



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS –IIQB-**

**MEJORAMIENTO GENÉTICO Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE CEPAS NATIVAS DE
Pleurotus spp**

COORDINADORA

Licda. María del Carmen Bran González

INVESTIGADORES

**Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel
Dr. Mario González Pérez
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú**

AUXILIAR DE INVESTIGACIÓN

Br. Roberto Agustín Cáceres Staackmann

**Inicio de la Investigación: Febrero de 2006
Conclusión de la investigación: Diciembre de 2006**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS –IIQB-**

**MEJORAMIENTO GENÉTICO Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE CEPAS
NATIVAS DE *Pleurotus* spp**

COORDINADORA

Licda. María del Carmen Bran González

INVESTIGADORES

**Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel
Dr. Mario González Pérez
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú**

AUXILIAR DE INVESTIGACIÓN

Br. Roberto Agustín Cáceres Staackmann

**Inicio de la Investigación: Febrero de 2006
Conclusión de la investigación: Diciembre de 2006**

INDICE

	Contenido	Página
I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Objetivos	3
IV.	Revisión de bibliografía	4
V.	Metodología	9
VI.	Resultados	14
VII.	Discusión de resultados	28
VIII.	Conclusiones y recomendaciones	32
IX.	Bibliografía	36
X.	Figuras	38
XI.	Anexos	43

I. RESUMEN

Los recursos genéticos de los hongos tienen un alto interés para la alimentación humana y animal. Las diferentes especies de *Pleurotus* se encuentran en la segunda posición entre los hongos comestibles cultivados, con el 24% de la producción mundial. También en su papel de reciclador de materia orgánica, *Pleurotus* spp, juegan un papel importante para el medio ambiente, proveyendo material básico para el desarrollo de la agricultura y alimentación.

La colecta de *Pleurotus* spp involucra la prospección, el estudio, la conservación, y el uso de cepas de este género con diferentes finalidades y objetivos, en aspectos de investigación ambiental, agrícolas, bioquímicas, farmacéuticos y taxonómicos.

Actualmente en Guatemala, los estudios sobre *Pleurotus* solamente se han enfocado a determinar su taxonomía y a evaluar la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos lignocelulósicos y otras características fenotípicas de varias cepas nativas. Así, se cuenta con un cepario que incluye cepas de *Pleurotus djamor* var. *djamor*, *P. djamor* var. *roseus*, y *P. ostreatus*; (Bran *et al* 2001, 2002, 2003 y 2004).

Por tal motivo, esta investigación formó un banco de cepas 47 cepas monocarióticas y 12 dicarióticas a partir de 2 cepas de *Pleurotus djamor* var. *djamor* y dos cepas de *P. ostreatus*. Los monocariones aislados a partir de la cepa parental *P. djamor* var. *djamor* 70.03, presentaron los tipos de incompatibilidad I, II y III, mientras que los monocariones de la cepa parental *P. djamor* var. *djamor* 01.06, correspondieron a los tipos de incompatibilidad II y III. Los monocariones de la cepa parental *P. ostreatus* 152.05, presentaron los tipos de incompatibilidad I, II, III y IV, en tanto que los monocariones de la cepa parental *P. ostreatus* 06.03, mostraron los tipos de incompatibilidad I, II, III y IV.

Como producto de las cruces se obtuvieron 12 dicariones: 4 para *P. djamor* var. *djamor* y 8 para *P. ostreatus*. Todos los dicariones de *P. djamor* var. *djamor* obtuvieron colonias con mayor diámetro medio y tasa de crecimiento radial que los parentales a los 7 días de incubación. Los dicariones de *P. ostreatus* no superaron a la cepa parental 152.05, pero tres de ellos fueron mejores a la cepa parental 06.03, en diámetro medio de las colonias y tasa de crecimiento radial, a los 9 días de incubación.

El inóculo de los dicariones y cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* y *P. ostreatus*, se obtuvo en tres semanas y la productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en pulpa de café, evidenció que el dicarion DJ_S₃ presentó la mayor eficiencia biológica y tasa de producción en pulpa de café, sobrepasando a las cepas parentales. La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en olote de maíz, mostró que la mayor eficiencia biológica se observó en la cepa parental 70.03 y ninguno de los dicariones superó a ambos parentales en eficiencia biológica. Las cepas parentales y dicariones de *P. ostreatus* en olote de maíz, mostraron que la mayor eficiencia biológica la obtuvo la cepa parental 152.05 ya que no fue superada por ninguno de los dicariones.

II. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cultivo de *Pleurotus* se visualiza como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial y se ha propuesto como una nueva alternativa de producción de alimentos de alta calidad para consumo humano, a través del reciclaje de desechos agrícolas y forestales que permite obtener de manera simultánea subproductos que se pueden destinar a la alimentación de animales o como biofertilizante.

Sin embargo, 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 (rendimiento, calidad, sabor).

Actualmente en Guatemala, gracias a los trabajos ejecutados sobre la diversidad fúngica guatemalteca se cuenta ya con una colección de cepas guatemaltecas de *Pleurotus* spp. Sin embargo, no existe un banco genético debidamente sistematizado y tampoco se han obtenido nuevos genotipos de las cepas que se tienen ya en colección, para escoger nuevas variedades mejoradas.

Por tal motivo, es necesario desarrollar programas de mejoramiento genético del germoplasma de *Pleurotus* nativos, que permitan seleccionar cepas de rápido desarrollo micelial y alta producción de cuerpos fructíferos con características aceptables para su comercialización y mejor aceptación por parte de los consumidores.

En esta investigación se obtuvieron aislamientos monocarióticos y dicarióticos a partir de cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* y *P. ostreatus*, para determinar su tasa de crecimiento radial *in vitro* y su productividad, sobre pulpa de café u olote de maíz. Para el efecto se utilizó las metodologías propuestas por Salmones *et al*, 1997; Mier, *et al*, 2002; Chang & Miles, *et al*, 2004 y Sánchez, 2001. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y pruebas de intervalos múltiples de Tukey.

Este proyecto fue cofinanciado por la Dirección General de Investigación y el Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

III.OBJETIVOS

1. Generales:

- a. Contribuir al mejoramiento genético de los recursos fúngicos comestibles con los que cuenta el país.
- b. Iniciar un programa de mejoramiento genético.

2. Específicos:

- a. Crear un banco de recursos genéticos de *Pleurotus*, utilizando cepas nativas y monocariones.
- b. Obtener dicariones por entrecruzamiento de micelio monospórico de cepas silvestres de *Pleurotus* spp.
- c. Evaluar la productividad de los dicariones obtenidos a través de la elaboración de inóculo y obtención de cuerpos fructíferos.
- d. Seleccionar los dicariones obtenidos que presenten rápido desarrollo micelial y alta producción de cuerpos fructíferos con características adecuadas para cultivo artesanal.

IV. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

1. Marco Conceptual:

A. Importancia de los hongos comestibles

La influencia de los hongos en el ambiente es enorme, en parte debido a que es el segundo grupo más numeroso en la tierra después de los insectos. Además, los hongos tienen un papel ecológico muy importante en todos los ecosistemas como descomponedores de materia orgánica, contribuyendo con la formación del suelo (Guzmán 1998).

Independientemente de la gran importancia ecológica de los hongos, está su enorme utilidad en la vida cotidiana de los seres humanos. Son muchas las especies comestibles que utiliza el hombre desde tiempos inmemorables y moderadamente numerosas las que cultiva (Guzmán 1998).

El consumo de hongos comestibles, aumenta en todo el mundo en forma continua. En pocos años ha pasado de ser una actividad artesanal con muchísimas improvisaciones a una agroindustria altamente tecnificada y rentable. La producción mundial de hongos comestibles en la temporada de 1989-1990 resultó ser de 3,763,000 toneladas, habiéndose registrado un incremento en la producción anual promedio de un 25%. Los valores actuales de producción acercan esta cifra a los 4 o 5 millones de toneladas anuales (Deschamps, 2003).

B. El género *Pleurotus* y su cultivo en Hispanoamérica

El género *Pleurotus* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra), es una de las especies mayormente cultivadas, sin embargo, existen otras, denominadas “exóticas”, que son producidas en menor escala en diversos países (Calvo-Bado, 2001).

La producción comercial de *Pleurotus* spp es una actividad relativamente reciente. Falk (1917) fue el primero en reportar el cultivo de estos hongos sobre tocones y troncos en Europa, en los inicios del siglo XX. Más tarde, Etter (1929), produjo los cuerpos fructíferos en cultivo. Block, Tsao y Han (1958,1959), fueron los primeros en escribir un reporte detallado sobre el cultivo de *Pleurotus* en Estados Unidos, mientras que la primera explotación comercial de este hongo fue establecida en Europa, hasta la mitad de los años setenta (Royse & Sánchez, 2001).

La producción de *Pleurotus* spp en España, ascendió a 11,640 ton en el año 1999, lo cual le permitió aportar el 22% de la producción europea. Estados Unidos y Canadá comenzaron a cultivar varias especies de *Pleurotus* de manera comercial hacia el inicio

de los años setenta. Estados Unidos en 1998, produjo 908 ton de *Pleurotus*; Canadá en ese mismo año produjo entre 600 y 900 ton (Royse & Sánchez, 2001).

En México, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* inició en 1974 en la población de Cuajimalpa. Durante el período 1990-1997 se observó un incremento en la producción superior al 400%. En ese último año, se estimó una producción de 1825 ton, lo cual significó un nivel de producción comercial de unas 5 ton/día. Por esta razón, se ha considerado a México como el principal productor de América (Royse & Sánchez, 2001).

En Chiapas (México), el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. se visualiza como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial (Guillén-Navarro *et al.*, 1998). Entre las mujeres de origen Tzeltal de los Altos de Chiapas, la producción rural de *Pleurotus ostreatus*, ha cobrado gran importancia como una alternativa económica importante. En el municipio de Tenejapa se encuentran ubicados 53 módulos de cultivo, produciendo un promedio de 10 ton de hongos, en tres ciclos de producción, con una eficiencia biológica estimada en 67.7% (León-Monzón, 2004).

El cultivo de *Pleurotus* en otros países de América, cada día adquiere mayor interés. No existen estadísticas al respecto, sin embargo, se cultiva en Cuba, Colombia, Guatemala, Venezuela y Brasil (Royse & Sánchez, 2001).

En Guatemala, La producción comercial de *Pleurotus* dio inicio en 1986, calculándose la producción en 29,580 kg/año. La mayor parte de la producción se consume en el país (90%) y una pequeña proporción (10%) se exporta a El Salvador y Honduras (De León, 2003).

Actualmente, la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ha cofinanciado un estudio por medio del cual se implementaron en el año 2005, alrededor de 203 módulos de producción artesanal de hongos comestibles, principalmente de cepas nativas de *Pleurotus* spp. La mayoría de estos módulos fueron organizados por mujeres, las cuales produjeron cuerpos fructíferos para autoconsumo y comercialización, alcanzando una producción de 600 lbs, en 4 meses (Bran, *et al.* 2005).

C. Colección de cepas de *Pleurotus* spp

La primera etapa de todo programa de mejora genética consiste en realizar una vasta colección de individuos que van a constituir el banco de cepas. Esta colección puede comprender variedades mejoradas preexistentes. En el primer momento se determinan con mucho cuidado las características fenotípicas como: el aspecto, el color, las cualidades gustativas, el modo de crecimiento del basidiocarpo, la adaptación a tal o cual sustrato o condiciones de cultivo, el rendimiento, la precocidad, la resistencia a los parásitos. Dicha lista está lejos de ser limitada (Labarére & Bois, 2001).

D. Mejoramiento genético de *Pleurotus* spp

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 sustratos 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 (Labarére & Bois, 2001).

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. Es la primera etapa de la fecundación, es decir, la fusión de dos nuevos individuos homocarióticos (monocarióticos) genéticamente compatibles (plasmogamia), la que se utiliza porque produce un micelio dicariótico capaz de diferenciarse y dar lugar a un basidiocarpo.

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: 1) la definición del objetivo, es decir, las características del hongo deseado; 2) el uso de un método de cruzamiento adaptado al objetivo y a los hongos preexistentes para el programa de trabajo y 3) un buen conocimiento del ciclo de 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, 1994).

E. El tipo de incompatibilidad sexual en *Pleurotus* spp.

Pleurotus es un género heterotálico tetrapolar, es decir que la fecundación solo puede tener lugar entre dos micelios homocarióticos de genotipos diferentes para dos genes: los genes de incompatibilidad sexual o de tipo acoplamiento. Los hongos heterotálicos se prestan bien para 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 desee hacer con ellos (Labarére & Bois, 2001).

En el caso 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 solo 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 (Labarére & Bois, 2001).

La fecundación tiene lugar cuando los dos homocariotes confrontados poseen alelos diferentes para los dos genes de incompatibilidad sexual. El conocimiento del mating-type o genes de incompatibilidad sexual 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 (Labarére & Bois, 2001).

F. Producción de inóculo de las cepas mejoradas

El micelio dicariótico constituye la semilla para los productores de hongos, Es más vigoroso que el micelio homocariótico y también puede ser objeto de una propagación vegetativa que aprovechan los productores de semilla para multiplicar las variedades. En el caso particular de *Pleurotus*, el inóculo se produce sobre maicillo (Labarére & Bois, 2001).

El inóculo producido con el micelio dicariótico de las cepas híbridas, se siembran sobre los sustratos deseados, en cantidades que van de 0.25 kg a 1 kg. Después de la fructificación, los basidiocarpos se muestrean y se estudian por sus características fenotípicas. En general, las nuevas variedades se obtienen después de uno o dos ciclos de cruzamientos (Labarére & Bois, 2001).

2. Marco Referencial:

A. Estudios sobre mejoramiento genético

Se han cultivado más de un centenar de cepas a nivel experimental, seleccionándose germoplasma de rápido crecimiento vegetativo, ciclos de cultivo cortos y alta producción de fructificaciones. Sin embargo, no siempre se mantienen estas características deseables cuando las cepas se cultivan a nivel industrial, fundamental para que los productores decidan utilizarlas (Chang & Miles, 2004; Stamets, 1993).

En los últimos años, el Laboratorio de Cultivo de Hongos del Instituto de Ecología (Xalapa, México) ha realizado diversos estudios para la obtención y selección de cepas de *Pleurotus* spp con características deseables para su explotación comercial (Guzmán, *et al*, 1993; Guzmán, *et al*, 1994; Guzmán, *et al*, 1995; Salmones, *et al*, 1995; Gaitán-Hernández, *et al*, 1996; Salmones, *et al*, 1997).

En México, se estudiaron comparativamente dos cepas de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. previamente seleccionadas en el laboratorio, y una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.)Kumm. con la finalidad de determinar su productividad, y adicionalmente observar su comportamiento ante la presencia de plagas y su manejo postcosecha, estos dos últimos factores muy importantes para su uso comercial. Los

experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de la compañía Forest Mushrooms Inc., ubicada en Minnesota, (EUA). Las cepas de *Pleurotus pulmonarius* cultivadas (IE-226 e IE-227) resultaron del cruzamiento genético entre las cepas IE-4 (Alemania) y la IE-115 (registrada como K-200 en la Cía. Fungi Perfecti de EUA), mientras que la cepa de *P. ostreatus* (1314) provino de EUA y ha sido explotada comercialmente en dicha planta durante varios años. Se concluyó que la cepa IE-226 produjo fructificaciones libres de patógenos, así como rendimientos adecuados, que le permiten considerarla para su explotación comercial (Vogel & Salmones, 2000).

