. 32:108-111.

Maldonado, A. Y. (2007). Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus* spp, por apareamiento de neohaplontes compatibles. Tesis de maestría en Bioprocesos. UPIBI. IPN.

Mankel, A., Kothe, E. (1999). Determining parameters for the use of a β -galactosidase reporter gene in *Schizophyllum commune*. Journal of Basic Microbiology. 39(3): 169-175.

Manning, D. L. 1977. Fruiting and mating compatibility studies in the *Pleurotus ostreatus-sapidus* complex. H.E. Bigelow y E. G. Simmons (eds). Second International mycological Congress. Abstract. 415. Tampa: IMC-2 Inc.

Martínez-Carrera, D., Vergara, F., S. Juárez., A. Aguilar., M. Sobal., W. Martínez. (1995). Simple technology for canning cultivated edible mushrooms in rural conditions in Mexico. Micol. Neotrop. Apl. 9:15-27.

Martínez-Carrera, D. (2002). Current development of mushroom biotechnology in Latin America. Micol. Apl. Int. 14:61-74.

Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Morales, P. Martínez, W., Martínez, M., Mayett, Y. (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Posgrados. México.

Martínez –Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles.

Magae, Y., Kakimoto, Y., Kashiwagi, Y., Sasaki, T. (1985). Fruiting body formation from regenerated mycelium of *Pleurotus ostreatus* protoplast. Applied and Environmental microbiology. 94(2):441-442.

Mikosch, T. S. P., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A. S. M., van Griensven L. J. L. D. (2000). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Mushroom Science. 15:173-179.

Milles, R. G. y Roper, J. R. (1956). Recovery of the component strain from dikaryotic micelia. Micologia 48: 484-494.

Moda, M. E., Horii, J., Fillet, S. M. E. (2005). Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju* producton on washed and supplemented sugarcane bagase. Sci. Agric. 62(2): 127-132.

Moncalvo J. M., H. H. Wang y R. S. Hseu. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacer and 25S ribosomal DNA sequences. Mycologia 87: 223-238.

Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F. M., Rehner, S. A., Johnson, J. & Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Syst Biol 49, 278–305.

Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S. A. & 11 other authors (2002). One hundred and seventeen clades of euagarics. Mol. Phylogenet Evol 23, 357–400.

Moore-Landecker, E. (1996), Fundamentals of the fungi. 4^a edición. Editorial Prentice Hall. USA 574 pp.

- Moore, A. J., Challen, M. P., Warner, P. J. (2001). RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. *Appl. Environment Microbiology*. 55:742-749.
- Moore, D., Chiu, S. W. (2001). Filamentous fungi as food. In: Pointing S. B., Hyde D. eds *Exploitation of filamentous fungi*. Fungal diversity press, Hong-Kong.
- Mora, V., Martínez-Carrera, D. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus spp.* en México. *Colegio de la Frontera Sur*. 7-26 pp.
- Neda, H., Naka, T. (1995). Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial secuencias of 18S rDNA and ITS-1 regions. 161-168. In *science and cultivation of edible fungi*. Ed. T. J. Elliot A. A. Balkema. Rotterdam.
- Noël, T., T.D. Ho Huynh y J. Labarère. 1991. Genetic variability of the wild incompatibility alleles of the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 745-751.
- Peña, M., Rust, B., Larraya, L., Ramírez, L., Pisabarro, A. G. (2002). Differentially regulated vegetative mycelium specific hydrophobins of the edible basidiomycete *P. ostreatus*. *Appl. Environment microbiology*. 68(8):3891-1898.
- Peña, M., Aranguren, J., Ramírez, L. y Pisabarro, A. G. (2004). Structure of the gene coding for the fruit body specific hydrophobin Fbh1 of the edible basidiomycete *P. ostreatus*. *Mycologia* 96(1):75-82.
- Prescott, Lansing. (2002). *Microbiology*. 5ta edición. USA: Mc. Graw-Hill. ISBN 0-07-282905-2.
- Ragot, M., D. A. Hoisington. 1993. Molecular markers for plant breeding : Comparisons of RFLP and RAPD genotyping cost. *Theor. Appl. Genet.* 86: 975-984.
- Ramírez-Carrillo, R., Leal-Lara, H. (2002). Symmetrical recovery of monokaryotic components from *lentinula edodes* using dikaryotization. *Mushroom biology and mushroom products*. UAEM. ISBN 968-878-105-3. 141-149 pp.
- Ramírez-Carrillo, R., Hernández, V. O., Galván, P. F., Leal-Lara, H. (2007). Productividad de cepas híbridas de *Pleurotus X Lentinula*. *Colegio de la Frontera Sur*. 55-64 pp.
- Ruiz-Deñás, F. J., Camarero, S., Pérez-Booda, M., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Chemical Society Transactions*. 29:116-122.
- Saiki, R. K., Geifand, D. H., Stoffel, S. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R., Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus* VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol. 14. 173-176 pp.