De la misma manera, se obtuvieron micelios monospóricos de tres cepas mexicanas de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin vars. *djamor* (IE-116), *roseus* (IE-134) y *salmoneostramineus* (IBUG-7), determinándose sus tipos de apareamiento y seleccionándose monocariones de rápido y buen crecimiento micelial para realizar las cruza intraespecímen. Las cepas parentales y seis cruza fueron cultivadas sobre paja de cebada a nivel piloto. La formación de los primordios se observó a entre los 9 y 11 días en los parentales y entre los 8 y 13 días en las cruza. En promedio se obtuvieron de 3 a 5 cosechas alcanzando eficiencias biológicas de 53.6 a 84.4% en los parentales y de 73.6 a 114.4% en las cruza, mientras que las tasas de producción fueron de 0.89 a 1.44% y de 1.22 a 1.9% y los rendimientos de 11.5 a 17.4% y de 17.5 a 26.9%, respectivamente. El tamaño de las fructificaciones varió entre 2 a 20 cm de diámetro del píleo, predominando los menores de 10 cm. Las cruza de las variedades *djamor* vs. *salmoneostramineus* y *djamor* vs. *roseus*, y una de las variedades *roseus* y *salmoneostramineus* superaron la productividad de sus parentales, por lo que se consideran con posibilidades de ser cultivadas comercialmente (Salmones, *et al*, 2004).

B. Estudios realizados en Guatemala

Los estudios realizados en el país han estudiado la diversidad y potencialidad de hongos comestibles silvestres que se desarrollan naturalmente. Además se ha formado un cepario dentro de la Universidad de San Carlos de Guatemala, producto de las investigaciones realizadas (Bran, *et al*, 2001, 2002, 2003, 2004).

Actualmente, gracias a las investigaciones cofinanciadas por la Dirección General de Investigación, se están cultivando cepas nativas de hongos comestibles (entre ellas, *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor*), en módulos implementados en comunidades campesinas (Bran, *et al*, 2005). Sin embargo, las cepas que están siendo utilizadas, si bien presentan buen rendimiento para su cultivo en condiciones artesanales, pueden ser mejoradas a través del inicio de un programa de mejoramiento genético.

V. METODOLOGÍA

FASE DE LABORATORIO

1. Revitalización de las cepas parentales de *Pleurotus* spp.

- Revitalización de 4 cepas de *Pleurotus*:
P. ostreatus 06.2003 y 152.05.
P. djamor var. *djamor* 70.2001 y 01.06
- Incremento de la biomasa por cultivo en medios sólidos (PDA, EMA o SAB).
- Incubar a 26°C, hasta que el micelio cubra toda la caja de petri.

2. Producción de inóculo de la cepas parentales de *Pleurotus* spp.

- Preparación de granos de maicillo remojando previamente durante 16 horas.
- Pesar 200 gramos en bolsas de polipapel.
- Esterilizar a 121°C y 15 lbs de presión por 30 minutos.
- Siembra de la biomasa obtenida en caja de petri, en el maicillo para la producción de inóculo.
- Incubación a 26°C hasta que el micelio cubra todo el sustrato.

3. Producción de cuerpos fructíferos de las cepas parentales de *Pleurotus* spp.

- Preparación y humedecimiento del sustrato (pulpa de café), por 12 horas.
- Llenado de bolas de polipapel con 500 g de pulpa de café.
- Esterilización a 121°C y 15 lbs de presión por 45 minutos.
- Determinación del porcentaje de humedad.
- Siembra de la pulpa de café con el inóculo producido al 2% (5 bolsas por cepa).
- Incubación a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, hasta obtener el crecimiento de los hongos en los sustratos.
- Fructificación en condiciones de invernadero artesanal, por carecer de un invernadero con condiciones controladas, regando los sustratos 4 veces al día.
- Recolectar los hongos obtenidos en las diferentes cosechas.

4. Obtención de monocariones a partir de esporas de las cepas parentales de las cepas de *Pleurotus* spp.

La metodología se describe de acuerdo con Salmones, *et al.* (1997):

- Escoger cuerpos fructíferos de cada una de las cepas, obtenidos en el paso anterior.
- Colocarlos en caja de petri de vidrio y sobre papel filtro estéril por 24 horas, para la obtención de esporas.
- Colocar las esporas obtenidas en refrigeración a 4°C, si no se trabajan inmediatamente.
- Preparar tubos de ensayo con solución salina (0.85%) estéril más cloranfenicol (20 mg/L).

- Cortar un fragmento del papel filtro que contiene las esporas, con tijeras estériles y en condiciones de asepsia.
- Colocar el fragmento en un tubo de ensayo con la solución salina estéril.
- Agitar el tubo para obtener una suspensión.
- Hacer diluciones 1×10^{-3} a 1×10^{-5} .
- Tomar estérilmente alícuotas de 0.5 ml
- Verter las alícuotas sobre placas de agar-agua al 20%.
- Incubar a 26°C.
- Examinar las placas bajo un estereoscopio.
- Entresacar una a una varias esporas, que ya han empezado a germinar, con ayuda de un asa de nicromo.
- Sembrar aproximadamente 20 cultivos monospóricos en el medio de germinación (PDA), de cada una de las cepas.
- Incubar a 26°C hasta que se obtenga el micelio monocariótico
- Aislar el micelio en cajas de petri, hasta obtener el cultivo axénico.
- Cortar fragmentos del cultivo axénico y guardarlos en el cepario en tubos de ensayo con agar PDA inclinado.

5. Determinación de la tasa de crecimiento radial, durante 10 días de incubación, de los monocariones aislados.

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier, *et al.*, (2002).

- Preparar el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA).
- Esterilizar los medios por 15 minutos a 121°C.
- Inocular 10 cajas del medio PDA, con cada uno de los monocariones, con un segmento de 0.5 mm del cultivo.
- Identificar las cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.
- Sellar las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Incubar 5 cajas de cada medio inoculadas con las cepas a temperatura de 26°C.
- Anotar la velocidad de crecimiento radial determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 2 días, obtenido en cada uno de los medios y a las diferentes temperaturas, durante un máximo de 10 días.
- Determinar gráficamente la tasa radial de crecimiento de las cepas, mediante la medición de los diámetros que se traspasen perpendicularmente, sumar y dividir entre dos para calcular el diámetro medio. Este diámetro se calcula cada dos días para estimar la tasa radial de crecimiento miceliar (mm/día) y el diámetro final.

6. Determinación de los tipos de incompatibilidad (mating type) de los monocariones.

Este paso es de suma importancia puesto que el conocimiento de los tipos de incompatibilidad es esencial en el trabajo de hibridación de cepas.

La metodología se describe de acuerdo con Chang & Miles, *et al.* (2004):

- Seleccionar 12 monocariones que presentaron valores altos de tasa de crecimiento radial en el paso anterior, de cada una de las cepas y estudiar cada grupo por separado, realizando tres pruebas:

Prueba 1:

- Seleccionar uno monocarión de cada grupo (por cepa) y asignarle arbitrariamente el tipo de incompatibilidad **A₁B₁ (Tipo I)**.
- Confrontar cada uno de los 12 monocariones, con el monocarión previamente seleccionado (A₁B₁), sembrándolos sobre agar PDA a una distancia de 2.5 cm.
- Incubar las cajas de petri a 26°C, por 5 días.
- Realizar las preparaciones (del área de unión de las dos colonias) con azul de algodón en lactofenol y observar al microscopio óptico a 400 aumentos.
- Comprobar la reacción compatible, la cual se demuestra por la presencia de fíbulas.
- Los monocariones con reacción compatible se designaron como tipo de incompatibilidad **A₂B₂ (Tipo III)**.

Prueba 2:

- Seleccionar uno de los monocariones **A₂B₂** (determinado en el paso anterior).
- Confrontar todos los monocariones que **NO** hayan presentado una reacción compatible en la prueba 1, con el monocarión previamente seleccionado, sembrándolos sobre agar PDA a una distancia de 2.5 cm.
- Incubar las cajas de petri a 26°C, por 72 horas.
- Realizar las preparaciones con azul de algodón en lactofenol (del área de unión de las dos colonias) y observar al microscopio óptico a 400 aumentos.
- Comprobar la reacción compatible, la cual se demuestra por la presencia de fíbulas.
- Los monocariones con reacción compatible se designaron como tipo de incompatibilidad **A₁B₁**.

Prueba 3:

- Seleccionar un monocarión que **NO** haya presentado reacción compatible en las pruebas 1 y 2 y asignarle arbitrariamente el tipo de incompatibilidad **A₁B₂ (Tipo II)**.
 - Confrontar todos los monocariones que **NO** hayan presentado una reacción compatible en las pruebas 1 y 2, con el monocarión previamente seleccionado, sembrándolos sobre agar PDA a una distancia de 2.5 cm.
 - Incubar las cajas de petri a 26°C, por 72 horas.
 - Realizar las preparaciones con azul de algodón en lactofenol (del área de unión de las dos colonias) y observar al microscopio óptico a 400 aumentos.
 - Comprobar la reacción compatible, la cual se demuestra por la presencia de fíbulas.
 - Los monocariones con reacción compatible se designarán como tipo de incompatibilidad **A₂B₁ (Tipo IV)**.
7. Los monocariones que **NO** presenten reacción compatible se designarán como tipo de incompatibilidad **A₁B₂**.

8. Cruzas intercepas de *Pleurotus* spp.

La metodología se describe de acuerdo con Salmones, *et al.* (1997):

- De los monocariones determinados para los cuatro tipos de incompatibilidad obtenidos en el paso anterior, seleccionar las cruzas, para cada una de las cepas.
- Sembrar cada uno de los cultivos monospóricos y entrecruzarlos por especies (cepas de *P. ostreatus*, cepas de *P. djamor* var *djamor*), de acuerdo con sus tipos de incompatibilidad (es decir, cruzar los tipos I y III y los tipos II y IV).
- Incubar a 26°C.
- Aislar los cultivos dicarióticos obtenidos (cepas híbridas).

9. Determinación de la tasa de crecimiento radial, durante 10 días de incubación, de los dicariones aislados.

El procedimiento se realizará de acuerdo con lo recomendado por Mier, *et al.* (2002).

- Preparar el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA).
- Esterilizar los medios por 15 minutos a 121°C.
- Inocular 10 cajas del medio PDA, con cada una de las cepas dicarióticas y parentales, con un segmento de 0.5 mm del cultivo.
- Identificar las cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo, con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.
- Sellar las cajas inoculadas con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Incubar 5 cajas de cada medio inoculadas con las cepas a las temperaturas de 18 y 26°C.
- Anotar la velocidad de crecimiento radial determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 3 días, obtenido en cada uno de los medios y a diferentes temperaturas, durante un máximo de 10 días.
- Determinar gráficamente la tasa radial de crecimiento de las cepas, mediante la medición de los diámetros que se traspasen perpendicularmente, sumar y dividir entre dos para calcular el diámetro medio. Este diámetro se calcula cada dos días para estimar la tasa radial de crecimiento miceliar (mm/día) y el diámetro final.
- Seleccionar los cultivos que poseen más rápido crecimiento.

10. Producción de inóculo de las cepas híbridas en condiciones de laboratorio.

Se realizó utilizando los métodos referidos por Sánchez (2001):

- Incrementar la biomasa de las cepas seleccionadas.
- Preparar granos de maicillo remojando previamente durante 16 horas.
- Pesar 200 gramos en bolsas de polipapel.
- Esterilizar a 121°C y 15 lbs de presión por 30 minutos.
- Sembrar la biomasa obtenida en caja de petri con agar PDA, en el maicillo para la producción de inóculo.
- Incubar a 26°C hasta que el micelio cubra todo el sustrato.

FASE DE CAMPO EN INVERNADERO EXPERIMENTAL

11. Producción de cuerpos fructíferos de las cepas híbridas en condiciones artesanales

Esta actividad se realizó en invernaderos artesanales, utilizando sistemas cerrados, para que las pruebas se llevaran a cabo bajo condiciones de investigación. La fructificación de *P. djamor* var. *djamor* se llevó a cabo en el invernadero de la Asociación de Villa Kelly, Chimaltenango y las pruebas de *P. ostreatus* se llevaron a cabo en el invernadero de la asociación ADIFE del parcelamiento la Giralda, Tecpán, Chimaltenango.

Se realizó utilizando los métodos referidos por Contreras, *et al*, (2004):

- Preparar y humedecer el sustrato (pulpa de café u olote de maíz), por 24 horas, en agua alcalina al 2%.
- Llenar bolsas de polipapel con 500 g de pulpa de café u olote de maíz.
- Determinar del porcentaje de humedad.
- Sembrar la pulpa de café con el inóculo producido al 2% (5 bolsas por cepa).
- Incubar a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, hasta obtener el crecimiento de los hongos en los sustratos.
- Fructificar en condiciones de invernadero artesanal, por carecer de un invernadero con condiciones controladas, regando los sustratos 4 veces al día.
- Determinar de las características de los hongos obtenidos en las diferentes cosechas.
- Determinar la eficiencia biológica, la cual se define como la habilidad que tienen las cepas fúngicas de convertir el sustrato en cuerpos fructíferos. El porcentaje de eficiencia biológica (%EB), se calcula mediante la fórmula:
$$\%EB = (\text{Peso de cuerpos fructíferos frescos} / \text{peso seco del sustrato}) \times 100$$
- Calcular la Tasa de producción con la siguiente fórmula:
$$TP = EB / \text{días requeridos para cosecha}$$

12. Análisis de los datos

Para determinar las diferencias significativas entre las cepas se realizarán análisis de varianza y pruebas de intervalos múltiples de Tukey.

VI. RESULTADOS

1. Crear un banco de recursos genéticos de *Pleurotus*, utilizando cepas nativas y monocariones.

Se aislaron 27 monocariones de dos cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* (70.03 y 01.06) y 20 monocariones de dos cepas parentales de *P. ostreatus* (152.05 y 06.03). A cada uno de ellos le fue determinado su tipo de incompatibilidad. En total, fueron almacenadas 47 cepas monocarióticas en el cepario (Figuras 1-12).

Con respecto al crecimiento miceliar de los monocariones obtenidos a partir de las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor*, en el grupo JH, todas las colonias presentaron textura algodonosa y la mayor parte de ellas evidenciaron una coloración blanco amarillenta, abundantes agregaciones miceliarias y exudado de color ámbar. Microscópicamente presentaron hifas de 1-5 µm, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas (Tabla 1).

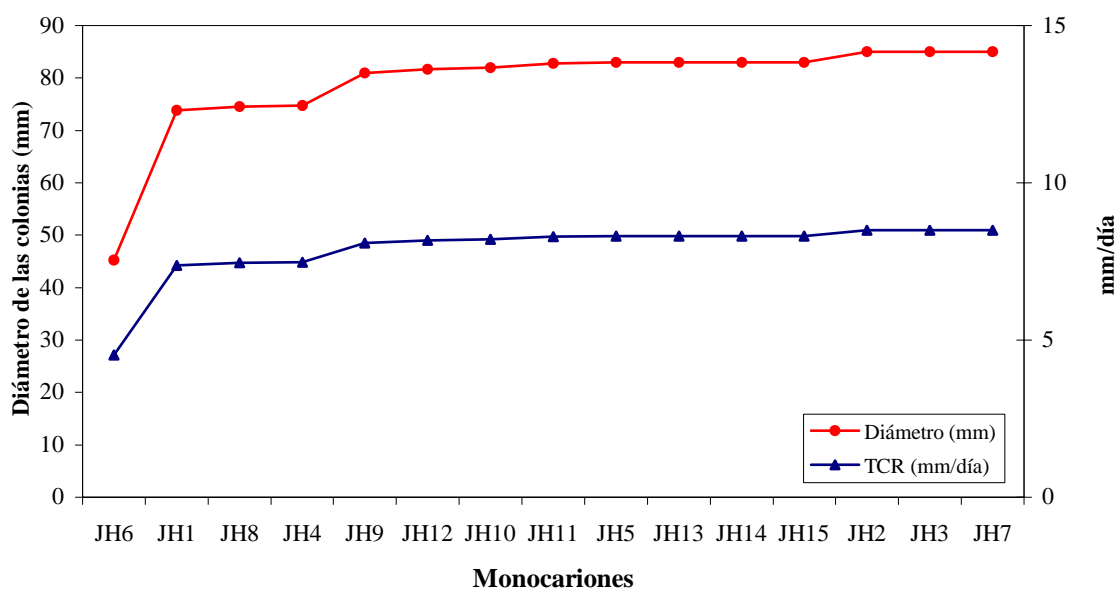
El mayor crecimiento fue observado en los monocariones 2, 3 y 7, los cuales alcanzaron un diámetro final de 85 mm y una tasa de crecimiento radial (TCR) de 8.5 mm/día a los diez días de incubación. El crecimiento menor lo obtuvo el aislamiento 6, el cual presentó un diámetro miceliar de 45.3 mm y una TCR de 4.53 mm/día (Tabla 1, Gráfica 1).

Tabla 1. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones JH a los 10 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

Monocariones	TCR (mm/día)	Diámetro final (mm)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (µm)
JH ₂	8.5	85	A ^a	B-A ^b	+ ^d	a ^g	1.0-3.0
JH ₃	8.5	85	A	B-A	++ ^c	p ^h	1.0-4.0
JH ₇	8.5	85	A	B ^c	-	p	1.0-3.0
JH ₁₃	8.3	83	A	B	+	a	1.0-3.0
JH ₁₄	8.3	83	A	B-A	+++ ^f	p	1.0-5.0
JH ₁₅	8.3	83	A	B-A	+++	a	1.0-4.0
JH ₅	8.3	83	A	B	-	p	1.0-3.0
JH ₁₁	8.28	82.8	A	B-A	+++	p	1.0-5.0
JH ₁₀	8.2	82	A	B-A	+++	p	1.0-2.0
JH ₁₂	8.17	81.7	A	B-A	+++	p	1.0-3.0
JH ₉	8.09	80.9	A	B-A	+++	p	1.0-4.0
JH ₄	7.47	74.7	A	B-A	+++	p	1.0-5.0
JH ₈	7.45	74.5	A	B-A	++	p	1.0-3.0
JH ₁	7.38	73.8	A	B-A	+++	p	1.0-3.0
JH ₆	4.53	45.3	A	B-A	+	p	1.0-3.0

a: Algodonosa; b: Blanco-amarillento; c: blanco; d: escasas; e: regular cantidad; f: abundantes; g: presencia de exudado; h: ausencia de exudado.

Gráfica 1. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones JH a los 10 días de incubación



En los monocariones SS, las colonias presentaron principalmente textura algodonosa, coloración blanco amarillenta, agregaciones miceliares y no se observó exudado. Microscópicamente se observaron hifas de 1-6 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas (Tabla 2).

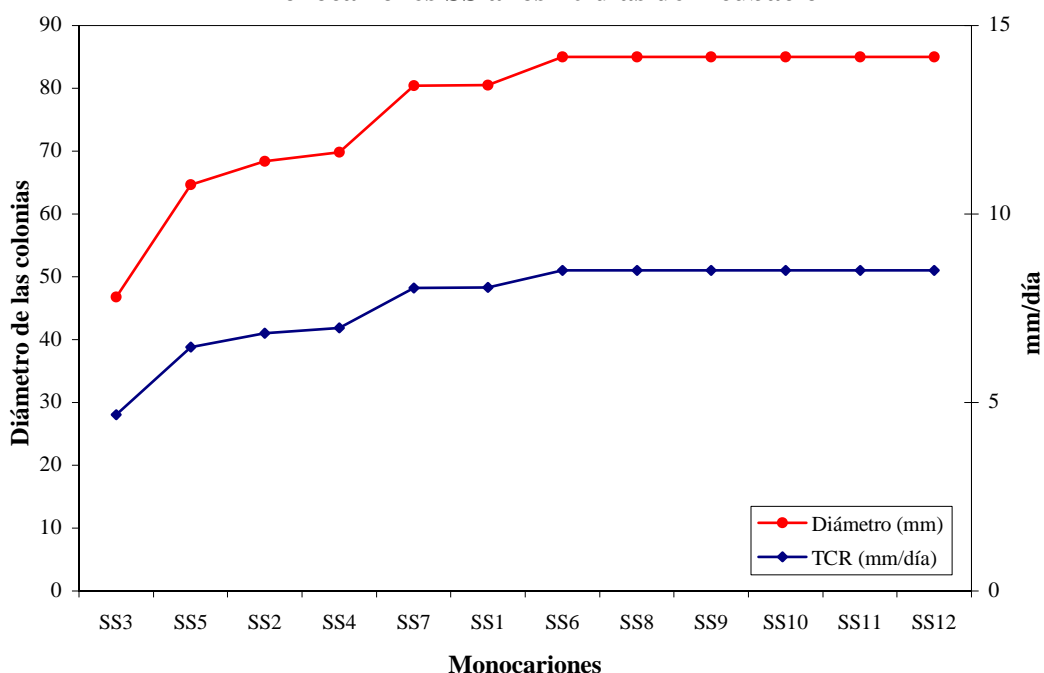
El mayor crecimiento se presentó en los monocariones 6, 8, 9, 10, 11 y 12, quienes obtuvieron un diámetro final de 85 mm y una tasa de crecimiento radial (TCR) de 8.5 mm/día a los diez días de incubación. El menor crecimiento se observó en el monocarión 3, el cual presentó un diámetro final de 46.8 mm y una TCR de 4.6 mm/día (Tabla 2, Gráfica 2).

Tabla 2. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones SS a los 10 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

Monocariones	TCR (mm/día)	Diámetro final (mm)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (μm)
SS ₆	8.5	85	A ^a	B-A ^b	+++ ^d	a ^g	3.0-6.0
SS ₈	8.5	85	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
SS ₉	8.5	85	A	B-A	++ ^e	a	2.0-5.0
SS ₁₀	8.5	85	A	B-A	+++	a	2.0-4.0
SS ₁₁	8.5	85	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
SS ₁₂	8.5	85	A	B-A	+++	a	1.0-5.0
SS ₁	8.05	80.5	A	B-A	+++	a	2.0-4.0
SS ₇	8.04	80.4	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
SS ₄	6.98	69.8	A	B ^c	+++	a	1.0-4.0
SS ₂	6.84	68.4	A	B	+	a	2.0-5.0
SS ₅	6.47	64.7	A	B	- ^f	a	1.0-3.0
SS ₃	4.68	46.8	A	B-A	++	a	1.0-3.0

a: Algodonosa; b: Blanco-amarillento; c: blanco; d: escasas; e: regular cantidad; f: abundantes; g: ausencia de exudado.

Gráfica 2. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones SS a los 10 días de incubación



En *P. ostreatus*, el grupo de los monocariones PB (152.05), mostraron colonias algodonosas, de color blanco, sin agregaciones miceliales, sin exudado. Microscópicamente se observaron hifas de 1-3 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas (Tabla 3).

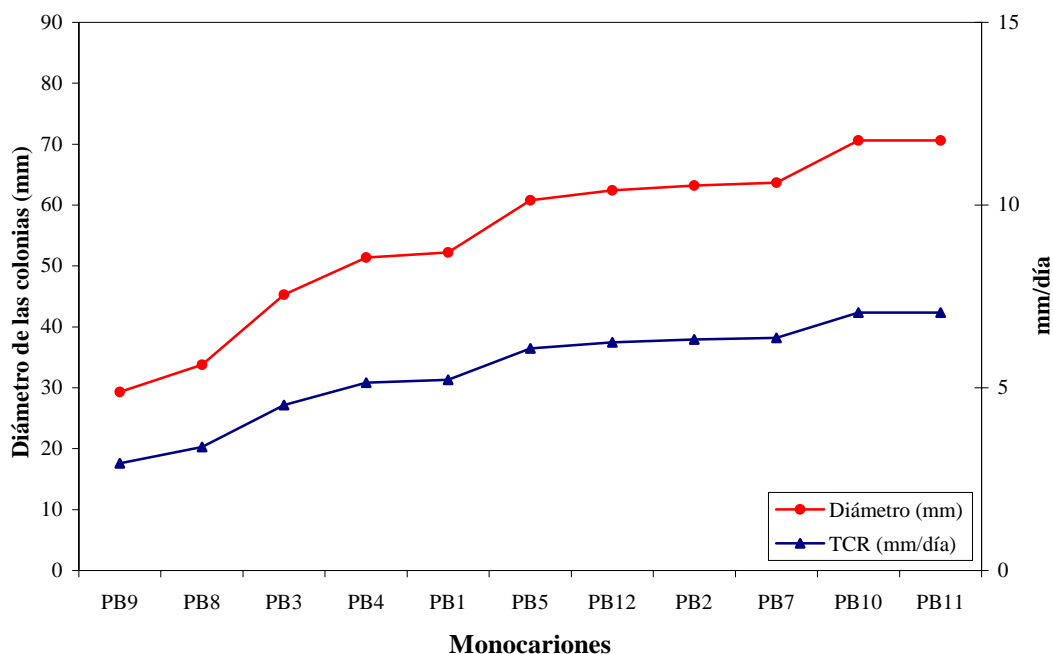
El mayor crecimiento se observó en los monocariones 10 y 11, los cuales alcanzaron una TCR de 7.06 mm/día y 70.6 mm de diámetro final a los 10 días de incubación. El menor crecimiento lo presentó el monocarión 9, el cual solamente obtuvo una TCR de 2.93 mm/día y 29 mm de diámetro final (Tabla 3, Gráfica 3).

Tabla 3. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones PB a los 10 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

Monocariones	TCR (mm/día)	Diámetro final (mm)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (μm)
PB ₁₀	7.06	70.6	A ^a	B ^b	- ^c	a ^d	1.0-3.0
PB ₁₁	7.06	70.6	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₇	6.37	63.7	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₂	6.32	63.2	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₁₂	6.24	62.4	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₅	6.08	60.8	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₁	5.22	52.2	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₄	5.14	51.4	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₃	4.53	45.3	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₈	3.38	33.8	A	B	-	a	1.0-3.0
PB ₉	2.93	29.3	A	B	-	a	1.0-3.0

a: Algodonosa; b: blanco; c: ausencia de agregaciones miceliales; d: ausencia de exudado.

Gráfica 3. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones PB a los 10 días de incubación



Los monocariones MG (06.03) presentaron colonias algodonosas, de color blanco, sin agregaciones miceliales y sin producción de exudado. Microscópicamente presentaron hifas de 1-5 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas (Tabla 4).

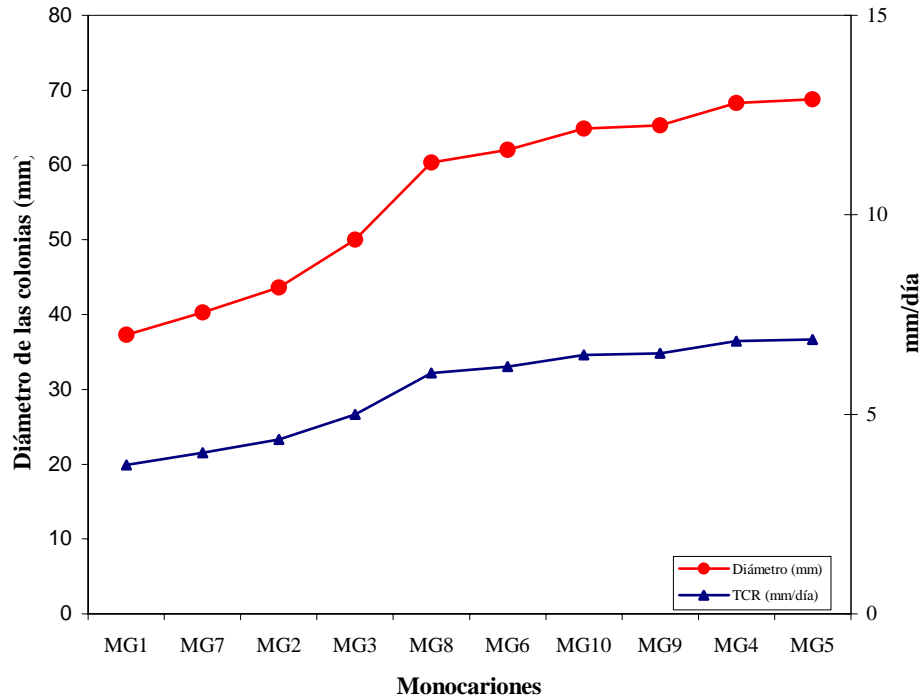
El mayor crecimiento se observó en los monocariones 5 y 4, los cuales alcanzaron una TCR de 6.88 mm/día y 68.8 mm de diámetro final el primero y una TCR de 6.83 y un diámetro final de 68.3 mm el segundo, a los 10 días de incubación. El menor crecimiento lo presentó el monocarión 1, el cual obtuvo una TCR de 3.72 mm/día y 37.3 mm de diámetro final (Tabla 4, Gráfica 4).

Tabla 4. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones MG a los 10 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

Monocariones	TCR (mm/día)	Diámetro final (mm)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (μm)
MG ₅	6.88	68.8	A ^a	B ^b	- ^c	a ^d	2.0-4.0
MG ₄	6.83	68.3	A	B	-	a	1.0-3.0
MG ₉	6.53	65.3	A	B	-	a	2.0-5.0
MG ₁₀	6.49	64.9	A	B	-	a	2.0-4.0
MG ₆	6.2	62.0	A	B	-	a	1.0-3.0
MG ₈	6.03	60.3	A	B	-	a	1.0-4.0
MG ₃	5.00	50.0	A	B	-	a	1.0-3.0
MG ₂	4.36	43.6	A	B	-	a	2.0-4.0
MG ₇	4.03	40.3	A	B	-	a	1.0-4.0
MG ₁	3.72	37.3	A	B	-	a	2.0-4.0

a: Algodonosa; b: blanco; c: ausencia de agregaciones miceliales; d: ausencia de exudado.

Gráfica 4. Diámetro final y tasa de crecimiento radial de los monocariones MG a los 10 días de incubación



Respecto a la evaluación de los tipos de incompatibilidad presente en cada uno de los aislamientos monocarióticos, de los quince monocariones JH obtenidos de la cepa *P. djamor* var. *djamor* 70.03, dos correspondieron al tipo de incompatibilidad I, cinco al tipo II, siete al tipo III y no fue encontrado ningún monocarión que correspondiera al tipo IV. En los 12 monocariones SS obtenidos de la cepa 01.06, dos correspondieron al tipo de incompatibilidad II, diez al tipo III y no se encontraron los tipos I y IV (Tabla 5).

En *P. ostreatus*, se obtuvieron 11 monocariones (PB) de la cepa 152.05, de los cuales tres presentaron el tipo de incompatibilidad I, uno el tipo II, dos el tipo III y cinco el tipo IV. De los 10 monocariones (MG) aislados de la cepa 06.2003, cinco mostraron el tipo de incompatibilidad I, dos el tipo II, uno el tipo III y dos el tipo IV (Figuras 13-18) (Tabla 5).

Tabla 5. Tipos de incompatibilidad de los monocariones aislados a partir de las cepas parentales de *Pleurotus*.

Cepas parentales	Tipos de incompatibilidad	Identificación de los monocariones
70.03 <i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>	I ^a	JH ₂ , JH ₁₃ ,
	II	JH ₁ , JH ₃ , JH ₄ , JH ₆ , JH ₁₄
	III	JH ₅ , JH ₇ , JH ₈ , JH ₁₀ , JH ₁₁ , JH ₁₂ , JH ₁₅
	IV	
01.06 <i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>	I	
	II	SS ₃ , SS ₄
	III	SS ₁ , SS ₂ , SS ₅ , SS ₆ , SS ₇ , SS ₈ , SS ₉ , SS ₁₀ , SS ₁₁ , SS ₁₂
	IV	
152.05 <i>P. ostreatus</i>	I	PB ₁ , PB ₂ , PB ₄
	II	PB ₃
	III	PB ₇ , PB ₈
	IV	PB ₅ , PB ₉ , PB ₁₀ , PB ₁₁ , PB ₁₂
06.03 <i>P. ostreatus</i>	I	MG ₁ , MG ₄ , MG ₇ , MG ₈ , MG ₁₀
	II	MG ₃ , MG ₆
	III	MG ₂
	IV	MG ₅ , MG ₉

^a I: A₁B₁; II: A₁B₂; III: A₂B₂; IV: A₂B₁.