- Salmones, D., Mestizo, L. V., Gaitán-Hernández, R. (2004). Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades *Pleurotus djamur* (Fr.) Boedijn. Revista mexicana de micología. 18:21-26.
- Scott, M. P. y S. M. Williams. (1993). Comparative reproductive success of comunally breeding burying beetles as assessed by PCR with randomly amplified polymorphic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2242- 245.
- Scott, M. P., K. M. Haymes y S. C. Willams. (1992). Parentage analysis usind RAPD PCR. Nucleic Acids Res. 20: 5493.
- Sierra-Galván, S. (2009). Los hongos comestibles y su cultivo. Historia, desarrollo actual y perspectivas en México y el mundo. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F.
- Singh, S. K., Doshi, A., Yadav, M. C., Kamal, S. (2006). Molecular characterization of specialy mushrooms of western Rajasthan, India. Current Science. Vol. 91 No. 9. 1225-1230.
- Sokol, S., M. Kaldorf y H. Bothe. 1999. Molecular characterization and taxonomic affinities of species of the white rot fungus *Ganoderma*. Zeitschrift fur Naturforschung C 54: 314-318.
- Sonnenberg, A. S. (2000). Genetics and breeding of *Agaricus bisporus*. In Mushroom science, XV L. J. L. D. Van Griensuen (Ed) Balkem, Totterdam, The Netherlands. 25-39 pp.
- Spicer, G.S. 1995 Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. J. Molec. Evol. 41: 749-759.
- Sunagawa, M., Magae, Y. (2005). Isolation of genes differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. FEMS Microbiology letters 246:279-284.
- Sugui, M., Alves de Lima, P., Delmanto, R., da Eira, A., Salvadori, A., Ribeiro, L., (2003). Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (Berk) pegler mshroom and possible variation among lineages. Food Chem. 41:555-560.
- Takemaru, T. (1964). Monokaryotization studies in the basidiomycetes I Chemical Induction Rep. Tottori Myo Institute (Japan).
- Terakawa H. 1960. The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. Scientific papers. (Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo). 10:65-71
- Valencia-del Toro, G., Leal-Lara, H. (1999). Estudios de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus spp.* con cuerpos fructíferos de diversos colores. Rev. Mex. Mocol. 15:65-71.
- Valencia-del Toro, G., Aguilar M. E., (2000). Aspectos generales de las setas comestibles (*Pleurotus spp.*). UNAM-Iztacala.

Valencia-del Toro, G. (2002). Estudio sobre la expresión del color de los esporóforos en *Pleurotus spp.* por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis-Doctorado. UNAM. México, D. F.

Valencia-del Toro, G., Castelán, V. R., Garín-Aguilar, M. E., Leal-Lara, H. (2003) Producción de cepas coloridas de *Pleurotus spp.* en sustrato estéril y pasteurizado. Revista Mexicana de Micología. 17: 1-5.

Valencia-del Toro, G., Castelán, R., Aguilar M. E., Leal-Lara H. (2006). Biological quality of proteins from tree strains *Pleurotus spp.* Food Chemistry. 94:494-497.

Vilgalys, R., Miller, O. (1983). Mating relationships within the *Collybia dryophila* group in Europe. Trans. Br. Mycol. Soc. 89:295-300.

Vilgalys, R. J., Johnson, J. L. (1987). Extensive genetic divergence associated with speciation in filamentous fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :2355-2358.

Vilgalys, R. (1991). Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. Micología 83: 758-773.

Vilgalys, R., Sun, B. L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushrooms *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proceed. Nat. Acad. Sc. 91:4599-603.

Vogel, F. y Salmones, D. (2000). Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus spp.* cultivadas en una planta comercial. Rev. Iberoam. Micol. 17:138-141.

Wasser S. P. y Weis A. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms. Current perspective (Review) International Journal of Medicinal Mushrooms 1:32-62.

Wingfield, B.D. y M.J. Wingfield. 1993. The value of dried fungal cultures for taxonomic comparisons using PCR and RFLP analysis. Mycotaxon 46: 429-436.

Zervakis, G., C. Bali. (1995). Incompatibility alleles and mating behavior between and within *Pleurotus* species. Mush. Sc. 14: 53-62.

Zervakis, G., Venturella, G., Papadopoulou, K. (2001) Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology. 147:3183-3194.

Zervakis, G., Venturella, G. (2002). Mushroom breeding and cultivation enhances *ex situ* conservation of Mediterranean *Pleurotus* taxa. Managing plant genetic diversity. CABI publishing, UK. 351-358.

Zervakis, G., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogenetic, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. Microbiology. 150:715-726.