2. Obtener dicariones por entrecruzamiento de micelio monospórico de cepas silvestres de *Pleurotus* spp.

Con base principalmente al tipo de incompatibilidad y luego a la velocidad de crecimiento miceliar, en total se obtuvieron 12 dicariones producto de las cruzas: 4 para *P. djamor* var. *djamor* y 8 para *P. ostreatus* (Figuras 19-20).

En *P. djamor* var. *djamor* se eligieron 2 monocariones por cepa parental para realizar las cruzas interespecimen. Del grupo JH (70.03) se tomaron los monocariones 2 y 13 y del grupo SS (01.06) los monocariones 9 y 12 (Tabla 6).

En *P. ostreatus* se eligieron 6 monocariones por cada cepa parental. En el grupo PB (152.05), se tomaron los monocariones 2, 3, 4, 7, 10 y 11. Del grupo MG (06.03) se optó por los monocariones 2, 4, 5, 6, 9 y 10 (Tabla 6).

Tabla 6. Cruzas y dicariones obtenidos a partir de los monocariones de *Pleurotus*

Especies /Cepas parentales	Tipos de incompatibilidad ^a	C ruzas	Dicariones resultantes
<i>P.djamor</i> var. <i>djamor</i> 70.03 vs. 01.06	I (JH) x III (SS)	JH ₂ x SS ₁₂	DJS ₁
	I (JH) x III (SS)	JH ₂ x SS ₉	DJS ₂
	I (JH) x III (SS)	JH ₁₃ x SS ₁₂	DJS ₃
	I (JH) x III (SS)	JH ₁₃ x SS ₉	DJS ₄
<i>P. ostreatus</i> 152.05 vs. 06.03	I (PB) x III (MG)	PB ₂ x MG ₂	DPM ₁
	I (PB) x III (MG)	PB ₄ x MG ₂	DPM ₂
	I (MG) x III (PB)	PB ₇ x MG ₄	DPM ₃
	I (MG) x III (PB)	PB ₇ x MG ₁₀	DPM ₄
	II (MG) x IV (PB)	PB ₁₀ x MG ₆	DPM ₅
	II (MG) x IV (PB)	PB ₁₁ x MG ₆	DPM ₆
	II (PB) x IV (MG)	PB ₃ x MG ₅	DPM ₇
	II (PB) x IV (MG)	PB ₃ x MG ₉	DPM ₈

a: indica el tipo de incompatibilidad de cada uno de los monocariones entrecruzados; I: A₁B₁; II: A₁B₂; III: A₂B₂; IV: A₂B₁.

Todos los dicariones DJS obtenidos en *P. djamor* var. *djamor*, presentaron colonias algodonosas, color blanco amarillento principalmente hacia el centro, abundantes agregaciones miceliales y ausencia de exudado. Microscópicamente se observaron hifas de 2.0-5.0 µm de ancho, hialinas y abundantes fíbulas. Las cepas parentales (70.03 y 01.06), presentaron características similares entre ellas, así como con los dicariones, con la salvedad de que la cepa parental 01.06, produjo hifas de 1.0-5.0 µm (Figuras 22-27) (Tabla 7).

Respecto al crecimiento miceliar a los 7 días de incubación, todos los dicariones DJS1 obtuvieron colonias con mayor diámetro medio y tasa de crecimiento radial comparados con los parentales, siendo los mejores los dicariones DJS₂, DJS₃ y DJS₁ (Gráfica 5). Sin embargo, a pesar de las diferencias observadas, hacia el día 7, todas alcanzaron el mismo valor de TCR y diámetro final (Anexo 1).

Tabla 7. Diámetro de las colonias y tasa de crecimiento radial de los parentales y dicariones DJS, después de 7 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

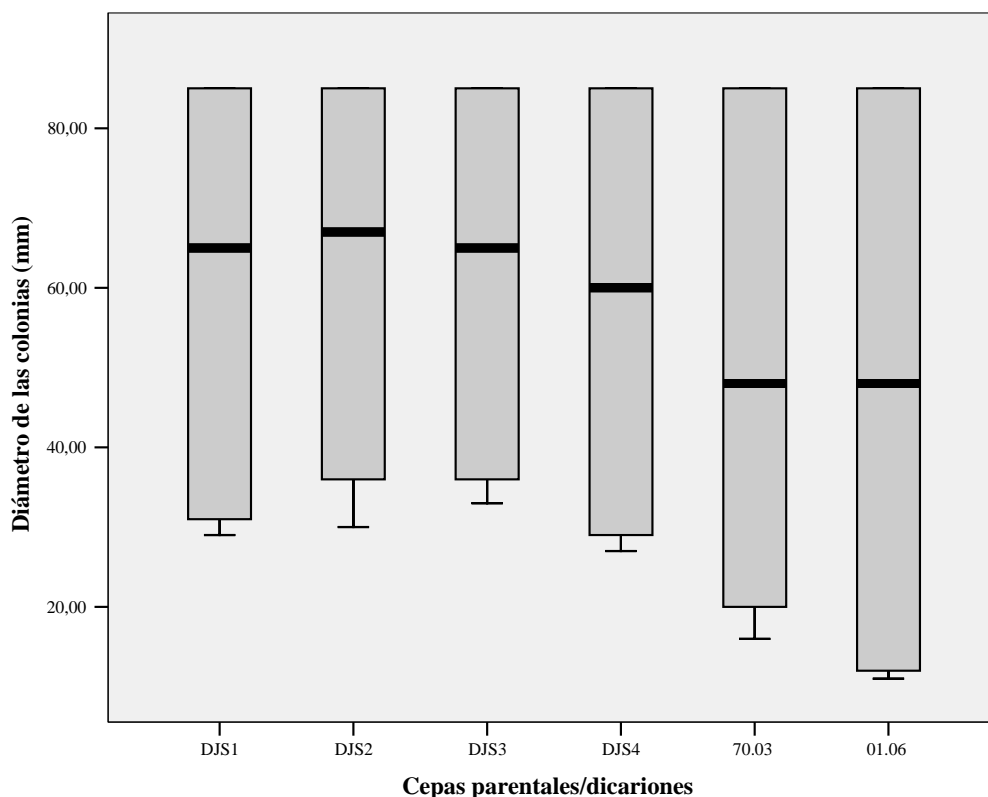
Dicariones / Parentales	Diámetro* (mm)	TCR * (mm/día)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (µm)
DJS ₂	62.0476 d**	8.86	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
DJS ₃	61.8095 d	8.82	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
DJS ₁	60.1905 d	8.60	A ^a	B-A ^b	+++ ^c	a ^d	2.0-5.0
DJS ₄	57.8095 c	8.26	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
70.2003	50.3333 a	7.19	A	B-A	+++	a	2.0-5.0
1.2006	47.4762 b	6.78	A	B-A	+++	a	1.0-5.0

a: Algodonosa; b: blanco amarillento; c: abundantes agregaciones miceliales; d: ausencia de exudado.

* Calculados a partir de la media de los valores obtenidos a los 3, 5 y 7 días de incubación.

**Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Gráfica 5. Diámetro medio de las colonias +/- la desviación estándar (rectángulos) de los dicariones y parentales de *P. djamor* var. *djamor*, durante 7 días de incubación



Los dicariones DPM obtenidos a partir de las cepas parentales de *P. ostreatus*, presentaron colonias algodonosas, de color blanco y blanco amarillento, no se observaron agregaciones miceliarias y solamente en dos casos se observó la aparición de exudado. Microscópicamente presentaron hifas de 1.0a 4.0 μm de ancho, hialinas, con abundantes fíbulas (Figuras 28-33) (Tabla 8).

En las cepas parentales se observó textura algodonosa de ambas colonias, la cepa 152.05 mostró una coloración blanco amarillento, sin agregaciones miceliarias ni exudado, además presentó hifas de 2.0-5.0 μm de ancho, con abundantes fíbulas. La cepa 06.03, exhibió color blanco, ausencia de agregaciones miceliarias y exudado. Las hifas tuvieron de 1.0-4.0 μm de ancho y abundantes fíbulas (Tabla 8).

Los dicariones con el mejor crecimiento miceliar fueron los identificados con los números 3, 7 y 6, pero no lograron superar a la cepa parental 152.05 en diámetro medio de las colonias (60.67 mm) y TCR (6.74 mm/día) a los 9 días de incubación. Los tres dicariones superaron a la cepa parental 06.03. El resto de dicariones (1, 2, 4, 5 y 8) obtuvieron valores menores que las cepas parentales, siendo el de menor crecimiento el DPM₄, el cual presentó una TCR de 3.84 mm/día y 34.57 mm de diámetro medio (Gráfica 6, Anexo 2).

Tabla 8. Diámetro medio y tasa de crecimiento radial de los dicariones DPM después de 9 días de incubación sobre agar PDA, a 26°C.

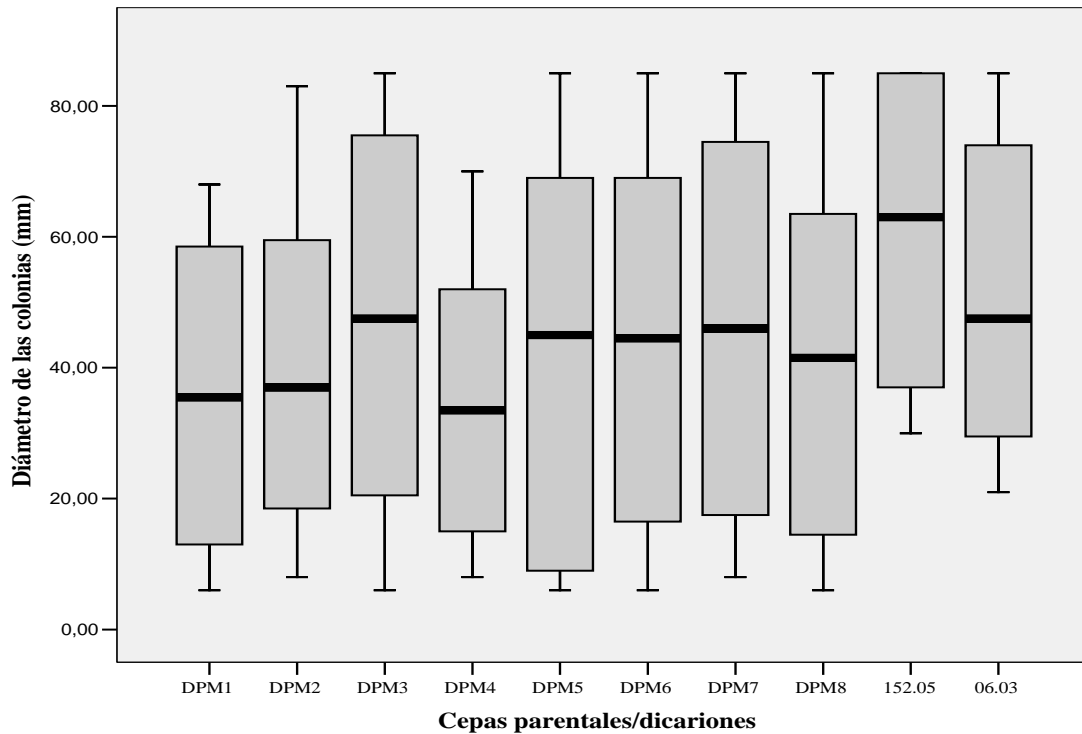
Dicariones / Parentales	Diámetro * (mm)	TCR* (mm/día)	Características de la colonia				
			Textura	Color	AG	Exudado	Hifas (µm)
152.03	60.6667 d**	6.74	A	B-A	-	a	2.0-5.0
DPM ₃	47.4286 c	5.27	A ^a	B-A ^b	- ^d	a ^c	1.0-4.0
DPM ₇	45.8571 c	5.09	A	B ^c	-	a	1.0-4.0
DPM ₆	44.5714 c	4.95	A	B-A	-	a	1.0-4.0
6.03	44.4066 e	4.93	A	B	-	a	1.0-3.0
DPM ₅	43.4643 b c	4.83	A	B	-	a	1.0-4.0
DPM ₈	42.5000 b c	4.72	A	B-A	-	a	1.0-4.0
DPM ₂	40.8214 b	4.53	A	B	-	p ^f	1.0-4.0
DPM ₁	36.6071 a	4.07	A	B-A	-	a	1.0-4.0
DPM ₄	34.5714 a	3.84	A	B	-	p	1.0-4.0

a: Algodonosa; b: blanco amarillento; c: blanco; d: sin agregaciones miceliares; e: ausencia de exudado; f: presencia de exudado.

* Calculados a partir de la media de los valores obtenidos a los 3, 5, 7 y 9 días de incubación.

**Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Gráfica 6. Diámetro de las colonias +/- la desviación estándar (rectángulos) y rango total (líneas) de los dicariones y parentales de *P. ostreatus*, durante 9 días de incubación.



3. Evaluar la productividad de los dicariones obtenidos a través de la elaboración de inóculo y obtención cuerpos fructíferos.

El inóculo de los dicariones y cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* y *P. ostreatus*, se obtuvo en tres semanas.

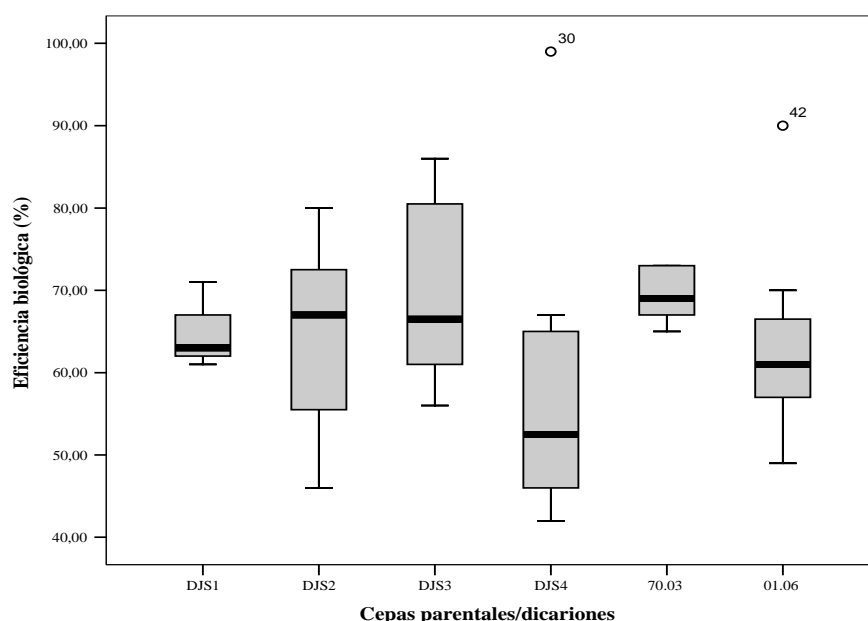
La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en pulpa de café, evidenció que el período de incubación de los sustratos fue de 17 días, obteniéndose todas las cosechas en un lapso de 31 días, con un total de 3 a 8 cosechas. Durante el desarrollo del experimento la temperatura promedio fue de 23°C y la humedad de 92% (Anexo 3). La mayor eficiencia biológica y tasa de producción, se observó en el dicarion DJS₃, la cual superó a ambas cepas parentales. Los dicariones DJS 1 y 2, no superaron a las cepa parental 70.03, pero si a la cepa parental 01.06. En cuanto al diámetro y color de los píleos, todas las cepas produjeron basidiomas entre 1.2 y 11.5 cm y de color blanco grisáceo (Tabla 9, Gráfica 7).

Tabla 9. Productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* sobre pulpa de café *

Cepas	Peso fresco de los basidiomas	Eficiencia biológica (%)	Tasa de producción	No. de cosechas	Diámetro de los píleos (cm)	Color de los basidiomas
DJS ₃	2696.32**	69.75	1.83	6	1.2-11.5	blanco grisáceo
70.2003	2563.00	69.40	1.54	8	1.2-11.5	blanco grisáceo
DJS ₂	2490.32	64.50	1.43	7	1.2-11.5	blanco grisáceo
DJS ₁	1248.50	64.50	1.69	3	1.5-11.5	blanco grisáceo
1.2006	1682.70	63.50	1.54	4	1.7-10.7	blanco grisáceo
DJS ₄	2785.30	57.60	1.20	6	1.5-9.5	blanco grisáceo

* Con excepción del peso fresco, el número de cosechas y diámetro de los píleos; los valores son promedio de 8 repeticiones. **No existió diferencia significativa con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Gráfica 7. Eficiencia biológica +/- la desviación estándar (rectángulos) y rango total (líneas) de los dicariones y parentales de *P. djamor* var. *djamor*, sobre pulpa de café.



La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamo*r evaluada en olote de maíz, evidenció que el período de incubación de los sustratos fue de 30 días, obteniéndose todas las cosechas en un lapso de 48 días, cuantificándose de 5 a 11 cosechas. Durante el desarrollo del experimento la temperatura promedio fue de 23°C y la humedad de 92% (Anexo 3).

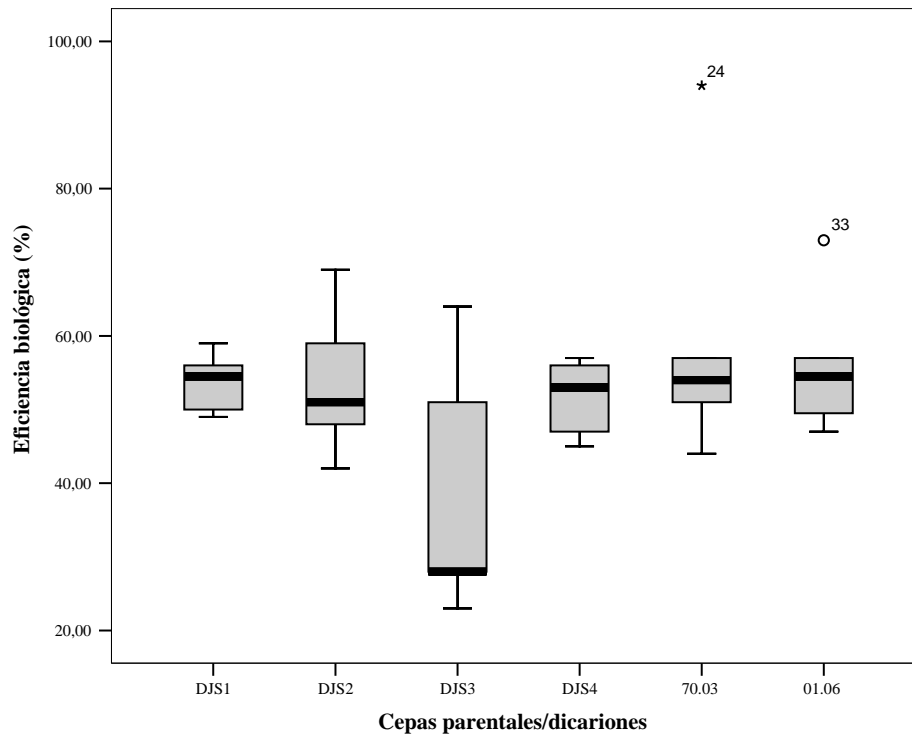
La mayor eficiencia biológica se observó en la cepa parental 70.03. Ninguno de los dicariones superó a ambos parentales en eficiencia biológica y tamaño de los basidiomas. La menor eficiencia biológica se observó en el dicarion DJS₃. El color fue uniforme en todas las cepas (Figuras 34-36) (Tabla 10, Gráfica 8).

Tabla 10. Productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamo*r sobre olote de maíz *

Cepas	Peso fresco de los basidiomas	Eficiencia biológica (%)	Tasa de producción	No. de cosechas	Diámetro de los píleos (cm)	Color de los basidiomas
70.2003	2490.0	57.00 **	0.76	11	2.0-17.5	blanco grisáceo
1.2006	2145.1	55.25	0.85	6	2.0-17.0	blanco grisáceo
DJS ₁	1565.1	53.83	0.86	5	1.0-12.0	blanco grisáceo
DJS ₂	1555.0	53.33	0.71	9	1.5-13.5	blanco grisáceo
DJS ₄	1516.8	51.83	0.77	7	1.0-13.5	blanco grisáceo
DJS ₃	945.5	38.80	0.52	7	1.0-12.5	blanco grisáceo

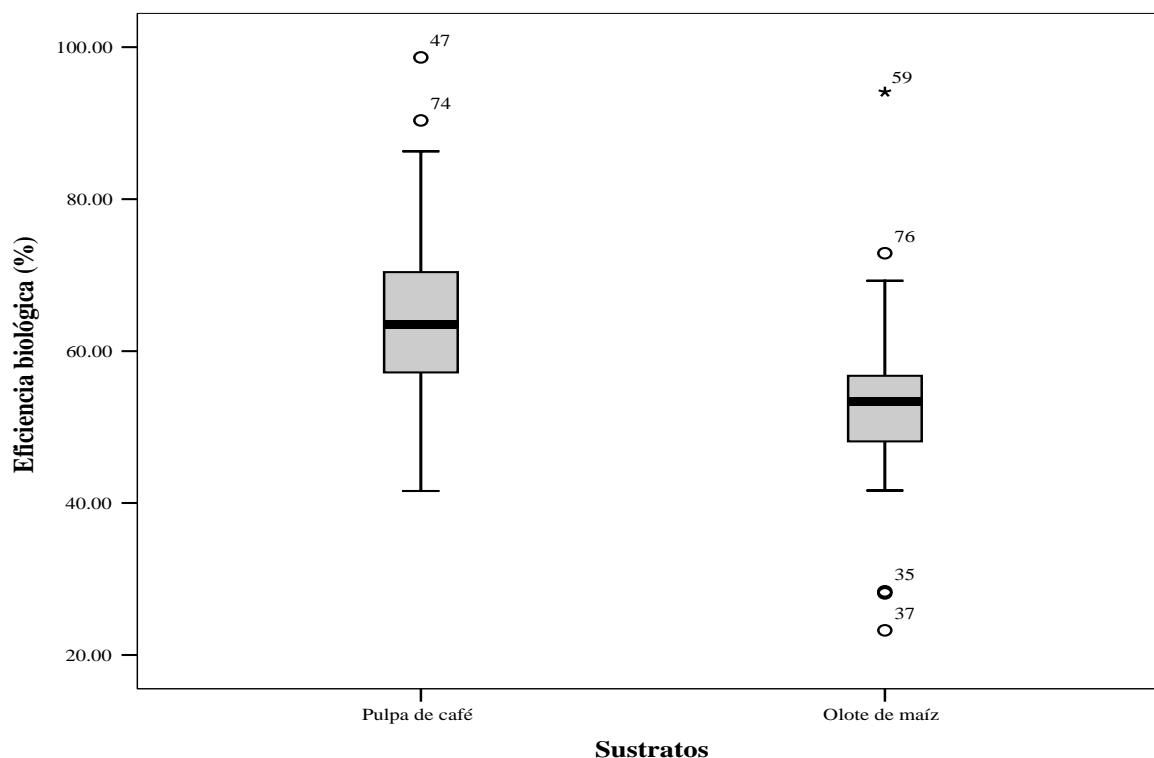
* Con excepción del peso fresco, el número de cosechas y diámetro de los píleos, los valores son promedio de 8 repeticiones. **No existió diferencia significativa con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Gráfica 8. Eficiencia biológica +/- la desviación estándar (rectángulos) y rango total (líneas) de los dicariones y parentales de *P. djamor* var. *djamo*r, sobre olote de maíz.



Por otra parte, al comparar los resultados de eficiencia biológica obtenidos en pulpa de café y olote de maíz, se comprobó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre ambos sustratos, siendo mayores los valores en pulpa de café que en olote (Figuras 37-42) (Gráfica 9).

Gráfica 9. Comparación de la eficiencia biológica de los dicariones y parentales de *P. djamor* var. *djamor* obtenida en pulpa de café y olote de maíz.



La productividad de las cepas parentales y dicariones de *P. ostreatus* se evaluó en olote de maíz. El lapso de incubación de los sustratos fue de 42 días y el período de cosechas fue de 38 días, contabilizándose entre 2 a 5 cosechas. La temperatura y humedad promedio durante el tiempo de cosecha fue de 17.5°C y 73% (Figuras 43-50) (Anexo 4).

La mayor eficiencia biológica la obtuvo la cepa parental 152.05, la cual alcanzó 54.97%, seguida del dicarion DMP₁, el cual obtuvo una eficiencia de 49.65%. Ninguno de los dicariones superó a la cepa parental 152.05 y solamente los dicariones DPM₁ y DPM₂ obtuvieron eficiencias mayores a la cepa parental 06.03. Los dicariones restantes, presentaron valores inferiores a las cepas parentales (Tabla 11, Gráfica 10).

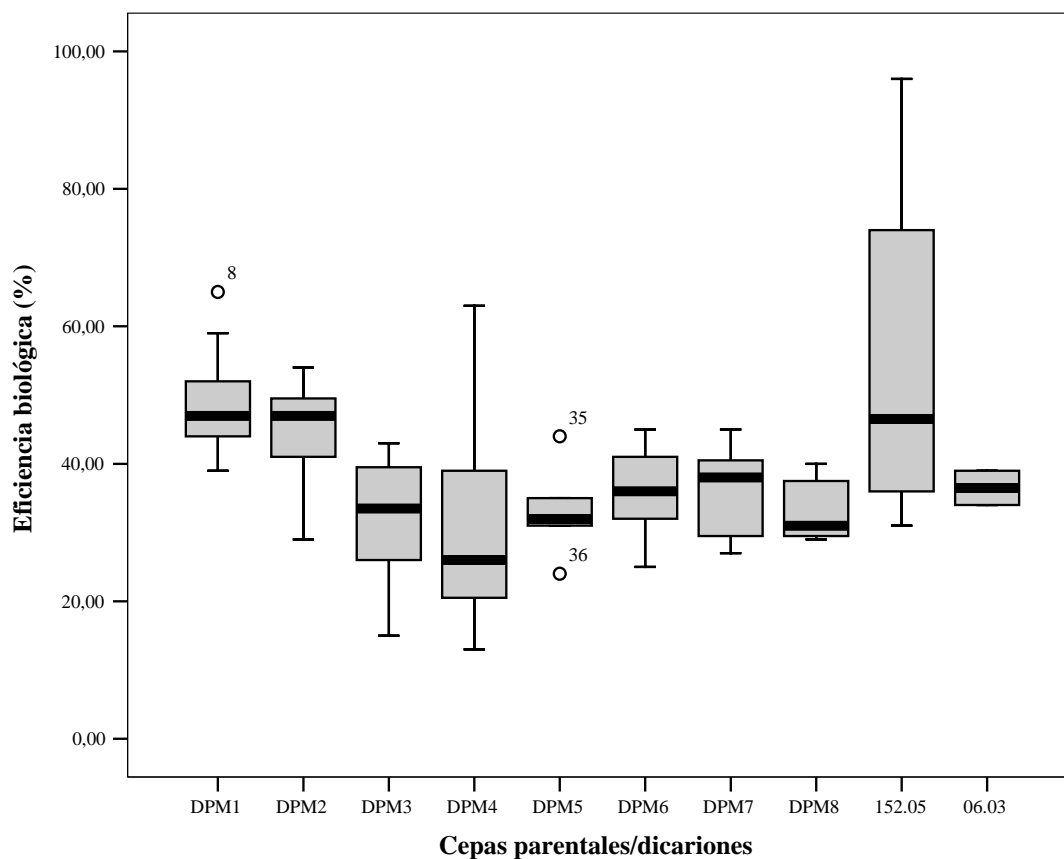
Respecto al tamaño de los basidiomas obtenidos, con excepción del dicarion DPM₄, todos superaron al tamaño observado en las cepas parentales. Por otra parte, ninguno de los dicariones presentó el color de los parentales (blanco grisáceo y gris), sino se observaron de color café grisáceo (Tabla 11).

Tabla 11. Productividad de las cepas de *P. ostreatus* sobre olote de maíz *

Cepas	Peso fresco de los basidiomas	Eficiencia biológica (%)	Tasa de producción	No. de cosechas	Diámetro de los píleos (cm)	Color de los basidiomas
152.05	1,069.3 e**	55.00	0.70	5	2.0-11.5	Blanco grisáceo
DPM ₁	2,414.3 a	49.78	0.64	5	1.0-13.5	Café grisáceo
DPM ₂	1,472.3 b	44.75	0.60	3	1.5-13.5	Café grisáceo
06.03	356.5 c	36.65	0.63	2	2.0-12.5	Gris
DPM ₄	1,072.1 b	36.48	0.40	4	2.0-9.0	Café grisáceo
DPM ₆	1,411.4 d	36.28	0.46	4	2.0-13.5	Café grisáceo
DPM ₇	1,385.8 c	35.71	0.45	5	1.5-13.0	Café grisáceo
DPM ₈	1,306.4 d	33.43	0.43	5	1.0-13.0	Café grisáceo
DPM ₅	1,273.7 d	33.00	0.41	3	1.0-13.0	Café grisáceo
DPM ₃	1,243.3 c	32.00	0.41	5	2.0-13.5	Café grisáceo

* Con excepción del peso fresco, el número de cosechas y diámetro de los píleos, los valores son promedio de 8 repeticiones. **Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con la prueba de rango múltiple de Tukey ($\alpha=0.05\%$).

Gráfica 10. Eficiencia biológica +/- la desviación estándar (rectángulos) y rango total (líneas) de los dicariones y parentales de *P. ostreatus*, sobre olote de maíz.



4. Seleccionar los dicariones obtenidos que presenten rápido desarrollo micelial y alta producción de cuerpos fructíferos con características adecuadas para cultivo artesanal.

Respecto a los dicariones obtenidos de las cepas de *P. djamor* var. *djamor*, dada la rapidez de su crecimiento micelial y la productividad, se seleccionó al dicarion DJS₃, el cual superó en eficiencia biológica a las cepas parentales, en el sustrato de pulpa de café.

En *P. ostreatus*, ya que ninguno de los dicariones superó a la cepa parental 152.05, no es posible seleccionar alguno de ellos, sin embargo, debido a que los dicariones DPM₁ y DPM₂ obtuvieron mayores valores de eficiencia biológica que la cepa parental 06.03, se considera utilizarlos para su cultivo artesanal.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del crecimiento miceliar de los monocariones aislados de *P. djamor* var. *djamor*, tanto los monocariones JH como los SS, presentaron diámetros coloniales similares y que coincidieron con los diámetros reportados para monocariones obtenidos a partir de una cepa cubana (*P. djamor* var. *djamor* IE-145), una cepa mexicana (*P. djamor* var. *djamor* IE-121) y una cepa guatemalteca (*P. djamor* var. *djamor* IE-11), las cuales se estudiaron en México, con fines de establecer la interacción entre el crecimiento miceliar y la productividad (Salmones, *et al*, 1997). Sin embargo, en esta investigación, el monocarión JH₆ presentó un diámetro inferior al mínimo observado en las tres cepas anteriormente mencionadas. También fueron comparables con los diámetros obtenidos en un estudio de monocariones de la cepa mexicana (*P. djamor* var. *djamor* IE-116), con la salvedad que los monocariones JH₆ y SS₃ obtuvieron diámetros inferiores a los observados en dicha cepa (Salmones, *et al*, 2004).

En el caso de *P. ostreatus*, los monocariones PB, presentaron el valor máximo y mínimo del diámetro de las colonias, mientras que los MG mostraron valores intermedios. Estos diámetros coloniales fueron similares a los observados en México para la cepa de *P. ostreatus* IE-179, con excepción del monocarión PB₉, el cual mostró un diámetro inferior (Salmones, *et al*, 1997).

Los aislamientos monocarióticos obtenidos a partir de las cepas parentales tanto de *P. djamor* var. *djamor* como de *P. ostreatus*, presentaron un patrón de sexualidad heterotálico, tretrapolar y completa compatibilidad entre cada una de las especies, tal y como ha sido observado en varios estudios sobre este género (Salmones, *et al*, 1997; Salmones, *et al*, 2004).

Además, como también fue posible observar en esta investigación, el entrecruzamiento está controlado por un sistema de incompatibilidad determinado por dos loci, cada uno con múltiples alelos (los tipos de incompatibilidad A y B). Dicho patrón también ocurre en muchas otras especies heterotálicas y ha sido estudiado ampliamente en *P. djamor* (James, *et al*, 2004).

En el crecimiento miceliar de los dicariones obtenidos de *P. djamor* var. *djamor* (DJS), existió una diferencia importante durante el crecimiento estimado los días 3 y 5 de incubación, por lo que se concluye que los cuatro entrecruzamientos efectuados superaron la velocidad de crecimiento de sus parentales.

Al respecto, el análisis estadístico demostró que, efectivamente existe diferencia estadísticamente significativa entre los parentales y los dicariones DJS 1 al 3, al comparar los valores obtenidos durante todo el período de incubación, superándolos en vigorosidad. Entre estos últimos, no existió diferencia significativa ($p > 0.01$). Además, el dicarión DJS₄, fue estadísticamente diferente y con crecimiento menor a los otros tres dicariones, pero superior que los parentales. Por otra parte, las cepas parentales también fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Por otra parte, los diámetros observados en los dicariones DJS, fueron superiores a los reportados para dicariones de la cepa guatemalteca IE-11, pero similares a los diámetros de los dicariones de las cepas cubana y mexicana, IE-121 e IE-145, estudiadas en México (Salmones, *et al*, 1997).

En *P. ostreatus*, el diámetro miceliar de los dicariones DPM, se comprobó que tres de ellos (3, 7 y 6), superaron a la cepa parental 06.03, pero fueron inferiores a la cepa 152.05. Por tal razón, se considera que estos dicariones pudieran ser utilizados para estudios posteriores y evaluar su productividad bajo diferentes condiciones y sobre diversos sustratos. Debido a que los dicariones 5, 8, 2, 1 y 4, no superaron a ninguna de las cepas parentales en cuanto al crecimiento miceliar, no se consideran promisorios.

Por otro lado, dado que las cepas parentales presentaban diferente color de micelio (color blanco amarillento y blanco para las cepas 152.05 y 06.03, respectivamente); dicha característica fue heredada en una proporción 50:50 por los dicariones resultantes, debido a que en esta investigación solamente se obtuvo la primera generación (F_1). Sin embargo, es necesario establecer en futuros estudios, el patrón hereditario del color micelial, tal y como se ha observado en otras especies de *Pleurotus* (Nicholl, 2000).

De acuerdo al análisis estadístico, las cepas parentales obtuvieron diferencia significativa con todos los dicariones estudiados. Sin embargo, no se encontró diferencia entre los dicariones DPM 3, 7, 6, 5 y 8, al igual que entre los dicariones DPM 5, 8 y 2. Los dicariones 1 y 4 fueron estadísticamente diferentes a todas las demás cepas.

Por otra parte, los diámetros miceliales fueron similares a los obtenidos con la cepa mexicana IE-179, la cual presentó valores entre 67.9 y 90.0 mm a los 9 días de incubación (Salmones, *et al*, 1997).

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

Al comparar los resultados con estudios previos, se observó que las eficiencias biológicas encontradas en este estudio fueron menores a las reportadas para las cepas mexicanas IE-116, IE-153 y a algunas cruces obtenidas a partir de estas, cultivadas en paja de cebada (Salmones, *et al*, 2004), aunque tal resultado podría haberse afectado por la disponibilidad de nutrientes en el sustrato específico.

Los valores obtenidos en olote de maíz mostraron que la cepa parental 70.03 fue la que obtuvo la mayor eficiencia biológica y el dicarion DJS₃, fue el que obtuvo la menor eficiencia. Dicho dicarion, como se mencionó anteriormente, fue el que mejores resultados obtuvo al ser cultivado en pulpa de café, por lo que es probable que esto se deba más a

diferencias en la composición nutricional del sustrato, que a la capacidad productora de basidiomas de las cepas.

Por otra parte, el tiempo de incubación y cosecha de basidiomas en los sustratos fue menor en pulpa de café y la productividad también fue mayor en pulpa de café que en olote de maíz, tal y como lo confirmó el análisis estadístico. Ésta es una característica interesante, ya que en la explotación comercial permitiría reducir los ciclos de cultivo (Salmones, *et al*, 1997)

Con respecto al tamaño de las fructificaciones, en pulpa de café, las fructificaciones de las cruzas presentaron tamaños similares con las parentales, por el contrario, el dicarión DJS₄ produjo basidiomas de menor tamaño. En olote de maíz, los basidiomas de las cruzas fueron de menor tamaño que los observados en las cepas parentales. Sin embargo, en ambos casos fueron similares a los obtenidos por las cepas mexicanas IE-116, 134 y 153 y las cruzas derivadas de ellas (I, II, III, IV, V, VI) (Salmones, *et al*, 2004).

Los resultados indicaron que la velocidad de crecimiento miceliar no estuvo relacionada con la productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor*, puesto que variaron en la eficiencia biológica obtenida en ambos sustratos. Por tal razón, se considera que la rápida velocidad de crecimiento de las cepas en caja de petri no necesariamente se relaciona con la habilidad de las cepas en degradar determinado sustrato para la producción de basidiomas.

En *P. ostreatus*, ningún dicarión superó a la cepa parental 152.05. Dicha cepa también obtuvo el mayor valor en cuanto a crecimiento miceliar, por lo que en este caso, si hubo correlación entre ambos parámetros. Dos dicariones (DPM 1 y 2) aventajaron a la cepa parental 06.03 en cuanto a eficiencia biológica. Sin embargo, no hubo correlación entre el crecimiento miceliar donde los dicariones DPM 3, 6 y 7 superaron a esta cepa parental.

Además, el color de los basidiocarpos fue diferente en las cruzas, no presentando ningún dicarión el color original de las cepas parentales. Por tal razón se hace necesario obtener una nueva generación de cruzas, a partir de los dicariones estudiados, para verificar la forma de segregación de esta característica en las cepas descendientes.

Por otra parte, ya que las cepas y especies fueron evaluadas por separado y bajo condiciones ambientales de cultivo artesanales, se asume que la disminución en la productividad de algunas cruzas se debió a factores genéticos y ambientales, ya que la heterogeneidad de alelos presentes en el proceso de selección y la gran variabilidad en la temperatura y humedad en los módulos artesanales de producción, probablemente no permitió la expresión de información genética, para la producción apropiada de los basidiomas.

Otra característica importante a estudiar es la carnosidad y sabor de las fructificaciones, si bien estas variables no se consideraron en este estudio, fue posible observar diferencias entre las consistencias y texturas de las cepas obtenidas.

Finalmente y considerando que los objetivos de este trabajo fueron obtener cepas de *Pleurotus djamor* y *P. ostreatus* con rápido desarrollo micelar, alta productividad en la producción de basidiocarpos, se concluye que al menos tres cepas dicarióticas obtenidas presentan características apropiadas para su cultivo artesanal.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

1. El banco de cepas de *Pleurotus* cuenta con 47 cepas monocarióticas, 27 de las cepas parentales (70.03 y 01.06) de *P. djamor* var. *djamor* y 20 de las cepas parentales de *P. ostreatus* (152.05 y 06.03).
2. Las colonias de los monocariones del grupo JH (*P. djamor* var. *djamor* 70.03), presentaron textura algodonosa, coloración blanco amarillenta, abundantes agregaciones miceliales y exudado de color ámbar e hifas de 1-5 μm , hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas.
3. Los monocariones JH 2, 3 y 7 presentaron el mayor crecimiento de su grupo, con diámetro final de 85 mm y una tasa de crecimiento radial (TCR) de 8.5 mm/día a los diez días de incubación.
4. Las colonias de los monocariones SS (*P. djamor* var. *djamor* 01.06) presentaron principalmente textura algodonosa, coloración blanco amarillenta, agregaciones miceliales, ausencia de exudado e hifas de 1-6 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas y sin fíbulas.
5. El mayor crecimiento en el grupo SS lo presentaron los monocariones 6, 8, 9, 10, 11 y 12, quienes obtuvieron un diámetro final de 85 mm y una tasa de crecimiento radial (TCR) de 8.5 mm/día a los diez días de incubación.
6. Los monocariones del grupo PB (*P. ostreatus* 152.05) mostraron colonias algodonosas, de color blanco, sin agregaciones miceliales, sin exudado e hifas de 1-3 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas.
7. El mayor crecimiento en el grupo PB se observó en los monocariones 10 y 11, los cuales alcanzaron una TCR de 7.06 mm/día y 70.6 mm de diámetro final a los 10 días de incubación.
8. Los monocariones MG (*P. ostreatus* 06.03) presentaron colonias algodonosas, de color blanco, sin agregaciones miceliales, sin producción de exudado e hifas de 1-5 μm de ancho, hialinas, poco ramificadas, sin fíbulas.
9. El mayor crecimiento del grupo MG se observó en los monocariones 5 y 4, los cuales alcanzaron una TCR de 6.88 mm/día y 68.8 mm de diámetro final el primero y una TCR de 6.83 y un diámetro final de 68.3 mm el segundo, a los 10 días de incubación.
10. Los monocariones JH (*P. djamor* var. *djamor* 70.03), correspondieron a los tipos de incompatibilidad I, II y III y no se encontró el tipo IV.

11. Los monocariones SS (*P. djamor* var. *djamor* 01.06), correspondieron a los tipos de incompatibilidad II, III y no se encontraron los tipos I y IV.
12. Los monocariones PB (*P. ostreatus* 152.05), presentaron los tipos de incompatibilidad I, II, III y IV.
13. Los monocariones MG (*P. ostreatus* 06.03), mostraron los tipos de incompatibilidad I, II, III y IV.
14. Como producto de las cruzas se obtuvieron 12 dicariones: 4 para *P. djamor* var. *djamor* (dicariones DJS) y 8 para *P. ostreatus* (dicariones DPM) .
15. Todos los dicariones DJS presentaron colonias algodonosas, color blanco amarillento principalmente hacia el centro, abundantes agregaciones miceliarias, ausencia de exudado, hifas de 2.0-5.0 μm de ancho, hialinas y abundantes fíbulas.
16. Las cepas parentales (70.03 y 01.06), presentaron características similares entre ellas, así como con los dicariones.
17. Todos los dicariones DJS obtuvieron colonias con mayor diámetro medio y tasa de crecimiento radial que los parentales a los 7 días de incubación, siendo los mejores los dicariones DJS₂, DJS₃ y DJS₁.
18. Los dicariones DPM presentaron colonias algodonosas, de color blanco, blanco amarillento, sin agregaciones miceliarias e hifas de 1.0a 4.0 μm de ancho, hialinas, con abundantes fíbulas.
19. Las cepas parentales (152.05 y 060.03) mostraron textura algodonosa, la cepa 152.05 mostró una coloración blanco amarillento, sin agregaciones miceliarias ni exudado, además presentó hifas de 2.0-5.0 μm de ancho, son abundantes fíbulas. La cepa 06.03, exhibió color blanco, ausencia de agregaciones miceliarias y exudado con hifas de 1.0-4.0 μm de ancho y abundantes fíbulas.
20. Los dicariones DPM con el mejor crecimiento miceliar fueron el 3, 7 y 6, superando a la cepa parental 06.03, pero sin aventajar a la cepa parental 152.05 en diámetro medio de las colonias y TCR, a los 9 días de incubación.
21. El inóculo de los dicariones y cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor* y *P. ostreatus*, se obtuvo en tres semanas.
22. La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en pulpa de café, evidenció un período de incubación de los sustratos de 17 días, obteniéndose todas las cosechas en un lapso de 31 días, con un total de 3 a 8 cosechas.

23. El dicarión DJS₃ presentó la mayor eficiencia biológica y tasa de producción en pulpa de café, sobrepasando a las cepas parentales.
24. La productividad de las cepas de *P. djamor* var. *djamor* evaluada en olote de maíz, evidenció un período de incubación en los sustratos de 30 días, obteniéndose todas las cosechas en un lapso de 48 días, cuantificándose de 5 a 11 cosechas.
25. La mayor eficiencia biológica se observó en la cepa parental 70.03 y ninguno de los dicariones superó a ambos parentales en eficiencia biológica.
26. La comparación de la eficiencia biológica obtenida en pulpa de café y olote de maíz, demostró diferencia significativa entre ambos sustratos, siendo mayores los valores en pulpa de café que en olote.
27. Las cepas parentales y dicariones de *P. ostreatus* en olote de maíz, mostraron un lapso de incubación de los sustratos de 42 días y un período de cosecha de 38 días, contabilizándose entre 2 a 5 cosechas.
28. La mayor eficiencia biológica la obtuvo la cepa parental 152.05, ninguno de los dicariones superó a la cepa parental y solamente los dicariones DPM₁ y DPM₂ obtuvieron eficiencias mayores a la cepa parental 06.03.
29. Se seleccionó al dicarión DJS₃ por haber superado en eficiencia biológica a las cepas parentales de *P. djamor* var. *djamor*, en el sustrato de pulpa de café.
30. Se considera utilizar los dicariones DPM₁ y DPM₂ para su cultivo artesanal debido a que obtuvieron mayores valores de eficiencia biológica que la cepa parental 06.03, aunque no superaron a la cepa parental 152.05.

B. Recomendaciones

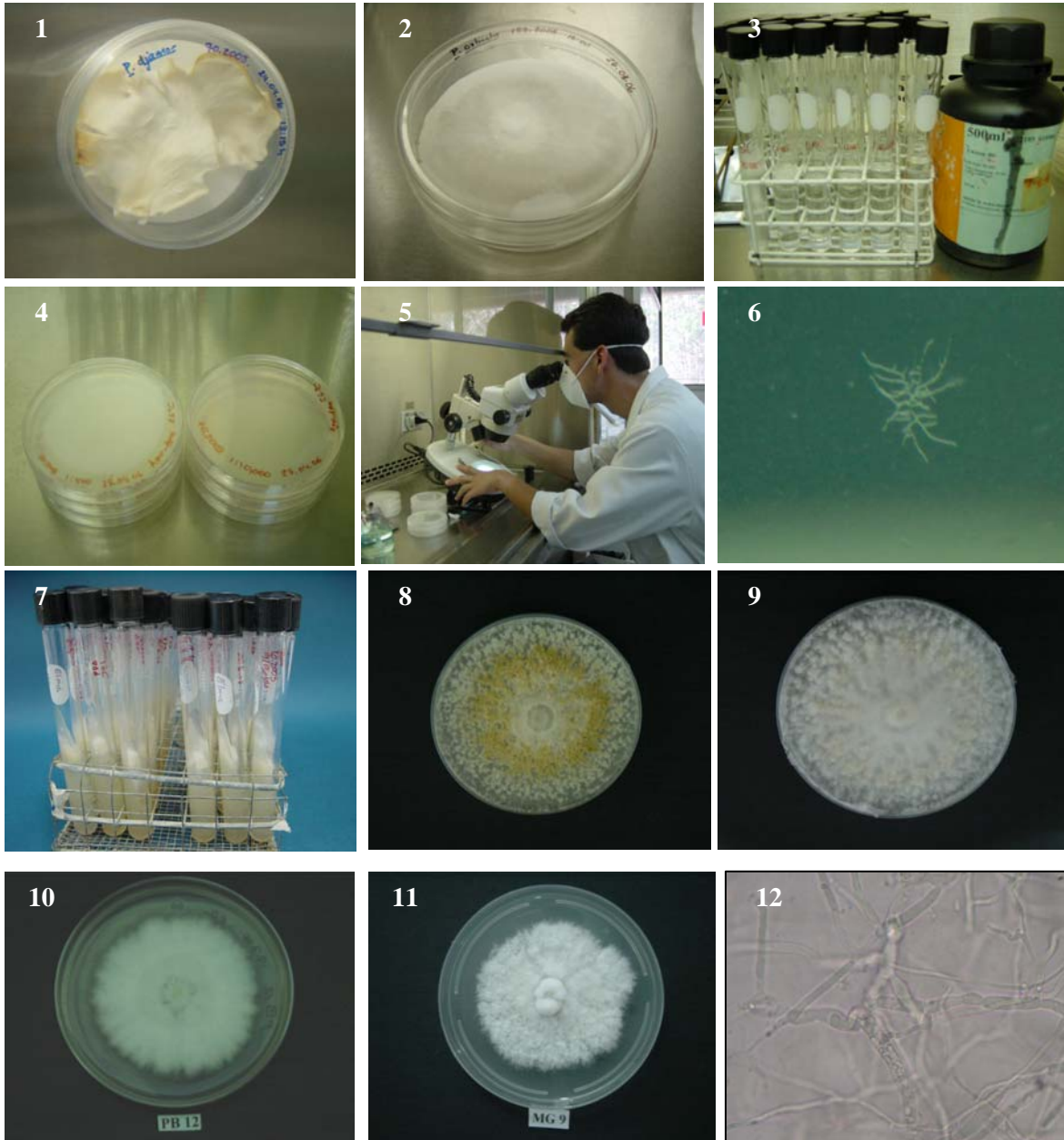
1. Realizar estudios posteriores con los monocariones y dicariones obtenidos en este estudio, a efecto de evaluar su productividad bajo diferentes condiciones ambientales, así como determinar su eficiencia biológica sobre diferentes sustratos.
2. Obtener más generaciones de dicariones, con la finalidad de establecer la segregación y selección de características adecuadas para su cultivo a nivel comercial.
3. Evaluar la relación C/N y disponibilidad de nutrientes en los sustratos, para obtener mejor eficiencia biológica de las cepas dicarióticas.
4. Efectuar análisis organolépticos y análisis proximal de dicariones y parentales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

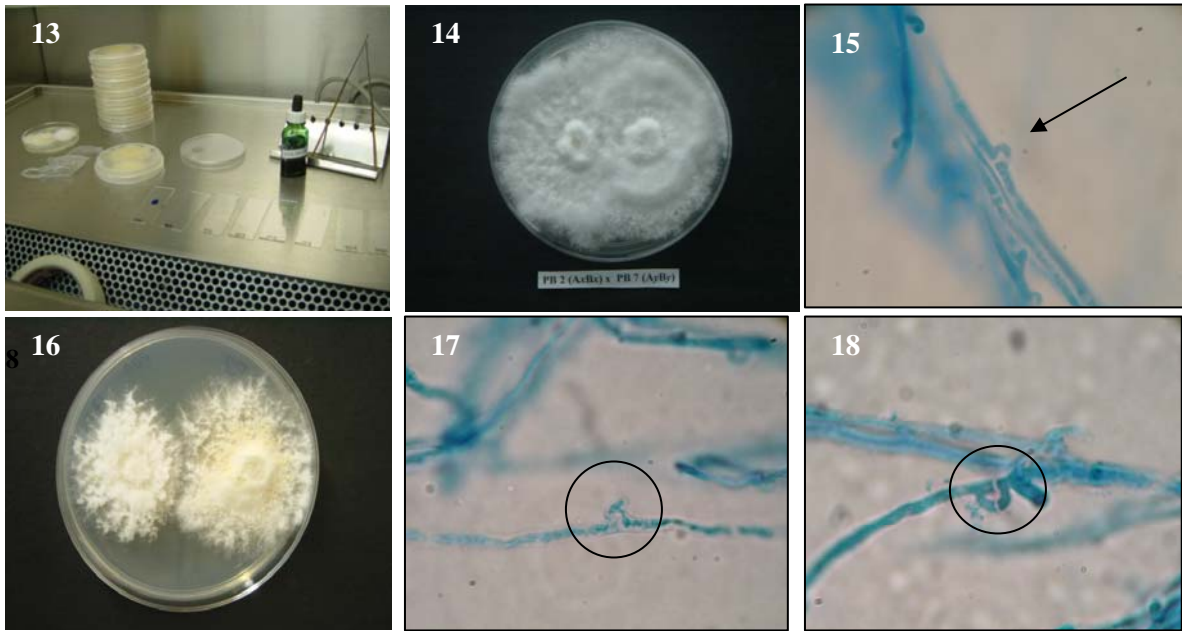
1. Bran M.C., *et al.* 2001. Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase I). Informe Técnico Final, Dirección General de Investigación. 73p.
2. Bran M.C., *et al.* 2002. Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase II). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. 68p.
3. Bran M.C., *et al.* 2003. Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase III). Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. 60p.
4. Bran M.C., *et al.* 2004. Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. (Fase IV). Informe de Avance. Dirección General de Investigación. Informe Final Técnico. Dirección General de Investigación. 50p.
5. Bran, M.C. *et al.* 2005. Producción de inóculo de cepas nativas de hongos comestibles, para estimular el cultivo en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización. Informe de avance. Dirección General de Investigación. 16p.
6. Calvo-Bado, L. 2001. Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez, J., Roise, D. (Eds). Editorial LIMUSA, México. pág 71-79.
7. Chang, S., Miles, P. 2004. Edible mushrooms and their cultivation. Boca Ratón, CRC Press.
8. Contreras, E. Sokolov, M., Mejía, G., Sánchez, J. 2004. Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 79 (2): 234-240.
9. De León R. 2003. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. Micol. Apl. Int. 15(1): 31-35.
10. Deschamps J. 2003. Producción y Comercialización de Hongos Comestibles. 1ª. Ed. Orientación Gráfica Editora S.R.L. Buenos Aires, Argentina. 210p.
11. Gaitán-Hernández R, Salmenes D. 1996. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus* spp. con alto rendimiento. Rev. Mex. Mic. 12: 107-113.
12. Guillén-Navarro G., Márquez-Rocha F., Sánchez-Vásquez J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iberoam. Micol. 15: 302-306.
13. Guzmán G, Montoya L, Bandala V., Salmenes D. 1995. Studies in the genus *Pleurotus*, IV. Observations on the pink forms growing in Mexico based in the interbreeding of two different strains. Mycotaxon 53: 247-259.
14. Guzmán G, Montoya L, Mata G, Salmenes D. 1994. Studies of the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. djamor* complex-based in interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. Mycotaxon 50: 365-378.
15. Guzmán G, Montoya L, Salmenes D, Bandala V. 1993. Studies of the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina) II. *P. djamour* in Mexico and in other Latin-American Countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. Crypt Bot 3: 213-220.
16. Guzmán G. 1998. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos de México (ensayo sobre el inventario fúngico del país). En Halffer G. (comp.) La

- Diversidad Biológica de Iberoamérica II. Volumen especial, Acta Zoológica Mexicana, nueva serie. 377p. pág. 111-175.
17. James, T., Liou, S., Vilgalys, R. 2004. The genetic structure and diversity of the *A* and *B* mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 813-825.
 18. Labarère, J. 1994. Métodos de la genética aplicados a la obtención y mejora de variedades de hongos comestibles cultivados. *Boletín de la Asociación Española de Cultivadores de Champiñón* 22: 15-26 y 23: 8-16.
 19. Labarère, J., Bois, F. 2001. La conservación y uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus*. Sánchez, J., Roise, D. (Eds). Editorial LIMUSA, México. pág 91-100.
 20. León-Monzón, Sánchez, J., Nahed-Toral, J. 2004. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los Altos de Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 18: 31-34.
 21. Nicholl, D. Petersen, R. 2000. Phenetic plasticity in *Pleurotus djamor*. *Mycotaxon* 76: 17-37.
 22. Salmones D, Gaitán-Hernández R, Pérez R, Guzmán G. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*, VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 173-176.
 23. Salmones D, Mata G, Guzmán G, Juárez M, Montoya L. 1995. Estudios sobre el género *Pleurotus*, V. Producción a nivel planta piloto de ocho cepas adscritas a cinco taxa. *Rev Iberoam Micol* 1995; 12: 108-110.
 24. Salmones, D. Mestizo, L., Gaitán-Hernández, R. 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Rev. Mex. Mic.* 18: 21-26.
 25. Sánchez, J., Roise, D. 2001. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. Estadísticas mundiales de producción con énfasis en Hispanoamérica. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus* spp. Sánchez, J., Roise, D. (Eds). Editorial LIMUSA, México. pág 19-26.
 26. Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Olympia, Mycomedea.
 27. Vogel, F., Salmones, D. 2000. Análisis comparativo de cepas de *Pleurotus* spp, cultivadas en una planta comercial. *Rev Iberoam Micol* 17:138-141.

X. FIGURAS



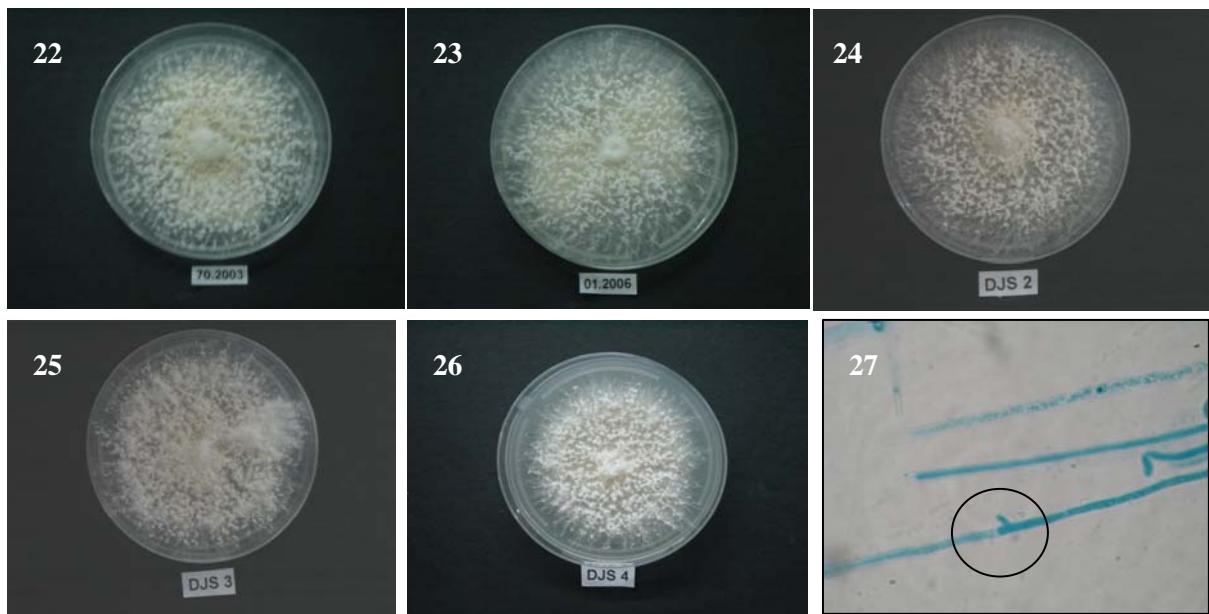
Figs.1-12. 1-7. Aislamiento de monocariones. 1.:Esporulación de los basidiocarpos. 2: Obtención de esporada en condiciones de esterilidad. 3: Dilución de las esporas. 4: Siembra de la dilución de esporas en agar-agua al 20%. 5: Localización de monocariones con ayuda del estereoscopio. 6: Micelio haploide (monocarión) desarrollado a partir de una basidiospora, sobre agar-agua al 20% (x75). 7: Cepario. 8-9. Monocariones de *P. djamor* var. *djamor* 8: Monocarión JH, obsérvese la coloración blanco amarillento de la colonia. 9: Monocarión SS. 10-12. Monocariones de *P. ostreatus*. 10: Monocarión PB. 11: Monocarión MG. 12: Hifas monocarióticas, nótese la ausencia de fíbulas (x1000).



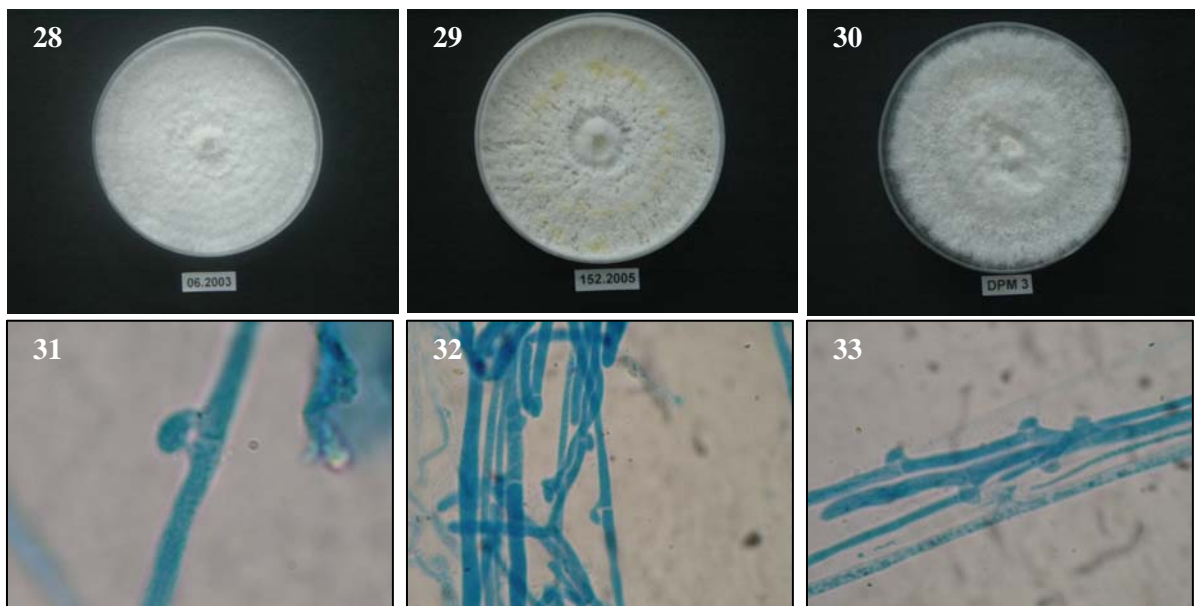
Figs. 13-18. Determinación de los tipos de incompatibilidad de los monocariones. 13: Preparación del micelio con azul de lactofenol para su observación. 14: PB₂ (A₁B₁) (izquierda) x PB₇ (A₂B₂) (derecha), compatibles. 15: Presencia de fíbulas en la reacción compatible (x1000) (señalada con la flecha). 16: JH₅ (A₂B₂) (izquierda) x JH₁ (A₁B₂) (derecha), incompatibles. 17-18: Falsas fíbulas observadas en la reacción incompatible (señaladas con el círculo) (x1000).



Figs. 19-20. Cruzas interespecimen de los monocariones compatibles e incompatibles. 19: Entrecruzamiento entre los monocariones JH₂ y SS₁₂, para obtener el dicarion DJ_{S1}. 20: Entrecruzamiento de los monocariones MG₄ y PB₇, para obtener el dicarion DPM₃. 21: Fíbulas presentes en la zona de entrecruzamiento (x1000).



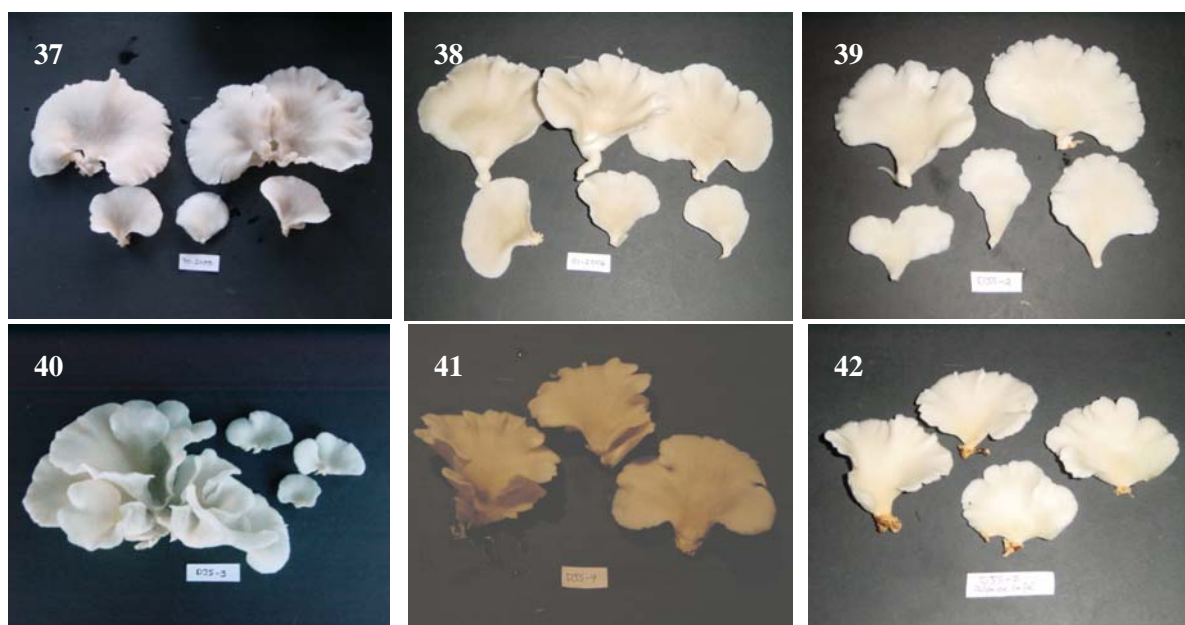
Figs. 22-27. Cepas parentales y dicariones de *P. djamor* var. *djamor*. 22: Cepa parental 70.03. 23: Cepa parental 01.06. 24: Dicarión DJS₂. 25: Dicarión DJS₃. 26: Dicarión DJS₄. 27: Célula gancho (hook cell) en la formación de una fíbula (x1000).



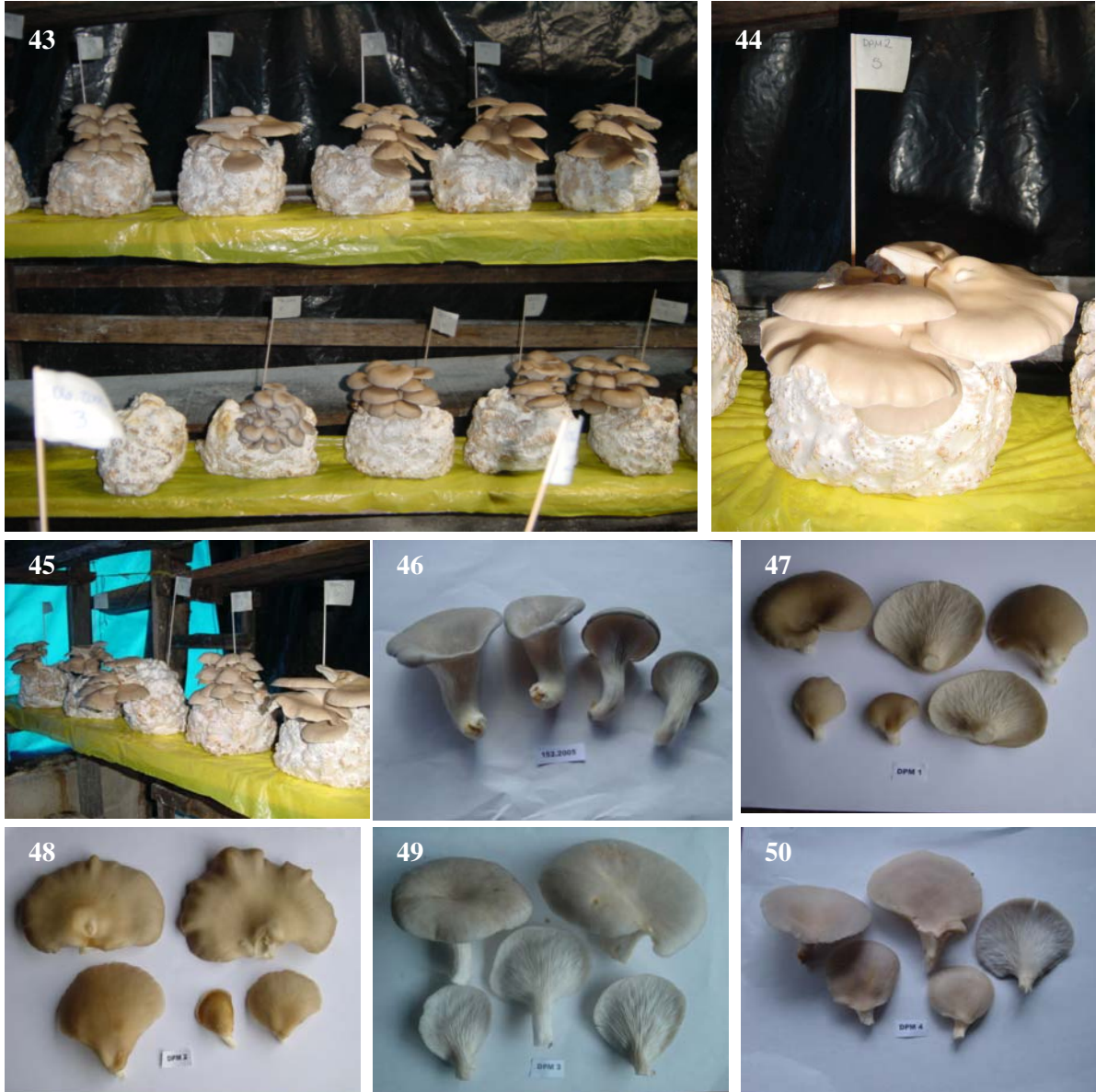
Figs. 28-33. Cepas parentales y dicariones de *P. ostreatus*. 28: Cepa parental 06.03. 29: Cepa parental 152.05. 30: Dicarión DPM₃. 31: Célula gancho (hook cell) en la formación de una fíbula (x1000). 32-33: Fíbulas (x1000).



Figs. 34-36. Fructificación de cepas parentales y dicariones de *P. djamor* var. *djamor* en condiciones artesanales, en Chimaltenango. 34: Fructificación en estanterías. 35: Detalle de la fructificación sobre olote de maíz. 36: Fructificación del dicarión DJS₄ en olote de maíz.



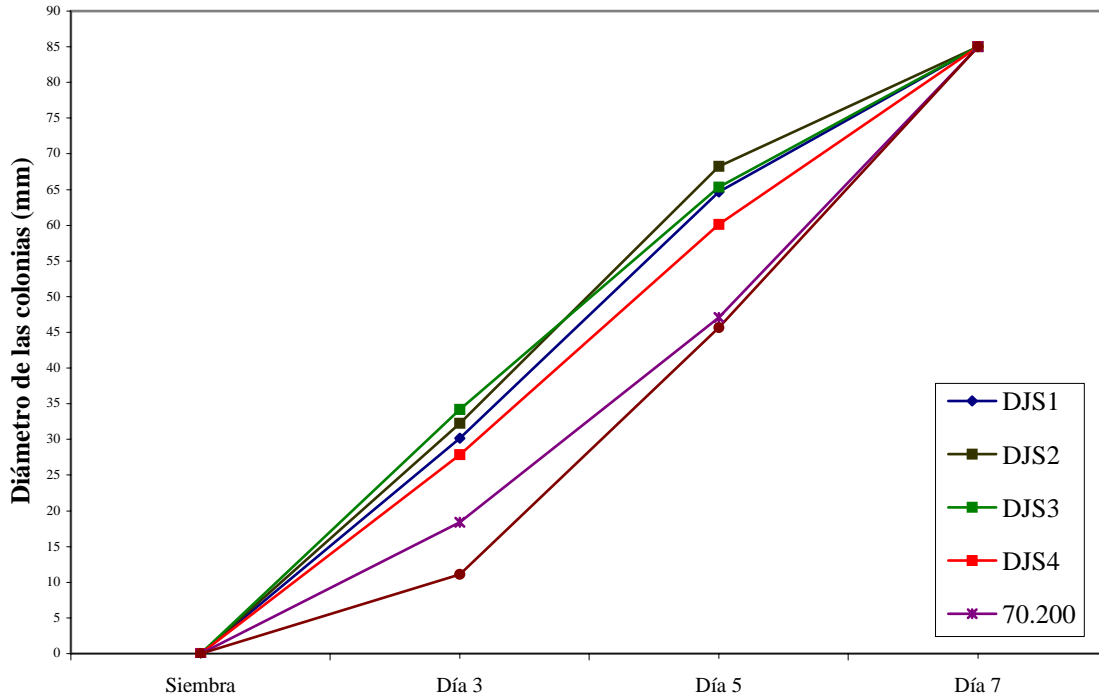
Figs. 37-42. Basidiomas (cuerpos fructíferos) de cepas parentales y dicariones de *P. djamor* var. *djamor*, producidos sobre olote de maíz. . 37: Cepa parental 70.03. 38: Cepa parental 01.06. 39: Dicarión DJS₂. 40: Dicarión DJS₃. 41: Dicarión DJS₄. 42: Dicarión DJS₂, producido sobre pulpa de café.



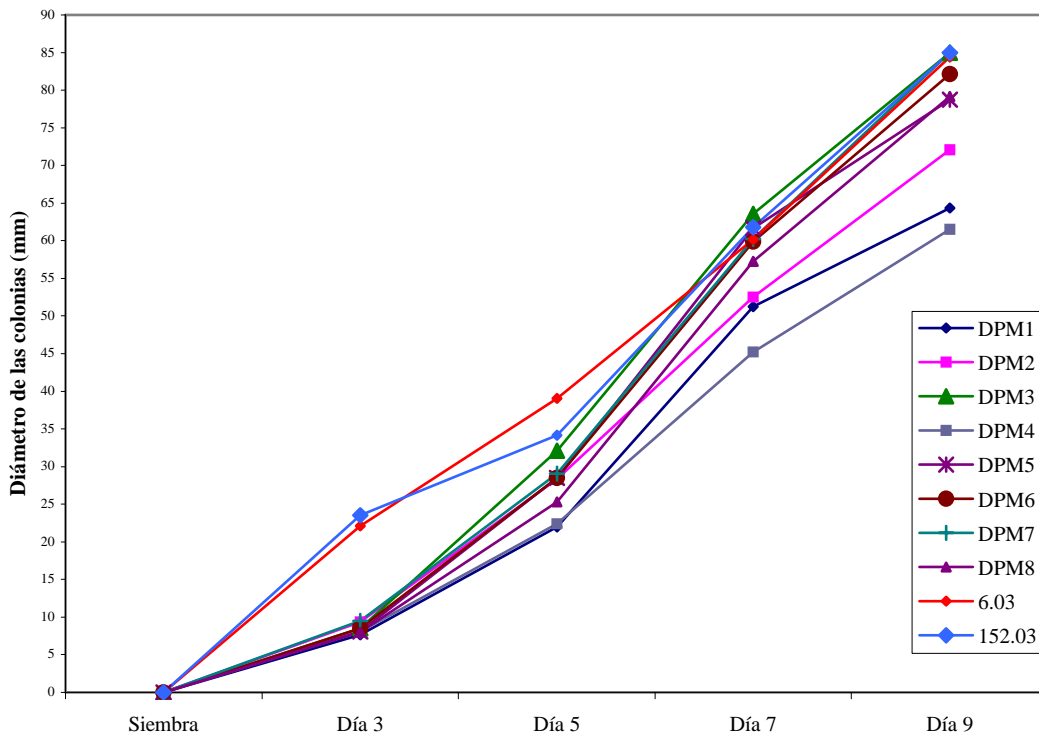
Figs. 43-50. 43-45: Fructificación de cepas parentales y dicariones de *P. ostreatus* en condiciones artesanales, en Tecpán Chimaltenango. 46-50. Basidiomas (cuerpos fructíferos) producidos sobre olote de maíz. 46: Cepa parental 152.05. 47: Dicarión DPM₁. 48: Dicarión DPM₂. 49: Dicarión DPM₃. 50: Dicarión DPM₄.

XI. ANEXOS

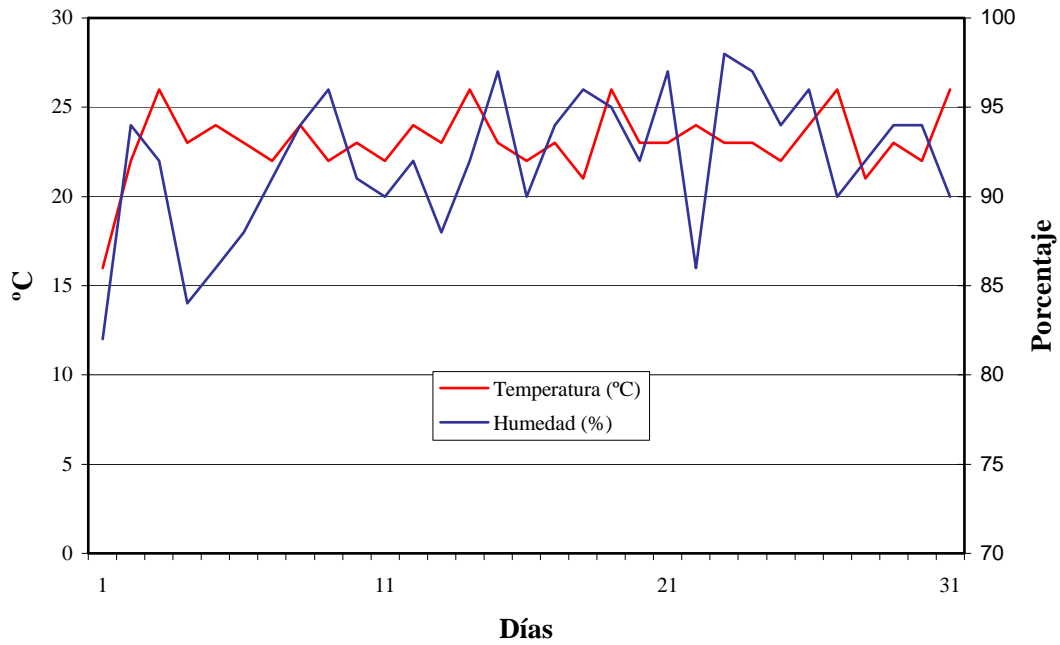
Anexo 1. Velocidad de crecimiento de cepas parentales y dicariones de *Pleurotus djamor* var. *djamor* evaluado durante 7 días de incubación



Anexo 2. Velocidad de crecimiento de dicariones y parentales de *Pleurotus ostreatus* durante 9 días de incubación



Anexo 3. Condiciones de temperatura y humedad registradas en el módulo de producción durante el cultivo de las cepas de *P. djamor* var. *djamor*



Anexo 4. Condiciones de temperatura y humedad registradas en el módulo de producción durante el cultivo de las cepas de *P. ostreatus*

